



**HAL**  
open science

# Régulation de la transcription par le facteur de la chromatine Corto au cours du développement de l'aile chez *Drosophila melanogaster*

Julien Rougeot

► **To cite this version:**

Julien Rougeot. Régulation de la transcription par le facteur de la chromatine Corto au cours du développement de l'aile chez *Drosophila melanogaster*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PA066049 . tel-00836149

**HAL Id: tel-00836149**

**<https://theses.hal.science/tel-00836149>**

Submitted on 20 Jun 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 M. **Julien ROUGEOT**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**Régulation de la transcription par le facteur de la chromatine Corto  
au cours du développement de l'aile chez *Drosophila melanogaster***

Soutenue le 18 janvier 2012

Devant le jury composé de :

Pr. Frédéric DEVAUX	Président
Dr. Christian MUCHARDT	Rapporteur
Pr. Laurent THEODORE	Rapporteur
Dr. Patricia UGUEN	Examinatrice
Pr. Emmanuèle MOUCHEL-VIELH	Directrice de thèse



Je tiens tout d'abord à remercier les Pr. Frédéric Devaux et Laurent Théodore ainsi que les Dr. Christian Muchardt et Patricia Uguen d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je tiens également à remercier les Dr. Ute-Christine Rogner, Laure Teysset ainsi qu'une nouvelle fois Christian Muchardt, qui ont fait partie de mon comité de thèse durant ces trois années.

Je tiens à remercier tout particulièrement Emmanuèle Mouchel-Vielh pour son encadrement au cours de ma thèse et de mon stage de M2. Merci pour ta patience, tes explications et ta très grande disponibilité. J'ai appris beaucoup à tes côtés. Merci aussi pour ton aide concernant l'enseignement. Au commencement, tu m'as dit vouloir tout faire pour que ma thèse se déroule mieux que la tienne. L'objectif est plus que largement atteint.

Merci à Frédérique Peronnet pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour son aide tout au long de ces années. J'ai beaucoup apprécié de travailler parmi les « Péro », comme disent certains, à tel point que j'ai moi aussi quelques vêtements violets maintenant.

Merci à Sébastien Bloyer, qui fut mon premier maître de stage en M1. C'est grâce à lui si j'ai découvert la drosophile. J'ai aussi eu un aperçu d'une manière de travailler quelque peu différente, mais aussi intéressante.

Merci aussi à tous les autres membres de l'équipe qui ont su me faire partager une ambiance de travail chaleureuse mais également sérieuse. Je pense à Neel, toujours prête pour une séance de dissection de disques d'aile et avec un coup de pince redoutable. Merci aux trois mamans : Anne, pour son humour qui vole souvent aussi haut que le mien, camarade de galère du CHIP, et pardon d'avoir tenté de saboter certaines de tes expériences... bon courage pour ta rédaction ; Myrtille, qui nous a rejoint plus tardivement mais sans qui j'aurais eu beaucoup de mal à terminer ma thèse ; Delphine qui nous apporte des chocolats de Pâques à Noël et des chocolats de Noël à Pâques. Bon courage pour ta thèse. Grâce à vous trois, je peux ajouter la mention « connaissance de la grossesse » à ma thèse. Ca me servira un de ces jours... Merci à Valérie, qui pense souvent à son entourage avant de penser à elle. Il paraît que l'année prochaine, je ferai le calendrier de l'Avent moi-même. Une pensée très forte pour Floria, qui a soutenu sa thèse voilà plus d'un an déjà. C'était plus pareil après... Ton épaule me manque, je pouvais taper dessus mais aussi m'appuyer dessus. Merci à Camille, qui prend la relève brillamment, mais qui encaisse moins bien du droit. Merci également à Jean, qui nous apporte la vision d'un généticien d'expérience. Et enfin, je remercie tous les étudiants de passage au laboratoire, et notamment Suk-Min, mon collègue de M2.

Merci à l'équipe de Stéphane Ronsseray, arrivée dans nos locaux avec le commencement de ma thèse. La pièce à mouche est devenue un endroit improbable mais très agréable grâce à vous. Grâce à Stéphane, j'ai appris des chansons et des nouveaux mots. Niainchuin pour tout. Augustin fut un très bon camarade de thèse. Il faudra que tu me donnes des conseils pour les expériences que je ne maîtrise pas encore (mariage et bébé entre autre). Un petit

mot pour Catherine, qui prend la relève de façon énergique. Je sais que je vais te manquer, mais tu pourras continuer à rêver de moi... Val a aussi grandement participé à cette atmosphère décalée. Mais je ne le répéterai pas trop fort car elle continue le body-karaté. Merci une nouvelle fois à Laure, déjà citée plus haut, et à Antoine, même s'il m'empêche de rigoler avec ses étudiantes. Pendant ces années, il y avait aussi l'équipe d'El spectacularrrrre Michel Gho. Grâce à Jérémy, je sais qu'il existe des zombies de jardin et grâce à Anne, j'ai pu me débarrasser du Club des docs. Penses à faire une offrande à Belzébuth de ma part de temps en temps. Enfin merci à toute l'UMR7622.

Je remercie aussi tous les étudiants du laboratoire, les thésards et les M2 rencontrés au cours de ces années. Il est agréable et enrichissant de progresser avec de bons camarades. Merci en particulier à ma binôme chérie, Vanessa. Plus que quelques mois à tirer et ça ira mieux. Continue bien les cultures de champignons. Merci aussi au « grand » Alwyn pour sa disponibilité.... Kasdédi à Julie, exilée à Montpellier, la première d'entre nous à avoir terminé sa thèse, félicitation. Je me demande si dans 10, 20 ou 30 ans on rigolera encore tous les trois sur les mêmes blagues. Je l'espère.

Au cours de ma thèse, j'ai aussi rencontré beaucoup de thésards sans qui ça n'aurait pas été pareille. En particulier ma binômette de Pasteur, Marriane, qui m'initie à la musique. Mais aussi Maëva, des mêmes cours Pasteur, Dr Saleté (a.k.a. Clémentine) qui m'a poursuivie depuis Marseille, et tant d'autres. Merci aussi à Mélinée, de l'équipe à côté, pour ses gâteaux, ses montages photos et sa bonne humeur. Et merci à Ronan le B., même s'il n'est plus étudiant, qui m'a permis de boucler la mise en page des figures récalcitrantes de mon manuscrit. Et enfin, merci à Christelle, camarade de rédaction. J'ai gagné la course à la rédaction mais tu m'as doublé sur la soutenance.

Je remercie aussi tous les membres de ma famille. En particulier ma maman et mon papa. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous, à votre éducation, vos encouragements et parce que vous m'avez toujours permis de choisir ma route tout en me soutenant. Je vous dois tout. Merci à ma sœur, p'tite Céline chimiste. Grâce à toi je n'ai jamais, jamais été seul. Dans quelques temps, ça sera à mon tour de lire tes remerciements. Merci aussi à Monique de Paris et à Chantal pour les dîners et pour votre hébergement. Et une léchouille à Camille, qui est la seule à trouver mes petites drosos jolies.

Et pour terminer, merci à Mirjam. Ma plus belle découverte !!! Tu m'as permis de tenir le coup jusqu'au bout. Je ne sais pas ce que l'avenir me réserve après la thèse, mais tu es là devant moi, et c'est en te suivant que je vais découvrir mon futur. Grands knuffels. J'arrive vite.

C'est grâce à vous tous si, malgré cette dernière année particulièrement difficile, j'ai pu terminer mon travail. Ma plus grande force est d'être entouré de personnes telles que vous. Merci. Et n'hésitez pas à venir passer un petit weekend aux Pays-Bas de temps en temps.

## RESUME

Chez les eucaryotes, la transcription est réalisée en plusieurs étapes constituant un cycle de transcription. Différents facteurs contrôlent chacune de ces étapes, notamment en apportant des modifications post-traductionnelles à l'ARN polymérase II, en modulant son activité catalytique ou en modifiant l'état et l'accessibilité de la chromatine. De plus, plusieurs exemples chez la levure et les mammifères montrent que les kinases des voies de signalisation MAP-kinase peuvent contrôler directement les différentes étapes de la transcription en se fixant sur la chromatine. Les étapes de pré-initiation et d'initiation de la transcription ont longtemps été considérées comme les plus importantes pour le contrôle de l'expression des gènes. Mais le contrôle de la pause de l'ARN polymérase II au début de l'élongation est lui aussi primordial pour la régulation de l'expression de nombreux de gènes.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux relations fonctionnelles entre le facteur chromatinien Corto, la MAP kinase ERK et le facteur d'élongation de la transcription Elongin au cours du développement des tissus de l'aile de drosophile.

J'ai montré que ERK, une de ses protéines d'échafaudage MP1 et Corto forment un complexe chromatinien qui régule le développement des tissus de l'aile. Corto interagissant avec des protéines des groupes Polycomb et Trithorax, ce complexe pourrait être impliqué dans un mécanisme de reprogrammation de l'expression de gènes en réponse à l'activation de ERK. Mes travaux ont également mis en évidence un rôle du complexe Elongin, en interaction avec Corto, au cours du développement des tissus de l'aile. Corto et Elongin pourraient ainsi participer à la régulation transcriptionnelle d'un gène clé du développement des tissus de l'aile, le gène *rhomboid*. Enfin, j'ai entrepris l'étude du rôle de l'interaction entre Corto et certains ARN, dont l'ARN codant la protéine d'échafaudage MP1.

## ABSTRACT

### **Transcriptional regulation by the chromatin factor Corto during wing development in *Drosophila melanogaster***

In eukaryotes, the transcription cycle is composed of several steps, each of them being strictly controlled by several factors. These factors act mainly through modulation of RNA Polymerase II catalytic activity and chromatin remodeling. In addition, in mammals and in yeast, some MAP kinases have been shown to be recruited on chromatin in response to external cues to control transcription. For many years, pre-initiation and initiation were considered as the main controlled steps. However, RNA Polymerase II undergoes a promoter-proximal pausing which is also crucial to regulate transcriptional activity.

During my PhD, I addressed the functional relationships between the chromatin factor Corto, the MAPK ERK and the transcription factor Elongin during *Drosophila* wing tissue development. I have shown that Corto, ERK and one of its scaffold proteins MP1 form a complex on chromatin. This complex could regulate the recruitment on chromatin of Polycomb and Trithorax complexes in response to ERK signaling. Furthermore, I have shown that Corto and the elongation factor Elongin could both participate in the regulation of *rhomboid*, a gene involved in wing tissue development. Lastly, I studied the role of the interaction of Corto with some mRNA, one of these being the *MP1* mRNA.

## **MOTS CLES**

Corto, drosophile, MAPK, transcription, chromatine

## **KEY WORDS**

Corto, drosophila, MAPK, transcription, chromatin

## **NOM ET ADRESSE DU LABORATOIRE**

UMR 7622 – CNRS – UPMC

Laboratoire de Biologie du Développement

Equipe Chromatine et Développement

9 quai Saint Bernard

75005

Paris

France





## TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>19</b>
<b>I. La transcription et ses principaux mécanismes intrinsèques de régulation</b>	<b>21</b>
<b>A. Différentes phases constituent le cycle de transcription</b>	<b>22</b>
1 - Présentation du cycle de transcription	22
2 - Les différents états de phosphorylation de l'ARN Pol II au cours du cycle de transcription	23
<b>B. Différents facteurs contrôlent l'initiation et l'élongation de la transcription</b>	<b>24</b>
1 - Facteurs augmentant la vitesse d'élongation	24
2 - Facteurs modifiant la chromatine : complexes de remodelage de la chromatine et complexes des groupes Trithorax (TrxG) et Polycomb (PcG)	25
<b>C. L'expression de nombreux gènes est contrôlée par la pause transcriptionnelle</b>	<b>33</b>
1 - Mise en évidence expérimentale des gènes en pause	34
2 - Mécanismes de maintien et de sortie de la pause transcriptionnelle	35
3 - Fonctions biologiques de la pause de transcription	39
<b>II. Le contrôle transcriptionnel par les voies de signalisation MAP kinase (MAPK) : un mécanisme rapide d'activation et de répression de la transcription</b>	<b>42</b>
<b>A. Les voies de signalisation MAPK</b>	<b>42</b>
1 - Présentation	42
2 - Les protéines d'échafaudage	45
<b>B. Exemples d'action des MAPK sur la chromatine</b>	<b>47</b>
1 - La MAPK Hog1 de <i>S. cerevisiae</i> : une plateforme d'assemblage sur la chromatine	47
2 - La MAPK p38 contrôle différentes étapes de la transcription au cours de la différenciation musculaire	49

<b>III. Les grandes étapes du développement de l'aile de Drosophile</b>	<b>53</b>
A. Présentation de l'aile de <i>Drosophila melanogaster</i>	53
B. Organisation et développement du disque imaginal d'aile	55
C. Spécification et différenciation des tissus de veine et interveine	61
D. Rôle du complexe SWI/SNF Brahma dans la différenciation des tissus de l'aile	67
<b>IV. Objectifs de la thèse : étude du rôle de Corto et de ses partenaires au cours du développement des tissus de l'aile chez la Drosophile</b>	<b>75</b>
A. Le facteur de la chromatine Corto : un Enhancer de Trithorax et Polycomb (ETP)	75
B. Objectifs de ma thèse	79
<b>RESULTATS</b>	<b>81</b>
<b>PARTIE I</b>	<b>81</b>
I. Présentation du manuscrit	81
II. Manuscrit 1	82
<b>PARTIE II</b>	<b>97</b>
I. Présentation du manuscrit	97
II. Manuscrit 2	102
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>139</b>
I. Corto, ERK et MP1 formeraient un complexe chromatinien impliqué dans la régulation transcriptionnelle au cours du développement de l'aile	139
II. Identification des gènes cibles de Corto dans le disque imaginal d'aile	140
III. Il pourrait exister d'autres complexes chromatiniens contenant ERK	143
IV. Corto et le complexe Elongin contrôleraient de façon antagoniste l'expression de gènes cibles	145
V. Existe-t-il un lien entre la kinase ERK et le complexe Elongin ?	149

<b>VI. Les gènes de choc thermique : un modèle possible d'étude du rôle de Corto, Elongin et ERK dans la régulation de la pause transcriptionnelle</b>	<b>149</b>
<b>PARTIE III</b>	<b>153</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>153</b>
<b>A. Structure et fonction des chromodomaines</b>	<b>153</b>
<b>B. Recrutement des complexes de modification de la chromatine par des ARN chez les mammifères</b>	<b>155</b>
1 - Exemple de l'interaction des protéines Cbx avec les ARN	<b>156</b>
2 - Rôle général des ARN dans le recrutement des complexes PcG et TrxG	<b>157</b>
<b>C. Recrutement des complexes de modification de la chromatine par des ARN chez la drosophile</b>	<b>161</b>
1 - Exemple de la compensation de dose	<b>161</b>
2 - Exemple des ARN transcrits dans les séquences régulatrices PRE/TRE	<b>163</b>
<b>D. Le chromodomaine de Corto est un domaine d'interaction avec les ARN</b>	<b>165</b>
<b>II. Résultats</b>	<b>167</b>
<b>A. Corto interagit spécifiquement avec un transcrit de <i>MP1</i> <i>in vivo</i></b>	<b>167</b>
<b>B. La triste histoire de l'ARN anti-sens de <i>MP1</i></b>	<b>169</b>
<b>C. Corto n'est pas localisée sur le locus de <i>MP1</i> sur des chromosomes polytènes de glandes salivaires de larves de troisième stade larvaire</b>	<b>171</b>
<b>D. Corto ne semble pas contrôler la transcription de <i>MP1</i> et des gènes à son voisinage</b>	<b>173</b>
<b>E. Implication de la voie des microARN dans la différenciation des tissus de l'aile</b>	<b>175</b>
<b>III. Discussion</b>	<b>179</b>
<b>A. Caractérisation précise de l'ARN <i>MP1</i> fixé par Corto</b>	<b>179</b>
<b>B. La protéine Corto joue-t-elle un rôle dans la régulation transcriptionnelle des gènes du locus <i>MP1</i> ?</b>	<b>179</b>
<b>C. Corto est-il présent sur la chromatine au locus <i>MP1</i> ?</b>	<b>183</b>

D. Existe-t-il d'autres ARN cibles de Corto ?	183
E. Rôle de la voie des miRNA dans la différenciation des tissus de l'aile : y-a-t-il une relation fonctionnelle avec Corto?	184
<b>IV. Matériel et méthodes</b>	<b>186</b>
A. Expérience de co-immunoprécipitation d'ARN	186
B. Expérience d'immuno-FISH sur les chromosomes polytènes	189
C. Analyse de l'expression de <i>MP1</i> par hybridation <i>in situ</i>	192
D. RT-PCR quantitative à partir de disque d'aile	194
E. Immunoprécipitation de la chromatine (X-ChIP) à partir de disque imaginaux d'aile pour la détection des marques épigénétiques H3K4me3 et H3K27me3	194
F. Séquences des amorces utilisées	197
G. Lignées de drosophile utilisées	198
<b>CONCLUSION</b>	<b>201</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>203</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>261</b>

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Les différentes étapes du cycle de transcription	20
Figure 2 : Modèle possible du recrutement et de l'action des complexes PcG	30
Figure 3 : Identification des gènes en pause par le calcul de leur index de pause	36
Figure 4 : Bouton de pause et mécanisme de pause transcriptionnelle	38
Figure 5 : Mécanisme de maintien et de sortie de pause	40
Figure 6 : Schéma simplifié de la voie MAPK ERK	44
Figure 7: La MAPK Hog1 est une plate-forme d'assemblage sur la chromatine de co-facteurs qui contrôlent la transcription	46
Figure 8 : Modèle de l'activation des gènes de la différenciation myogénique par la MAPK p38	50
Figure 9 : Structure du disque imaginal d'aile (A) et de l'aile adulte (B, C) de <i>Drosophila melanogaster</i>	52
Figure 10 : Cycle de développement de <i>Drosophila melanogaster</i>	56
Figure 11: Carte des tissus imaginaux de la larve de Drosophile et des structures adultes auxquelles ils donnent naissance	58
Figure 12 : Mise en place des axes de polarité dans le disque d'aile	60
Figure 13 : Expressions géniques impliquées dans la mise en place des pro-veines L2 à L5 dans le disque imaginal d'aile	62
Figure 14 : Phénotypes d'ailes de différents mutants de gènes impliqués dans la formation des tissus veineux et interveineux	64
Figure 15: Modèle de régulation de la transcription des gènes pro-veines par le complexe Brahma selon le type cellulaire	70
Figure 16: Conservation de Corto dans l'embranchement des arthropodes	72
Figure 17 : Le chromodomaine de Corto	74
Figure 18: Exemples de phénotypes induits par la dérégulation de <i>corto</i>	76
Figure 19 : Corto se fixe sur les chromosomes polytènes et co-localise partiellement avec des protéines PcG et ETP	78
Figure 20 : Rôles des protéines du complexe Elongin	98
Figure 21 : Après un choc thermique, Elongin A et l'ARN Pol II sont relocalisées au	100

## locus des gènes de réponse au choc thermique

Figure 22 : Cascade de régulations géniques impliquée dans la mise en place des tissus de l'aile.	142
Figure 23 : Modèle de mécanisme de contrôle des promoteurs en pause par Corto	146
Figure 24 : Modèle de mécanisme de contrôle de la vitesse d'élongation de la transcription par Corto	148
Figure 25 : Structure du chromodomaine de HP1 $\beta$ et de PC	154
Figure 26 : Exemples de recrutement des complexes PcG sur la chromatine par des ARN non-codants chez les mammifères	158
Figure 27 : Expression des ARN codants et non-codants dans le locus <i>BX-C</i> au cours de l'embryogenèse	160
Figure 28 : Modèles de régulation de l'expression d' <i>Ubx</i> par les transcrits de <i>bxd</i>	162
Figure 29 : Corto fixe les ARN <i>in vitro</i> grâce à son chromodomaine	164
Figure 30 : Corto interagit spécifiquement avec l'ARN <i>MP1 in vivo</i>	166
Figure 31 : Visualisation de la localisation de Corto et du locus <i>MP1</i> sur les chromosomes polytènes.	168
Figure 32 : Analyse de l'expression de <i>MP1</i> par hybridation <i>in situ</i> sur des disques imaginaux d'ailes de larves sur-exprimant Corto grâce au système UAS/Gal4	170
Figure 33 : Corto ne semble pas contrôler l'expression de <i>MP1</i> et des gènes voisins	172
Figure 34 : Les différentes voies de petits ARN chez la drosophile	174
Figure 35 : Phénotypes de veines ectopiques induits par une perturbation de la voie des petits ARN	178
Figure 36 : Analyse par RNA-seq du niveau d'expression de <i>MP1</i> et des gènes voisins en contexte de dérégulation de <i>corto</i>	180
Figure 37 : Immunoprécipitation de la chromatine pour analyser la présence des marques H3K4me3 et H3K27me3 sur <i>MP1</i> dans le disque imaginal d'aile d'individus <i>w<sup>1118</sup></i>	182

## TABLE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 : Caractéristiques des principales protéines PcG chez la drosophile et l'Homme</b>	<b>26</b>
<b>Tableau 2 : Caractéristiques des principales protéines TrxG chez la drosophile et l'homme</b>	<b>28</b>
<b>Tableau 3 : Caractéristiques des principales protéines ETP chez la drosophile et l'homme</b>	<b>32</b>
<b>Tableau 4 : Structure des complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF chez la levure, la drosophile et l'homme</b>	<b>68</b>
<b>Tableau 5 : Certains acteurs de la voie DER/ERK sont dérégulés dans des disques d'aile de mutants de dérégulation de <i>corto</i></b>	<b>144</b>
<b>Tableau 6 : De nombreux gènes de réponse au choc thermique sont dérégulés dans les disques d'aile de mutants de dérégulation de <i>corto</i></b>	<b>150</b>
<b>Tableau 7 : Analyse des phénotypes d'ailes induits par des mutations perte-de-fonction de <i>loqs</i>, <i>Dicer2</i>, <i>AGO2</i></b>	<b>176</b>
<b>Tableau 8 : Liste des anticorps utilisés</b>	<b>196</b>





## LISTE DES ABREVIATIONS

A/P	antéro-postérieur
<i>ab</i>	<i>abrupt</i>
<i>AGO</i>	<i>Argonaute</i>
<i>aos</i>	<i>argos</i>
<i>ap</i>	<i>apterous</i>
ARN Pol II	ARN polymérase II
<i>brk</i>	<i>brinker</i>
Brm	Brahma
<i>bs</i>	<i>blistered</i>
CBX	Chromobox
CHD	Chromodomain-Helicase-DNA-binding
ChIP	Immunoprécipitation de chromatine
<i>cic</i>	<i>capicua</i>
CTD	domaine C-terminal
D/V	dorso-ventral
<i>Dcr</i>	<i>Dicer</i>
DER	Drosophila EGF Receptor
DI	Delta
DPE	Downstream Promoter Element
Dpp	Decapentaplegic
DSIF	DRB-sensitivity-inducing-factor
<i>E(spl)m<math>\beta</math></i>	<i>Enhancer of split m<math>\beta</math></i>
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
ETP	« Enhancers of Trithorax and Polycomb »
<i>fng</i>	<i>fringe</i>
FT	Facteur de transcription

<i>fws</i>	<i>four way stop</i>
GAF	facteur GAGA
<i>grk</i>	<i>gurken</i>
<i>gro</i>	<i>groucho</i>
<i>gug</i>	<i>grunge</i>
H3K27me3	tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3
H3K36me3	tri-méthyliser la lysine 36 de l'histone H3
H3K4me3	tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3
HDAC	histones déacétylase
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>
HMT	histone méthyltransferase
HP1	Heterochromatin Protein 1
HSF	Heat Shock Factor
Inr	Initiator
IP	immunoprécipitation
<i>kek</i>	<i>kekkon</i>
<i>kn</i>	<i>knot</i>
<i>kni</i>	<i>knirps</i>
<i>krn</i>	<i>keren</i>
<i>loqs</i>	<i>loquacious</i>
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK	MAPK kinase
MAPKKK	MAPK kinase kinase
ME	élément de maintenance
miRNA	microARN
MLE	Maleless
MOF	Males absent on the first
MP1	MEK Partner 1

MSK	Mitogen and Stress activated Kinase
MSL	Male Specific Lethal
<i>omb</i>	<i>optomotorblind</i>
P/D	proximo-distal
PB	bouton de pause
PC	Polycomb
PcG	groupe Polycomb
<i>pnt</i>	<i>pointed</i>
PRE/TRE	« Polycomb /Trithorax Response Elements »
P-TEFb	Positive Elongation Factor-b
<i>px</i>	<i>plexus</i>
Rho	Rhomboid
RIP	immunoprécipitation d'ARN
RISC	RNA-induced Silencing Complex
<i>rl</i>	<i>rolled</i>
<i>sal</i>	<i>spalt</i>
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
<i>Ser</i>	<i>Serrate</i>
siRNA	petit ARN interférent
<i>spi</i>	<i>spitz</i>
SRF	Serum Response Factor
S	Star
<i>sty</i>	<i>sprouty</i>
TrxG	groupe Trithorax
<i>Ubx</i>	<i>Ultrabithorax</i>
<i>vn</i>	<i>vein</i>
<i>wg</i>	<i>wingless</i>



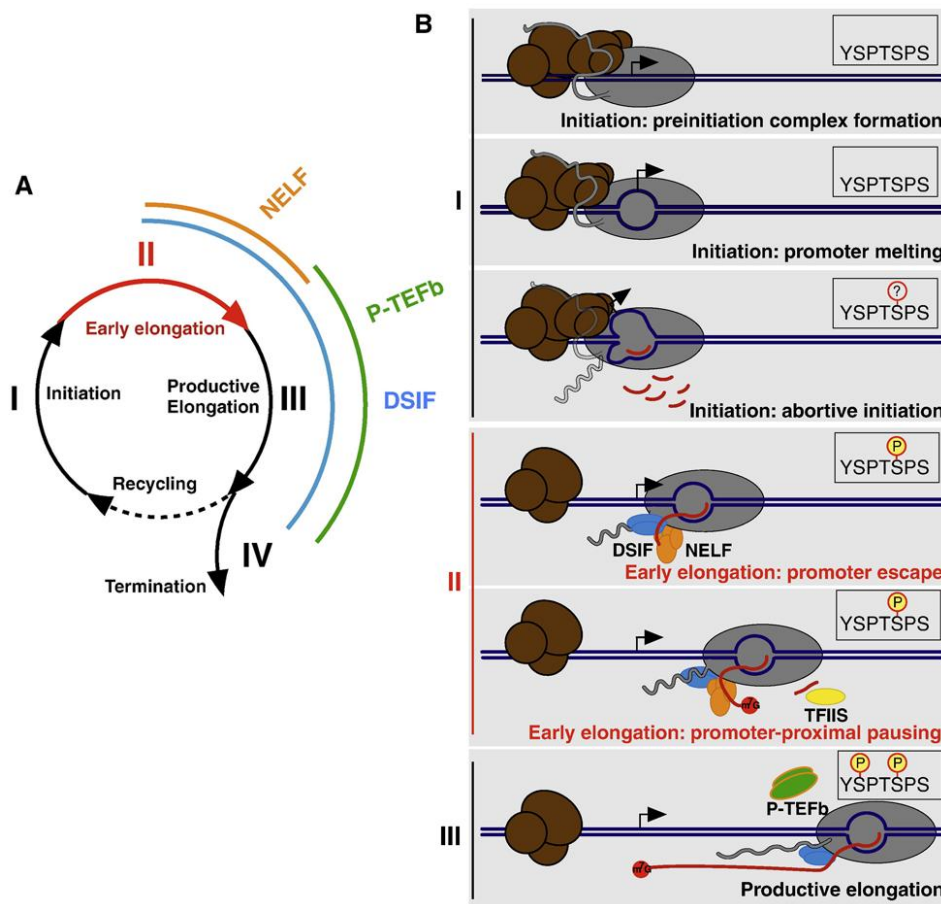
## INTRODUCTION

Toutes les cellules composant un organisme possèdent la même information génétique. L'activité des gènes doit donc être précisément et différenciellement régulée dans chaque cellule afin de permettre le développement correct des organismes, la possibilité d'adaptation à l'environnement extérieur ainsi que le maintien de l'homéostasie. La dérégulation de l'expression des gènes peut induire des anomalies développementales et de nombreuses pathologies.

L'expression d'un gène implique sa transcription, un processus hautement régulé. Ces mécanismes de régulation concernent soit la modulation du recrutement et de l'activité de la machinerie transcriptionnelle, soit la modification de la structure de la chromatine. Ces régulations, qui interviennent à toutes les étapes de la transcription, résultent en différents états d'activation des gènes. Ainsi, certains gènes à un moment donné dans une cellule donnée seront totalement réprimés, tandis que d'autres seront plus ou moins activement transcrits ou maintenus dans un état de pause, prêt à être activés.

Différents signaux extracellulaires permettent de moduler l'activation de la transcription. Les signaux mitogènes et les signaux de stress, par exemple, sont transduits par les voies de signalisation MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), et peuvent induire des modifications du programme transcriptionnel. Les MAPK agissent notamment *via* la phosphorylation de facteurs de transcription mais peuvent également, dans certains cas, se fixer directement sur la chromatine et coopérer avec des complexes chromatinien.

Au cours de ma thèse, je me suis principalement intéressé aux relations entre la MAP kinase ERK et le facteur chromatinien Corto dans la régulation de la transcription au cours du



**Figure 1 : Les différentes étapes du cycle de transcription**

A – La transcription se déroule selon un cycle constitué des étapes I - d'initiation, II – d'élongation précoce, III – d'élongation productive, IV – de terminaison couplée à un recyclage de l'ARN Pol II. Autour du cycle sont représentés les principaux régulateurs de la transcription contrôlant l'entrée en élongation de la transcription ainsi que leur fenêtre d'action.

B – Détail des trois premières étapes du cycle de transcription

I - Les facteurs de transcription généraux (en marron) recrutent l'ARN Pol II (en gris) sur le promoteur des gènes. Le double brin est alors ouvert et l'ARN Pol II entre dans une étape de transcription abortive.

II - L'ARN Pol II échappe ensuite au promoteur et est phosphorylée sur la sérine 5 de son domaine CTD. L'action combinée de DSIF, NELF et TFIIIS permet ensuite le maintien en pause de la polymérase. Au cours de cette étape, l'ARNm est coiffé.

III – La phosphorylation sur la sérine 2 du CTD de l'ARN Pol II par P-TEFb entraîne sa sortie de pause et son entrée en élongation productive.

(D'après Nechaev and Adelman, 2011)

développement des tissus de l'aile chez la Drosophile. Corto appartient à la famille des « Enhancer of Trithorax and Polycomb » (ETP), des co-facteurs des complexes Trithorax (TrxG) et Polycomb (PcG). Ces deux types de complexes sont capables de modifier et maintenir la structure de la chromatine dans un état permissif ou non pour la transcription. Les résultats décrits dans les deux premières parties de ce manuscrit suggèrent que Corto pourrait participer, avec le facteur de transcription Elongin, à la régulation de l'état de pause transcriptionnelle de certains gènes dans le disque imaginal d'aile en réponse à la signalisation ERK. Dans la troisième partie de ce manuscrit, je décris mes travaux concernant l'étude de l'interaction entre Corto et les ARN, qui pourrait aussi participer à un mécanisme de régulation transcriptionnelle.

## **I. La transcription et ses principaux mécanismes intrinsèques de régulation**

La transcription des gènes est un processus extrêmement complexe impliquant de nombreux niveaux de contrôle. Sa régulation permet d'exprimer des répertoires de gènes différents selon les cellules, ce qui est indispensable au développement ainsi qu'au maintien de l'homéostasie cellulaire. Sa dérégulation a des effets importants sur les fonctions cellulaires et est à l'origine de nombreuses pathologies. Bien que la transcription soit parmi les domaines scientifiques les plus étudiés et que de nombreuses connaissances aient été accumulées, beaucoup de points restent encore à découvrir.



## A. Différentes phases constituent le cycle de transcription

Chez les eucaryotes, la transcription est réalisée en plusieurs étapes constituant un cycle de transcription (**Figure 1**). Chacune d'entre elles est précisément contrôlée.

### 1 - Présentation du cycle de transcription

La première étape est la pré-initiation de la transcription. Celle-ci consiste en l'assemblage d'un complexe de pré-initiation (ou PIC) sur les promoteurs des gènes. Il est composé des facteurs de transcription généraux TFIIB, IID, IIE, IIF et IIH qui assurent le recrutement de l'ARN polymérase II (ARN Pol II) (Nechaev and Adelman, 2011; Sikorski and Buratowski, 2009). TFIIE et IIH ouvrent la double hélice d'ADN, ce qui permet à la transcription de commencer avec l'incorporation des deux premiers nucléotides et la formation de la première liaison phospho-diester. Cette transcription est très souvent abortive, l'ARN Pol II, alors instable, peinant à produire des transcrits supérieurs à 10 nucléotides (Nechaev and Adelman, 2011; Sims et al., 2004). L'étape suivante, appelée « promoter clearance », permet à l'ARN Pol II d'échapper au promoteur et d'entrer en élongation productive. Cette étape est associée à un remaniement du PIC. TFIID reste fixée au promoteur alors que TFIIB, E et H se décrochent du PIC et que TFIIF s'associe à l'ARN Pol II (Zawel et al., 1995). La transcription entre ensuite dans une étape d'élongation plus efficace, déclenchée par le recrutement du facteur d'élongation P-TEFb (Positive Elongation Factor-b). Finalement, lors de la terminaison, l'ARN produit est clivé et poly-adénylé avant d'être transporté dans le cytoplasme. La terminaison de la transcription se produit au niveau de sites de terminaison pouvant se trouver parfois plusieurs kilobases en aval du site de poly-adénylation (Nechaev and Adelman, 2011; Sims et al., 2004).

Chacune de ces étapes est hautement régulée. Un des niveaux de régulation met en jeu des états de phosphorylation différents de l'ARN Pol II.

## 2 - Les différents états de phosphorylation de l'ARN Pol II au cours du cycle de transcription

Rpb1, la plus grande sous-unité de l'ARN Pol II, est en partie régulée par l'intermédiaire de son domaine C-terminal (CTD). Celui-ci est constitué de la répétition d'un même motif Tyr<sub>1</sub>-Ser<sub>2</sub>-Pro<sub>3</sub>-Thr<sub>4</sub>-Ser<sub>5</sub>-Pro<sub>6</sub>-Ser<sub>7</sub> soumis à des phosphorylations sur les sérines 2, 5 et 7 (Buratowski, 2009) (**Figure 1**). Le nombre de répétitions est variable selon les espèces, avec 26 répétitions chez la levure, 43 chez la drosophile et 52 chez les mammifères (Hampsey and Reinberg, 2003). Différents états de phosphorylation sont associés à chaque étape du cycle de transcription et permettent de faire progresser l'ARN Pol II à travers celui-ci (Buratowski, 2009). Lors de son intégration dans le PIC, le CTD de l'ARN Pol II n'est pas phosphorylé. Le complexe Mediator, qui fait le lien entre l'ARN Pol II et différents cofacteurs, stimule l'activité kinase de TFIIH une fois intégré au PIC. TFIIH phosphoryle le CTD de l'ARN Pol II sur la Ser<sub>5</sub>, induisant la libération de l'ARN Pol II du promoteur et son entrée en élongation précoce (Max et al., 2007).

La phosphorylation sur la Ser<sub>5</sub> ne reste présente à son niveau maximal sur le CTD que sur les 100 premières bases. Après le début de la transcription, cette marque disparaît progressivement et est remplacée par une phosphorylation sur la Ser<sub>2</sub> déposée par le facteur d'élongation de la transcription P-TEFb (Bres et al., 2008; Buratowski, 2009). Cette marque augmente au fur et à mesure de l'avancée de l'ARN Pol II dans la séquence codante et est requise pour la terminaison de la transcription (Peterlin and Price, 2006).

## B. Différents facteurs contrôlent l'initiation et l'élongation de la transcription

L'initiation et l'élongation de la transcription sont contrôlées par différents cofacteurs. Concernant la progression de l'ARN Pol II, il existe deux grandes familles de facteurs régulateurs : les facteurs augmentant la vitesse et l'activité catalytique de l'ARN Pol II et les facteurs facilitant son déplacement à travers les nucléosomes (Sims et al., 2004).

### 1 - Facteurs augmentant la vitesse d'élongation

L'étude de l'ARN Pol II a montré que celle-ci était capable de s'arrêter, restant dans un état de pause. *In vitro*, la pause résulte d'un glissement de l'ARN Pol II sur son substrat et d'un mauvais alignement entre son site catalytique et l'extrémité 3'-OH de l'ARN en cours d'élongation. Contrairement à une polymérase arrêtée, l'état de pause est un état réversible pouvant être contrecarré par la présence de facteurs d'élongation de la transcription (Sims et al., 2004). Plusieurs de ces facteurs ont été identifiés sur la base de leur effet de stimulation de l'activité d'élongation de l'ARN Pol II *in vitro*.

Le premier d'entre eux, TFIIF, est un élément du PIC. Il diminue les temps de pause et augmente la vitesse d'élongation sur les séquences proches du promoteur (Tan et al., 1994). Elongin et ELL sont deux facteurs d'élongation qui agissent après que l'ARN Pol II ait échappé au promoteur. Ils permettent tous les deux de réduire les temps de pause et d'augmenter la vitesse d'élongation en diminuant la constante de Michaelis ( $K_m$ ) et en augmentant la vitesse initiale maximale ( $V_{max}$ ) de la réaction d'élongation. Bien que leurs rôles soient indiscernables *in vitro*, leurs fonctions ne sont pas redondantes *in vivo*. En effet, chez la

drosophile, des mutations pour ces facteurs sont létales et présentent des phénotypes différents (Smith et al., 2008). J'exposerai plus en détail les propriétés du facteur Elongin dans la seconde partie des résultats.

Trois autres facteurs d'élongation ont une fonction précoce dans le contrôle de la transcription (Sims et al., 2004). P-TEFb, cité précédemment, est un hétérodimère constitué de la kinase Cdk9 associée à la Cycline T qui phosphoryle l'ARN Pol II (Bres et al., 2008). DSIF (DRB-sensitivity-inducing-factor) est lui aussi un hétérodimère composé de Spt4 et Spt5. Il a initialement été identifié comme un répresseur car isolé avec NELF, un régulateur négatif de la transcription. D'un point de vue mécanistique, NELF est associé à DSIF et bloque l'élongation lors des premières étapes de la transcription. P-TEFb induit la phosphorylation de l'ARN Pol II ainsi que celle de Spt5. Ces modifications ont pour effet de décrocher NELF de DSIF. Celui-ci peut alors jouer un rôle positif dans l'élongation de la transcription (Nechaev and Adelman, 2011; Yamaguchi et al., 1999).

## 2 - Facteurs modifiant la chromatine : complexes de remodelage de la chromatine et complexes des groupes Trithorax (TrxG) et Polycomb (PcG)

Une des principales difficultés rencontrées par l'ARN Pol II lors de la transcription *in vivo* est le passage à travers les nucléosomes. Au cours de la transcription, différents complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants sont recrutés, facilitant l'accès de l'ADN à l'ARN Pol II. De manière générale, l'activité des complexes de remodelage de la chromatine permet de diminuer l'enroulement de l'ADN autour des nucléosomes et se fait de deux

<b>Tableau 1 : Caractéristiques des principales protéines PcG chez la drosophile et l'Homme</b>				
Drosophile	Homme	Domaines fonctionnels	Activité	Complexe
Polycomb (PC)	HPC1, 2, 3, CBX6, 7, 8	Chromodomaine	Reconnaissance de H3K27me3	PRC1
Polyhomeotic (PH)	HPH1, 2, 3	Zn finger, SAM	?	PRC1
Posterior Sex Combs (PSC)	BMI1	RING finger	Co-facteur de dRING	PRC1, dRAF
dRING	RING1, RNF2	RING finger	E3 ubiquitin ligase de H2AK119	PRC1, dRAF
Sex Comb on Midleg (SCM)	SCMH1 et 2	SAM, MBT, Zn finger	?	PRC1
Enhancer of Zeste (E(Z))	EZH1, EZH2	SET, SANT	H3K27 méthyltransférase	PRC1
KDM2	KDM2	F-box	H3K36me2 déméthylation, H2A ubiquitylation	dRAF
Extra sex combs (ESC)	EED	WD40	Co-facteur de E(Z)	PRC2
NURF55 (p55)/CAF1	RbAp48/RBBP4	WD40		PRC2
Suppressor of zeste -12 (Su(Z)12)	SUZ12	Zn finger	Co-facteur de E(Z)	PRC2
Polycomb-like (PCL)	HPCL1, 2, 3	PHD, Tudor	Co-facteur de PRC2	
Pleiohomeotic (PHO)	YY1	Zn finger	DNA binding	PhoRC
Pho-like (PHO-L)	YY2	Zn finger	DNA binding	PhoRC
dSFMBT	SFMBT1	MBT, SAM	Fixe H3K9 et H3K20me1/me2	
Calypso	BAP1	ubiquitin C-terminal	H2A déubiquitylase	PR-DUB

façons différentes : (1) en *cis*, en permettant le déplacement des nucléosomes le long de la fibre d'ADN ; (2) en *trans*, en déplaçant les histones hors de l'ADN vers un accepteur d'histones (Vignali et al., 2000). Des chaperons d'histones sont aussi requis, comme les protéines FACT et Spt6 (Belotserkovskaya et al., 2003; Bortvin and Winston, 1996). Leur fonction est de déstabiliser les histones pendant l'élongation et de les réassocier par la suite (Selth et al., 2010).

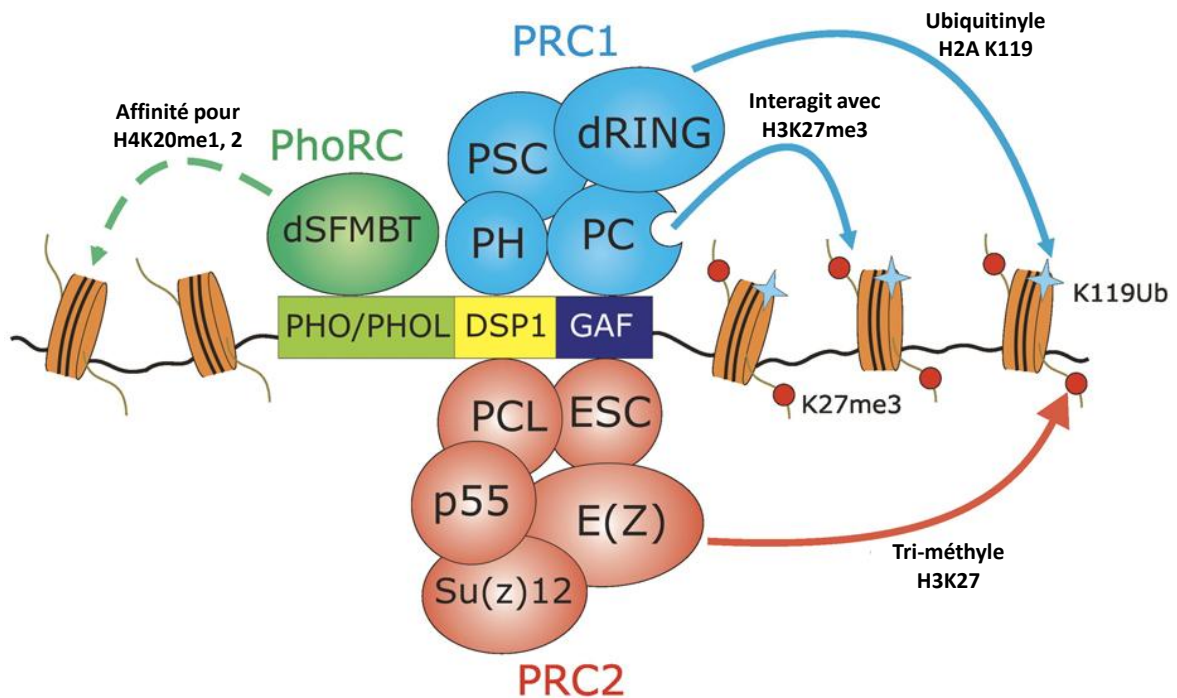
Le remodelage de la chromatine sur un locus permet d'augmenter son accessibilité aux facteurs de transcription et à l'ARN Pol II et ainsi d'augmenter sa transcription. Quatre familles principales de complexes de remodelage de la chromatine ont été identifiées. Il s'agit des complexes des familles SWI/SNF, ISWI, CHD, intervenant majoritairement dans le contrôle de la transcription, ainsi que de la famille INO82/SWR, intervenant dans la réparation des dommages de l'ADN (Hargreaves and Crabtree, 2011). Ces complexes interviennent à différentes étapes de la transcription. Le complexe SWI/SNF joue un rôle précoce au cours de l'initiation de la transcription, avant même le recrutement de l'ARN Pol II (Armstrong et al., 2002). SWI/SNF intervient aussi dans l'épissage, favorisant l'inclusion d'exons alternatifs (Batsche et al., 2006). Kismet, l'homologue de CHD7 chez la drosophile, est requis dans la phase précoce de l'élongation avant le recrutement de P-TEFb, alors que CHD1 est nécessaire au cours de l'étape suivante d'élongation productive (Srinivasan et al., 2005; Srinivasan et al., 2008). Les complexes de remodelage de la chromatine ont été initialement identifiés comme des activateurs de la transcription. Toutefois, certains d'entre eux semblent posséder également un rôle répresseur, comme nous le verrons plus tard.

Certains gènes codant des composants des complexes de remodelage de la chromatine, comme le complexe SWI/SNF, font partie de la famille des gènes du groupe Trithorax (TrxG).

<b>Tableau 2 : Caractéristiques des principales protéines TrxG chez la drosophile et l'homme</b>				
Drosophile	Homme	Domaines fonctionnels	Activité	Complexe
Trithorax (Trx)	MLL1, 5	SET, PHD	H3K4 méthyltransférase	TAC1
Sbf1				TAC1
dCBP	CBP	HAT	H3 Acétyltransférase	TAC1, ASH1
ASH1	ASH1L	SET, PHD, BAH	H3K4, K36 méthyltransférase	ASH1
ASH2	ASH2L	PHD finger, SPRY	Essentielle pour H3K4me3	
Brahma (BRM)	BRG1, hBRM	Bromodomain, hélicase	ATPase	BRM
OSA	hELD1/OSA1	ARID	Co-facteur de BRM	BRM
oira (MOR)	SMARCC1, 2	SANT, SWIRM	Co-facteur de BRM	BRM
Kismet (KIS)	CHD7	Chromodomaine, SANT	DNA hélicase	
Iswi	SNF2L		ATPase	NURF
Nurf38	?	Phosphate inorganique		NURF
Nurf301	BPTF	PHD, bromodomain		NURF
Nurf55	RpAp46, 48	WD-40		NURF

Les gènes du groupe Trithorax, tout comme ceux du groupe Polycomb (PcG), ont été initialement caractérisés chez la drosophile grâce aux phénotypes homéotiques induits par leurs mutations, ce qui traduit le fait qu'ils interviennent dans le maintien du profil d'expression des gènes Hox. Les protéines des groupes PcG et TrxG sont des protéines de la chromatine très bien conservées au cours de l'évolution, qui forment des complexes hétéromultimériques. Ces complexes se fixent au niveau de séquences d'ADN appelées « Polycomb /Trithorax Response Elements » (PRE/TRE) ou éléments de maintenance (ME) et également à proximité des promoteurs (Schwartz and Pirrotta, 2007; Simon and Kingston, 2009). Ils ont des actions antagonistes, puisque les complexes PcG sont impliqués dans des mécanismes de répression de l'expression génique, tandis que les complexes TrxG jouent un rôle dans le maintien de l'activité transcriptionnelle. Mis à part les gènes Hox, les complexes PcG et TrxG sont impliqués dans la régulation de autres nombreux gènes participant à divers processus cellulaires et développementaux (Beck et al., 2010). Au moins trois complexes PcG (PRC1, PRC2 et PhoRC) et quatre complexes TrxG (TAC1, Ash1, SWI/SNF et NURF) ont été purifiés chez la drosophile et possèdent des équivalents chez les mammifères (**Tableaux 1 et 2**) (Schwartz and Pirrotta, 2007 ; Simon and Kingston, 2009). Certaines sous-unités additionnelles s'associent à ces complexes, formant des complexes alternatifs qui permettent d'étendre leurs fonctions. Deux autres complexes ont également été mis en évidence plus récemment, il s'agit des complexes PcG PR-DUB et dRAF (Lagarou et al., 2008; Scheuermann et al., 2010). Au sein de ces complexes, certaines protéines PcG et TrxG sont des enzymes qui apposent des modifications post-traductionnelles sur les queues des histones, appelées marques épigénétiques (méthylations, phosphorylations, acétylations, ubiquitylations etc...), tandis que d'autres sont capables de reconnaître spécifiquement certaines de ces modifications ou de déplacer les nucléosomes. La combinaison de ces





**Figure 2 : Modèle possible du recrutement et de l'action des complexes PcG**

Schéma représentant la fixation des complexes PcG sur un élément de maintien. Les rectangles représentent les protéines possédant de l'affinité pour l'ADN. Celles-ci permettraient de recruter les 3 principaux complexes PcG, à savoir PRC1, PRC2 et PhoRC, représentés respectivement en bleu, rouge et vert. Les flèches représentent l'interaction entre certaines sous-unités et des marques épigénétiques ou leur activité enzymatique. Les points rouges représentent les tri-méthylations des queues des histones et les étoiles bleues représentent les ubiquitylations. (D'après Schwartz et Pirrotta, 2008)

modifications des histones, appelée « code histone » (Strahl and Allis, 2000), joue un rôle sur l'état de compaction de la chromatine et sur l'activité transcriptionnelle des gènes.

Un modèle a été initialement proposé pour le maintien de la répression de la transcription par les complexes PcG (**Figure 2**) (Schwartz and Pirrotta, 2008). Le complexe PhoRC, le seul composé de protéines possédant des domaines de liaison à l'ADN, fixe les PRE et y recrute PRC2. Celui-ci, grâce à sa sous-unité E(Z) contenant un domaine histone méthyltransferase (HMT), tri-méthyle la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), constituant un site d'ancrage pour le chromodomaine de la protéine PC du complexe PRC1. PRC1 est ainsi recruté sur les PRE et maintient un état répressif pour la transcription en compactant la chromatine et en déposant d'autres marques épigénétiques, comme l'ubiquitinylation de l'histone H2A (Schwartz and Pirrotta, 2007; Simon and Kingston, 2009). Ce modèle initial a été remis en question sur plusieurs points, notamment en ce qui concerne le recrutement de PRC1 par PRC2. D'autre part, PhoRC n'est pas le seul élément important pour le recrutement de PRC1 et PRC2, ces derniers étant toujours recrutés sur une large majorité de leurs cibles en son absence (Brown et al., 2003). Enfin, l'action des complexes PcG serait plutôt due à un blocage de l'initiation ou de l'élongation de la transcription de l'ARN Pol II plutôt qu'à l'inhibition du recrutement de la polymérase. En effet, la présence de l'ARN Pol II et des facteurs de transcriptions généraux peut être concomitante à celle des complexes PcG (Breiling et al., 2001; Stock et al., 2007).

Certaines protéines TrxG maintiennent l'activation de la transcription en apposant d'autres marques épigénétiques. Les complexes TAC1 ainsi que la protéine ASH2 sont impliqués dans la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) et acétylent les histones au niveau du promoteur, alors que ASH1, en plus d'apposer la marque H3K4me3, peut tri-

<b>Tableau 3 : Caractéristiques des principales protéines ETP chez la drosophile et l'homme</b>				
Drosophile	Homme	Domaines fonctionnels	Activité	Complexe
E(Pc)	EPC1			
Corto		chromodomaine		
Cramped (CRM)	CRAMP1L	SANT		
DSP1	HMGB1	HMG	DNA binding	
GAGA factor (GAF)		BTB/POZ, Zn finger	DNA binding	
Grainyhead	GRHL1, 2, 3		DNA binding	
Lolal/Batman	ZFP161	BTB/POZ	DNA binding	
Pipsqueak (PSQ)		BTB/POZ	DNA binding	
Su(Z)2		Zn finger		
Zeste (Z)		Homeodomain-like	DNA binding	
ASX	ASXL1	PHD	Co-facteur de Calypso	PR-DUB
Mxc			DNA binding	

méthyler la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me3) dans le corps du gène (Yuan et al., 2011). Ces modifications constituent les principales marques activatrices de la transcription et sont associées à l'élongation de la transcription (Schuettengruber et al., 2007; Schwartz and Pirrotta, 2007). Elles permettent notamment d'empêcher la fixation des complexes PcG et de recruter des protéines du complexe SWI/SNF (Beisel et al., 2002). Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, les complexes SWI/SNF, NURF et les protéines de la famille CHD activent la transcription en remodelant la chromatine.

Chez la drosophile, des cribles visant à identifier des modificateurs des phénotypes homéotiques de mutants de gènes PcG et TrxG ont permis d'identifier un troisième groupe de gènes augmentant simultanément les deux types de phénotypes (Gildea et al., 2000). Ce troisième groupe a été appelé « Enhancers of Trithorax and Polycomb » (ETP) et est impliqué à la fois dans le maintien de l'activation et de la répression de la transcription. Certains ETP ont des homologues chez les mammifères (**Tableau 3**). Les protéines codées par ces gènes pourraient jouer un rôle dans le recrutement des complexes PcG et TrxG sur la chromatine (Beck et al., 2010). Nous parlerons plus longuement de l'un de ces ETP, Corto, à la fin de cette introduction.

### **C. L'expression de nombreux gènes est contrôlée par la pause transcriptionnelle**

Les étapes de pré-initiation et d'initiation de la transcription ont longtemps été considérées comme les plus importantes pour le contrôle de l'expression des gènes. Le recrutement de l'ARN Pol II sur les promoteurs était donc perçu comme l'étape principale régulant la transcription. Mais le contrôle de la pause de l'ARN Pol II au début de l'élongation est lui

aussi primordial pour la régulation de l'expression d'un certain nombre de gènes, dont les gènes de réponse aux chocs thermiques.

## 1 - Mise en évidence expérimentale des gènes en pause

Les promoteurs des gènes de réponse au choc thermique chez la drosophile, et en particulier celui de *hsp70*, sont connus depuis le milieu des années 1980 pour posséder une ARN Pol II en état de pause de transcription en absence d'induction. En effet, une ARN Pol II a été décrite sur le promoteur de *hsp70* entre les positions -12 et +65 par rapport au +1 de transcription avant induction, alors qu'aucune polymérase n'est présente sur le corps du gène (Gilmour and Lis, 1986). Cette polymérase produit des ARN de 17 à 37 nucléotides de long ayant la particularité d'être coiffés en 5' (Rasmussen and Lis, 1993). L'activation de l'élongation de la transcription de *hsp70* après un choc thermique est très efficace et rapide, l'ARN Pol II en élongation s'associant à la séquence codante en quelques secondes, ce qui entraîne l'augmentation de plus de 100 fois de la quantité de transcrits en une minute (Boehm et al., 2003).

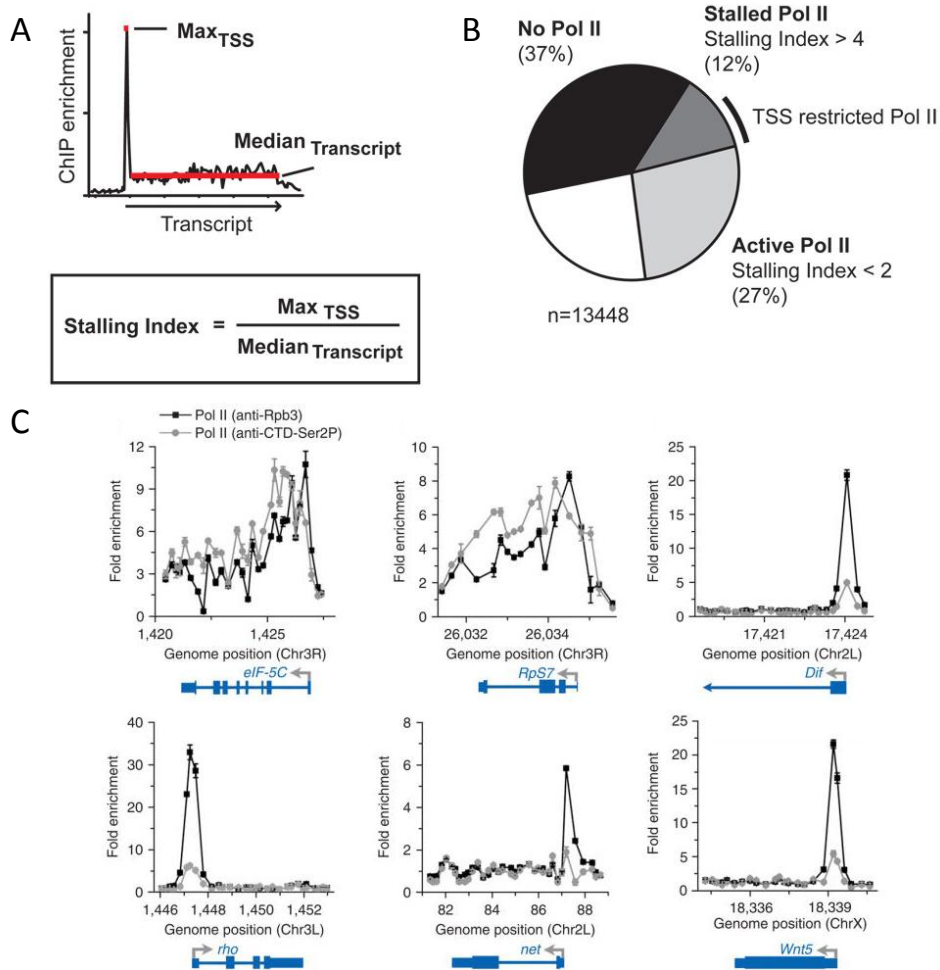
Certaines observations ont suggéré que ce mécanisme de régulation de la pause transcriptionnelle s'étend à d'autres gènes, comme les oncogènes humains *c-myc* (Strobl and Eick, 1992), *c-myb* (Bender et al., 1987), *c-fos* (Collart et al., 1991) et aussi certains gènes codés par le virus du VIH (Kao et al., 1987).

Plus récemment, des études globales ont montré que de nombreux promoteurs sont en état de pause transcriptionnelle. Une analyse sur des fibroblastes humains a identifié 28 % des gènes comme étant en pause (Core et al., 2008). De même, chez la drosophile, deux études

ont montré que 12 à 18% des gènes sont en pause juste après le promoteur, en embryons et en cellules S2 (Muse et al., 2007; Zeitlinger et al., 2007). Ces deux études reposent essentiellement sur des expériences d'immunoprécipitation de chromatine avec un anticorps dirigé contre l'ARN Pol II suivies d'un séquençage global (ChIP-Seq). Les gènes en pause sont ensuite identifiés en définissant un index de pause qui compare l'enrichissement en ARN Pol II sur les promoteurs par rapport à son enrichissement sur la séquence codante (**Figure 3**). Par ce critère, les gènes en pause sont définis comme possédant un index de pause supérieur à 4 et les gènes transcrits un index de pause inférieur à 2.

## 2 - Mécanismes de maintien et de sortie de la pause transcriptionnelle

Le répresseur de l'élongation NELF, tout comme DSIF, est important pour le maintien en pause de nombreux gènes, dont *hsp70*. NELF se fixe à plus de 2000 gènes chez la drosophile (Lee et al., 2008; Wu et al., 2003). Dans un mutant perte de fonction pour NELF, 60% des gènes en pause perdent leur enrichissement en ARN Pol II sur leur région 5'-UTR sans que celui-ci n'augmente dans la séquence codante (Muse et al., 2007). Ce rôle a été confirmé pour la transcription du gène *slp1*, un gène régulé par les facteurs de transcription « pair-ruled » au cours de l'embryogénèse précoce chez la drosophile (Wang et al., 2007). D'autres facteurs interviennent pour la levée de la pause. C'est par exemple le cas des facteurs d'élongation de la transcription P-TEFb, ELL et Elongin, qui sont recrutés sur *hsp70* après un choc thermique et sont nécessaires pour son expression (Gerber et al., 2005; Lis et al., 2000; Smith et al., 2008). Le complexe TrxG TAC1 est lui aussi recruté au promoteur de *hsp70* après choc thermique, où il dépose la marque épigénétique H3K4me3, acétyle les histones et est requis pour la pleine activation de la transcription (Smith et al., 2004). Il en est de même



**Figure 3 : Identification des gènes en pause par le calcul de leur index de pause**

A : Graphique représentant l'enrichissement en ARN Pol II sur un gène en pause hypothétique. L'enrichissement maximal au niveau du promoteur est rapporté à l'enrichissement moyen le long du transcrite afin de calculer l'index de pause.

B : Dans l'embryon de Drosophile, 12% des gènes présentent un index de pause supérieur à 4 et sont donc considérés en pause, 27% possèdent un index de pause inférieur à 2 et sont donc considérés comme transcriptionnellement actifs, 37% ne présentent aucun enrichissement en ARN Pol II et sont considérés comme réprimés, les 24% restants se trouvent dans un état indéterminé. (D'après Zeitlinger et al., 2007).

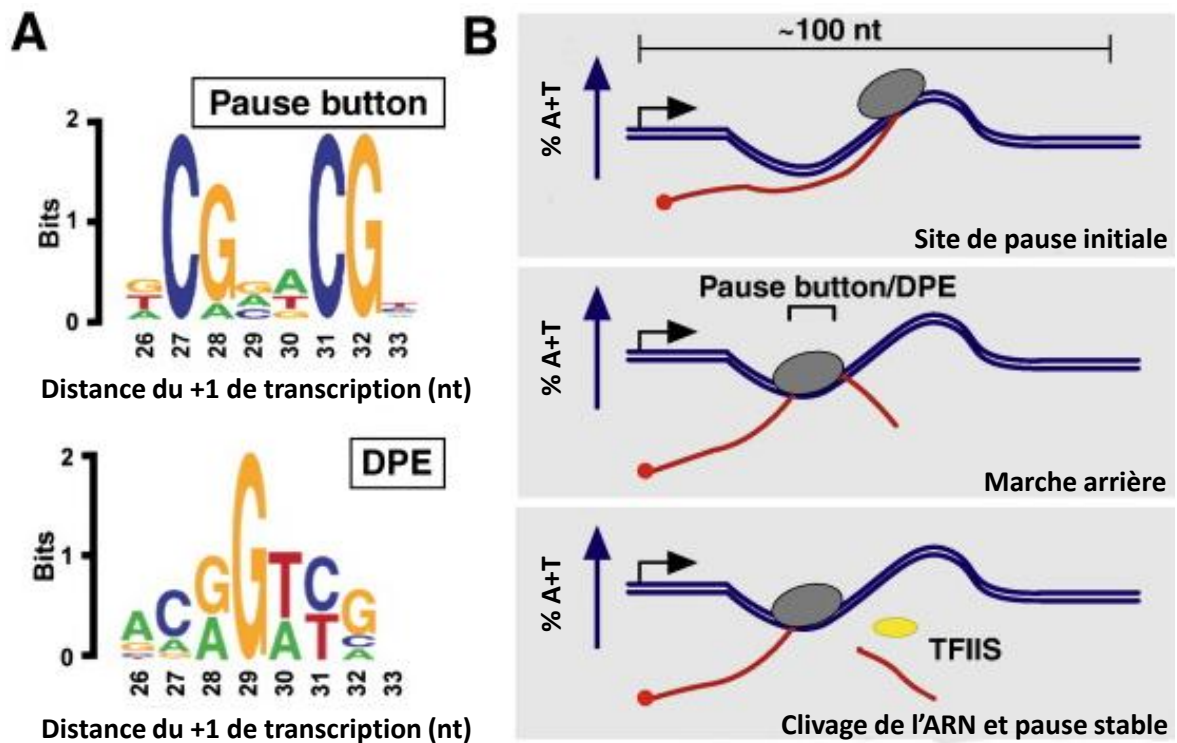
C : Graphiques représentant l'enrichissement en ARN Pol II totale (anti-Rpb3) ou phosphorylée sur la Ser2 du domaine CTD (anti-CTD-Ser2P) sur les locus de *eIF-5C*, *RpS7*, *rho* et *net*. *eIF-5C* et *RpS7* sont deux gènes activement transcrits et présentent un index de pause faible. *rho* et *net* sont deux gènes en pause et présentent un index de pause élevé. En bleu est schématisée la structure des gènes, avec des boîtes pour les exons et des lignes pour les introns. (D'après Muse et al., 2007).

pour le complexe de remodelage de la chromatine NURF et, chez les mammifères, pour le complexe SWI/SNF. Toutefois, ce dernier est requis dans le cas d'une activation par des métaux lourds ou un inhibiteur du métabolisme et non pas par un choc thermique, indiquant une sélectivité de recrutement des complexes de remodelage de la chromatine dépendant de la voie d'activation (Badenhorst et al., 2005; de La Serna et al., 2000). Enfin, la kinase JIL-1 phosphoryle la sérine 10 de l'histone H3, ce qui est nécessaire à l'entrée en élongation productive après un choc thermique (Ivaldi et al., 2007).

L'analyse bioinformatique des séquences des gènes en pause identifiés par Zeitlinger et ses collaborateurs (Zeitlinger et al., 2007) a permis de découvrir un motif important pour le maintien en pause, appelé bouton de pause (*PB*), dont la séquence consensus est KCGRWCG (**Figure 4A**). Ce motif se retrouve dans plus d'un quart des gènes analysés, principalement entre les positions +20 et +30. Les éléments de promoteur *Inr* (Initiator) et *DPE* (Downstream Promoter Element), responsables du recrutement du facteur général de transcription TFIID, sont également sur-représentés dans ces promoteurs (Hendrix et al., 2008). Enfin, 39% des gènes possédant NELF sur leur promoteur possèdent aussi une séquence *GAGA* de fixation pour le facteur *GAGA* (*GAF*), un facteur important pour l'expression de *hsp70* (Lee et al., 2008; Shopland et al., 1995). Ainsi, la combinaison d'une séquence *GAGA* suivie d'une séquence *Inr* et d'un motif *PB* ou *DPE* apparaît comme un enchaînement prédictif d'un promoteur en pause, plus d'un tiers des gènes en pause possédant cette combinaison contre seulement 2% des promoteurs constitutifs (Hendrix et al., 2008).

L'analyse des transcrits courts produits par les locus en pause a montré qu'ils sont coiffés et possèdent le même +1 de transcription que les ARNm correspondants. De plus, pour les produire, l'ARN Pol II traverse une zone entre les positions +20 et +35 dans laquelle l'hybride





**Figure 4 : Bouton de pause et mécanisme de pause transcriptionnelle**

A : Identification de deux sites importants pour la pause de la transcription, appelés bouton de pause et site DPE. Le graphique représente le niveau de conservation à chaque position par rapport au début de transcription.

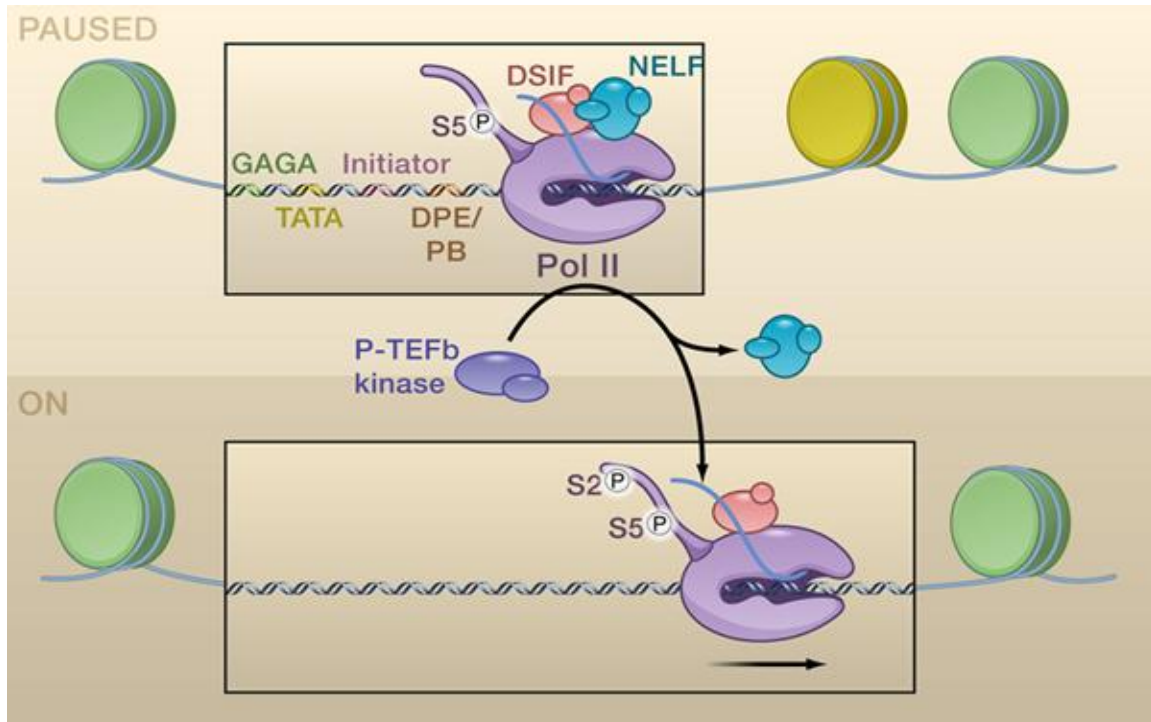
B : Le pourcentage en nucléotides A+T est important pour l'entrée en pause de l'ARN Pol II. Lorsque celle-ci rencontre un site avec un fort pourcentage en A+T, l'hybride ARN/ADN formé est peu stable. L'ARN Pol II recule alors sur un site plus stable contenant un pourcentage en A+T plus faible et TFIIIS clive l'extrémité d'ARN produit en excès. (D'après Nechaev et Adelman, 2011).

ARN/ADN créé est particulièrement stable. Cette zone est suivie d'une région dans laquelle la stabilité de l'hybride est beaucoup plus faible. Ces propriétés thermodynamiques particulières favorisent un recul de l'ARN Pol II à la jonction entre ces deux régions. Le petit fragment d'ARN produit en excès est ensuite clivé d'une façon dépendante de TFIIS et l'ARN Pol II se retrouve en pause aux environs de la position +35 après le début de transcription (Nechaev et al., 2010) (**Figure 4B**).

Il a été proposé que NELF, associé à DSIF, maintienne en pause l'ARN Pol II ayant reculé vers la position +35. L'action d'un signal sur le promoteur en pause, comme le Heat Shock Factor dans le cas de *hsp70* (Shopland et al., 1995), induit le recrutement de P-TEFb qui permet de décrocher NELF de DSIF et de transformer le complexe d'élongation en pause en une forme active (Gilmour, 2009; Nechaev and Adelman, 2011) (**Figure 5**). De plus, des petits ARN caractéristiques des gènes en pause sont produits par des gènes activement transcrits (Nechaev et al., 2010). Cette observation, appuyée par le fait que NELF est également fixé sur des promoteurs de gènes transcriptionnellement actifs (Lee et al., 2008), suggère que l'étape de pause est obligatoire pour la plupart des gènes. Seul le temps de maintien en pause permet alors de faire la différence entre un gène en pause et un gène activement transcrit.

### 3 - Fonctions biologiques de la pause de transcription

Le fait que des gènes du développement et des voies de signalisation représentent une part importante des gènes identifiés en pause suggère l'implication de la pause dans une réponse rapide au cours du développement, ainsi qu'une préparation à une activation future (Levine, 2011; Muse et al., 2007; Zeitlinger et al., 2007). La présence d'une ARN Pol II par promoteur



**Figure 5 : Mécanisme de maintien et de sortie de pause**

Schéma représentant un promoteur type possédant une ARN Pol II en pause (en haut). Le promoteur contient la majorité des séquences pour recruter et maintenir l'ARN Pol II en pause, à savoir les séquences GAGA, TATA, Initiator et DPE/PB. L'ARN Pol II, phosphorylée sur la Ser2 de son domaine CTD après avoir échappé au promoteur, est maintenue en pause par le complexe répresseur NELF/DSIF juste après la séquence DPE/PB. L'activation du facteur d'élongation P-TEFb entraîne la libération de NELF, la phosphorylation de l'ARN Pol II sur la Ser5 et son entrée en élongation (en bas). (D'après Levine, 2011).

n'explique toutefois pas comment une seule enzyme peut favoriser les cycles de transcriptions suivants. Il a été proposé que l'ARN Pol II en pause, en plus d'être associée à un PIC déjà présent sur un promoteur ouvert, pourrait « lubrifier » la séquence codante du gène lors du premier cycle de transcription grâce au recrutement de facteurs de remodelage qui augmenteraient la vitesse de transcription (Levine, 2011). De plus, si la présence d'un activateur permet d'induire rapidement l'expression des gènes en pause, sa disparition permettrait de stopper tout aussi rapidement leur expression. La pause serait donc à l'origine d'un mécanisme précis de contrôle de la transition activation/répression de l'expression génique (Hendrix et al., 2008).

La pause pourrait aussi servir à synchroniser de façon précise un groupe de cellules en réponse à un signal (Boettiger and Levine, 2009). Dans le même ordre d'idée, elle pourrait synchroniser l'expression de gènes produisant des protéines appartenant à un même complexe, assurant ainsi sa stœchiométrie (Levine, 2011).

La pause de transcription peut être impliquée également dans le contrôle de l'association de l'ARN à sa coiffe 5' terminale (Gilmour, 2009). Les ARN produits par les promoteurs en pause, en plus d'être coiffés (Nechaev et al., 2010), sont transcrit par une ARN Pol II phosphorylée sur la Ser5 du CTD. Cette modification est connue pour interagir avec les enzymes fixant la coiffe à l'ARN en cours d'élongation (Buratowski, 2009).

Le maintien des promoteurs en pause pourrait enfin avoir une fonction de structuration des chromosomes. En effet, les promoteurs en pause des gènes Hox et de *hsp70* possèdent une activité insulatrice, c'est-à-dire qu'ils permettent de bloquer l'action de séquences « enhancers ». Des mutants pour les gènes codant DSIF, NELF et GAF perdent à la fois l'activité insulatrice des promoteurs en pause et celle des insulateurs classiques. L'hypothèse

proposée est que les insulateurs et les promoteurs s'associent physiquement grâce à DSIF, NELF et GAF, créant des domaines de chromatine en boucle isolant les « enhancers » de leurs cibles (Chopra et al., 2009a).

La transcription est donc un mécanisme extrêmement régulé, et ceci à chaque étape de son cycle. En plus de ces régulations intrinsèques, il existe d'autres niveaux de régulation médiés par des signaux extracellulaires transduits par des voies de signalisation, par exemple les voies de signalisation MAP kinase.

## **II. Le contrôle transcriptionnel par les voies de signalisation MAP kinase (MAPK) : un mécanisme rapide d'activation et de répression de la transcription**

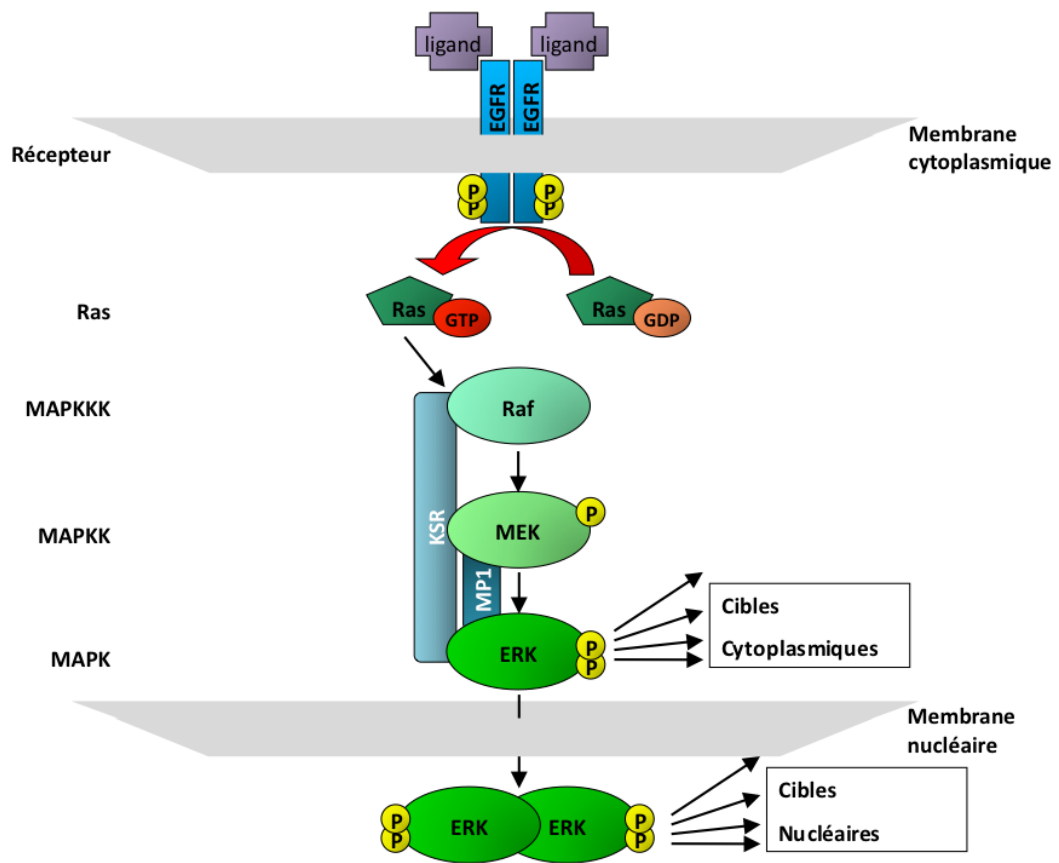
### **A. Les voies de signalisation MAPK**

#### 1 - Présentation

Les voies de signalisation MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) sont des cascades de signalisation conservées au cours de l'évolution qui régulent des fonctions cellulaires aussi variées que la progression du cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la migration, la transcription etc... Elles sont ainsi impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques allant de la réponse hormonale jusqu'au développement de la mémoire en passant par de nombreuses étapes du développement (Ramos, 2008). Leur

dérégulation conduit à l'apparition de nombreuses maladies, comme le diabète, des maladies cardio-vasculaires ainsi que différents cancers (Dhillon et al., 2007; Kim and Choi, 2010). Différents couples ligands-récepteurs permettent d'activer une cascade de signalisation conduisant à l'activation séquentielle par phosphorylation de trois protéines kinases. La MAPK kinase kinase (MAPKKK) active par phosphorylation une MAPK kinase (MAPKK) qui, à son tour, phosphoryle la MAPK. Cette dernière est capable de phosphoryler de très nombreuses cibles, aussi bien cytoplasmiques que nucléaires (**Figure 6**). Le résultat de l'activation d'une voie MAPK dépend des cibles qu'elle phosphoryle, celle-ci étant exprimées différemment selon le type cellulaire (Ramos, 2008).

Il existe trois classes de protéines MAPK répondant à différents types de stimuli. Les kinases p38 et JNK (aussi appelées SAPK) sont activées principalement par le stress, tandis que les MAPK ERK répondent à l'action de facteurs mitogènes tels que des facteurs de croissance. Chez la drosophile, il existe une seule MAPK ERK codée par le gène *rolled*. Celle-ci peut être activée par un récepteur à activité tyrosine kinase tel que le récepteur à l'EGF DER (*Drosophila* EGF Receptor), qui contrôle de nombreux processus au cours du développement. DER possède quatre ligands activateurs différents (Spitz, Keren, Gurken, Vein) ainsi qu'un ligand inhibiteur (Argos) (Shilo, 2003). Spitz, Keren et Gurken sont des ligands trans-membranaires qui doivent être clivés pour se fixer à DER (Ghiglione et al., 2002; Reich and Shilo, 2002; Schweitzer et al., 1995). Ce clivage est assuré par un couple de protéines, Star et Rhomboid (Rho) (Bang and Kintner, 2000). Star est requise pour le transport du ligand du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi où il est clivé par Rho, une sérine-protéase (Tsruya et al., 2002). Alors que Star est exprimée de façon assez homogène, l'expression de Rho présente une spécificité tissulaire et constitue donc un élément limitant de l'activation de la voie (Sturtevant et al., 1993). De plus, *rho* est lui-même



**Figure 6 : Schéma simplifié de la voie MAPK ERK**

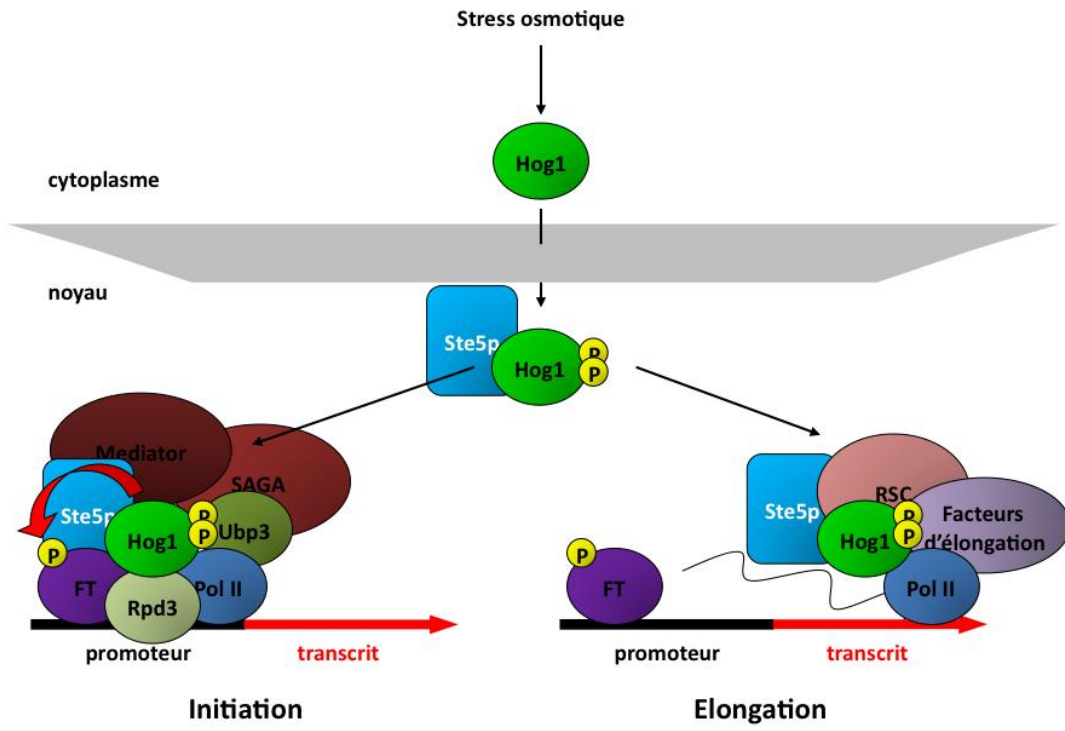
La fixation d'un ligand au récepteur, tel que le récepteur à l'EGF, induit l'auto-phosphorylation du récepteur sur de multiples résidus tyrosine. Cette activation induit la transformation de Ras-GDP en Ras-GTP (*via* une protéine à domaine SH2 et un facteur d'échange SOS non représentés sur le schéma), ce qui permet le recrutement et l'activation de la MAPKKK Raf. Celle-ci phosphoryle et active la MAPKK MEK qui fait alors de même avec la MAPK ERK. ERK activée peut phosphoryler plus de 100 substrats cytoplasmiques ou nucléaires. Dans ce dernier cas, un dimère de ERK activée est transloqué dans le noyau et y phosphoryle notamment des facteurs de transcription. L'activation de cette voie de signalisation nécessite l'intervention de protéines d'échafaudage, dont deux exemples (KSR et MP1) sont représentés, liés aux kinases.

une cible transcriptionnelle de la voie, permettant une auto-amplification du signal (Sapir et al., 1998). Le dernier ligand, Vein, est une protéine sécrétée possédant une activité activatrice plus faible que les ligands trans-membranaires (Schnepp et al., 1996). Enfin, Argos est un ligand sécrété qui inhibe l'activation du récepteur et entre en compétition avec les activateurs. Ce dernier est induit en réponse à l'activation de la voie et permet de réguler le niveau d'activation (Golembo et al., 1996).

## 2 - Les protéines d'échafaudage

Les voies MAPK font également intervenir des protéines d'échafaudage qui permettent une régulation spatiale et temporelle de l'activation. Ces protéines favorisent les interactions entre les différentes kinases, ce qui facilite leur phosphorylation et régule l'intensité du signal. Elles permettent également d'adresser les complexes de kinases à différents compartiments sub-cellulaires (Brown and Sacks, 2009). La stœchiométrie entre les protéines d'échafaudage et les kinases est primordiale pour leur efficacité. Ainsi, une expression trop faible ne sera pas suffisante pour la formation des complexes alors qu'une expression trop forte conduit à la formation de complexes incomplets (Ramos, 2008). Dans le cas de la voie ERK, une des protéines d'échafaudage est KSR. Elle forme un complexe avec Ras, MEK et ERK et permet une activation maximale de la voie (Nguyen et al., 2002; Roy et al., 2002). De plus, son interaction avec la protéine LSP1 permet l'adressage de MEK et ERK au cytosquelette d'actine (Harrison et al., 2004). Sef et MP1 (MEK Partner 1) sont deux protéines d'échafaudage fixant MEK1 et ERK1 et facilitant l'activation de la seconde par la première. Elles permettent l'adressage du complexe ainsi formé à l'appareil de Golgi et aux endosomes respectivement (Schaeffer et al., 1998; Teis et al., 2002; Torii et al., 2004).





**Figure 7: La MAPK Hog1 est une plate-forme d'assemblage sur la chromatine de co-facteurs qui contrôlent la transcription**

En condition de stress osmotique, Hog1 est activée et transloquée dans le noyau. Elle est recrutée, avec sa protéine d'échafaudage Ste5p, sur les promoteurs des gènes de réponse au choc osmotique où elle phosphoryle les facteurs de transcription déjà présents. Hog1 recrute alors un grand nombre de co-facteurs nécessaires à l'initiation de la transcription comme l'histone acétylase Rpd3, la déubiquitinylyse Ubp3 et les complexes SAGA et Mediator. Hog1 et Ste5p sont aussi fixés le long de la séquence transcrite du gène où elles contrôlent l'élongation de la transcription. Pour cela, elles recrutent différents facteurs d'élongation (Spt4, TFIIIS, Paf1 et Thp1) ainsi que le complexe de remodelage de la chromatine RSC. (D'après Proft et al., 2006).

Après leur activation, les MAPK peuvent passer dans le noyau et y phosphoryler de nombreuses cibles dont des facteurs de transcription. Plusieurs exemples chez différents organismes montrent qu'elles peuvent être recrutées directement sur la chromatine pour y phosphoryler ces facteurs de transcription déjà en place, mais aussi d'autres protéines de la chromatine.

## B. Exemples d'action des MAPK sur la chromatine

### 1 - La MAPK Hog1 de *S. cerevisiae* : une plateforme d'assemblage sur la chromatine

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Hog1, une MAPK de type p38, est impliquée dans la réponse au stress, et notamment aux changements d'osmolarité du milieu externe. La voie de signalisation Hog1 est activée par deux senseurs membranaires différents, et l'activation de ses cibles a pour conséquences une augmentation de la concentration interne d'osmolytes, un ralentissement du cycle cellulaire, une réorganisation du cytosquelette et une modification de l'activité métabolique (Chen and Thorner, 2007). Parmi les cibles nucléaires de Hog1 se trouvent les facteurs de transcription Msn2/Msn4, Sko1 et Hot1, permettant de contrôler l'expression d'un vaste réseau de gènes. Cette phosphorylation se produit directement sur la chromatine (**Figure 7**). En effet, Hog1 est recrutée sur les promoteurs de gènes cibles tels que *GPD1*, *CTT1* et *HSP12*, et y active par phosphorylation les facteurs déjà en place Hot1, Msn2/4 (Alepuz et al., 2001). Une fois fixée sur les promoteurs, Hog1 joue un rôle de plateforme d'assemblage pour les complexes contrôlant l'initiation de la

transcription. Hog1 est notamment nécessaire pour recruter l'ARN Pol II sur ces promoteurs. Ce recrutement implique une interaction directe entre Hog1 et l'ARN Pol II, indépendamment de la phosphorylation des facteurs de transcription (Alepez et al., 2003). Hog1 est aussi requise pour le recrutement de plusieurs cofacteurs de l'ARN Pol II stimulant l'initiation de la transcription, dont l'histone désacétylase Rpd3 (De Nadal et al., 2004), le complexe SAGA et le complexe Mediator (Zapater et al., 2007). Hog1 est également capable de transformer un répresseur de la transcription en activateur. En effet, certains gènes de réponse au stress osmotique, tels que les gènes *GRE2*, *AHP1* et *HAL1*, sont réprimés par le complexe répresseur de la transcription Sko1-Cyc8-Tup1 en absence de stress. En présence d'un excès de sel dans le milieu, Hog1 est recrutée aux promoteurs par Sko1 et le phosphoryle. Le complexe répresseur devient alors un complexe activateur (Proft and Struhl, 2002). Enfin, Hog1 recrute sur la chromatine et active par phosphorylation l'ubiquitine protéase Ubp3, dont l'action est d'empêcher la dégradation des protéines en les dé-ubiquitinylant. Ubp3 protège alors de la dégradation les facteurs de transcription et l'ARN Pol II, ce qui favorise l'activation de la transcription. (Sole et al., 2011).

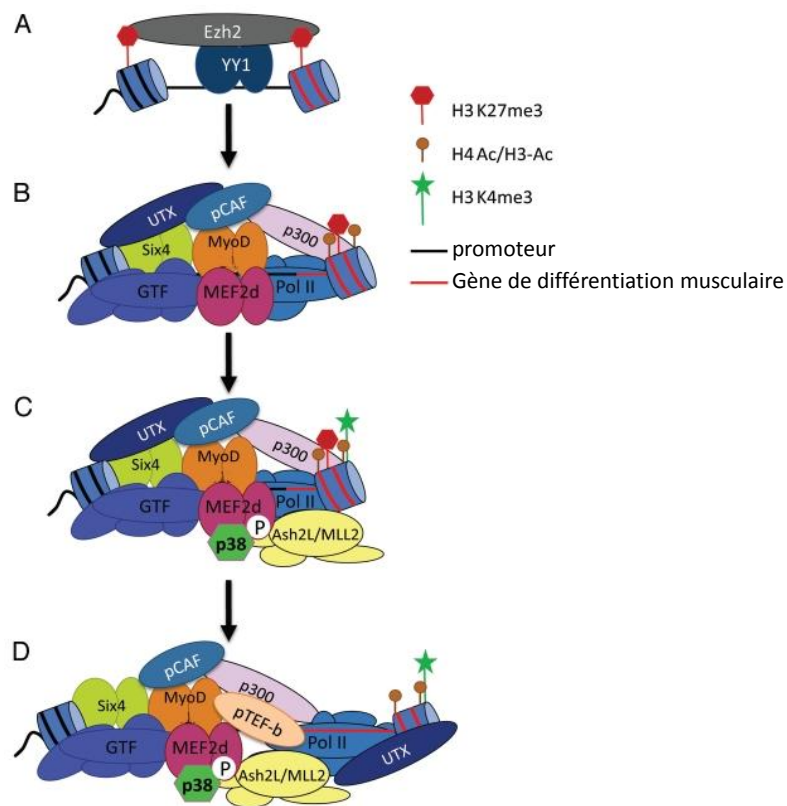
L'étude de la fixation de Hog1 à la chromatine par CHIP-chip a permis de compléter ces résultats en montrant que Hog1 n'est pas fixée uniquement sur le promoteur des gènes mais sur toute la séquence codante ainsi que sur la région 3'-UTR (Proft et al., 2006). Le rôle de Hog1 ne s'arrête donc pas au contrôle de l'initiation de la transcription mais concerne également les étapes d'élongation et de terminaison de la transcription. En effet, Hog1 interagit directement avec les facteurs d'élongation de la transcription Spt4, TFIIS, Paf1 et Thp1 (Proft et al., 2006) et aussi avec le facteur de remodelage de la chromatine RSC, de la famille SWI/SNF (Mas et al., 2009). RSC facilite la progression de l'ARN Pol II et de Hog1, qui

voyagent ensemble le long de la séquence codante des gènes de réponse au choc osmotique.

Ces différentes études ont révélé un rôle inattendu de la MAPK Hog1 dans le contrôle de la transcription, qui s'étend au-delà de la simple phosphorylation des facteurs de transcription cibles. Hog1 constitue en effet une véritable plateforme d'assemblage sur la chromatine, recrutant de nombreux complexes favorisant les différentes étapes de la transcription (initiation, élongation, terminaison). Cette propriété est partagée par plusieurs autres kinases de levure appartenant ou non à la famille des MAPK (Chow and Davis, 2006). On peut ainsi citer à titre d'exemple les MAPK Fus3P et Kss1 de la voie de réponse aux phéromones sexuelles, qui se fixent elles aussi sur le promoteur et la séquence codante de gènes de réponses aux phéromones tel que *AGA1*. Dans cet exemple particulier, il a été montré que, de façon surprenante, la protéine d'échafaudage Ste5p, permettant de former un complexe entre les trois kinases de la cascade de signalisation, est elle aussi fixée à la chromatine avec les MAPK (Pokholok et al., 2006).

## 2 - La MAPK p38 contrôle différentes étapes de la transcription au cours de la différenciation musculaire

Cette fonction des MAPK sur la chromatine n'est pas restreinte aux eucaryotes unicellulaires, plusieurs exemples étant aussi connus chez les mammifères. Par exemple, p38, JNK et ERK1/2 sont recrutées sur le promoteur de l'insuline et contrôlent sa transcription en réponse à un changement de glycémie (Lawrence et al., 2008; Lawrence et al., 2009). Mais l'exemple le plus documenté est celui de la MAPK p38 au cours de la différenciation musculaire.

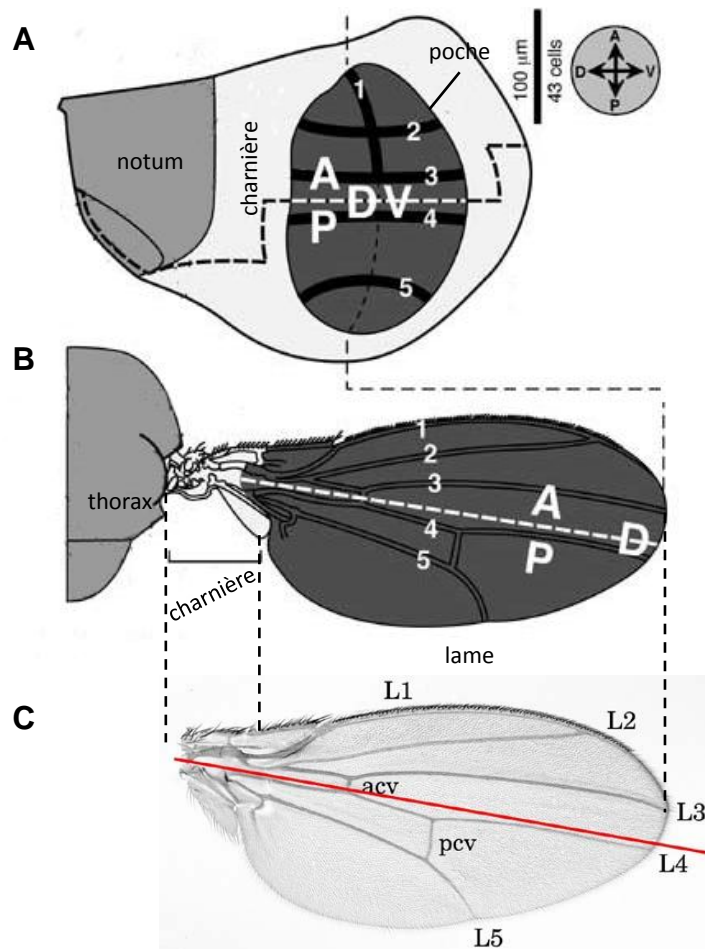


**Figure 8 : Modèle de l'activation des gènes de la différenciation myogénique par la MAPK p38**

(A) Avant différenciation, YY1 recrute l'histone méthyltransferase EZH2 qui dépose la marque épigénétique répressive H3K27me3 sur les gènes de différenciation musculaire. (B) Les facteurs de transcription MyoD, MEF2 et Six4 se fixent au promoteur de ces gènes et y recrutent l'histone déméthylase UTX, les histones acétyltransferases pCAF et p300 ainsi que l'ARN Pol II. Le promoteur est alors déméthylé, acétylé et l'ARN Pol II est maintenue en pause. (C) L'activation et la fixation de p38 sur le promoteur conduit à la phosphorylation de MEF2 et au recrutement de l'histone méthyltransferase Ash2 qui dépose la marque activatrice H3K4me3. P-TEFb est ensuite recruté, phosphoryle l'ARNpolIII qui devient alors processive. La polymérase est accompagnée le long du gène par UTX qui retire la marque H3K27me3 sur le corps du gène. (D'après Aziz et al., 2010).

L'analyse par immunoprécipitation de la chromatine des sites de fixation de p38 a révélé sa présence sur le promoteur du gène *Myog* ainsi que sur la séquence « enhancer » de *Ckm*, deux gènes impliqués dans la différenciation myogénique (Simone et al., 2004). Toutefois, p38 n'a jamais été détectée sur la séquence codante de ces gènes. Plusieurs observations suggèrent que p38 serait recrutée à la chromatine par les facteurs de transcription MyoD et MEF2. p38 n'est pas impliquée dans le contrôle des premières étapes de l'activation de la transcription comme le recrutement d'autres facteurs de transcription ou l'acétylation du promoteur, mais son activation est requise pour le recrutement et la phosphorylation du facteur de remodelage de la chromatine SWI/SNF et l'entrée en élongation de l'ARN Pol II (Simone et al., 2004).

L'activation de certains gènes de la différenciation myogénique semble donc se faire en deux temps (**Figure 8**). Avant différenciation, les promoteurs des gènes myogéniques sont fixés par YY1 et l'histone méthyltransférase EZH2 qui triméthyle l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3), constituant un environnement chromatinien répressif pour la transcription (Caretta et al., 2004). Au cours de la première étape de l'activation, le recrutement sur les promoteurs et les séquences régulatrices de facteurs de transcription tel que MyoD, Six4 et MEF2 permet le recrutement de l'ARN Pol II ainsi que des acétyltransférases p300 et pCAF, de l'histone déméthylase UTX et d'autres modificateurs de la chromatine (Aziz et al., 2010; Rampalli et al., 2007; Seenundun et al., 2010; Simone et al., 2004). Cependant, ces événements ne sont pas suffisants pour démarrer la transcription et résultent en un promoteur qui reste en état de pause transcriptionnelle. Au cours d'une seconde étape, l'activation de p38 et son recrutement sur les promoteurs et les séquences régulatrices induit la phosphorylation de MEF2. Cet événement conduit au recrutement de l'histone méthyltransférase Ash2L, du complexe SWI/SNF et du facteur d'élongation de la



**Figure 9 : Structure du disque imaginal d'aile (A) et de l'aile adulte (B, C) de *Drosophila melanogaster***

(A) Au troisième stade larvaire, le disque d'aile contient environ 50 000 cellules pour une taille d'approximativement 300 x 450µm, constituant le plus grand disque imaginal de *Drosophila melanogaster*. Il contient trois zones majoritaires : le notum, qui formera la moitié du thorax dorsal ; la poche, qui formera la lame de l'aile ; la charnière, entourant la poche et qui permettra l'attachement de l'aile au thorax. (B) Schéma d'aile adulte montrant les frontières antéro-postérieure (AP) et dorso-ventrale (DV) (en pointillés). Les lignes noires représentent les futures veines numérotées de 1 à 5. (C) Photographie d'une aile montrant les veines longitudinales (L1 à L5) et les veines transversales antérieure et postérieure (acv et pcv). Le trait rouge figure la position de l'axe antéro-postérieur. (D'après Lewis et Hedel, 2002).

transcription P-TEFb (Giacinti et al., 2006; Rampalli et al., 2007; Simone et al., 2004). L'ARN Pol II entre alors dans une phase d'élongation processive, accompagnée par UTX qui supprime la marque épigénétique répressive H3K27me3 encore présente sur le corps du gène (Aziz et al., 2010; Seenundun et al., 2010).

Ces deux exemples montrent que, chez la levure et les mammifères, les différentes étapes de la transcription peuvent être contrôlées directement sur la chromatine par les MAPK. Ce mécanisme peut permettre une adaptation rapide et efficace de l'état de transcription des gènes en réponse à un signal extérieur, comme un stress ou un signal développemental. Les travaux de l'équipe Chromatine et Développement où j'ai réalisé ma thèse suggèrent qu'un tel mécanisme pourrait aussi exister chez la drosophile, au cours du développement des tissus de l'aile.

### III. Les grandes étapes du développement de l'aile de *Drosophile*

#### A. Présentation de l'aile de *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster* est un diptère et possède donc une paire d'ailes, comme tous les insectes de cet ordre. Leur observation révèle une organisation particulièrement stéréotypée au sein de l'espèce (Crozatier et al., 2004) (**Figure 9**). La lame de l'aile est rattachée au corps de la mouche au niveau du thorax dorsal ou notum par l'intermédiaire de la charnière. Elle est constituée d'un double feuillet de cellules épithéliales contenant deux tissus majoritaires : le tissu de nervures et le tissu d'inter-nervures. Pour qualifier ces deux tissus, j'emploierai par la suite les termes de veines et d'interveines, issus d'un anglicisme



mais les plus couramment utilisés. A cela, il faut ajouter des organes sensoriels, tels que des soies réparties essentiellement sur le tour de l'aile, appelée marge, et des soies campaniformes sur les veines. Ces organes permettent le contrôle du vol (Bate. M, 2004).

Chez *Drosophila melanogaster*, il existe cinq veines longitudinales, numérotées de L1 à L5, et deux veines transversales, appelées acv et pcv pour « cross-veines » antérieure et postérieure (De Celis, 2003). Les veines L2 à L5 sont complètes et traversent toute la lame de l'aile jusqu'à sa marge. La veine L1 est en continuité avec l'extrémité antérieure de la marge. Les veines transversales antérieures et postérieures s'étendent respectivement des veines L3 à L4 et des veines L4 à L5. Les veines sont distribuées de part et d'autre de l'axe antéro-postérieur (A/P) de l'aile, ce dernier se situant entre les veines L3 et L4. Les cellules de veines, vivantes dans l'aile adulte contrairement aux cellules d'interveines, sont des cellules cuticulaires plus intensément pigmentées et plus denses que les cellules épidermales d'interveines (Bier, 2000). Elles présentent une surface apicale réduite et expriment peu de molécules d'adhésion à leur surface. Grâce à ces propriétés, les cellules de veines forment des conduits entre les deux feuillets de l'aile, alors que les cellules d'interveines adhèrent fortement les une aux autres, formant une fine membrane. Les veines assurent plusieurs fonctions dans l'aile. D'une part, elles permettent la rigidité de l'aile nécessaire pour le vol. D'autre part, elles servent de canaux conducteurs pour l'hémolymphe et les axones sensoriels. Enfin elles sont requises pour l'évagination de la lame de l'aile lors de la métamorphose (Bier, 2000; De Celis, 2003).

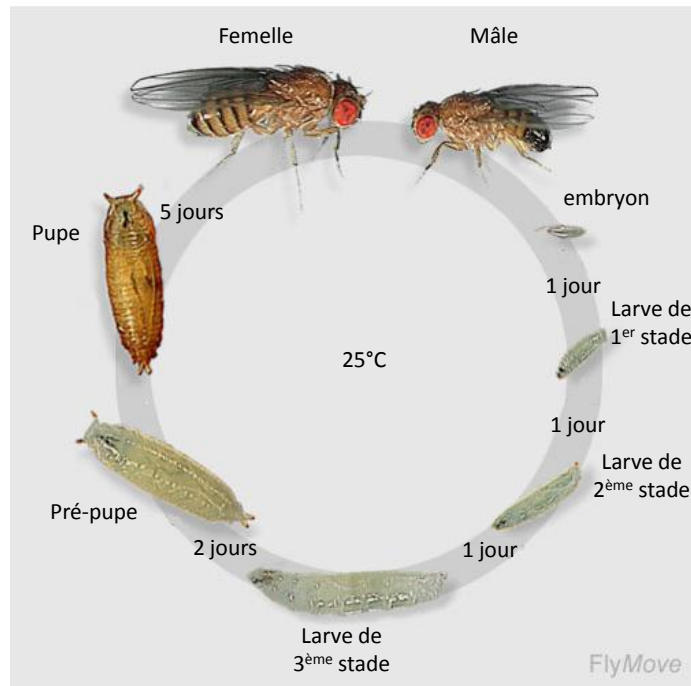
L'aspect le plus surprenant des veines de l'aile est la reproductibilité de leur schéma d'organisation au sein d'un individu et également au sein de l'espèce. Il est couramment admis que l'apparition de l'aile chez les insectes ne s'est produite qu'une seule fois.

L'analyse de la disposition des veines chez différentes espèces suggère l'existence de six veines ancestrales. A partir de ce schéma ancestral, différentes veines secondaires ont pu être acquises ou bien perdues par fusion entre différentes veines et réduction de leur taille. Chez les Diptères par exemple, la sixième veine, située sous la veine L5, a subi une réduction drastique de sa taille, et reste seulement visible sous la partie proximale de la veine L5 (De Celis and Diaz-Benjumea, 2003). Cette grande reproductibilité de la disposition des veines est probablement liée à la robustesse des réseaux génétiques qui sous-tendent le développement du disque imaginal d'aile, la structure larvaire qui donnera la future aile adulte.

## **B. Organisation et développement du disque imaginal d'aile**

La durée de développement de *Drosophila melanogaster* est d'environ dix jours à 25°C. A l'issue de l'embryogenèse, trois stades larvaires se succèdent. A la fin du troisième stade, la larve s'immobilise et forme une puppe dans laquelle les tissus larvaires polypléïdes sont hydrolysés et les tissus diploïdes, dits imaginaires, se différencient en structures adultes. Cinq jours plus tard, un individu adulte éclot de la puppe (**Figure 10**).

Il existe deux types de cellules imaginaires dans une larve. Certaines d'entre elles, par exemple les histoblastes abdominaux qui donneront l'épithélium abdominal adulte, sont isolées et nichées dans les tissus larvaires polypléïdes. D'autres sont organisées en structures compactes formant des sortes de disques appelés disques imaginaires (**Figure 11**). Dans une larve, on trouve neuf paires de disques imaginaires, qui formeront la tête, le thorax et leurs appendices, et un disque unique qui formera les structures génitales et anales. Les disques imaginaires sont formés au cours de l'embryogenèse par l'invagination d'une dizaine de



**Figure 10 : Cycle de développement de *Drosophila melanogaster***

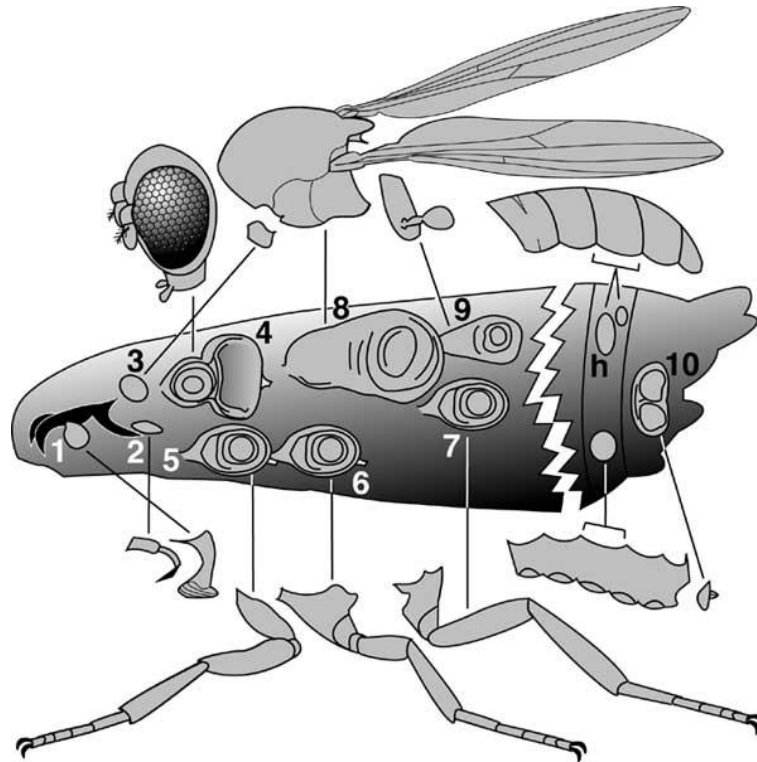
Le cycle de développement de *D. melanogaster* est de 10 jours à 25°C. L'embryogenèse dure 24 heures et aboutit à la formation d'une larve de premier stade. Trois stades larvaires se succèdent alors, les deux premiers ayant une durée de 24 heures et le dernier de 48 heures. A la fin du troisième stade, la larve s'immobilise et forme une pupa. C'est au cours de cette période d'une durée de 5 jours que la métamorphose a lieu.

(D'après [http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life\\_cycle.jpg](http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life_cycle.jpg))

cellules ectodermiques. Celles-ci prolifèrent jusqu'à atteindre quelques dizaines de milliers de cellules à la fin de la vie larvaire. Au cours de la métamorphose, les disques s'évagincent pour donner les appendices adultes (Lewis I. Held, 2002).

Le primordium embryonnaire du disque imaginal d'aile est formé d'environ 40 cellules à la fin de l'embryogénèse, qui prolifèrent jusqu'à atteindre environ 50 000 cellules dans un disque imaginal de larve de troisième stade larvaire. A ce stade, le disque est composé de deux feuillets monocellulaires, l'épithélium colonnaire et la membrane péripodiale, qui délimitent une cavité appelée le lumen. L'épithélium colonnaire est à l'origine des structures adultes de l'aile et est divisé en trois compartiments aux devenir différents. La poche donnera la future lame de l'aile, alors que la partie qui l'entoure deviendra la charnière. La pointe du disque formera la moitié du mésothorax dorsal, ou notum (**Figure 9**). A la métamorphose, les cellules de la membrane péripodiale se contractent et participent très peu aux structures adultes (Bate. M, 2004). La voie de signalisation JNK activée dans ces cellules est cependant requise pour assurer la morphogénèse correcte du thorax (Tripura et al., 2011).

Le développement des disques imaginaires, pour aboutir à la formation des structures adultes, nécessite la mise en place d'axes de polarité proximo-distal (P/D), dorso-ventral (D/V) et antéro-postérieur (A/P). La mise en place de l'axe D/V commence au deuxième stade larvaire par l'expression d'*apterous* (*ap*) dans le futur compartiment dorsal uniquement (**Figure 12A**). *Ap* induit l'activation de *fringe* (*fng*) et *Serrate* (*Ser*) qui vont respectivement inhiber et activer l'activation de Notch. Il en résulte l'activation de Notch dans les cellules ventrales situées à la frontière D/V. Notch active Delta à la frontière D/V qui, à son tour, active Notch mais requiert la présence de *Fng*. Notch active également



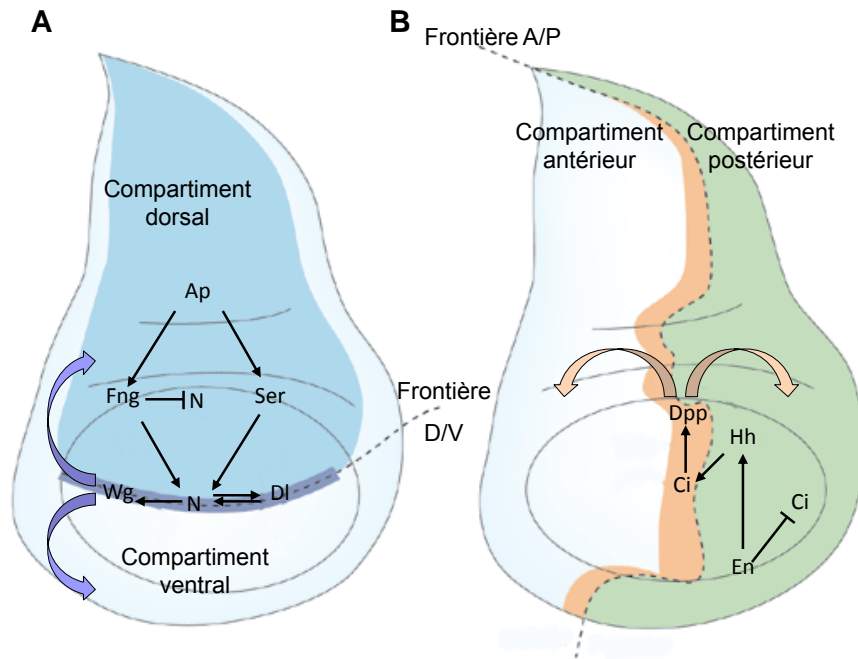
**Figure 11: Carte des tissus imaginaux de la larve de *Drosophile* et des structures adultes auxquelles ils donnent naissance**

La structure externe de la mouche adulte provient de l'assemblage de différentes structures imaginales. Les structures externes de la tête et du thorax sont formées à partir de 9 paires de disques imaginaux (1 à 9) ; un disque unique formera les structures génitale et anale (10) ; la cuticule abdominale est issue de cellules imaginales nichées dans l'épithélium larvaire appelées histoblastes (h).

1 : disque labial ; 2 : disque clypéolabral ; 3 : disque prothoracique ; 4 : disque d'œil-antenne ; 5 : disque de patte (1<sup>er</sup>) ; 6 : disque de patte (2<sup>ème</sup>) ; 7 : disque de patte (3<sup>ème</sup>) ; 8 : disque d'aile ; 9 : disque de balancier ; 10 : disque génital ; h : nids d'histoblastes. (D'après Lewis et Hedel, 2002).

l'expression de *Ser*. Il en résulte une boucle de rétro-contrôle permettant l'expression de Notch dans les cellules situées à la frontière D/V. Au milieu du troisième stade larvaire, Notch induit l'expression de *wingless (wg)* qui code un morphogène. La diffusion de Wg à partir de l'axe D/V permet la spécification des cellules selon l'axe D/V (Gonzalez et al., 2006).

La mise en place de l'axe antéro-postérieur (A/P) commence avant celle de l'axe D/V et est initiée par l'expression du gène *engrailed (en)* codant un facteur de transcription à homéodomaine (**Figure 12B**). *en* est exprimé dans le compartiment postérieur du disque, où il active l'expression de *hedgehog (hh)* qui code une molécule de signalisation capable de diffuser sur une courte distance de 8 à 9 cellules. En même temps, *en* bloque la réponse à la signalisation Hh dans le compartiment postérieur en réprimant l'expression de l'effecteur de la voie Hh, *cubitus interruptus*. *en* permet donc au compartiment postérieur d'émettre un signal Hh auquel il ne peut pas répondre lui-même. Ce type de signal est appelé « pour export seulement » (Bier, 2000). Hh diffuse dans les quelques cellules situées à la frontière entre les deux compartiments, qui sont les seules à pouvoir répondre à cette voie de signalisation, et vont constituer le centre organisateur antéro-postérieur. L'activation de la voie Hh dans cette bande d'environ cinq cellules induit l'expression de nombreux gènes dont celui codant le morphogène Decapentaplegic (Dpp). Dpp diffuse alors de part et d'autre du centre organisateur, créant un gradient qui organise l'aile selon l'axe A/P en permettant l'expression de différents gènes cibles de façon dose-dépendante (Lewis I. Held, 2002). L'expression de ces gènes permet la mise en place, selon l'axe A-P, des tissus de veines et d'interveines. La polarité antéro-postérieure est donc directement impliquée dans le positionnement et la différenciation des veines de l'aile adulte.



**Figure 12 : Mise en place des axes de polarité dans le disque d'aile**

A : Mise en place de l'axe dorso-ventral. Les compartiments ventral et dorsal sont respectivement représentés en blanc et en bleu. Le centre organisateur D/V à partir duquel diffuse le morphogène Wg est représenté en violet. Les flèches violettes représentent le sens de diffusion de Wg.

B : Mise en place de l'axe antéro-postérieur. Les compartiments antérieur et postérieur sont respectivement représentés en blanc et en vert. Le centre organisateur A/P à partir duquel diffuse le morphogène Dpp est représenté en orange. Les flèches oranges représentent le sens de diffusion de Dpp. (D'après Kiecker et Lumsden, 2005).

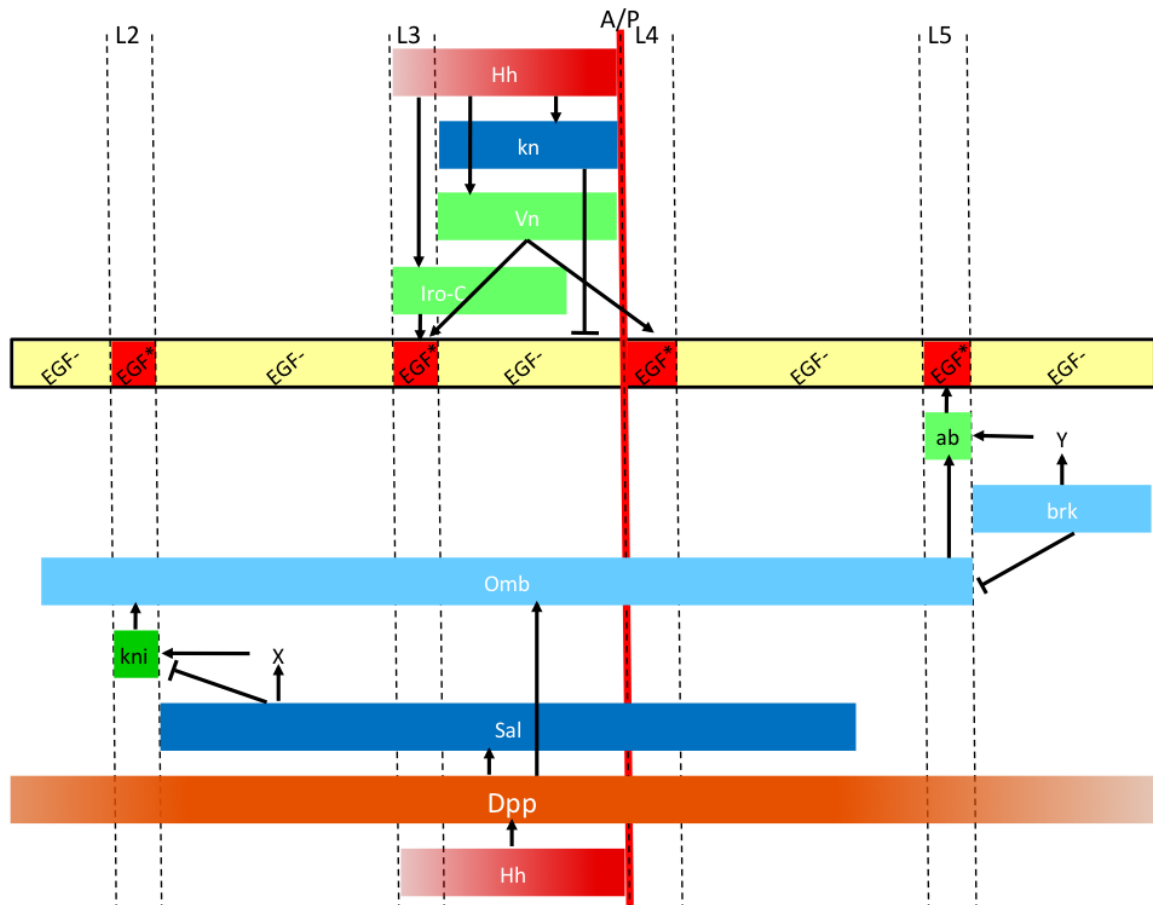
### C. Spécification et différenciation des tissus de veine et interveine

La première étape de la formation des veines longitudinales se déroule au début du troisième stade larvaire et consiste en la mise en place de pro-veines au sein d'un tissu constituant les futures interveines. Les pro-veines sont des bandes de quelques cellules de large parfaitement symétriques par rapport à l'axe D/V et parallèles à l'axe A/P (De Celis, 2003). Une fois les territoires de pro-veines définis, chacun d'entre eux exprimera une combinaison particulière de facteurs de transcription (**Figure 13**).

Les pro-veines L3 et L4 sont spécifiées respectivement à la frontière antérieure et postérieure du centre organisateur antéro-postérieur. En effet, dans le centre organisateur, différents gènes sont activés par la voie de signalisation Hh. Parmi eux se trouvent *vein* (*vn*) et *knot* (*kn*). *vn* code un ligand du récepteur à l'EGF DER capable de diffuser dans les cellules voisines. Le récepteur DER activé induit l'activation de la MAPK ERK. *kn* code quant à lui un répresseur de la voie DER/ERK agissant de façon cellule autonome. Il en résulte un signal « pour export seulement » qui permet d'activer la voie DER/ERK uniquement dans les cellules adjacentes au centre organisateur A/P et d'y établir une identité pro-veine (Crozatier et al., 2002; Mohler et al., 2000). Toutefois, si *vn* est suffisant pour définir la veine L4, la formation de la veine L3 requiert également l'activation des gènes du complexe *iroquois* qui sont exprimés dans toutes les veines portant un numéro impair (de Celis and Barrio, 2000).

Les positions des pro-veines L2 et L5 sont définies par le gradient de morphogène Dpp. Un niveau moyen de Dpp induit l'expression des deux gènes du complexe *spalt* (*sal*), *spalt* et *spalt-related*, ainsi que du gène *optomotorblind* (*omb*). Les protéines codées par le complexe *sal* sont capables, sans doute de façon indirecte, d'activer l'expression de *knirps* (*kni*) dans les cellules adjacentes alors qu'elles la répriment de façon cellule autonome. Il en résulte



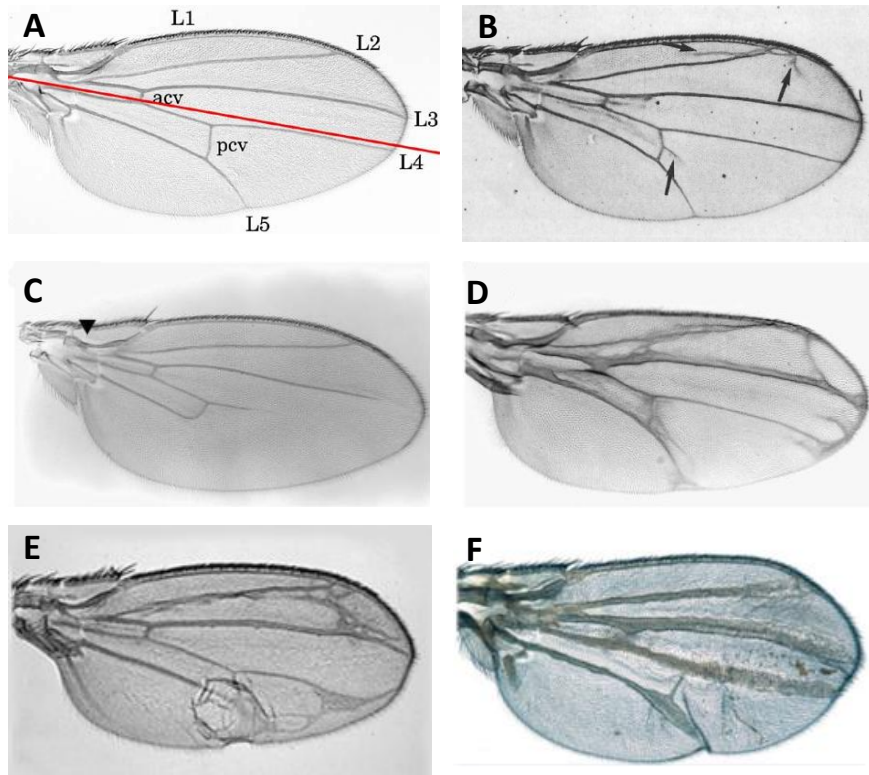


**Figure 13 : Expressions géniques impliquées dans la mise en place des pro-veines L2 à L5 dans le disque imaginal d'aile**

La ligne rouge verticale représente l'axe A/P et les pointillés délimitent le positionnement des futures veines L2 à L5. Le rectangle central représente l'état d'activation de la voie DER/ERK, en jaune pour un état inactif (EGF-) et en rouge pour un état actif (EGF\*). Les bandes de couleur représentent les domaines d'activation des différents gènes impliqués dans le positionnement des pro-veines. Hh et Dpp sont représentés en dégradés de couleurs corrélant avec leur gradient de concentration. (D'après Crozatier et al., 2004 et Cook et al., 2004).

une expression localisée de *kni* à la frontière antérieure du domaine d'expression du complexe *sal*, ce qui permet de définir la position de la future veine L2 (de Celis and Barrio, 2000). Dans les parties les plus éloignées du centre organisateur, là où le signal Dpp est le plus faible, l'expression de *brinker (brk)* est activée (Cook et al., 2004). Brk active dans les cellules adjacentes, et de façon indirecte, l'expression du gène *abrupt (ab)* et réprime celle de *omb* de façon cellulaire autonome. Omb est lui aussi requis pour activer l'expression de *ab* de façon cellulaire autonome. Il en résulte l'expression spécifique de *ab* à la frontière entre les domaines d'expression de *brk* et *omb*, ce qui définit la position de la pro-veine L5 (Cook et al., 2004).

Au milieu du troisième stade larvaire, chaque pro-veine exprime ainsi son propre répertoire de facteurs de transcription défini par son éloignement par rapport à l'organisateur A/P. Toutefois, ces différentes combinaisons conduisent à un seul et même mécanisme impliquant le récepteur DER et la MAPK ERK. En effet, l'acquisition de l'identité de pro-veine nécessite l'activation par phosphorylation de ERK. Ainsi, la sur-activation de la voie DER/ERK grâce à l'expression d'une forme constitutivement active de ERK, codée par le gène *rolled (rl)*, conduit à l'apparition de veines ectopiques dans l'aile (**Figure 14B**), alors que l'expression d'une forme dominant négatif de DER induit une perte de veines (Brunner et al., 1994; Sotillos and De Celis, 2005). L'activation de ERK dans les proveines se traduit par le maintien de l'expression de *rhomboid (rho)*, qui constitue le premier marqueur connu commun à toutes les futures veines (Bier, 2000; Sturtevant et al., 1993). Rho, qui est nécessaire à l'activation des ligands transmembranaires de DER comme nous l'avons vu précédemment, est requis pour la formation des veines. Ainsi, un mutant perte de fonction pour *rho* induit une perte de veines alors que sa surexpression produit des veines ectopiques (Sturtevant and Bier, 1995; Sturtevant et al., 1993) (**Figure 14C-D**). L'expression de *rho* est



**Figure 14 : Phénotypes d'ailes de différents mutants de gènes impliqués dans la formation des tissus veineux et interveineux**

**A** : Aile d'un individu sauvage. Le trait rouge figure la position de l'axe antéro-postérieur. **B** : Aile dans laquelle ERK est constitutivement activée (génotype  $r^{sem}/+$ ), présentant plusieurs veines ectopiques notées par des flèches (Brunner et al., 1994). **C** : Aile d'un mutant perte de fonction pour *rhomboid* (génotype  $rho^{ve/ve}$ ) présentant une perte importante du tissu de veine (Sturtevant and Bier, 1995). **D** : Aile d'un individu sur-exprimant *rhomboid* sous le contrôle du promoteur de *hsp70* (génotype  $hs::rho$ ) présentant des veines ectopiques et épaissies (Sturtevant et al., 1993). **E** : Aile d'un mutant perte de fonction pour *blistered* (génotype  $bs^{10/10}$ ) présentant des veines épaissies, des veines ectopiques et une bulle. (Fristrom et al., 1994). **F** : Aile d'un individu exprimant une forme dominant négatif de *Notch* présentant des veines épaissies (De Celis, 2003).

requis dès la fin du troisième stade larvaire mais n'est pas suffisante à elle seule pour la différenciation des veines. Celle-ci requiert également l'expression de *Star* qui est exprimé constitutivement dans le disque d'aile (Guichard et al., 1999). L'activation de ERK dans les futures veines conduit de plus à la répression de l'expression de *blistered (bs)*, qui code l'homologue du SRF (Serum Response Factor) des mammifères. *bs* se retrouve donc exprimé uniquement dans les cellules d'interveine, où il est nécessaire pour inhiber le destin de veines et acquérir le destin d'interveine (Fristrom et al., 1994; Montagne et al., 1996). Ainsi, un mutant perte de fonction pour *bs* induit des veines ectopiques dans l'aile pouvant se traduire, dans le cas des phénotypes les plus forts, par une bulle dans l'aile. Cette bulle est formée par un excès de cellules de veines qui n'adhèrent pas les unes aux autres (Fristrom et al., 1994) (**Figure 14E**). L'expression de *bs* est régulée par différentes séquences « enhancers » spécifiques à chaque région d'interveine. Un « enhancer » permet d'activer l'expression de *bs* par la voie Hh entre les veines L3 et L4, un second permet de l'activer entre les veines L2 et L3 et les veines L4 et L5 en réponse à la voie Dpp (Nussbaumer et al., 2000). Dans les futures cellules d'interveine sont aussi exprimés le facteur de transcription Net et la protéine nucléaire Plexus qui permettent d'empêcher la différenciation en cellules de veine (Brentrup et al., 2000; Matakatsu et al., 1999). L'acquisition de l'identité de veine et d'interveine est donc contrôlée par l'expression différentielle des gènes *bs* et *rho*, cibles de la voie ERK, qui sont également capables de s'autoréguler (Roch et al., 1998).

Après le positionnement et la spécification des pro-veines, un mécanisme d'interaction entre la voie DER/ERK et la voie Notch permet de maintenir, mais également de restreindre, le destin de veine. En effet, l'activation de la voie DER/ERK dans les pro-veines entraîne l'expression de Delta (DI), le ligand de la voie Notch. La voie Notch est alors activée dans les cellules d'interveines bordant les pro-veines. Notch déclenche la transcription de *Enhancer*

of *split mβ* (*E(spl)mβ*) qui réprime la formation des veines en inhibant l'expression de *rho* et *Star* (de Celis et al., 1997; Huppert et al., 1997). Cette connexion entre ces deux voies de signalisation permet donc de restreindre l'activation de la voie DER/ERK au centre des pro-veines, qui acquièrent ainsi leur largeur définitive en début de stade pupal. Ainsi, la surexpression d'un dominant négatif de Notch se traduit par des veines épaissies (**Figure 14F**). Au stade pupal, la voie DER/ERK induit l'expression de *dpp* dans les pro-veines où elle est nécessaire et suffisante pour induire la différenciation des cellules en cellules de veine (Sotillos and De Celis, 2005). Les gènes *ventral veinless* et *nubbin*, requis pour la formation des veines, voient leur expression se restreindre progressivement aux futures veines (De Celis, 2003).

Enfin, pendant la métamorphose, la poche de l'aile s'évagine et ses faces dorsale et ventrale s'accolent l'une à l'autre, ce qui forme la lame de l'aile. Chaque veine dorsale forme une veine complète avec son homologue ventral. Cependant, le mécanisme par lequel les deux moitiés de veines s'accolent pour former une veine parfaitement ajustée n'est pas encore compris (De Celis, 2003).

Le cas de la veine L1 est différent de celui des autres veines longitudinales. Celle-ci est défini perpendiculairement au domaine d'expression de *Dpp*, le long de la future marge, et ne dépend donc pas de ce morphogène. De plus, si la veine L1 exprime les mêmes gènes que les autres lors du stade pupal, l'expression de la voie DER/ERK n'est pas requise pour sa détermination (Lewis I. Held, 2002). Les deux veines transversales ("cross-veines" antérieure et postérieure) sont, quant à elles, mises en place d'une façon différente et plus tardivement au cours du stade pupal (Shimmi et al., 2005).

Le développement des tissus de l'aile consiste donc en la différenciation d'un tissu minoritaire, le tissu de veine, au sein d'un autre tissu largement majoritaire, le tissu d'interveine. L'enchaînement spatio-temporel précis de l'activation de réseaux géniques par différentes voies de signalisation, suivi du maintien mais également de la restriction de leur activité, permettent le développement des veines. Ces enchaînements complexes suggèrent l'existence de mécanismes permettant de changer rapidement le profil d'expression de certains gènes mais également de les maintenir. Un modèle impliquant le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF Brahma a été proposé pour expliquer de telles propriétés.

#### **D. Rôle du complexe SWI/SNF Brahma dans la différenciation des tissus de l'aile**

Le complexe Brahma (Brm) de *Drosophila* est l'homologue des complexes SWI/SNF de la levure et l'homme. C'est un complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant, composé d'au moins huit sous-unités différentes (Martens and Winston, 2003; Vignali et al., 2000) (**Tableau 4**). L'une d'entre elle porte à la fois une activité ATPase, une activité de remodelage des nucléosomes et un bromodomaine. Chez la *Drosophila*, il s'agit de la protéine Brahma (BRM). Les autres sous-unités du complexe ont des fonctions encore mal comprises et sont parfois facultatives. Par exemple, la protéine Osa est présente dans un seul des deux complexes SWI/SNF formés par BRM, le complexe BAP. Elle possède un domaine ARID de fixation à l'ADN (Collins et al., 1999). Les protéines BAP170 et polybromo sont spécifiques du complexe PBAP (Mohrmann et al., 2004). Enfin, la protéine SNR1, l'homologue de *ini1/hsnf5*, interagit avec BRM et Osa (Marenda et al., 2003). Ces protéines seraient requises pour recruter le complexe Brm sur certains gènes de façon spécifique, des

Levure		Drosophile		Homme	
SWI/SNF	RSC	BAP	PBAP	BAF	PBAF
Swi2/Snf2	Sth1	Brahma	Brahma	BRG1 ou hBRM	BRG1
Swi1/Adr6		OSA		BAF250	
	Rsc1, Rsc2, Rsc4		Polybromo		Polybromo/BAF180
	Rsc9		BAP170		
Swi3	Rsc8	Moira	Moira	BAF170 et BAF155	BAF170 et BAF155
		BAP111	BAP111	BAF57	BAF57
Swp73	Rsc6	BAP60	BAP60	BAF60a	BAF60a ou BAF60b
Swp61/Arp7 Swp59/Arp9	Rsc11/Arp7 Rsc12/Arp9	BAP55	BAP55	BAF53	BAF53
		actin	actin	actin	actin
Snf5	Sfh1	Snr1	Snr1	hSNF5/INI1	hSNF5/INI1
	Rsc5, 7, 10, 13-15				
	Rsc3, Rsc30				
Swp82					
Swp29/Tfg3/ TAF30/Anc1					
Snf6, 11					

**Tableau 4 : Structure des complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF chez la levure, la drosophile et l'homme**

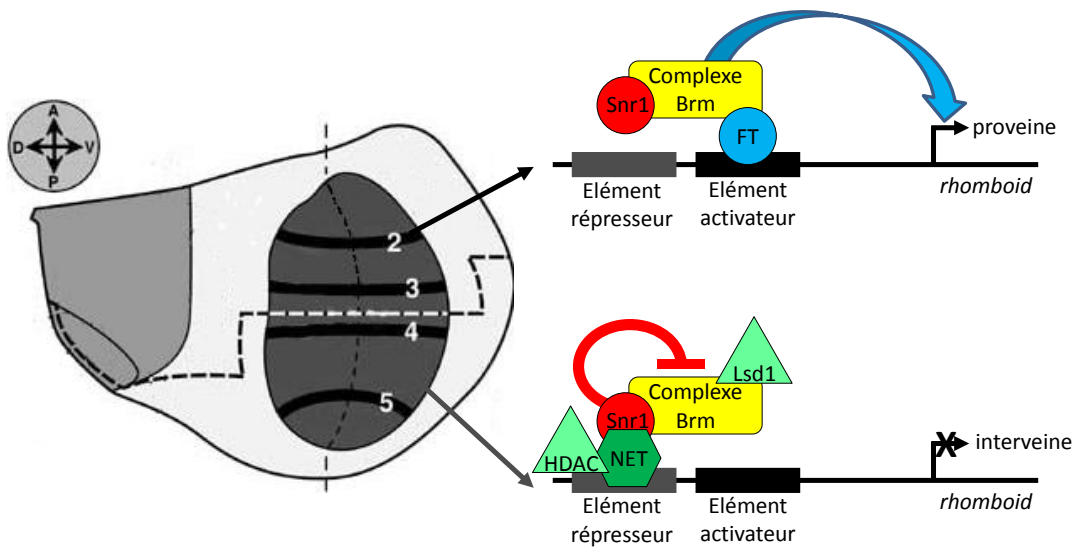
Les sous-unités conservées sont regroupées sur une même ligne, la sous-unité contenant l'activité ATPase se trouvant en haut de la liste. (D'après Mohrmann et Verrijzer, 2005).

mutants pour les différents co-facteurs présentant des phénotypes différents et parfois opposés. Ainsi, si *osa* agit de façon synergique avec *brm* au cours du développement des veines, *snr1* a quant à lui un rôle antagoniste (Collins et al., 1999; Marena et al., 2003).

Chez la Drosophile, le complexe Brm a été initialement identifié comme un activateur de la transcription grâce à son action de remodelage de la chromatine permettant d'augmenter l'accessibilité de l'ARN Pol II. Cependant, il est parfois impliqué de façon directe dans la répression de la transcription. Cette fonction est encore peu connue mais semble requérir l'activité de remodelage de la chromatine du complexe et son interaction avec des histones déacétylases (HDAC) (Martens and Winston, 2003). Par exemple, chez les mammifères, le suppresseur de tumeur Prohibitine recrute le complexe SWI/SNF aux promoteurs dépendants de E2F et inhibe ainsi l'activation de la transcription par E2F (Wang et al., 2002). D'autre part, le complexe répresseur de la transcription REST/coREST recrute le complexe SWI/SNF sur des gènes neuronaux et est requis pour la répression de leur transcription (Battaglioli et al., 2002). Enfin, la sous-unité INI1/hSNF5 du complexe SWI/SNF se fixe au promoteur de *cyclin D1* et y recrute HDAC1, résultant en la déacétylation du promoteur et la répression de la transcription de *cyclin D1* (Zhang et al., 2002).

Chez la Drosophile, les mutants de gènes du complexe Brm présentent de nombreux phénotypes développementaux (Elfring et al., 1998). Une perte de fonction totale de *brm* est létale, indiquant son rôle essentiel au cours du développement. Une perte de fonction partielle de *brm* conduit à un large éventail de transformations homéotiques, comme la transformation de balancier en aile ou de la première paire de pattes en seconde paire de pattes. Les mutants *brm* présentent aussi des modifications du système nerveux périphériques mises en évidence par des défauts dans la mise en place des organes





**Figure 15: Modèle de régulation de la transcription des gènes pro-veines par le complexe Brahma selon le type cellulaire**

A gauche est représenté un disque d'aile avec les bandes d'expression de *rhomboid* (*rho*) (en noir), le premier facteur spécifique des pro-veines. L'action opposée du complexe Brm sur le promoteur dans les futures cellules de veines et d'interveines conduirait à l'expression différentielle de *rhomboid*. (D'après Marena et al., 2004).

sensoriels adultes. Enfin, différents mutants de gènes codant des sous-unités du complexe Brm présentent des phénotypes concernant la mise en place des tissus de l'aile. Par exemple, un mutant dominant négatif de *brm* présente une perte de veines. Au contraire, une perte de fonction BAP170 induit des veines ectopiques (Rendina et al., 2010). Un mutant perte de fonction de *snr1* présente également des veines ectopiques (Marenda et al., 2003; Zraly et al., 2003). Ce phénotype est aggravé par des allèles perte de fonction de *osa* et *moira*. Les travaux de Marenda et ses collaborateurs (Marenda et al., 2004) ont permis de montrer que, au cours du développement des tissus de l'aile, la sous-unité Snr1 est capable de moduler l'activité du complexe Brm selon le type cellulaire. Celui-ci possède donc deux effets différents sur le développement des veines (**Figure 15**). Dans le tissu de veines, Brm est important pour promouvoir le destin de veines, potentiellement *via* l'activation de la transcription de *rho*. Dans l'interveine, il interagit avec des co-facteurs différents. Par l'intermédiaire de Snr1, il interagit avec le facteur de transcription Net, exprimé seulement dans les interveines et interagissant génétiquement avec les gènes codants les histones déacétylases HDAC1/Rpd3 et HDAC3 (Marenda et al., 2004). *brm* interagit également avec le gène codant l'histone déméthylase Lsd1 qui réprime le développement des veines. Ce complexe spécifique de l'interveine est requis pour inhiber l'activation de gènes pro-veines. Il est intéressant de noter que Lsd1 forme un complexe avec le répresseur de la transcription coREST, lui-même impliqué dans un autre exemple de répression de la transcription par SWI/SNF (Curtis et al., 2011). Ainsi, le complexe Brm, selon son association avec des co-facteurs spécifiques de certains types cellulaires, possède une activité d'activateur ou de répresseur de la transcription.

L'exemple du complexe SWI/SNF est intéressant pour comprendre les mécanismes permettant de contrôler rapidement l'expression de gènes. En effet, dans le cas du

*Drosophila melanogaster* -----SNAAPAPSPQKDYSIPLHVDCSVEYELPNQPKPPAGQ RVEPLLLMIHPCYFRKMES 55  
*Drosophila pseudoobscura* -----SGATAAAASPQKDYSIPLHVDCSVEYELPNQPKPPAGQ RVEPLLLMIHPCYFRKMES 56  
*Drosophila virilis* -----GGSSSAAVSSNKDYSIPLHVDCSVEYELPNQPKPPAGQ RVEPLLLMIHPCYFRKMES 56  
*Anopheles darlingi* -----AASSMPVQKDFSIPLHVDCSVEYELPNQAKPPVGARVEPLLLMIHPCYFRKMES 53  
*Anopheles gambiae* -----SNMSAVQKDFSIPLHVDCSVEYELPNQAKPPVGARVEPLLLMIHPCYFRKMES 52  
*Acyrtosiphon pisum* -----GSSSGPSGYRVKDFNVPLHVDCSVEYEMPSSAKPPVGGKVEPLLLMIHPSYRKAES 56  
*Solenopsis invicta* VAINGYK----VQEKDYSQPLHVDCSVEYELPSQAKPPPGG--GEPLLLMIHPCYRRAER 55  
*Camponotus floridanus* -----MQPLHVDCSVEYELPSQAKPPPGG--GEPLLLMIHPCYRRAER 41  
*Acromyrmex echinatio* MAACCYEKEVVVQEKDYSQPLHVDCSVEYELPSQAKPPPGG--GEPLLLMIHPCYRRAER 59  
*Pediculus humanus corporis* -----GGPAGPGRPQKDYSRPLHVDCSVEYELPNAKPPVGTKSEPLLLMIHPCYRRAES 55  
*Tribolium castaneum* ---TPPQRTVQVPVQKDYSRPLHVDCSVEYELPNTAKPPQGVNNEPLLLMIHPCYFRKIES 57  
*Daphnia pulex* -----VNRTLSVDPKKDYSAPLHVDCSVEYDLPRIVRPPPGA--EPLLVFAP----- 45  
\*\*\*\*\*::\* : \*\* \* \*\*\*\*\*: \*

*Drosophila melanogaster* QRRSPFVNNMHATA-----RAVSSSSLSSGA---ALGGG-----SGAAVATAPS 97  
*Drosophila pseudoobscura* QRRSPFVNNMQATA-----RTANNSAVSSGA---ALGGG-----GGAAATAPS 96  
*Drosophila virilis* QRRSPFVNNMQATATASA---RSAASSAVSSAA---ALGSG-----AATVAAAPS 100  
*Anopheles darlingi* QRRSPFVNNMPNST-----RSSSSSLVAKSN---ASANSGN-----NSNSNS---S 93  
*Anopheles gambiae* QRRSPFINNMPNSS-----RSSASIAAKAGNGGAVGSGS-----SSSVASNAV 98  
*Acyrtosiphon pisum* RTRSLFVNNMPAAASASSG---RSRPSAAAAAAAAAAAAVGGVC-----GRPTIANAAD 107  
*Solenopsis invicta* ERRSPFVNNLPPAAPTTTTPLSARRNGRRSAAATASASTAG-----VVAVTAATT 107  
*Camponotus floridanus* ERRSPFVNNLPPAAPTTAPMSARRNGRRSAAATASATAASGGVAPGPAATAAIAIAA 101  
*Acromyrmex echinatio* ERRSPFVNNLPPAAPATTPMSARRNGRRSAAAT----- 93  
*Pediculus humanus corporis* QRRSPFINNLP SRQPQPAVAAKRRARPQPAQPQQAQYPVQYAADRQQLWDQMPNLVPI 102  
*Tribolium castaneum* QRRSPFVNNLPSRQPQPAVAAKRRARPQPAQPQQAQYPVQYAADRQQLWDQMPNLVPI 117  
*Daphnia pulex* -PRSSAVASLATPSGYHPSTWTTTATNSRPLPPQWNQQQQQGA-----ASRIKSDKP 97  
\*\* : .:

*Drosophila melanogaster* SSAARRGARAATSA----- 111  
*Drosophila pseudoobscura* SSAARRGARQSA----- 108  
*Drosophila virilis* SSSAAR--RKT----- 109  
*Anopheles darlingi* SSSNSNSNN----- 103  
*Anopheles gambiae* SSSASAAVDSVASRRSAVAAAHKSSS----- 124  
*Acyrtosiphon pisum* GPPPAKKPYAGPAPGVTASTAAGVYGMVTGAV----- 139  
*Solenopsis invicta* SSSTTTTVVPPSSNIVVSSNVVSASVVSPTTSSITSSSV 146  
*Camponotus floridanus* SSSTTTTVVPPSNNNVASTNVVSTSVVSPSTS-IA---- 135  
*Acromyrmex echinatio* ----- 130  
*Pediculus humanus corporis* RAEAVMALLWPEGPPPLYTKPVRPTGKR----- 130  
*Tribolium castaneum* QAYCKRDQLAYSGDSGHWTDPDRSPDRPEDKHILSG--- 153  
*Daphnia pulex* SAASVKSHPAAI----- 109

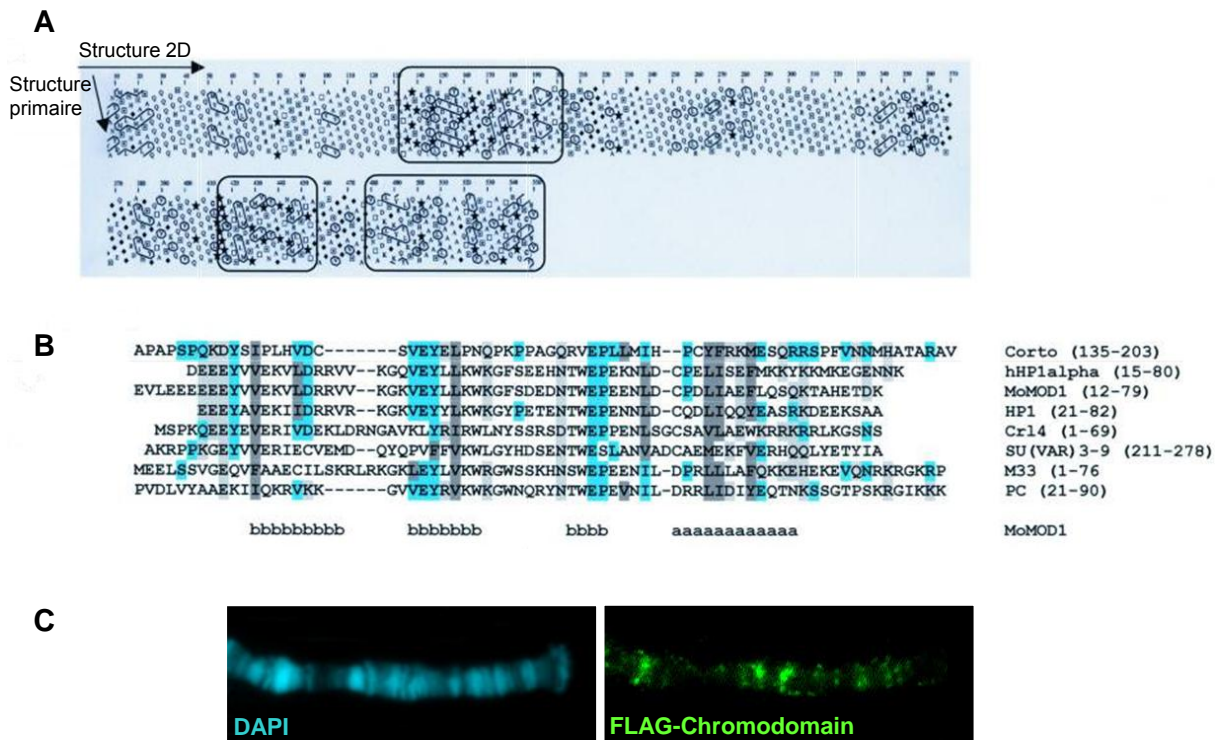
**Figure 16: Conservation de Corto dans l'embranchement des arthropodes**

Alignement de la région située entre les acides aminés 132 et 242 de Corto (couvrant le chromodomaine) de *Drosophila melanogaster* avec l'homologue de Corto chez 10 autres insectes et un crustacé (*Daphnia pulex*).

développement des tissus de l'aile, le complexe SWI/SNF, à la fois activateur et répresseur de la transcription, serait fixé sur des gènes actifs et inactifs. Un simple signal, pouvant prendre la forme d'un co-facteur ou de l'activation d'une voie de signalisation, peut ainsi changer la fonction du complexe et activer ou bloquer la transcription d'un gène cible. Des expériences d'interactions génétiques entre *brm*, *osa*, *Bap170* et des gènes codants des éléments de la voie MAPK ERK, montrent un rôle commun dans la régulation de gènes cibles tels que *Delta*, *rhomboid* et *argos* au cours du développement de l'aile (Rendina et al., 2010; Terriente-Felix and de Celis, 2009).

Ce mécanisme rappelle par certains points ceux décrits dans les paragraphes précédents, au cours desquels des voies de signalisation modifient le recrutement de facteurs à la chromatine, contrôlant ainsi l'expression des gènes. Le passage d'un état répresseur à un état activateur de la transcription des complexes Brm pourrait donc être contrôlé par la voie de signalisation ERK activée dans les pro-veines.

Mon travail de thèse vise à comprendre un mécanisme pouvant jouer un rôle similaire au cours du développement de l'aile, qui impliquerait le facteur chromatinien Corto.



**Figure 17 : Le chromodomaine de Corto**

A : Représentation de l'analyse HCA: les trois domaines globulaires mis en évidence par cette analyse sont encadrés (Salvaing et al., 2003).

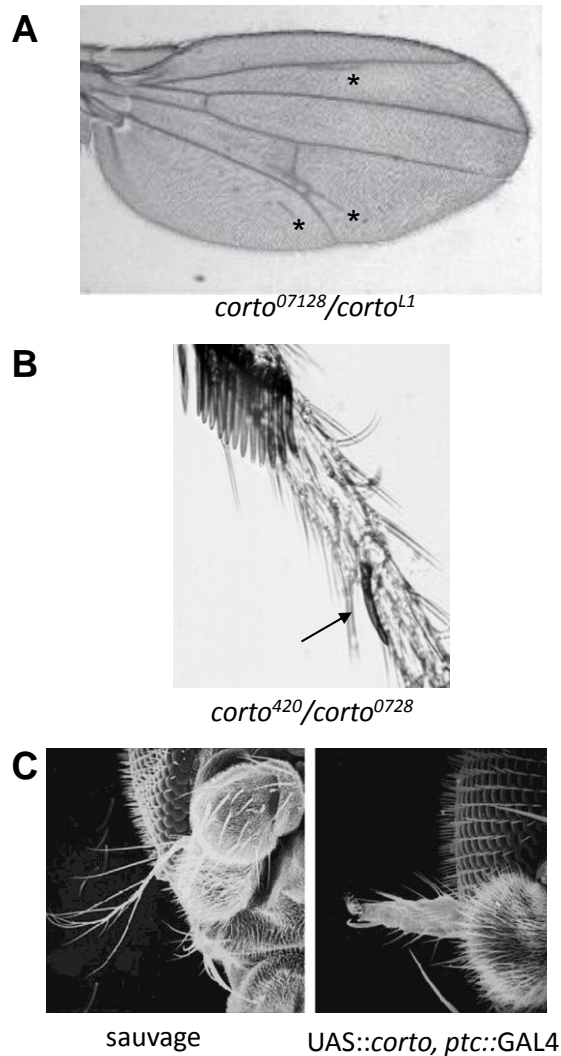
B : Comparaison de la séquence du domaine globulaire formé par les acides aminés 141-196 avec les séquences des chromodomaines des protéines HP1 humaine (hHP1) et de drosophile (HP1), de la protéine de souris MoMOD1, de la protéine de levure Cr14 et de la protéine de drosophile Su(Var)3-9. Les acides aminés identiques ou conservatifs sont représentés en bleu et gris. Leur position sur la structure secondaire de la protéine MoMOD1 est indiquée en bas de l'alignement (b: acide aminé appartenant à un feuillet beta; a: acide aminé appartenant à une hélice alpha) (Salvaing et al., 2003).

C : Analyse de la fixation à la chromatine d'une forme étiquetée du chromodomaine de Corto sur des chromosomes polytènes de glandes salivaires de larves de troisième stade (Coléno et al. soumis).

## IV. Objectifs de la thèse : étude du rôle de Corto et de ses partenaires au cours du développement des tissus de l'aile chez la Drosophile

### A. Le facteur de la chromatine Corto : un Enhancer de Trithorax et Polycomb (ETP)

Le gène *corto* a été identifié en 1998 au cours d'un crible visant à découvrir de nouveaux gènes essentiels au développement de la drosophile (Kodjabachian et al., 1998). Il semble spécifique des arthropodes puisqu'il a été identifié chez plusieurs insectes et un crustacé, alors qu'aucun homologue n'a été identifié dans d'autres embranchements. Par ailleurs la comparaison des séquences disponibles montre que la conservation est restreinte à un domaine particulier, le chromodomaine (voir ci-dessous) (**Figure 16**). Ce résultat suggère une vitesse d'évolution rapide des autres domaines. Le gène *corto* de *Drosophila melanogaster* ne contient pas d'introns et permet la production de deux transcrits de 3,2 et 3,6 kb issus de deux promoteurs différents. Chez l'adulte, seul le plus court est synthétisé et déposé maternellement dans l'embryon. Ces deux transcrits codent une protéine de 550 acides aminés riche en répétitions homopolymériques telles que des séquences polyglutamine, polyhistidine, polyproline. L'analyse prédictive de la structure secondaire de Corto par la méthode HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) révèle l'existence de trois domaines globulaires qui pourraient représenter des domaines fonctionnels. Seul le domaine le plus proche de l'extrémité N-terminale, situé entre les acides aminés 127 et 203, présente une similarité de structure mais également de séquence avec un domaine de type chromodomaine (Salvaing et al., 2003) (**Figure 17A- B**). Les chromodomains sont présents dans de nombreuses protéines de la chromatine comme Polycomb et HP1. Ce sont des domaines d'adressage à la chromatine capables de reconnaître les lysines triméthylées des histones et de fixer les ARN



**Figure 18: Exemples de phénotypes induits par la dérégulation de *corto***

A : Apparition de veines ectopiques dans l'aile d'un individu hétéroallèle pour deux allèles perte de fonction de *corto*. Les veines ectopiques sont indiquées par des astérisques.

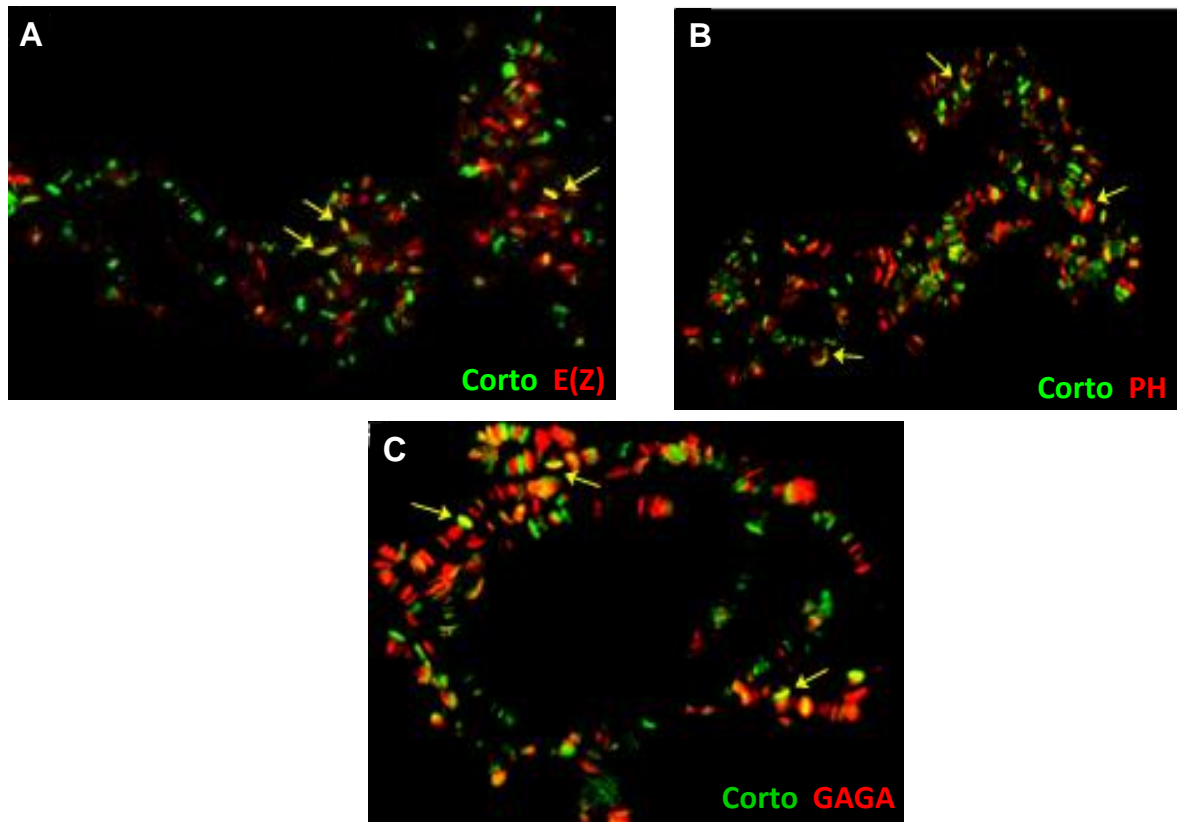
B : Apparition d'une dent de peigne sexuel ectopique (flèche) sur le deuxième article du tarse d'une patte T1 de mâle hétéroallèle pour deux allèles perte de fonction de *corto*.

C : Transformation d'une arista en extrémité de patte chez un individu sur-exprimant *corto* grâce au système UAS/Gal4. (D'après Kodjabachian et al., 1998).

(Brehm et al., 2004). Je reviendrai plus en détail sur les propriétés des chromodomaines dans la troisième partie des résultats. Afin de tester la fonctionnalité d'adressage à la chromatine du chromodomaine de Corto, des lignées transgéniques de drosophile ont été produites au laboratoire, permettant la synthèse d'une forme étiquetée du chromodomaine de Corto (Chromodomaine-FLAG). Des expériences d'immunolocalisation sur chromosomes polytènes montrent que le chromodomaine de Corto est effectivement capable de se fixer à la chromatine en de très nombreux sites (**Figure 17C**) (Coléno et al. soumis).

Les mutants *corto* présentent une forte létalité tout au long du développement. 10% des individus parviennent toutefois au stade adulte. Les survivants présentent de nombreux phénotypes tels que des défauts de soies mécano-sensorielles thoraciques, des veines ectopiques dans l'aile (**Figure 18A**), et un phénotype de type homéotique, l'apparition de peignes sexuels ectopiques (**Figure 18B**). De plus, la surexpression de *corto* grâce au système UAS/Gal4 induit également l'apparition de phénotypes homéotiques tels que la transformation de l'extrémité de l'antenne en patte (Kodjabachian et al., 1998; Lopez et al., 2001) (**Figure 18C**). Ces phénotypes homéotiques, partagés par différents mutants des gènes PcG et TrxG suggèrent que *corto* participerait à la régulation de plusieurs gènes Hox et pourrait se comporter soit comme un activateur de transcription, soit comme un répresseur, en fonction du stade de développement et des gènes cibles considérés. Il a été effectivement montré dans l'équipe que *corto* intervient dans la régulation de l'expression de trois gènes Hox au moins, *Ubx*, *Scr* et *AbdB* (Lopez et al., 2001; Salvaing et al., 2006; Salvaing et al., 2008a). Par ailleurs, des analyses génétiques ont permis de montrer que *corto* interagissait avec des gènes PcG, TrxG et des Enhancers de Trithorax et Polycomb (ETP). De plus, la protéine Corto interagit, *in vitro* comme *in vivo*, avec certaines de ces protéines. Enfin, Corto possède plus de 270 sites de fixation aux chromosomes polytènes de





**Figure 19 : Corto se fixe sur les chromosomes polytènes et co-localise partiellement avec des protéines PcG et ETP**

Co-localisations entre Corto et E(Z) (A), Corto et PH (B), Corto et GAGA (C). L'anti-Corto est détecté en vert, et les autres anticorps sont détectés en rouge. Les flèches indiquent certaines colocalisations. (Salvaing et al., 2003).

drosophile, et plusieurs de ces sites sont communs à d'autres protéines PcG et ETP (Lopez et al., 2001; Salvaing et al., 2006; Salvaing et al., 2003) (**Figure 19**). Le gène *corto* possède donc les caractéristiques d'un ETP, à savoir qu'il se comporte à la fois comme un gène PcG et un gène TrxG (Gildea et al., 2000). De plus, le grand nombre de sites d'adressage à la chromatine de Corto suggère que, outre les gènes Hox, cette protéine serait impliquée dans la régulation de nombreux autres gènes cibles, ce qui peut expliquer la grande variété des phénotypes observés en condition de perte ou de gain de fonction. L'étude approfondie de la régulation de l'expression du gène Hox *Scr* par Corto et un autre ETP, DSP1, a permis de suggérer que la présence au niveau d'un gène cible d'une combinaison particulière d'ETP pourrait permettre le recrutement soit de complexes PcG, soit de complexes TrxG. Suivant les tissus ou les stades de développement, ce gène pourrait ainsi être maintenu soit activé, soit réprimé (Salvaing et al., 2003).

## **B. Objectifs de ma thèse**

Afin de mieux comprendre la fonction moléculaire de Corto, un crible double-hybride a été réalisé au laboratoire, permettant d'isoler plusieurs interacteurs potentiels. Parmi ceux-ci se trouve une cycline atypique, Cycline G. Des travaux ultérieurs ont permis de montrer que, chez la drosophile, cette cycline est un régulateur négatif de la croissance cellulaire et contrôle les phases G1 et S du cycle cellulaire (Faradji et al., 2011). Par ailleurs, Cycline G et Corto interagissent *in vivo* et *in vitro*, co-localisent sur les chromosomes polytènes de glandes salivaires de larves et régulent l'expression d'*AbdB* en se fixant sur son promoteur et son PRE *iab-7* (Salvaing et al., 2008b). Ce crible a également permis d'identifier MP1, une protéine d'échafaudage de la voie MAPK ERK présentée précédemment, et Elongin C, une

sous-unité du complexe d'élongation de la transcription Elongin. Mes travaux de thèse, exposés dans la suite de ce manuscrit (Parties I et II), visent à comprendre le rôle fonctionnel des interactions de Corto avec MP1 et Elongin C au cours de la mise en place des tissus de l'aile chez la drosophile. Nous avons ainsi montré que Corto joue un rôle dans le développement des tissus de l'aile avec MP1 et la MAP kinase ERK (Partie I). L'analyse de l'interaction entre Elongin C et la protéine Corto suggère que celle-ci pourrait participer à la régulation tissu-spécifique de la pause transcriptionnelle du gène pro-veine *rhomboid* (Partie II). Enfin, dans une troisième partie, j'exposerai les résultats préliminaires que j'ai obtenus concernant les propriétés de fixation aux ARN du chromodomaine de Corto.

# RESULTATS

## PARTIE I

### I. Présentation du manuscrit

La protéine d'échafaudage MP1 a initialement été découverte chez la souris dans un crible double-hybride visant à identifier des régulateurs de la MAPKK MEK1. C'est une petite protéine de 15 kDa sans apparente activité enzymatique, qui interagit directement avec les kinases MEK1 et ERK1 et facilite la phosphorylation de la seconde par la première, augmentant ainsi l'activation de la voie de signalisation (Schaeffer et al., 1998). De plus, MP1 interagit avec la protéine p14, localisée sur la face cytoplasmique des endosomes tardifs (Wunderlich et al., 2001). Cette interaction permet au complexe MP1-MEK1-ERK1 d'être recruté sur ces organelles, ce qui constitue une étape importante pour atteindre un niveau optimal d'activation de ERK1 (Teis et al., 2002). L'homologue de MP1 chez la drosophile, aussi appelé dMP1, est codée par un gène exprimé de manière ubiquitaire tout au long du développement. dMP1 possède 45% d'identité en acides aminés avec ses homologues humains et murins. Elle est présente dans le cytoplasme mais également dans le noyau. Elle interagit directement avec ERK et MEK, ce qui suggère que, comme ses homologues mammifères, elle remplit le rôle de protéine d'échafaudage de la voie ERK (Mouchel-Vielh et al., 2008). Afin d'étudier le rôle de *dMP1* au cours du développement de l'aile, et en l'absence de mutant, des lignées permettant d'inactiver ce gène par interférence à l'ARN, ou au contraire de le sur-exprimer grâce au système UAS-Gal4, ont été utilisées. La dérégulation du niveau de *dMP1* au cours du développement de l'aile (par sur-expression ou perte de fonction) induit l'apparition de veines ectopiques au sein du tissu interveineux, un

phénotype traduisant une activation ectopique de la voie DER/ERK. Ce résultat met en évidence l'importance du niveau d'expression de *dMP1* pour réguler de manière correcte l'activation de la voie ERK au cours du développement des tissus de l'aile. Cette propriété est typique des protéines d'échafaudage, qui agissent au sein de complexes protéiques dont la formation peut être perturbée soit par l'excès soit au contraire par le manque d'un de leurs composants (Cacace et al., 1999). De plus, des expériences d'interactions génétiques avec des gènes de la voie DER-ERK montrent que *dMP1* intervient au cours du développement de l'aile pour réguler la signalisation ERK dans le futur tissu interveineux, permettant ainsi de réprimer la différenciation en tissu veineux et/ou de favoriser la différenciation en tissu interveineux (Mouchel-Vielh et al., 2008). L'interaction entre Corto et *dMP1* mise en évidence par crible double hybride ainsi que les phénotypes de veines ectopiques partagés par des individus présentant une dérégulation de *dMP1*, des mutants perte de fonction *corto*, ainsi que des mutants de différents gènes codant des protéines de la voie ERK, nous ont conduit à étudier les relations fonctionnelles entre Corto et la signalisation DER-ERK au cours du développement des tissus de l'aile.

## II. Manuscrit 1

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# The MAP kinase ERK and its scaffold protein MP1 interact with the chromatin regulator Corto during *Drosophila* wing tissue development

Emmanuèle Mouchel-Vielh<sup>1\*</sup>, Julien Rougeot<sup>1</sup>, Martine Decoville<sup>2</sup>, Frédérique Peronnet<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades (p38, JNK, ERK pathways) are involved in cell fate acquisition during development. These kinase modules are associated with scaffold proteins that control their activity. In *Drosophila*, *dMP1*, that encodes an ERK scaffold protein, regulates ERK signaling during wing development and contributes to intervein and vein cell differentiation. Functional relationships during wing development between a chromatin regulator, the Enhancer of Trithorax and Polycomb Corto, ERK and its scaffold protein dMP1, are examined here.

**Results:** Genetic interactions show that *corto* and *dMP1* act together to antagonize *rolled* (which encodes ERK) in the future intervein cells, thus promoting intervein fate. Although Corto, ERK and dMP1 are present in both cytoplasmic and nucleus compartments, they interact exclusively in nucleus extracts. Furthermore, Corto, ERK and dMP1 co-localize on several sites on polytene chromosomes, suggesting that they regulate gene expression directly on chromatin. Finally, Corto is phosphorylated. Interestingly, its phosphorylation pattern differs between cytoplasm and nucleus and changes upon ERK activation.

**Conclusions:** Our data therefore suggest that the Enhancer of Trithorax and Polycomb Corto could participate in regulating vein and intervein genes during wing tissue development in response to ERK signaling.

## Background

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways are evolutionary conserved signaling pathways used by eukaryotic cells to regulate gene expression during diverse processes such as proliferation, differentiation, apoptosis, adaptation to changes in their environment, and so on (for a review, see [1]). MAPK proteins are serine-threonine kinases that can phosphorylate targets in the cytoplasm or the nucleus in response to stimuli such as mitogenic or stress signals. MAPKs can be grouped into three classes depending on the stimuli they respond to. Extracellular regulated kinases (ERK) are mainly activated by mitogenic stimuli such as growth factors and hormones, whereas *c-Jun* N-terminal kinases (JNK) and p38 kinases respond predominantly

to stress stimuli. Kinases associate with scaffold proteins that regulate signaling by providing critical spatial and temporal specificities. Notably, the scaffold protein MP1 forms a signaling complex with MEK and ERK thus facilitating ERK activation [2,3]. One of the best characterized mechanisms by which MAPKs regulate gene expression involves phosphorylation of transcription factors, which consequently modifies their activity, regulating either their intracellular location, their stability, their binding to DNA, or their interactions with regulatory proteins (for a review, see [4]).

Although the traditional view has been that most phosphorylation events do not occur directly at promoters of genes that are ultimately controlled by MAPK pathways, recent reports have highlighted some cases where MAPKs are integral components of transcriptional activation complexes. For example, during mammalian myoblast differentiation, p38 is recruited to the promoters of myogenic genes together with the muscle-regulatory factors MyoD and MEF2C [5]. In pancreatic

\* Correspondence: emmanuele.mouchel@upmc.fr

<sup>1</sup> Université Pierre et Marie Curie-Paris 6; Centre National de la Recherche Scientifique; UMR7622, Laboratoire de Biologie du Développement, Equipe Chromatine et Développement, 75005 Paris, France  
Full list of author information is available at the end of the article

$\beta$ -cells, in response to increased glucose concentration, ERK1/2 MAPKs are bound to the insulin gene promoter in the same complex as their transcription factor substrates MafA, Beta2 and PDX-1 [6]. In yeast, the p38-related Hog1 kinase coordinates the transcriptional program required for cell survival upon osmostress: active Hog1 interacts with the transcription factor Hot1, inducing recruitment of Hog1 to osmostress-responsive promoters [7]. Anchoring of Hog1 to chromatin was shown to be important to stimulate the recruitment and activation of RNA Pol II [8]. In addition to this role in transcriptional initiation, Hog1 also behaves as a transcriptional elongation factor [9]. Genome-wide chromatin immunoprecipitation coupled with microarrays (ChIP-Chip) experiments have revealed that two other yeast MAPKs involved in pheromone response, Fus3 and Kss1, are bound to several genes that are expressed upon pheromone pathway activation [10].

Once bound to chromatin, MAPKs do not only modulate transcription factor activity and RNA Pol II recruitment, but also regulate gene expression by inducing changes in chromatin organization and epigenetic histone modifications. Indeed, yeast Hog1 facilitates recruitment of either the histone deacetylase Rpd3-Sin3 complex [11], the SAGA complex which contains both histone acetylation and de-ubiquitylation activities [12], or the SWI-SNF chromatin remodeling complex [13]. During mammalian myoblast differentiation, p38 targets the SWI-SNF complex [5] as well as the ASH2L Trithorax complex, that contains a histone methyltransferase, to muscle-specific genes [14]. It is tempting to speculate that binding of these complexes to chromatin relies on phosphorylation of some of their components by MAPKs. For example in mammals, the downstream MAPKAP3 kinase, once activated by phosphorylation in response to mitogenic or stress signals, phosphorylates some members of the chromatin Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1). This results in dissociation of PRC1 from chromatin and subsequent de-repression of target genes [15]. Altogether, these data show that chromatin reorganization mediated by nucleosome remodeling and epigenetic mark modifications is an important process to regulate gene expression in response to MAPK signaling. This process could involve a dynamic switch between the binding of either a silencing complex or an activating complex on a target gene.

In most of the examples mentioned above, these repressing and activating complexes are formed by proteins of the Polycomb-group (PcG) and Trithorax-group (TrxG) which combine into several heteromeric complexes that bind chromatin. PcG and TrxG complexes regulate gene expression by modulating chromatin structure, in particular by depositing specific post-translational histone modifications and by nucleosome

remodeling. PcG complexes lead to compact, transcriptionally inactive chromatin, whereas TrxG complexes counteract PcG-mediated repression and maintain chromatin in an open conformation that facilitates transcription (for a review, see [16]). A third class of proteins, the Enhancers of Trithorax and Polycomb (ETP), is involved in PcG- as well as TrxG-mediated gene regulation (for a review, see [17]). Interestingly, ETPs allow the recruitment on chromatin of either PcG or TrxG complexes and could therefore participate in a switch between activation and repression. The first ETP mutants have been identified in *Drosophila* as enhancers of both *Polycomb-group* (PcG) and *trithorax-group* (TrxG) mutations [18]. Although not found in any of the PcG or TrxG core complexes purified so far, ETPs interact with these complexes and are required for both PcG-mediated silencing and TrxG-mediated activation. For example, mutants of the ETP gene *Asx* enhance homeotic phenotypes of both *PcG* and *trxG* mutations [19]. The GAGA factor encoded by *Trithorax-like* (*Trl*) was first described as an activator of *Hox* gene expression and later shown to play a role in recruitment of PcG complexes [20,21]. The HMGB protein DSP1 behaves as an ETP since a *dsp1* null allele exhibits a *PcG* phenotype but enhances at the same time the phenotype of several *trxG* mutants [22]. Furthermore, DSP1 is required for PcG complex recruitment to chromatin [23]. Lastly, *corto*, which is ubiquitously expressed all along development, presents the characteristics of an ETP since loss-of-function mutants exhibit both *PcG* and *trxG* phenotypes and enhance the phenotype of some *PcG* as well as *trxG* mutants [24,25]. The Corto protein interacts not only with PcG and TrxG proteins, but also with other ETPs such as GAGA and DSP1, which suggests that different combinations of ETPs could favor the recruitment of either PcG or TrxG complexes on chromatin [26,27]. Nevertheless, the mechanism through which ETPs could exert this dual function remains to be investigated.

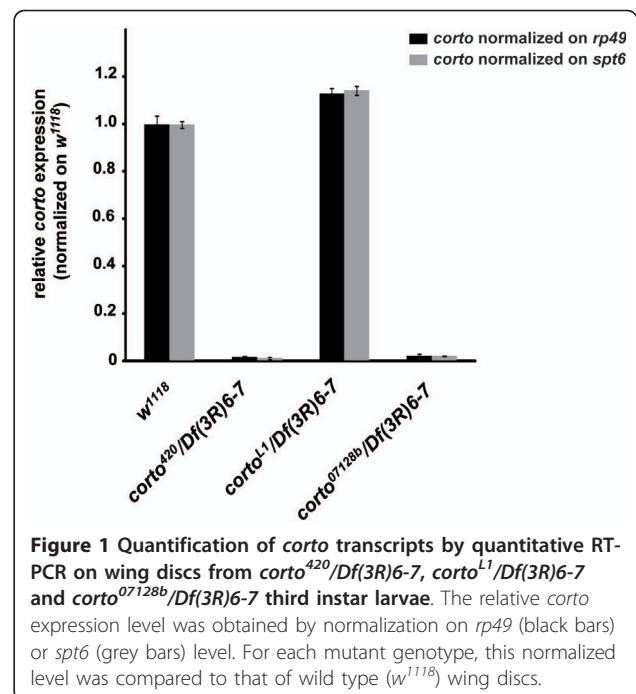
*corto* loss-of-function mutants exhibit several phenotypes, among them ectopic veins on wings which recall the phenotype induced by a gain-of-function mutation of *rolled* (*rl*) that encodes the MAPK ERK [25,28]. In *Drosophila*, specification and differentiation of wing tissues (*i.e.* vein and intervein) occur in wing imaginal discs during the third larval and pupal stages and rely on several developmental signals including those mediated by EGF, BMP, Hedgehog and Wnt (for a review, see [29]). Signaling mediated by the *Drosophila* EGF Receptor (DER) is crucial for early specification of the longitudinal vein primordia called proveins, as well as for differentiation of vein and intervein cells (for a review, see [30]). Once activated by one of its ligands, DER activates a phosphorylation cascade leading to ERK signaling. Early ERK signaling in wing discs

of third instar larvae specifies provein [31]. In provein territories, ERK maintains expression of *rhomboid* (*rho*), which is required to direct provein cells to differentiate as vein cells [32]. *rho* encodes a serine-threonine protease which is required to process EGFR ligands and thus participates in a positive feed-back loop that maintains high levels of ERK activity [33,34]. On the other hand, ERK signaling represses *blistered* (*bs*) expression. *bs*, that encodes a homolog of the mammalian Serum Response Factor (SRF), is expressed in the future intervein cells and controls the specification of intervein tissue [35,36]. Later during development, at the pupal stage, ERK signaling is also required to promote intervein cell differentiation [31]. The formation of vein and intervein tissues thus depends on the outcome of a fine-tuned balance between *rho* and *bs* expression patterns, which are both regulated by ERK signaling. Furthermore, the scaffold protein dMP1 also participates in ERK signaling during vein and intervein differentiation [3]. The wing phenotype of *corto* mutants, but also the fact that we isolated dMP1 in a two-hybrid screen using Corto as bait, prompted us to address the potential role of this ETP in relation to ERK signaling during wing vein and intervein differentiation. Our genetic interactions between *corto* and genes encoding some actors of the ERK signaling pathway, *i.e.* *rl* itself, *dMP1*, *bs* and *rho* show that *corto* and *dMP1* contribute to antagonize *rl* vein-promoting function in future intervein cells. Biochemical analyzes show that Corto interacts directly with ERK. Furthermore, Corto is phosphorylated and its phosphorylation increases upon ERK activation. Surprisingly, ERK and dMP1 associate with Corto exclusively in the nucleus. As suggested by immunolocalizations on polytene chromosomes, a dMP1/ERK/Corto complex might be targeted to chromatin to directly regulate gene expression, thus allowing proper wing tissue differentiation.

## Results and Discussion

### *corto* contributes to intervein tissue differentiation

We first investigated the ectopic vein phenotype of *corto* mutants using three different recessive lethal alleles: *corto*<sup>420</sup>, *corto*<sup>07128b</sup> and *corto*<sup>L1</sup>. *corto*<sup>420</sup> is a deletion of the *corto* locus [25], *corto*<sup>07128b</sup> a P-element insertion located 0.5 kb upstream of *corto* 5'-UTR [37], and *corto*<sup>L1</sup> an EMS-induced mutation [38]. As already described for *corto*<sup>420</sup> [24,25], heteroallelic combinations using *corto*<sup>07128b</sup>, *corto*<sup>L1</sup> and a deficiency encompassing *corto* [*Df(3R)6-7*] are poorly viable, since we observed 0% to 10% escapers depending on combinations. Therefore, these three alleles are true loss-of-function alleles. This was confirmed by quantitative RT-PCR analysis on wing discs from third instar larvae, that showed absence of *corto* transcripts in *corto*<sup>420</sup>/*Df(3R)6-7* and *corto*<sup>07128b</sup>/*Df(3R)6-7* larvae (Figure 1). In contrast, *corto*<sup>L1</sup>/*Df(3R)6-*



**Figure 1** Quantification of *corto* transcripts by quantitative RT-PCR on wing discs from *corto*<sup>420</sup>/*Df(3R)6-7*, *corto*<sup>L1</sup>/*Df(3R)6-7* and *corto*<sup>07128b</sup>/*Df(3R)6-7* third instar larvae. The relative *corto* expression level was obtained by normalization on *rp49* (black bars) or *spt6* (grey bars) level. For each mutant genotype, this normalized level was compared to that of wild type (*w*<sup>1118</sup>) wing discs.

7 larvae exhibited the same level of *corto* transcripts as wild-type flies, which suggests that the mutation in *corto*<sup>L1</sup> rather affects the level or activity of Corto protein.

As already described [25], *corto*<sup>420</sup>/+ heterozygous flies exhibited very few ectopic veins (2.2% to 8.6%). This phenotype was more penetrant in *corto*<sup>L1</sup>/+ (49% to 52.2%) and *corto*<sup>07128b</sup>/+ (97.4% to 97.8%) heterozygous flies (Table 1 and Figure 2A). Since both *corto*<sup>420</sup> and *corto*<sup>07128b</sup> are devoid of *corto* transcripts, the discrepancy between these alleles may be a consequence of an interaction with the genetic background. For all combinations, the few heteroallelic *corto* escapers displayed a stronger ectopic vein phenotype than *corto* heterozygous flies (Figure 2B-D). Ectopic veins mainly arose close to longitudinal veins 2, 3, 5 and to the posterior cross-vein, which seems to be the case for most mutations that induce ectopic vein phenotypes [32]. Interestingly, over-expressing *corto* using a *UAS::corto* construct and the wing specific *Beadex::Gal4* (*Bx::Gal4*, data not shown) or *scalloped::Gal4* (*sd::Gal4*) driver also induced extra pieces of vein tissue in all flies (Figure 2E). Since both *corto* over-expression and loss-of-function induced the same phenotype, one possibility is that Corto may be required in stoichiometric amount to allow correct wing tissue differentiation. This feature characterizes proteins that act through formation of complexes. Indeed, complexes are very sensitive to the relative amounts of their components, and can be disrupted either by an excess or a shortage of one of these [39].



**Table 1 *corto* mutants induce ectopic vein phenotypes and interact with *blistered (bs)* and *rhomboid (rho)* during wing tissue differentiation**

Genotype	Total females observed	% females with ectopic veins only	% females with blistered wings
<i>corto</i> <sup>420</sup> /+	70	8.6	0
+/ <i>corto</i> <sup>420</sup>	45	2.2	0
<i>corto</i> <sup>L1</sup> /+	51	49	0
+/ <i>corto</i> <sup>L1</sup>	90	52.2	0
<i>corto</i> <sup>07128b</sup> /+	78	97.4	0
+/ <i>corto</i> <sup>07128</sup>	46	97.8	0
+/ <i>bs</i> <sup>EY23316</sup>	136	100	0
+/ <i>bs</i> <sup>EY23316</sup> ; <i>corto</i> <sup>07128b/+</sup>	80	67.5	32.5 <sup>a</sup>
+/ <i>rho</i> <sup>EP3704</sup>	68	0	0
<i>sd::Gal4/+</i> ; +/ <i>rho</i> <sup>EP3704</sup>	105	90.5	9.5
<i>sd::Gal4/+</i> ; <i>corto</i> <sup>420</sup> / <i>rho</i> <sup>EP3704</sup>	34	58.8	41.2 <sup>a</sup>
<i>sd::Gal4/+</i> ; <i>corto</i> <sup>07128b</sup> / <i>rho</i> <sup>EP3704</sup>	90	51.1	48.9 <sup>a</sup>

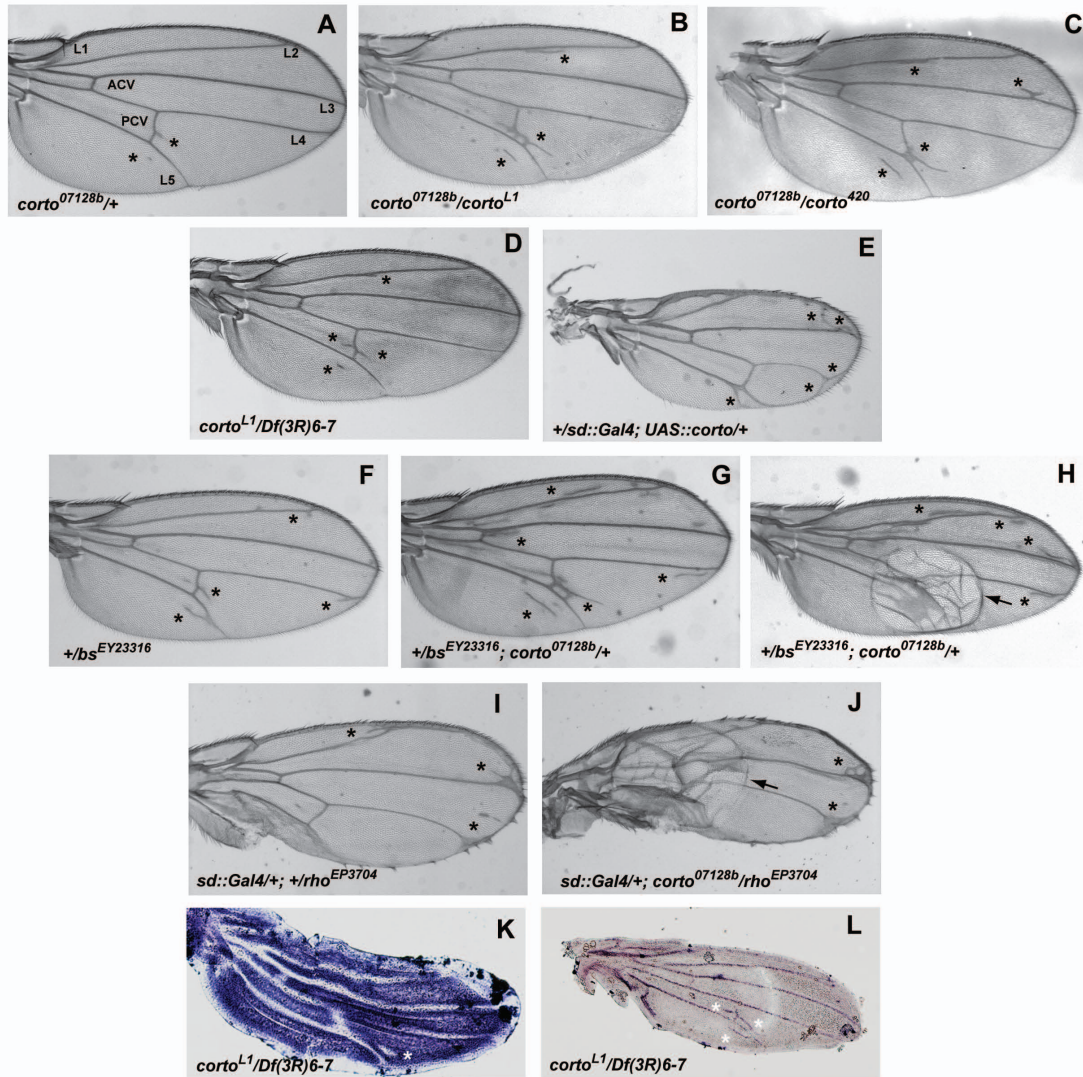
For all genotypes, the first allele was brought by the mother. Only female phenotypes are reported here, but similar results were obtained for males. Numbers of females with blistered wings in flies containing a *corto* mutation and the *bs*<sup>EY23316</sup> or *rho*<sup>EP3704</sup> allele were compared to those of flies containing the *bs*<sup>EY23316</sup> or *rho*<sup>EP3704</sup> allele only (Z-test, <sup>a</sup> p < 0.001).

In order to assess the temporal requirement for *corto* function in wing tissue differentiation, we crossed the *UAS::corto* line with the *hs::Gal4* driver strain allowing staged *Gal4* expression (Table 2). The highest percentage of ectopic vein phenotype was obtained when heat-shock was applied between 96 to 120 hours after egg laying, which corresponds to the mid to late third instar larval stage. Interestingly, it has been shown that, from late third instar larval stage to pupal stage, down-regulation of ERK signaling is crucial for wing tissue formation: indeed, expression of a constitutively active form of the MAPKK Raf at the third instar larval stage induces vein loss, whereas expression of a dominant negative form of the receptor DER at pupal stage leads to formation of ectopic veins [31].

In conclusion, *corto* misregulation (either loss-of-function or over-expression) induced ectopic veins that formed within intervein tissue and never truncated veins. This observation suggested that Corto contributes to intervein tissue differentiation, whereas it does not seem to be involved in vein formation. We have previously shown that *corto* interacts with some TrxG genes during wing tissue formation. Indeed, *moira*, *kismet* and *ash1* mutants enhance the ectopic vein phenotype of *corto*<sup>420</sup> [25]. Furthermore, several *corto* alleles enhance the ectopic vein phenotype of mutations in *snr1* that encodes a component of the SWI/SNF complex [38,40], a chromatin-remodeling complex also involved in wing tissue differentiation [41-43]. One hypothesis is that Corto, as an ETP, could participate in the recruitment of TrxG complexes to regulate expression of genes involved in wing tissue differentiation.

To clarify the role of *corto* in the formation of intervein tissue, we performed genetic interaction assays between *corto* and the intervein-promoting gene *blistered (bs)*, or the vein-promoting gene *rhomboid (rho)*. As expected for a *bs* loss-of-function allele [35,36], wings of flies heterozygous for *bs*<sup>EY23316</sup> exhibited a moderate ectopic vein phenotype, but none showed blisters in the wings (Table 1 and Figure 2F). *corto*<sup>07128b</sup> enhanced the ectopic vein phenotype induced by *bs*<sup>EY23316</sup> (compare Figure 2G to Figure 2F). In addition, 32.5% of these trans-heterozygous flies had blisters in the wings (Table 1 and Figure 2H). These blisters, which result from impaired adhesion between the ventral and dorsal wing surfaces, could be caused by formation of many vein cells within intervein tissue. They are frequently observed in *bs* mutants [35] or when *rho* is over-expressed [36]. This result therefore showed that *bs* and *corto* act synergistically to promote intervein cell fate. Ectopic over-expression of *rho* using the *rho*<sup>EP3704</sup> allele and the *sd::Gal4* driver induced ectopic veins for most of the flies and in a few cases (9.5%) formation of blisters (Figure 2I and Table 1). This phenotype was similar to that induced by over-expressing *rho* under control of a heat-inducible promoter [32]. Both *corto*<sup>420</sup> and *corto*<sup>07128b</sup> alleles enhanced this phenotype since the number of flies with blisters in the wings significantly increased (Table 1 and Figure 2J). This observation showed that *corto* antagonizes *rho* in vein formation.

Taken together, these results suggest that *corto* might antagonize *rl* vein-promoting function in future intervein cells. *corto* misregulation could therefore lead to deregulation of certain vein and intervein-promoting genes. Indeed, we observed deregulation of *bs* and *rho*



**Figure 2** *corto* regulates wing tissue differentiation in interaction with *blistered* (*bs*) and *rhomboid* (*rho*). (A): Wings from *corto*<sup>07128b</sup>/+ flies exhibit ectopic veins (shown by asterisks) within intervein tissue (L1-L5: longitudinal veins; ACV and PCV: anterior and posterior cross-veins). (B, C, D): This phenotype is more severe in flies heteroallelic for *corto* loss-of-function mutations (*corto*<sup>07128b</sup>/*corto*<sup>L1</sup>; *corto*<sup>07128b</sup>/*corto*<sup>420</sup>; *corto*<sup>L1</sup>/*Df*(3R)6-7). (E): *corto* over-expression induces ectopic veins (shown by asterisks). (F to J): *corto*<sup>07128b</sup> enhances the ectopic vein phenotype (shown by asterisks) and the blistered phenotype (shown by arrows) induced by the *bs*<sup>EY23316</sup> loss-of-function allele (F, G, H) and by *rho* over-expression using the *rho*<sup>EP3704</sup> allele (I, J). (K, L): *in situ* hybridization of 30 h pupal wings from *corto*<sup>L1</sup>/*Df*(3R)6-7 mutants with *bs* probe (K) or *rho* probe (L); white asterisks point to *bs* and *rho* deregulation.

in some intervein cells of pupal wings from *corto*<sup>L1</sup>/*Df*(3R)6-7 escapers: in these cells, *bs* is down-regulated (Figure 2K) whereas *rho* is ectopically expressed (Figure 2L). These cells could thus acquire a vein fate.

#### **Corto and dMMP1 act together and participate in the control of wing tissue differentiation**

Since the wing phenotype of *corto* mutants resembles the one induced by hyperactivation of ERK signaling pathway, we wondered whether *corto* was involved in the regulation of this pathway during wing development.

We first tested genetic interactions between *corto* and *rolled* using the *UAS::rolled* strain which allows targeted ERK over-expression when crossed with a *Gal4* driver. All flies over-expressing *rolled* with the *sd::Gal4* driver at 25°C exhibited a mild ectopic vein phenotype ([3] and Figure 3A). Expressivity of this phenotype was enhanced by the *corto*<sup>07128b</sup> allele (Figure 3B). This result suggests that the roles of *corto* and *rolled* in vein-promoting function are antagonistic.

We also used the *UAS::rolled*<sup>Sem</sup> (*rt*<sup>Sem</sup>) transgene that encodes a hyper-active form of ERK [28,44]. At 18°C,

**Table 2 Staged *corto* over-expression induced ectopic vein phenotypes mostly during late larval development**

Time of heat-shock (hours After Egg Laying AEL)	+/hs::Gal4		UAS::corto/hs::Gal4	
	Total females observed	% females with ectopic veins	Total females observed	% females with ectopic veins
No heat-shock	32	0	195	17.9
48 h-72 h AEL (L2 larvae)	127	3.1	182	25.8
72 h-96 h AEL (early to mid L3 larvae)	123	3.2	235	29.8
96 h-120 h AEL (mid to late L3 larvae)	56	3	216	46.3 <sup>a</sup>
120 h-136 h AEL (young pupae)	78	5.1	309	31.7

For all genotypes, the first allele was brought by the mother. Only female phenotypes are reported here, but similar results were obtained for males. The number of females with ectopic veins when heat-shock was applied between 96 h-120 h AEL was compared to the ones of females with ectopic veins obtained after heat-shock applied between 72 h-96 h AEL or 120 h-136 h AEL (Z-test, <sup>a</sup> p < 0.001).

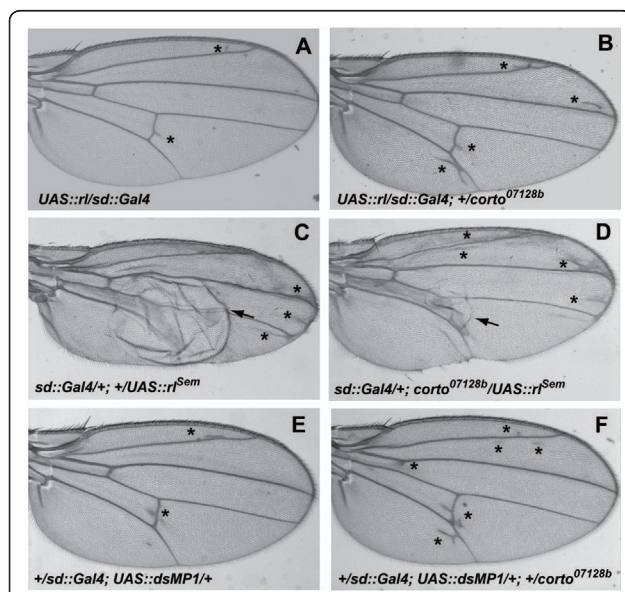
flies that over-expressed the *UAS::rl<sup>Sem</sup>* transgene under control of the *sd::Gal4* driver exhibited ectopic veins. This phenotype was much stronger than the one induced by *rolled* over-expression (compare Figure 3 to 3). For 88% of these flies, this phenotype was very strong since one or the two wings showed blisters (Table 3 and Figure 3C). Surprisingly, penetrance and expressivity of the *rl<sup>Sem</sup>* over-expression phenotype were lowered by *corto<sup>420</sup>* and *corto<sup>07128b</sup>* alleles, as only 49.4% of *corto<sup>420</sup>* flies and 55.1% of *corto<sup>07128b</sup>* ones exhibited blisters in one or both wings (Table 3) and blisters were

smaller (Figure 3D). This result confirmed that *corto* and *rl* interact during wing tissue formation. However, the observation that *corto* mutation enhanced a mild-activation of ERK pathway (as induced by *UAS::rl*) whereas slowing-down a hyper-activation (as induced by *UAS::rl<sup>Sem</sup>*) is paradoxical and requires further experiments to be fully understood.

We have recently shown that the *Drosophila* ortholog of *MPI*, *dMPI*, antagonizes *rl* vein-promoting function in the future intervein cells of the wing [3]. Furthermore, we isolated *dMPI* in a two-hybrid screen using *Corto* as bait (see below and Figure 4B). We thus tested the genetic interactions between *corto* and *dMPI*. As already described [3], down-regulation of *dMPI* by RNA interference using the *sd::Gal4* driver induced ectopic veins in 78.5% of flies (Table 3 and Figure 3E). This percentage increased to 92.2% and 100% in combination with *corto<sup>420</sup>* or *corto<sup>07128b</sup>*, respectively (Table 3). With *corto<sup>07128b</sup>*, the expressivity of the ectopic vein phenotype was also enhanced (compare Figure 3F to Figure 2A and 3E). Therefore, these results showed that *corto* and *dMPI* act synergistically and participate in intervein tissue differentiation in response to ERK signaling.

#### Corto interacts *in vitro* directly with ERK and indirectly with *dMPI*

We have previously shown that *dMPI* forms a complex with ERK, which is required for the proper development of intervein cells [3]. To understand the molecular bases of the relationship between *Corto*, *dMPI* and ERK, we first questioned the physical interaction between *Corto* and ERK. We carried out GST pull-down assays using *in vitro* translated ERK and GST-*Corto* fusion proteins. Structural analysis of *Corto* has shown that this 550 amino-acid protein contains three globular domains that might correspond to functional domains ([26] and Figure 4A). The first one is located at position 127-203 and exhibits strong structural similarities with



**Figure 3 *corto* interacts with *rl* and *dMPI* during wing development.** (A, B): *corto* loss-of-function (*corto<sup>07128b</sup>*) enhances the ectopic vein phenotype (shown by asterisks) induced by *rl* over-expression. (C, D): *corto* loss-of-function (*corto<sup>07128b</sup>*) diminishes the blistered phenotype (shown by arrows) induced by *rl<sup>Sem</sup>* over-expression. (E, F): *corto* loss-of-function (*corto<sup>07128b</sup>*) enhances the ectopic vein phenotype (shown by asterisks) induced by *dMPI* down-regulation.

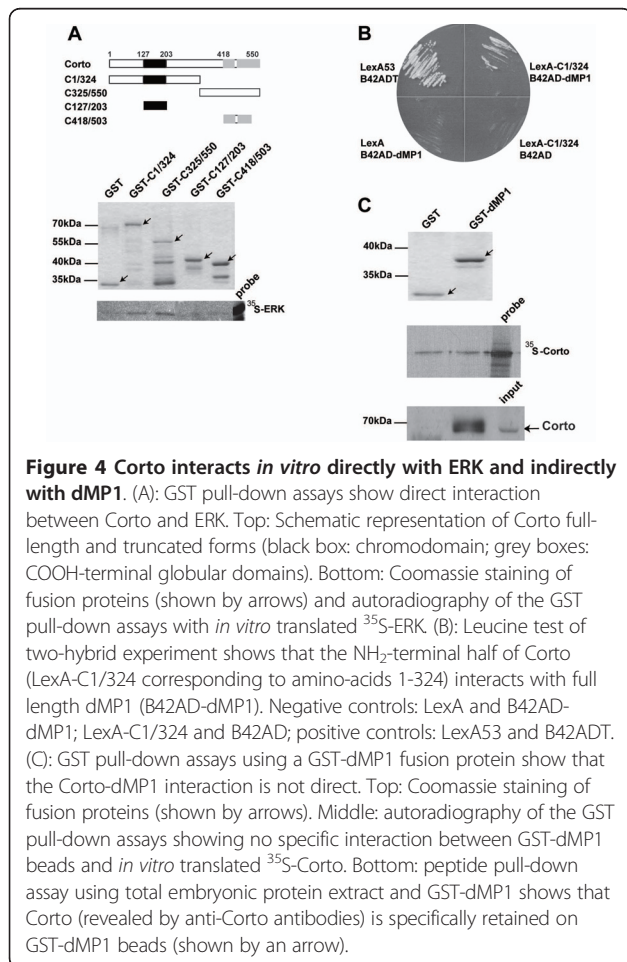
**Table 3** *corto* interacts with *rolled (rl)* and *dMP1* during wing tissue differentiation

Genotype	Total females observed	% females with ectopic veins only	% females with one blistered wing	% females with two blistered wings
<i>sd::Gal4/+;+;UAS::r<sup>sem</sup></i>	108	12	40.7	47.3
<i>sd::Gal4/+;corto<sup>420</sup>/UAS::r<sup>sem</sup></i>	85	50.6 <sup>a</sup>	36.5	12.9 <sup>a</sup>
<i>sd::Gal4/+;corto<sup>07128b</sup>/UAS::r<sup>sem</sup></i>	78	44.9 <sup>a</sup>	44.9	10.2 <sup>a</sup>
<i>+/sd::Gal4; UAS::dsMP1/+</i>	158	78.5	0	0
<i>+/sd::Gal4; UAS::dsMP1/+; +/corto<sup>420</sup></i>	90	92.2 <sup>b</sup>	0	0
<i>+/sd::Gal4; UAS::dsMP1/+; +/corto<sup>07128b</sup></i>	92	100	0	0

For all genotypes, the first allele was brought by the mother. Only female phenotypes are reported here, but similar results were obtained for males. Numbers of females with ectopic veins only or with two blistered wings among flies bearing a *corto* allele and over-expressing *r<sup>sem</sup>* were compared to the one of flies over-expressing *r<sup>sem</sup>* only. Numbers of females with ectopic veins among flies containing the *UAS::dsMP1* transgene, the *sd::Gal4* transgene and a *corto* mutation were compared to that of flies containing the *UAS::dsMP1* and the *sd::Gal4* transgenes only (Z-test, <sup>a</sup> p < 0.001; <sup>b</sup> p < 0.05).

chromodomains, that are chromatin targeting modules found in some regulators of chromatin structure (for a review, see [45]). The two others, located at positions 418-455 and 480-550, present no obvious similarities with known protein domains. *In vitro* translated ERK

protein was retained on GST-C1/324 and GST-C325/550 beads containing the NH<sub>2</sub>-terminal half and the COOH-terminal half of Corto, respectively (Figure 4A). In contrast, ERK was not retained on GST-C127/207 beads containing the Corto chromodomain, or on GST-C418/503 beads containing part of the two COOH-terminal globular domains. The lack of interaction with GST-C127/207 and GST-C418/503 suggested that none of these domains was sufficient to mediate Corto-ERK interaction, either because of inappropriate folding of these short domains in the GST fusion proteins, or because none of these two fragments contains the sequences that mediate ERK binding. Taken together, these results showed that Corto interacts directly with ERK *in vitro*. Further experiments are needed to determine the precise domains or residues that mediate the interaction between Corto and ERK.

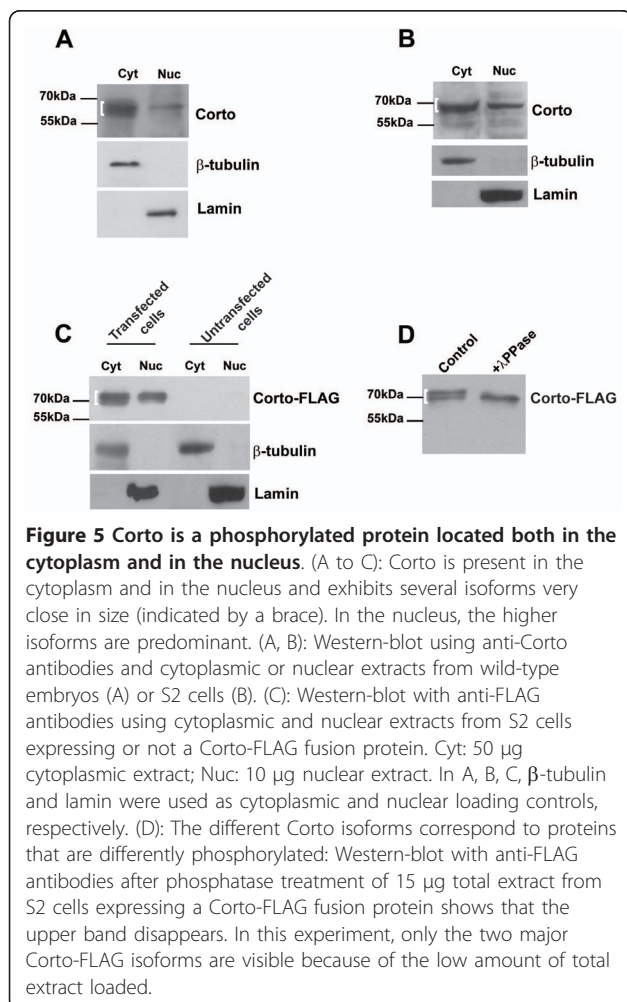


Since we isolated dMP1 in a two-hybrid screen using the NH<sub>2</sub>-terminal part of Corto as a bait (Figure 4B), we next questioned the physical interaction between Corto and dMP1. We performed GST pull-down assays using GST-dMP1 fusion protein and *in vitro* translated Corto to see whether their interaction was direct or indirect. Indeed, indirect interactions *via* yeast proteins have already been observed in two-hybrid experiments [46]. As shown in the middle panel of Figure 4C, the same result was obtained using GST or GST-dMP1 beads indicating that there was no specific direct interaction between Corto and dMP1. However, by incubating GST-dMP1 beads with total embryonic protein extract, we observed after blotting with anti-Corto antibodies that Corto was specifically retained on GST-dMP1 beads (bottom panel of Figure 4C). Therefore, we concluded that Corto and dMP1 interact *via* additional factors. One potential candidate could be ERK, since it directly interacts with Corto (as shown above) and with dMP1 [3].

### Corto is located both in the cytoplasm and the nucleus and is phosphorylated

Upon activation of the MAPK cascade, ERK is phosphorylated in the cytoplasm. Di-phosphorylated ERK (dP-ERK) phosphorylates in turn a large number of targets with diverse functions and different subcellular localizations. In particular, part of dP-ERK is translocated into the nucleus where it phosphorylates some transcription factors (for reviews, see [1,4]). Mammalian MP1 is present in the cytoplasm in association with ERK but its possible nuclear localization has not been reported [47,48]. Nevertheless, we have recently shown that dMP1 is present both in the cytoplasm and the nucleus [3]. We thus asked whether Corto was present in the same compartments as ERK and dMP1. Corto was detected in nuclear and cytoplasmic extracts from embryos (Figure 5A), third instar larvae (data not shown) and Schneider S2 cells (Figure 5B). A similar nuclear and cytoplasmic distribution was observed for a Corto-FLAG fusion protein expressed in S2 cells (Figure 5C). Both Corto and Corto-FLAG exhibited several

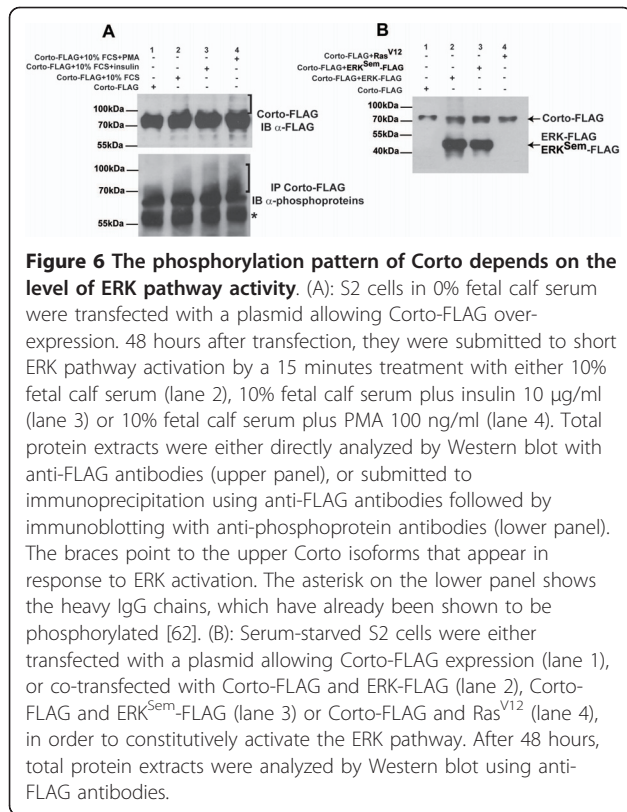
isoforms very close to each other in size, with the lowest isoforms being more abundant in the cytoplasm than in the nucleus (Figure 5A-C). Corto is very rich in serine (16%), threonine (4.5%), tyrosine (2.9%), and presents many predicted phosphorylation sites for several kinases distributed all along the sequence (according to NetPhos predictions: 28 phosphorylatable serines, 6 threonines, and 3 tyrosines). Hence we checked whether the isoforms we observed could indeed correspond to differentially phosphorylated molecules. As shown in Figure 5D, the upper bands of Corto-FLAG disappeared after lambda phosphatase treatment. Altogether, these results showed that Corto is a phosphorylated protein present both in the cytoplasm and in the nucleus. In addition, the Corto phosphorylation pattern seemed to be different between the two cellular compartments, with enrichment in highly phosphorylated forms in the nucleus. Phosphorylation of M33, a chromatin regulator, has been shown to regulate its nuclear translocation [49]. Further experiments are required to determine if Corto localization is regulated through a similar mechanism.



### The phosphorylation pattern of Corto is controlled at least partially by ERK pathway

Since Corto is phosphorylated and interacts *in vitro* with ERK, it is tempting to speculate that Corto could be phosphorylated in response to activation of the corresponding MAP kinase cascade. To answer this question, we transfected S2 cells in absence of serum with a plasmid allowing Corto-FLAG expression. After two days, we transiently activated the MAP kinase cascade by a short (15 minutes) treatment either with serum, with serum plus insulin or with serum plus PMA. In all three conditions, faint upper Corto isoforms appeared (brace on Figure 6A, upper panel), showing that Corto phosphorylation was induced very rapidly upon ERK activation. To confirm the existence of these faint upper isoforms, we immunoprecipitated Corto from these extracts using anti-FLAG antibodies and blotted the immunoprecipitates with antibodies directed against phosphoproteins (Figure 6A, lower panel). This experiment revealed first that Corto is constitutively phosphorylated even without MAP kinase activation. Second, ERK activation induced an hyperphosphorylation of Corto since an upper smear containing several bands very close in size appeared in all three conditions of activation tested.

As another way to activate the ERK pathway, we co-expressed Corto-FLAG and tagged forms of either ERK, ERK<sup>Sem</sup> or Ras<sup>V12</sup> in S2 cells. Similar to ERK and ERK<sup>Sem</sup> over-expression, over-expression in flies of a constitutively active form of Ras, Ras<sup>V12</sup>, induces ectopic vein cells [50]. Surprisingly, smaller Corto isoforms appeared when constitutively activating the ERK pathway with



either ERK, ERK<sup>Sem</sup> or Ras<sup>V12</sup> (Figure 6B). One possibility is that these smaller isoforms could correspond to partially dephosphorylated Corto molecules. Taken together, these experiments demonstrate that Corto presents a complex phosphorylation pattern that depends at least on ERK signaling. It is tempting to speculate that some phosphorylations are performed directly by ERK. Indeed, Corto contains 3 SP sites at positions 139, 190 and 428 that correlate with theoretical ERK1/ERK2 phosphorylation sites [51]. Identification of Corto phosphorylation sites as well as phospho-mutant analysis and determination of Corto phosphorylation status when bound to chromatin would help to better understand the role of these phosphorylation events.

#### Interaction between ERK and dMP1 or Corto takes place in the nucleus only

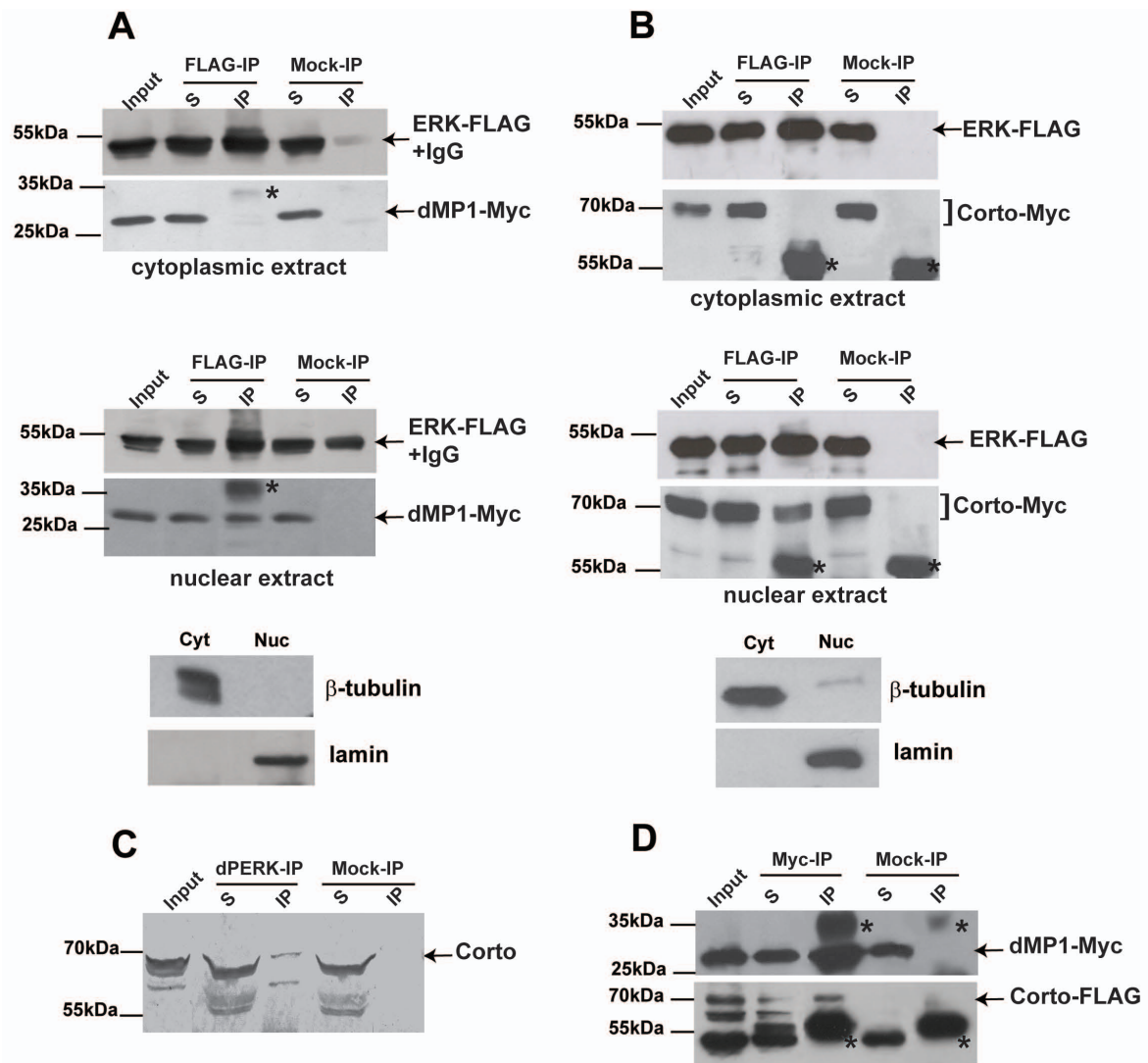
We next performed co-immunoprecipitation experiments to see whether Corto interacts with ERK and dMP1 *in vivo*. We have previously shown that ERK and dMP1 co-immunoprecipitate in a total protein extract [3]. In order to determine the subcellular localization of this dMP1/ERK complex, we carried out co-immunoprecipitation experiments using cytoplasmic or nuclear extracts of S2 cells expressing dMP1 and ERK tagged proteins. Surprisingly, dMP1-Myc co-immunoprecipitated with ERK-FLAG in the nuclear extract only

(Figure 7A). Corto-Myc and ERK-FLAG also co-immunoprecipitated in the nuclear extract only (Figure 7B). In this last experiment, all Corto isoforms were co-immunoprecipitated with ERK. In both cases, the lack of co-immunoprecipitation in cytoplasmic extracts was confirmed by using two different protocols to prepare nuclear and cytoplasmic extracts (see the Methods section). The co-immunoprecipitation observed between Corto and ERK fusion proteins was confirmed with endogenous proteins from a total embryonic extract using anti-dP-ERK antibody (Figure 7C). Furthermore, this experiment showed that Corto was able to interact with dP-ERK. Lastly, we observed no co-immunoprecipitation between Corto-FLAG and dMP1-Myc whether in total, cytoplasmic or nuclear extracts (data not shown). Labile protein interactions can be stabilized by cross-linking before performing cell extracts, although such treatment does not allow separating cytoplasmic and nuclear extracts. When using a total extract from cross-linked cells, we could detect co-immunoprecipitation between Corto-FLAG and dMP1-Myc (Figure 7D). This observation was consistent with our GST pull-down and peptide pull-down assays showing that the interaction between dMP1 and Corto was not direct but was probably mediated by other proteins. Altogether, our co-immunoprecipitation results suggest that a complex containing Corto, ERK and dMP1 might exist in the nucleus only. The core protein of this complex should be ERK, since it interacts directly with both Corto and dMP1.

#### ERK and dMP1 bind polytene chromosomes where they partially co-localize with Corto

To further analyze the relationship between Corto, dMP1 and ERK, and since Corto has been shown to bind polytene chromosomes [26], we analyzed the binding of ERK and dMP1 onto polytene chromosomes. We observed that ERK and dMP1 bound polytene chromosomes on many sites where they completely co-localized (Figure 8A). Furthermore, Corto and dMP1 co-localized on several sites (Figure 8B-C). These results suggest that a dMP1/ERK/Corto complex might regulate targets directly on chromatin. Since the co-localization of Corto with dMP1 is not complete, Corto appears to be an optional partner of dMP1/ERK on chromatin. Corto association may require additional factors or may be controlled by signaling events.

Previously, other scaffold proteins have been reported to bind chromatin. This is the case of the scaffold protein Ste5p in the pheromone pathway of yeast which interacts with the MAPKs Fus3p and Kss1p and occupies the same mating-type genes. Ste5p has then been suggested to function as an adaptor for protein-protein interactions both at the plasma membrane and in the



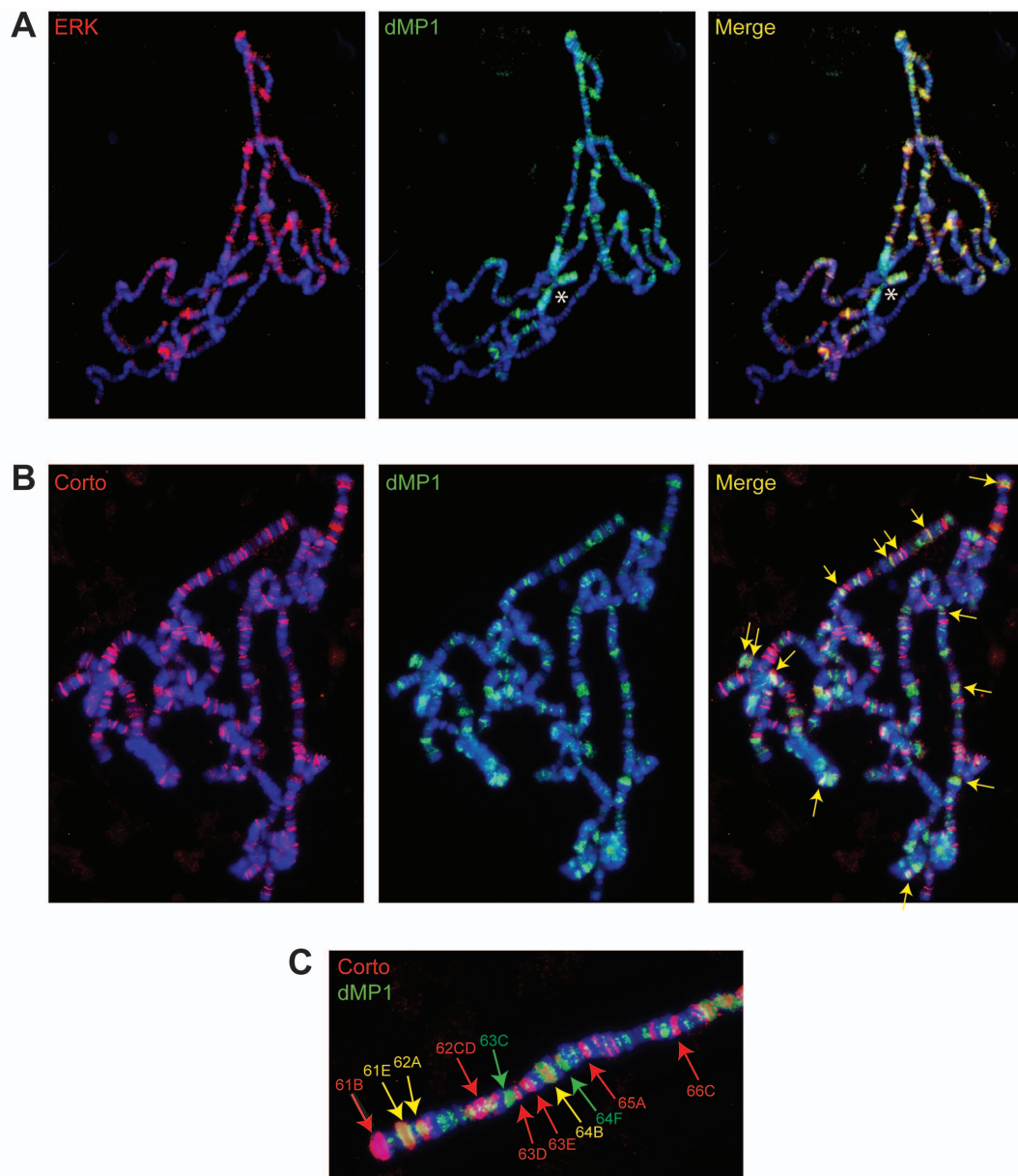
**Figure 7** Corto interacts *in vivo* with ERK in the nucleus only. (A, B): ERK-FLAG co-immunoprecipitates with dMP1-Myc (A) and Corto-Myc (B) only in nuclear extracts. Immunoprecipitation was performed with either anti-FLAG (FLAG-IP) or anti-HA (Mock-IP) antibodies. Cytoplasmic (Cyt) and nuclear (Nuc) extracts from S2 cells expressing tagged proteins were analyzed by Western blot using  $\beta$ -tubulin and lamin as cytoplasmic and nuclear loading controls, respectively. Note that ERK-FLAG (about 50 kDa) co-migrates with the heavy IgG chains (asterisks). (C): Corto co-immunoprecipitates with the di-phosphorylated form of ERK (dP-ERK) in a total embryonic extract. Immunoprecipitated proteins were revealed using rat anti-Corto antibodies. (D): dMP1-Myc co-immunoprecipitates with Corto-FLAG only after cross-linking of cells before protein extraction. Immunoprecipitation was performed using either anti-Myc (Myc-IP) or anti-HA (Mock-IP) antibodies. In A, B, D, immunoprecipitated proteins were revealed by Western-blot using anti-FLAG or anti-Myc antibodies. Arrows and braces show immunoprecipitated tagged proteins and asterisks point to heavy or light IgG chains. In A and D, the light IgG chains in the mock-IP lanes are poorly recognized by the secondary antibodies, but are clearly visible when membranes were stained with Ponceau red (data not shown). S: supernatant after immunoprecipitation; IP: protein G-agarose beads. 5% of the input and 50% of the immunoprecipitate were loaded onto the gel.

nucleus [10]. In mammals, the scaffold protein  $\beta$ -arrestin, localized both in the cytoplasm and in the nucleus, is also recruited to target promoters under opioid receptor stimulation thus enhancing gene transcription [52]. The scaffold protein dMP1 could serve as an adaptor to connect ERK with other partners directly on chromatin. It could also allow ERK to form dimers, as mammalian scaffold proteins have been shown to be

essential to connect ERK dimers to cytoplasmic targets [53]. It would therefore be interesting to know if ERK is monomeric or dimeric when bound to chromatin.

### Conclusions

We show here that the ETP *corto*, *rl* and *dMP1* interact during wing tissue differentiation in *Drosophila*. Corto, ERK and dMP1 form a complex exclusively in the



**Figure 8 ERK and dMP1 bind polytene chromosomes where they partially co-localize with Corto.** (A): Immunostaining of polytene chromosomes using rabbit anti-ERK (C-16) (left), and guinea-pig anti-dMP1 (center). DNA was stained with DAPI. ERK and dMP1 co-localize on all sites (right). The staining observed with dMP1 antibodies on centromeric heterochromatin and chromosome four (asterisk) is non-specific, since the same staining was observed with the pre-immune serum (data not shown). (B): Immunostaining of polytene chromosomes with rabbit anti-Corto antibodies (left) and guinea-pig anti-dMP1 antibodies (center). Corto and dMP1 co-localize on a number of sites (right, arrows). (C): Magnification of chromosome 3L extremity showing that Corto and dMP1 co-localize on several sites (yellow arrows).

nucleus. In addition, these proteins bind polytene chromosomes where they partially co-localize, suggesting that the Corto-ERK-dMP1 complex might regulate vein and/or intervein gene expression directly on chromatin. Future experiments will be needed to test whether this complex, *via* the ETP Corto, participates in the recruitment of TrxG complexes on target genes in response to ERK signaling.

## Methods

### *Drosophila* strains and genetic crosses

Flies were raised on standard yeast-cornmeal medium at 25°C. *w<sup>1118</sup>* was used as control strain. The *corto<sup>L1</sup>* (EMS-induced allele), *corto<sup>07128b</sup>*, *bs<sup>EY23316</sup>*, *rho<sup>EP3704</sup>* (P-insertion alleles) lines were from the Bloomington Stock Center. The *corto<sup>420</sup>* line results from imprecise P-element excision [24,25]. The transgenic lines *UAS::corto*



[24] (transgene on the third chromosome), *UAS::rolled* (transgene on the X chromosome) and *UAS::rl<sup>Sem</sup>* [54] (transgene on the third chromosome) were gifts from Dr. R. Rosset (*UAS::corto*) and Dr. K. Moses (*UAS::rl* and *UAS::rl<sup>Sem</sup>*). The *UAS::dsMPI* line allowing *dMPI* down-regulation by RNA interference (transgene on the second chromosome) was described previously [3]. Lines containing a transgene with *UAS* sequences were crossed with the *hs::Gal4*, *scalloped::Gal4* (*sd::Gal4*, [55]) and *Beadex::Gal4* (*Bx::Gal4*, [56]) drivers. All crosses were performed at 25°C, except those of *UAS::rl<sup>Sem</sup>* with *sd::Gal4* that were performed at 18°C to decrease Gal4 activity and therefore lower transgene expression. To perform staged *corto* expression with the *hs::Gal4* driver, Gal4 was induced by 20 minute heat-shocks applied at various moments during larval and pupal development.

#### **In situ hybridization experiments on pupal wings**

White pupae were collected and maintained for 30 h at 25°C. After puparium dissection, pupae were fixed in 8% formaldehyde for 12 h at 4°C. *In situ* hybridization with *blistered* (EST SD23611) and *rhomboid* (EST RE59529) DIG-UTP labeled RNA probes was performed according to standard protocols [57].

#### **Q-RT PCR experiments**

Total RNA were extracted from 20 third instar larval discs of each genotype using the PureLink RNA Microkit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. 1 µg of RNA was reverse-transcribed with the SuperScript<sup>®</sup> VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Q-RT PCR experiments were carried out on a Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) with the Maxima Sybr-Green mix (Fermentas). The primers used were: *cortoF* (5'-TGGCCACAGTTCCTAGCATT-3') and *cortoR* (5'-GCATGGGATTGGTGTTCAGG-3'); *rp49F* (5'-CCGCTTCAAGGGACAGTATC-3') and *rp49R* (5'-GACAACTCTCCTTGCCTTC-3'); *spt6F* (5'-CGGAGGAGCTCTTCGATATG-3') and *spt6R* (5'-GACAGCTCTGGGAAGTCGTC-3'). A standard curve of amplification efficiency for each set of primers was generated with a serial dilution of cDNA. *rp49* or *spt6* levels were used for normalization according to the standard curve method. Three independent experiments were performed.

#### **Plasmids and S2 cell transfection**

The *corto*, *dMPI*, *rl* and *rl<sup>Sem</sup>* cDNAs were cloned into Gateway<sup>®</sup> *Drosophila* vectors allowing expression of the fusion proteins under control of the *actin5C* promoter, as previously described [3]. The *rl<sup>Sem</sup>* sequence was obtained by *in vitro* mutagenesis using the Quick-Change<sup>®</sup> Site Directed Mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. This gain-

of-function mutation is a G to A transition resulting in a D to N substitution at position 334 [28]. pMT-Ras<sup>V12</sup> (a gift from Dr. A. Nagel) allowed transient expression of the constitutively active form of Ras, Ras<sup>V12</sup>, under the control of the heavy metal inducible promoter *metallothionein* [58]. Ras<sup>V12</sup> was induced by treating transfected cells for 24 h with CuSO<sub>4</sub> 0.5 mM. For transfection, S2 cells were cultivated at 25°C in Schneider medium with or without 10% fetal calf serum as indicated. 5.10<sup>6</sup> cells were transfected with 2 µg of DNA using Effecten<sup>®</sup> transfection reagent (Qiagen) according to the manufacturer's instructions (1/10 DNA-Effecten<sup>®</sup> ratio). Cells were collected 48 h (ERK pathway activation) or 72 h (immunoprecipitation) after transfection.

#### **Protein extracts and phosphatase treatment**

Embryos and S2 cell total extracts were prepared by sonication in RIPA buffer [50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 25 mM NaVO<sub>4</sub>, 25 mM NaF, 0.1% SDS, 0.5% NP40, complete protease inhibitors (Roche)]. Cytoplasmic extracts were prepared either with NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce) according to the manufacturer's instructions or by homogenization using a Dounce potter in low salt buffer as described in [59]. When analyzed by immunoprecipitation, these two kinds of cytoplasmic extracts gave the same results. Nuclear extracts were obtained by sonication of the nuclear pellet in RIPA buffer. Phosphatase treatments of S2 cell extracts prepared without NaVO<sub>4</sub> and NaF phosphatase inhibitors were performed using Lambda Protein Phosphatase (Upstate) for a 10 minute incubation time at 37°C.

#### **Western blot analysis and antibodies**

Cell lysates or immunoprecipitated proteins were resolved on 8% SDS-PAGE Anderson gels [60] when separating different isoforms of Corto, or on 12% or 15% classical SDS-PAGE depending on the molecular weight of proteins. Western blot experiments were performed according to standard protocols. Antibodies used were monoclonal anti-FLAG (F3165, Sigma) or anti-Myc (sc-40, Santa Cruz Biotechnology) antibodies for fusion proteins, anti-β-tubulin (E7) and anti-lamin (ADL67.10) antibodies (Developmental Studies Hybridoma Bank) for control of cytoplasmic and nuclear fractions, rat anti-Corto antibodies [26], monoclonal phosphoserine/threonine/tyrosine antibody (MA1-38450, Pierce), rabbit anti-ERK antibodies (C-16, Santa-Cruz Biotechnology) or monoclonal anti-dP-ERK E10 antibody (9106, Cell Signaling). Anti-HA antibody (H3663, Sigma) was used as a negative control in immunoprecipitation experiments.

#### **Protein-protein interactions**

*In vitro* transcription-translation and GST pull-down assays were performed as previously described [26]

using GST-Corto fusion proteins [61] and GST-dMP1 fusion protein [3].

For co-immunoprecipitation experiments, 500 µg of protein extracts (total, cytoplasmic or nuclear) were immunoprecipitated either with monoclonal anti-FLAG antibody, anti-Myc 9E10 antibody or anti-HA antibody using magnetic protein G-agarose beads (Ademtech). To co-immunoprecipitate Corto and dMP1, proteins were cross-linked before extraction by treating cells with 1% formaldehyde for 10 minutes followed by neutralization with 0.13 M glycine. To co-immunoprecipitate Corto and dP-ERK in embryonic extracts, monoclonal anti-dP-ERK E10 antibody was covalently bound onto protein G-agarose beads using standard protocols.

Two-hybrid experiments were performed as previously described [26], using leucine and X-Gal tests. Both tests gave the same result, and only the leucine test is shown. The full length dMP1 protein was fused with the B42 activation domain (B42AD). The NH<sub>2</sub>-terminal half of Corto was fused with the LexA DNA binding domain. B42AD and LexA were used as negative controls. B42/SV40 large T-antigen (B42ADT) and LexA/p53 (LexA53) fusion proteins were used as positive controls.

#### Immunolocalization on polytene chromosomes

Co-immunostaining of *w*<sup>1118</sup> polytene chromosomes was performed as previously described [26] using rabbit anti-ERK (1:20) (C-16; Santa-Cruz Biotechnology), guinea-pig anti-dMP1 (1:20) [3] and rabbit anti-Corto (1:20) [26] as primary antibodies. Secondary antibodies (Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 goat anti-guinea-pig IgG, Molecular Probes) were used at a 1:1000 dilution.

#### Acknowledgements

We thank Dr. Anja Nagel for the gift of the pMT-Ras<sup>V12</sup> plasmid, the Murphy lab for *Drosophila* Gateway vectors, Dr. Kevin Moses, Dr. Roland Rosset and the Bloomington Stock Center for flies, the Developmental Studies Hybridoma Bank for antibodies. We thank Valérie Ribeiro and Sarah Leridée for excellent technical assistance. Q-RT PCR experiments were performed at the IFR83 (UPMC). We thank Dr. Neel Randsholt, Dr. Willem Voncken, Dr. Sébastien Bloyer and Pr. Jean Deutsch for their comments on the manuscript. This work was supported by CNRS and UPMC, and by a scholarship from the Ministère de la Recherche to J.R.

#### Author details

<sup>1</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris 6; Centre National de la Recherche Scientifique; UMR7622, Laboratoire de Biologie du Développement, Equipe Chromatine et Développement, 75005 Paris, France. <sup>2</sup>Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, conventionnée avec l'Université d'Orléans, 45071 Orléans, France.

#### Authors' contributions

EM-V. conceived and performed all the genetics experiments and most of the biochemical experiments. JR and MD participated in biochemical experiments. JR performed quantitative PCR experiments. FP performed *in situ* hybridization experiments and polytene chromosome immunostainings. EM-V and FP wrote the paper. All the authors read and approved the final manuscript.

Received: 26 August 2010 Accepted: 14 March 2011  
Published: 14 March 2011

#### References

1. Raman M, Chen W, Cobb MH: Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007, **26**(22):3100-3112.
2. Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A, Weber MJ: MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science (New York, NY)* 1998, **281**(5383):1668-1671.
3. Mouchel-Vielh E, Bloyer S, Salvaing J, Randsholt NB, Peronnet F: Involvement of the MP1 scaffold protein in ERK signaling regulation during *Drosophila* wing development. *Genes Cells* 2008, **13**(11):1099-1111.
4. Yang SH, Sharricks AD, Whitmarsh AJ: Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 2003, **320**:3-21.
5. Simone C, Forcales SV, Hill DA, Imbalzano AN, Latella L, Puri PL: p38 pathway targets SWI-SNF chromatin-remodeling complex to muscle-specific loci. *Nature genetics* 2004, **36**(7):738-743.
6. Lawrence MC, McGlynn K, Shao C, Duan L, Naziruddin B, Levy MF, Cobb MH: Chromatin-bound mitogen-activated protein kinases transmit dynamic signals in transcription complexes in beta-cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(36):13315-13320.
7. Alepuz PM, Jovanovic A, Reiser V, Ammerer G: Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Molecular cell* 2001, **7**(4):767-777.
8. Alepuz PM, de Nadal E, Zapater M, Ammerer G, Posas F: Osmotress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *The EMBO journal* 2003, **22**(10):2433-2442.
9. Proft M, Mas G, de Nadal E, Vendrell A, Noriega N, Struhl K, Posas F: The stress-activated Hog1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic stress. *Molecular cell* 2006, **23**(2):241-250.
10. Pokholok DK, Zeitlinger J, Hannett NM, Reynolds DB, Young RA: Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science (New York, NY)* 2006, **313**(5786):533-536.
11. De Nadal E, Zapater M, Alepuz PM, Sumoy L, Mas G, Posas F: The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature* 2004, **427**(6972):370-374.
12. Zapater M, Sohrmann M, Peter M, Posas F, de Nadal E: Selective requirement for SAGA in Hog1-mediated gene expression depending on the severity of the external osmotress conditions. *Molecular and cellular biology* 2007, **27**(11):3900-3910.
13. Mas G, de Nadal E, Dechant R, Rodriguez de la Concepcion ML, Logie C, Jimeno-Gonzalez S, Chavez S, Ammerer G, Posas F: Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *The EMBO journal* 2009, **28**(4):326-336.
14. Rampalli S, Li L, Mak E, Ge K, Brand M, Tapscott SJ, Dilworth FJ: p38 MAPK signaling regulates recruitment of Ash2L-containing methyltransferase complexes to specific genes during differentiation. *Nature structural & molecular biology* 2007, **14**(12):1150-1156.
15. Voncken JW, Niessen H, Neufeld B, Rennefahrt U, Dahlmans V, Kubben N, Holzer B, Ludwig S, Rapp UR: MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1. *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(7):5178-5187.
16. Beck S, Faradji F, Brock H, Peronnet F: Maintenance of Hox gene expression patterns. *Advances in experimental medicine and biology* 2010, **689**:41-62.
17. Grimaud C, Negre N, Cavalli G: From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Res* 2006, **14**(4):363-375.
18. Gilda JJ, Lopez R, Shearn A: A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the *Drosophila melanogaster* homologue of human retinoblastoma binding protein 2. *Genetics* 2000, **156**(2):645-663.
19. Milne TA, Sinclair DA, Brock HW: The Additional sex combs gene of *Drosophila* is required for activation and repression of homeotic loci, and interacts specifically with Polycomb and super sex combs. *Mol Gen Evol* 1999, **26**(4-5):753-761.
20. Farkas G, Gausz J, Galloni M, Reuter G, Gyurkovics H, Karch F: The Trithorax-like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature* 1994, **371**(6500):806-808.

21. Poux S, Melfi R, Pirrotta V: Establishment of Polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC. *Genes & development* 2001, **15**(19):2509-2514.
22. Decoville M, Giacomello E, Leng M, Locker D: DSP1, an HMG-like protein, is involved in the regulation of homeotic genes. *Genetics* 2001, **157**(1):237-244.
23. Dejardin J, Rappailles A, Cuvier O, Grimaud C, Decoville M, Locker D, Cavalli G: Recruitment of *Drosophila* Polycomb group proteins to chromatin by DSP1. *Nature* 2005, **434**(7032):533-538.
24. Kodjabachian L, Delaage M, Maurel C, Miassod R, Jacq B, Rosset R: Mutations in *ccf*, a novel *Drosophila* gene encoding a chromosomal factor, affect progression through mitosis and interact with Pc-G mutations. *The EMBO journal* 1998, **17**(4):1063-1075.
25. Lopez A, Hiquet D, Rosset R, Deutsch J, Peronnet F: *corto* genetically interacts with Pc-G and trx-G genes and maintains the anterior boundary of Ultrabithorax expression in *Drosophila* larvae. *Mol Genet Genomics* 2001, **266**(4):572-583.
26. Salvaing J, Lopez A, Boivin A, Deutsch JS, Peronnet F: The *Drosophila* *Corto* protein interacts with Polycomb-group proteins and the GAGA factor. *Nucleic acids research* 2003, **31**(11):2873-2882.
27. Salvaing J, Decoville M, Mouchel-Vielh E, Bussiere M, Daulny A, Boldyreva L, Zhimulev I, Locker D, Peronnet F: *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 biology* 2006, **4**:9.
28. Brunner D, Oellers N, Szabad J, Biggs WH, Zipursky SL, Hafen E: A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* 1994, **76**(5):875-888.
29. Blair SS: Wing vein patterning in *Drosophila* and the analysis of intercellular signaling. *Annual review of cell and developmental biology* 2007, **23**:293-319.
30. Bier E: Drawing lines in the *Drosophila* wing: initiation of wing vein development. *Current opinion in genetics & development* 2000, **10**(4):393-398.
31. Martin-Blanco E, Roch F, Noll E, Baonza A, Duffy JB, Perrimon N: A temporal switch in DER signaling controls the specification and differentiation of veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development (Cambridge, England)* 1999, **126**(24):5739-5747.
32. Sturtevant MA, Roark M, Bier E: The *Drosophila* rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes & development* 1993, **7**(6):961-973.
33. Lee JR, Urban S, Garvey CF, Freeman M: Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell* 2001, **107**(2):161-171.
34. Urban S, Lee JR, Freeman M: *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* 2001, **107**(2):173-182.
35. Fristrom D, Gotwals P, Eaton S, Kornberg TB, Sturtevant M, Bier E, Fristrom JW: Blistered: a gene required for vein/intervein formation in wings of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* 1994, **120**(9):2661-2671.
36. Montagne J, Groppa J, Guillemin K, Krasnow MA, Gehring WJ, Affolter M: The *Drosophila* Serum Response Factor gene is required for the formation of intervein tissue of the wing and is allelic to blistered. *Development (Cambridge, England)* 1996, **122**(9):2589-2597.
37. Smulders-Srinivasan TK, Szakmary A, Lin H: A *Drosophila* chromatin factor interacts with the Piwi-interacting RNA mechanism in niche cells to regulate germline stem cell self-renewal. *Genetics* 186(2):573-583.
38. Marendra DR, Zraly CB, Dingwall AK: The *Drosophila* Brahma (SWI/SNF) chromatin remodeling complex exhibits cell-type specific activation and repression functions. *Developmental biology* 2004, **267**(2):279-293.
39. Cacace AM, Michaud NR, Therrien M, Mathes K, Copeland T, Rubin GM, Morrison DK: Identification of constitutive and ras-inducible phosphorylation sites of KSR: implications for 14-3-3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR overexpression. *Molecular and cellular biology* 1999, **19**(1):229-240.
40. Marendra DR, Zraly CB, Feng Y, Egan S, Dingwall AK: The *Drosophila* SNR1 (SNF5/INI1) subunit directs essential developmental functions of the Brahma chromatin remodeling complex. *Molecular and cellular biology* 2003, **23**(1):289-305.
41. Elfring LK, Daniel C, Papoulas O, Deuring R, Sarte M, Moseley S, Beek SJ, Waldrip WR, Daubresse G, DePace A, *et al.*: Genetic analysis of *brahma*: the *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* 1998, **148**(1):251-265.
42. Collins RT, Furukawa T, Tanese N, Treisman JE: *Osa* associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. *The EMBO journal* 1999, **18**(24):7029-7040.
43. Terriente-Felix A, de Celis JF: *Osa*, a subunit of the BAP chromatin-remodelling complex, participates in the regulation of gene expression in response to EGFR signalling in the *Drosophila* wing. *Developmental biology* 2009, **329**(2):350-361.
44. Lim YM, Nishizawa K, Nishi Y, Tsuda L, Inoue YH, Nishida Y: Genetic analysis of *rolled*, which encodes a *Drosophila* mitogen-activated protein kinase. *Genetics* 1999, **153**(2):763-771.
45. Brehm A, Tufteland KR, Aasland R, Becker PB: The many colours of chromodomains. *Bioessays* 2004, **26**(2):133-140.
46. Feng XH, Derynck R: Mammalian two-hybrid assays. Analyzing protein-protein interactions in transforming growth factor-beta signaling pathway. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2001, **177**:221-239.
47. Wunderlich W, Fialka I, Teis D, Alpi A, Pfeifer A, Parton RG, Lottspeich F, Huber LA: A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *The Journal of cell biology* 2001, **152**(4):765-776.
48. Teis D, Wunderlich W, Huber LA: Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Developmental cell* 2002, **3**(6):803-814.
49. Noguchi K, Shiurba R, Higashinakagawa T: Nuclear translocation of mouse polycomb m33 protein in regenerating liver. *Biochemical and biophysical research communications* 2002, **291**(3):508-515.
50. Prober DA, Edgar BA: *Ras1* promotes cellular growth in the *Drosophila* wing. *Cell* 2000, **100**(4):435-446.
51. Schwartz D, Gygi SP: An iterative statistical approach to the identification of protein phosphorylation motifs from large-scale data sets. *Nature biotechnology* 2005, **23**(11):1391-1398.
52. Kang J, Shi Y, Xiang B, Qu B, Su W, Zhu M, Zhang M, Bao G, Wang F, Zhang X, *et al.*: A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* 2005, **123**(5):833-847.
53. Casar B, Pinto A, Crespo P: Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Molecular cell* 2008, **31**(5):708-721.
54. Kumar JP, Moses K: EGF receptor and Notch signaling act upstream of *Eyeless/Pax6* to control eye specification. *Cell* 2001, **104**(5):687-697.
55. Campbell S, Inamdar M, Rodrigues V, Raghavan V, Palazzolo M, Chovnick A: The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes & development* 1992, **6**(3):367-379.
56. Milan M, Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM: *Beadex* encodes an LMO protein that regulates Apterous LIM-homeodomain activity in *Drosophila* wing development: a model for LMO oncogene function. *Genes & development* 1998, **12**(18):2912-2920.
57. Masucci JD, Miltenberger RJ, Hoffmann FM: Pattern-specific expression of the *Drosophila* decapentaplegic gene in imaginal disks is regulated by 3' cis-regulatory elements. *Genes & development* 1990, **4**(11):2011-2023.
58. Roy F, Labege G, Douziech M, Ferland-McCollough D, Therrien M: KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes & development* 2002, **16**(4):427-438.
59. Andrews NC, Faller DV: A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic acids research* 1991, **19**(9):2499.
60. Anderson CW, Baum PR, Gesteland RF: Processing of adenovirus 2-induced proteins. *Journal of virology* 1973, **12**(2):241-252.
61. Salvaing J, Nagel AC, Mouchel-Vielh E, Bloyer S, Maier D, Preiss A, Peronnet F: The enhancer of trithorax and polycomb *corto* interacts with cyclin G in *Drosophila*. *PloS one* 2008, **3**(2):e1658.
62. Emadali A, Metrakos PP, Kalantari F, Boutros T, Boismenu D, Chevet E: Proteomic analysis of tyrosine phosphorylation during human liver transplantation. *Proteome science* 2007, **5**:1.

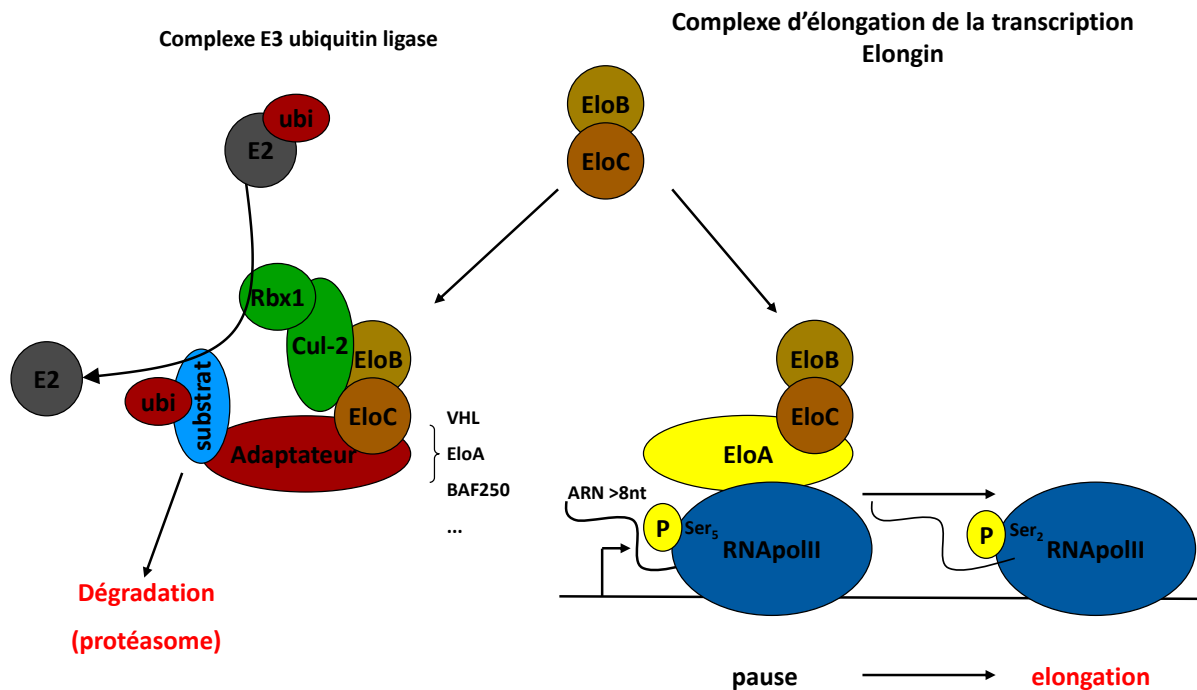
doi:10.1186/1471-213X-11-17

**Cite this article as:** Mouchel-Vielh *et al.*: The MAP kinase ERK and its scaffold protein MP1 interact with the chromatin regulator *Corto* during *Drosophila* wing tissue development. *BMC Developmental Biology* 2011 **11**:17.

## PARTIE II

### I. Présentation du manuscrit

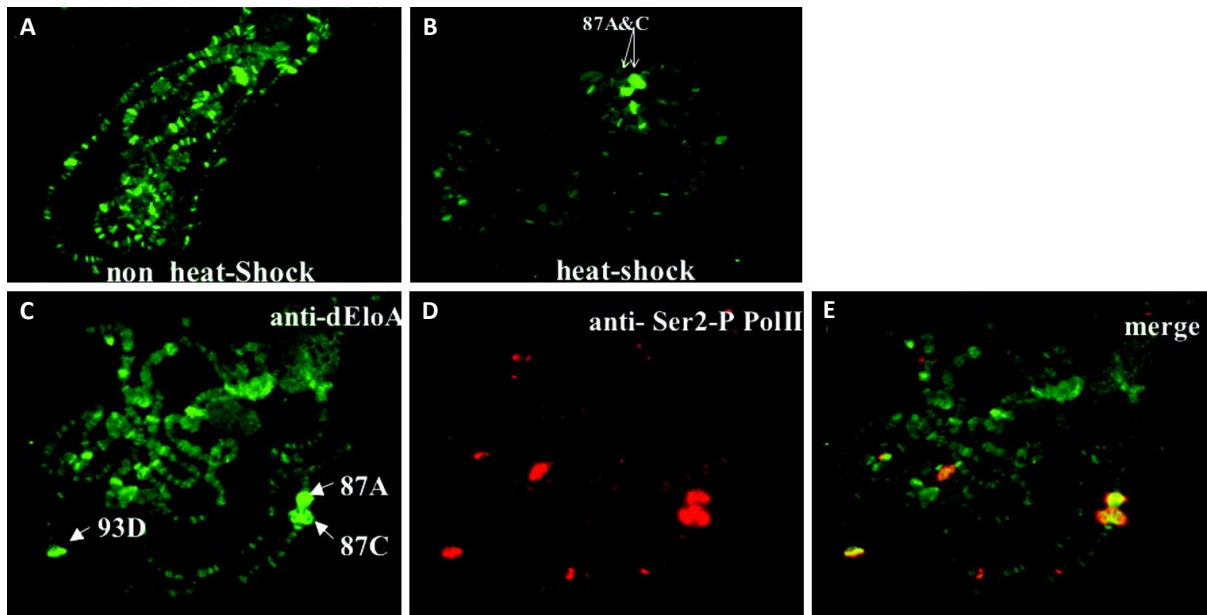
Le facteur de transcription Elongin, aussi appelé facteur de transcription SIII, est un complexe composé de trois sous-unités, purifié chez le rat sur la base de sa capacité à stimuler l'activité de l'ARN Pol II *in vitro* (Bradsher et al., 1993a) (**Figure 20**). L'analyse de ses propriétés a montré que, *in vitro*, Elongin n'a pas d'effet sur l'initiation de la transcription mais augmente la vitesse d'élongation en diminuant les temps de pause de l'ARN polymérase, après que celle-ci ait déjà synthétisé un ARN d'une taille minimale de 7 ou 8 nucléotides (Bradsher et al., 1993b ; Moreland et al., 1998). La plus grande sous-unité, Elongin A, possède l'activité catalytique et est suffisante à elle seule pour augmenter la vitesse de transcription *in vitro* (Aso et al., 1995). Elle interagit directement avec Elongin C, une petite sous-unité d'environ 15 kDa possédant un domaine BTB/POZ, un domaine d'interaction protéine-protéine (Garrett et al., 1994). La troisième sous-unité, Elongin B, d'une taille de 18 kDa, possède un domaine d'homologie avec l'ubiquitine et interagit avec Elongin C (Garrett et al., 1995). *In vitro*, Elongin C est suffisante pour augmenter l'activité de Elongin A alors que Elongin B possède un rôle de protéine chaperon permettant de stabiliser le complexe (Aso et al., 1995). Le complexe Elongin et ses différents composants ont été trouvés dans différentes espèces eucaryotes, de la levure jusqu'à l'homme (Aso and Conrad, 1997 ; Aso et al., 1996), où il existe trois sous-unités Elongin A différentes (Aso et al., 2000 ; Yamazaki et al., 2002). Chez la drosophile, il existe un seul homologue de *elongin A* codant une protéine possédant effectivement une activité de stimulation de l'élongation de la transcription *in vitro*. Ce gène est exprimé tout au long du développement et son expression augmente chez la larve de deuxième stade et jusqu'au stade pupal. Une inactivation



**Figure 20 : Rôles des protéines du complexe Elongin**

EloB et EloC forment un hétérodimère appartenant à deux complexes différents. D'une part, il interagit avec EloA pour former le complexe d'élongation de la transcription. *In vitro*, ce complexe permet de diminuer le temps des pauses de l'ARN Pol II lorsque celle-ci a déjà synthétisé un ARN d'au moins 7 ou 8 nucléotides. EloB/C fait aussi partie du complexe E3 ubiquitine ligase ECS (ElonginB/C-Cullin-2-SOCSbox protein). Ce complexe peut poly-ubiquitinyler différents substrats, les adressant au protéasome, ou les mono-ubiquitinyler.

d'*elongin A* par ARN interférence conduit à une forte létalité durant le stade pupal. *In vivo*, Elongin A se fixe sur les chromosomes polytènes de glandes salivaires et co-localise en de nombreux sites avec l'ARN Pol II phosphorylée sur la sérine 5 ou la sérine 2. Il existe cependant des sites où l'ARN Pol II est présente, mais Elongin A absente, ce qui suggère que le complexe Elongin régulerait certains gènes de façon spécifique. Notamment, Elongin A est fixée sur les gènes de réponses à l'ecdysone ainsi que sur les gènes de réponse au choc thermique après induction, où elle co-localise avec l'ARN Pol II phosphorylée sur la sérine 2 (Gerber et al., 2004) (**Figure 21**). Bien qu'Elongin A soit requise pour l'expression de *hsp70*, elle n'est pas nécessaire pour le recrutement de l'ARN Pol II et sa phosphorylation (Gerber et al., 2005). De plus, bloquer la phosphorylation de l'ARN Pol II sur la sérine 2 en mutant *cdk9* n'affecte pas le recrutement d'Elongin A (Smith et al., 2008). Enfin, si l'activité d'Elongin A semble requise pour l'élongation active de la transcription, son interaction par co-immunoprécipitation avec l'ARN Pol II a été détectée uniquement avec la forme phosphorylée sur la sérine 5, que ce soit chez la drosophile ou chez l'homme (Gerber et al., 2004 ; Yasukawa et al., 2008). En plus de son rôle dans l'expression de *hsp70*, Elongin A semble requise pour l'expression correcte de deux gènes homéotiques en pause chez la drosophile : *Ubx* et *Abd-B* (Chopra et al., 2009b). Des clones mitotiques perte de fonction pour *elongin A* présentent d'autres défauts, comme la présence de veines ectopiques, de « cross-vein » incomplètes et de perte ou de duplication des macrochaetes du notum. Ces phénotypes pourraient être dus à une perturbation des voies de signalisation EGF, Dpp ou Notch, dont de nombreux composants sont codés par des gènes en pause transcriptionnelle (Chopra et al., 2009b). Ces observations suggèrent donc que le complexe Elongin joue un rôle important dans la régulation de l'expression de certains gènes en pause au cours du développement de la drosophile.



**Figure 21 : Après un choc thermique, Elongin A et l'ARN Pol II sont relocalisées au locus des gènes de réponse au choc thermique**

Haut : Immunomarquage d'Elongin A sur les chromosomes polytènes avant (A) et après choc thermique (B). Après choc thermique, Elongin A est relocalisée majoritairement sur les locus des gènes de réponse au choc thermique situés aux positions chromosomiques 87A et 87C. Bas : Immunomarquage d'Elongin A (C) et de l'ARN Pol II phosphorylée sur la sérine 2 (D) après choc thermique. On peut voir une colocalisation de ces deux protéines au niveau des locus des gènes de réponse au choc thermique (E). (D'après Gerber et al., 2005)

Elongin B et C forment également un hétérodimère capable d'interagir avec d'autres protéines possédant un domaine appelé boîte B/C. La première protéine de cette famille qui a été identifiée est le suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (VHL). Une hypothèse formulée quant à cette interaction était la possibilité pour VHL d'entrer en compétition avec Elongin A pour la fixation avec ElonginB/C et ainsi influencer sur le contrôle de la transcription (Duan et al., 1995). Mais le complexe ElonginB/C est 100 fois plus abondant que Elongin A ou VHL, rendant cette hypothèse peu probable (Conaway et al., 1998). D'autres études ont ensuite montré que la fixation de VHL à Elongin B/C participait à la formation d'un complexe E3-ubiquitin ligase, avec les protéines Cullin-2/4 et Rbx1, de type ECS (ElonginB/C-Cullin2/5-SOCS-box protein) (**Figure 20**). Une des principales cibles de ce complexe est la protéine HIF, un régulateur majeur des gènes induits en conditions d'hypoxie, qui est poly-ubiquitinylée et dégradée *via* le protéasome en présence d'oxygène (Kim and Kaelin, 2003). Au sein du complexe E3-ubiquitin ligase, VHL peut être remplacée par différentes protéines et permettre l'adressage du complexe à de très nombreux substrats. Chez l'homme, Elongin A fait elle-même partie d'un tel complexe qui induit la dégradation de l'ARN Pol II après irradiation. La polymérase bloquée par des cassures de l'ADN serait ainsi détruite, ce qui permettrait la réparation de ces dommages. L'ARN Pol II définitivement bloquée au cours de la transcription pourrait aussi être dégradée de la même façon, ce qui participerait à la fonction d'élongation de la transcription du complexe Elongin (Yasukawa et al., 2008). La sous-unité BAF250/ARID1 du complexe SWI/SNF humain forme aussi un complexe E3-ubiquitin ligase avec ElonginB/C et a comme cible principale l'histone H2B. Celle-ci est mono-ubiquitinylée sur la lysine 120, ce qui constitue une marque épigénétique activatrice de la transcription. Cette fonction semble conservée par l'homologue de BAF250/ARID1, Osa, chez la Drosophile (Li et al., 2010).



Un crible double-hybride réalisé dans l'équipe avec Corto a permis d'identifier la sous-unité Elongin C. Dans l'article qui suit, nous présentons l'étude du rôle fonctionnel de cette interaction au cours du développement des tissus de l'aile. Il reste cependant à compléter les expériences d'immunoprécipitation de chromatine sur la séquence de *rho* pour finaliser ce travail.

## **II. Manuscrit 2**

# The chromatin factor Corto antagonizes the Elongin complex during *Drosophila* wing tissue development

Julien Rougeot<sup>1\*</sup>, Myrtille Renard<sup>1\*</sup>, Neel B. Randsholt<sup>1</sup>, Frédérique Peronnet<sup>1</sup> and Emmanuèle Mouchel-Vielh<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR7622 Paris, F-75005 France; Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7622, Laboratoire de Biologie du Développement, Equipe Chromatine et Développement, Paris, F-75005 France

\* Equal contributions

§Corresponding author

## Abstract

*Drosophila* wings are mainly constituted of two cell types, vein and intervein cells. Acquisition of these two fates depends on the specific expression of genes that are controlled by several signaling pathways. Although not completely understood, the nuclear mechanisms that translate signaling into gene expression regulation involve chromatin factors from the Trithorax (TrxG) and the Enhancers of Trithorax and Polycomb (ETP) families. For example, the ETP Corto participates with the EGFR/ERK pathway to promote intervein fate. We examine here the functional relationships between Corto and the Elongin complex during wing development. Elongin is a transcription factor that increases RNA polymerase II elongation rate *in vitro* by suppressing transient pausing. We show that Corto and Elongin interact *in vivo*, although they share very few sites on polytene chromosomes. Genetic interactions reveal that Elongin participates in wing tissue development and antagonizes *corto* as well as several *trxG* genes. In addition, chromatin immunoprecipitation experiments indicate that Elongin binds the vein-promoting gene *rhomboid* in wing imaginal discs. We therefore propose that Corto and Elongin could both participate in the tissue-specific transcriptional regulation of *rhomboid*.

## Introduction

*Drosophila* wings are mainly composed of two cell types, the vein and intervein cells. In *Drosophila melanogaster*, vein cells form a stereotyped network of seven veins (five longitudinal veins and two cross-veins) that act as rigid supports necessary for flight. Intervein cells are much more abundant than vein cells and separate veins from each other. These two cell types present different characteristics. Vein cells are more darkly pigmented than intervein cells. Intervein cells from the two apposed monolayers of the wing strongly adhere *via* integrins. In contrast, vein cells do not adhere to each other, and thus form fluid-conducting tubes within intervein tissue. Furthermore, intervein cells die shortly after adult emergence, whereas vein cells survive into adulthood. Intervein and vein tissues develop in wing imaginal discs from the third larval stage to the pupal stage, and rely on several developmental transduction pathways. One of these involves the *Drosophila* EGF receptor (DER) and the MAP kinase ERK (for a review, see Blair, 2007). While initial wing disc proliferation is induced by general activation of DER-ERK signaling, specification and differentiation of veins and interveins are based on fine-tuned ERK activation. Longitudinal veins are first determined as broad regions named proveins, each one expressing a specific combination of transcription factors that gives positional information. From the late third larval instar to the pupal stage, localized expression of *rhomboid* (*rho*) in provein cells directs them to differentiate as veins (Sturtevant et al., 1993). *rho* encodes a protein required for the proteolytic processing of DER ligands (Lee et al., 2001; Urban et al., 2001), which is necessary for ERK activation in future vein cells (Guichard et al., 1999). In addition, DER-ERK signaling activates *rho* expression, which provides a positive feedback loop on the pathway

(Martin-Blanco et al., 1999). Whereas *rho* is required for the development of vein cells, *blistered (bs)*, that encodes a homolog of the mammalian Serum Response Factor (SRF), is expressed in the future intervein cells of third larval instar and pupal wing discs and controls formation of intervein tissue (Fristrom et al., 1994; Montagne et al., 1996). *bs* is repressed by DER-ERK signaling in pro vein territories and represses *rho* in future intervein cells (Roch et al., 1998). Development of vein and intervein cells thus depends on the outcome of a fine-tuned balance between *rho* and *bs* expression patterns, that are both regulated by the DER-ERK pathway.

Although the mechanisms that trigger spatial and temporal DER-ERK signaling are well described, little is known about the nuclear mechanisms that translate signaling into gene expression regulation. Several studies have reported connections between DER-ERK signaling and chromatin factors from the Trithorax (TrxG) and Enhancers of Trithorax and Polycomb (ETP) families. TrxG proteins form complexes that bind chromatin, deposite specific post-translational histone modifications and remodel nucleosomes. TrxG complexes maintain chromatin in an open conformation and counteract transcriptional repression mediated by Polycomb complexes (PcG). Hence, TrxG complexes mostly maintain active gene expression (for reviews, see Beck et al., 2010; Schuettengruber et al., 2011). However, the TrxG complexes BAP and PBAP, *Drosophila* counterparts of the yeast SWI/SNF complex (Crosby et al., 1999; Tamkun et al., 1992) also participate in transcriptional repression of certain genes (Coisy et al., 2004; Rendina et al., 2010). ETP are PcG and TrxG co-factors involved in both PcG silencing and TrxG activation, and could therefore participate in a switch between activation and repression of transcription (for a review, see Grimaud et al., 2006). Several TrxG members are involved in wing tissue development. The chromatin remodeling complexes BAP and PBAP were

proposed to participate in differential regulation of *rhomboid* expression (Marenda et al., 2004; Rendina et al., 2010 ; Terriente-Felix and de Celis, 2009). Kismet (Kis), a TrxG protein of the Chromodomain-Helicase-DNA binding (CHD) family (Daubresse et al., 1999; Therrien et al., 2000), also plays a role in vein development (Terriente-Felix et al., 2011). Indeed, *kis* mutants present ectopic wing veins and increase the wing phenotype of mutants for *snr1*, encoding a component of the BAP complex (Crosby et al., 1999; Marenda et al., 2004; Marenda et al., 2003; Zraly et al., 2003). Interestingly, the ETP Corto is also involved in wing tissue development and associates with ERK and its scaffold protein MP1 on chromatin (Lopez et al., 2001; Mouchel-Vielh et al., 2008; Mouchel-Vielh et al. 2011).

To better understand Corto function, we performed a two-hybrid screen using the amino-terminal half of the protein as a bait (Salvaing et al., 2008). Elongin C, a subunit of the Elongin complex, was isolated during this screen. The Elongin complex was initially purified from rat liver extracts based on its ability to increase the catalytic rate of RNA polymerase II (RNA-PolII) transcription *in vitro* (Bradsher et al., 1993). The Elongin complex is a heterotrimer composed of a catalytic subunit, Elongin A (EloA), responsible for transcriptional activity, and two regulatory subunits, Elongin B (EloB) and Elongin C (EloC). Whereas EloC increases EloA specific activity, EloB acts as a chaperon that facilitates assembly and enhances stability of the Elongin complex (Aso et al., 1995). *In vitro* experiments have shown that the Elongin complex acts through suppression of transient RNA-PolII pausing (Bradsher et al., 1993; Takagi et al., 1995). Together with other proteins, EloB and EloC also participate in formation of an E3-ubiquitin ligase complex (Brower et al., 2002; Kamura et al., 2001; Kamura et al., 1999; Kamura et al., 1998). The Elongin complex has been conserved during evolution since EloA, B and C homologs exist in mammals, *C. elegans*, *D.*

*melanogaster* and *S. cerevisiae* (Aso and Conrad, 1997; Aso et al., 1996; Aso et al., 2000; Bradsher et al., 1993; Gerber et al., 2004; Yamazaki et al., 2002). In *Drosophila*, *EloA* down-regulation by RNA interference induces lethality, which suggests that the Elongin complex is essential for development (Gerber et al., 2004). Here, we address the role of the Elongin complex in wing tissue development. We validate its interaction with Corto *in vivo* and demonstrate by genetic analyses that it participates in wing tissue development, antagonizing *corto* and certain *trxG* genes. We show that EloC and Corto share but few sites on polytene chromosomes, suggesting that their interaction may be either transient or restricted to few targets. Lastly, we performed chromatin immunoprecipitation experiments to test whether Corto and Elongin both participate in the tissue-specific transcriptional regulation of *rhomboid*.

## Results and discussion

### Corto interacts with the Elongin complex *in vivo*

To confirm the Corto-EloC interaction detected in the two-hybrid screen, we performed co-immunoprecipitation experiments with tagged proteins expressed in *Drosophila* S2 cells. We also addressed whether Corto interacted with the EloC subunit only or with the EloA catalytic or the EloB regulatory subunits as well. The three Elongin fusion proteins were mainly detected in nuclear extracts of S2 cells (data not shown), as observed for the mammalian ones (Kamura et al., 1998). We first tested co-immunoprecipitation between Elongin fusion proteins, to check that they behaved as the native ones. Using whole cell extracts, we detected a strong interaction between EloA and EloC (Figure 1A) as well as between EloB and EloC (Figure 1B). In contrast, EloA and EloB co-immunoprecipitated very weakly and only after treating cells with a cross-link reagent in order to stabilize protein interactions (data not shown). These results show that, in *Drosophila* as in mammals (Aso et al., 1995; Takagi et al., 1996), EloA binds EloC, whereas its interaction with EloB is indirect and mediated by EloC. We then addressed the interactions between Elongin proteins and Corto. EloC and Corto co-immunoprecipitated very efficiently without cross-link treatment (Figure 1C), confirming the two-hybrid result. For EloA and EloB, we detected no interaction without cross-link treatment. After cross-linking, we observed a strong co-immunoprecipitation between Corto and EloA (Figure 1D), but only a very weak one between Corto and EloB (Figure 1E). All together, these results show that Corto interacts with the whole Elongin complex, probably *via* direct binding to the EloC subunit. EloC binds a degenerate BC box motif, defined as XLXXX(C,S)XXX(A,I,L,V) (Aso et al., 1996); (Kamura et al., 1998). Interestingly, two



BC boxes that could mediate the interaction between Corto and EloC are present in the C-terminal half of Corto (Figure 1F).

## Characterization of transgenic lines deregulating *Elo* genes

We wanted to address whether the Elongin complex, like Corto, was involved in control of wing tissue development (Mouchel-Vielh et al., 2011). To deregulate expression of *Elo* genes, we used transgenic lines where a *P* element was inserted in or nearby each of these genes (Figure 2A). The *EloA*<sup>G4930</sup> line is homozygous viable and contains an *EP* element located 58bp after the annotated *EloA* transcription start site (TSS). This element, which contains *UAS* sequences, potentially allows *EloA* over-expression when driven by a *Gal4*-expressing transgene (Bellen et al., 2004). It is also the case for the *EloB*<sup>EP3132</sup> homozygous lethal line, whose *EP* element insertion site is 21bp after *EloB* TSS (Rorth, 1996). For this line, lethality occurs during early development since no homozygous *EloB*<sup>EP3132</sup> third instar larvae were observed. For *EloC*, we used the *EloC*<sup>SH1520</sup> and *EloC*<sup>SH1299</sup> lines, which contain a *P{lacW}* element inserted either 31bp upstream or 34bp downstream from the *EloC* TSS, respectively (Oh et al., 2003). *EloC*<sup>SH1520</sup> was also homozygous lethal at early developmental stages, whereas a few homozygous *EloC*<sup>SH1299</sup> third instar larvae developed, but none reached the adult stage. Rare heteroallelic *EloC*<sup>SH1520</sup>/*EloC*<sup>SH1299</sup> third instar larvae were also observed.

First, we quantified *Elo* mRNA levels in heterozygous and homozygous third instar larvae from these lines, to see whether the insertions affected *Elo* gene transcription. As shown in Figure 2B, all four transgenic lines exhibited decreased *Elo* gene expression (between 1.4 and 3-fold reduction, depending on the genotype). These insertions therefore behaved as hypomorphic, loss of function alleles.

The early lethality (before the third larval instar) of *EloB*<sup>EP3132</sup>, *EloC*<sup>SH1520</sup> or *EloC*<sup>SH1299</sup> homozygotes revealed that both *EloB* and *EloC* are essential genes. The same conclusion was previously drawn for *EloA* using a transgenic line down-regulating *EloA* by RNA interference (Gerber et al., 2004). *EloA*<sup>G4930</sup> homozygous individuals are probably viable because they express enough protein to correctly achieve development, despite their decreased level of *EloA* mRNA (Figure 2B). Our results therefore show that all Elongin complex subunits, and not only the *EloA* catalytic one, are essential for proper development. Surprisingly, animals with RNA interference-reduced *EloA* level died during the pupal stage (Gerber et al., 2004), whereas lethality of *EloB* and *EloC* homozygotes occurred much earlier. This discrepancy might reflect the fact that maternal *EloA* product is more abundant or more stable thus being sufficient to allow development up to the pupal stage.

When driven by the ubiquitously expressed *daughterless::Gal4* (*da::Gal4*) transgene, the *EloA*<sup>G4930</sup> and *EloB*<sup>EP3132</sup> insertions induced huge over-expression of *EloA* and *EloB* (35 or 15-fold increase, respectively) (Figure 2C). To over-express *EloC*, we generated lines containing a *Myc-EloC* transgene controlled by *UAS* sequences. When driven by *da::Gal4*, the *Myc-EloC* fusion protein was detected in protein extracts from third instar larvae (data not shown). Ubiquitous over-expression of *Elo* genes using *EloA*<sup>G4930</sup>, *EloB*<sup>EP3132</sup> or *UAS::Myc-EloC* lines and the *da::Gal4* driver induced no lethality, showing that activity of the Elongin complex is not drastically impaired by excess of one of its components.

## The Elongin complex participates in wing tissue development

Homozygous *EloA*<sup>G4930</sup> flies had normal wings. In contrast, 19 to 39% of heterozygous *+EloB*<sup>EP3132</sup> females showed a truncated L5 longitudinal vein (Figure 3B). A similar phenotype was observed for *EloC* heterozygotes, although much less penetrant (1 to 1.4% of females). This phenotype resembles that of flies heterozygous for a mutant allele of the vein-promoting gene *rhomboid* (*rho*). Indeed, we observed a truncated L5 vein for 13.2% of females heterozygous for the *rho*<sup>ve1</sup> hypomorphic allele (Sturtevant et al., 1993) (Figure 3C), and for 24.2% of females heterozygous for the *rho*<sup>7M43</sup> amorphic allele (Klambt et al., 1991). In all these genetic contexts, the truncated L5 vein phenotype was also observed in males, although less penetrant than in females. A previous study reported that *EloA* mutant mitotic clones produced ectopic wing veins (Chopra et al., 2009). However, since this result was obtained using the *Df(3R)Exel6274* deficiency that uncovers *EloA* as well as more than 10 other genes, this ectopic vein phenotype might not be the consequence of *EloA* loss-of-function alone.

Over-expression of *EloA* driven by the wing specific *scalloped::Gal4* transgene (*sd::Gal4>EloA*<sup>G4930</sup>) induced margin defects (79% of flies) as well as ectopic vein tissue (54% of flies) (Figure 3D). Such phenotypes were not observed when over-expressing *EloB* or *EloC* with the same driver. These data suggest that the global activity of the *Drosophila* Elongin complex is more sensitive to the dosage of the catalytic *EloA* subunit than to those of the *EloB* or *EloC* regulatory subunits. Indeed, in mammals, *EloA* is the limitant component of the Elongin complex since the *EloB-C* sub-complex is in large excess (100 to 1000-fold more abundant than *EloA*) (Conaway et al., 1998; Kamura et al., 1998). Importantly, the *EloA* over-expression

phenotype (*i.e* formation of ectopic veins) is opposite to the *EloB* loss-of-function phenotype (*i.e* truncation of vein), and recalls the *rho* over-expression phenotype observed when driving the *rho*<sup>EP3704</sup> transgene with *sd::Gal4* (Mouchel-Vielh et al., 2011; Figure 3E).

To further investigate implication of the Elongin complex in wing tissue formation, we performed genetic interactions between *EloC* and genes involved in the ERK signaling pathway. We first used a line containing the *UAS::rolled*<sup>Sem</sup> (*rl*<sup>Sem</sup>) transgene that encodes a hyper-active form of ERK (Brunner et al., 1994; Lim et al., 1999). At 20°C, flies over-expressing *rl*<sup>Sem</sup> in wing discs (*sd::Gal4>UAS::rl*<sup>Sem</sup>) exhibited ectopic veins as well as blisters (Figure 3F, Table 1). These blisters, which result from impaired adhesion between the ventral and dorsal wing surfaces, can be caused by many ectopic vein cells formed within intervein tissue. Hence, they correspond to a strong ectopic vein phenotype. Blisters are frequently observed in loss-of-function mutants for the intervein-promoting gene *blistered* (*bs*), or when over-expressing the vein-promoting gene *rho* (Fristrom et al., 1994; Montagne et al., 1996; Sturtevant et al., 1993). Expressivity of the *rl*<sup>Sem</sup> phenotype was lowered by a copy of either *EloC*<sup>SH1520</sup> or *EloC*<sup>SH1299</sup> loss-of-function allele. Indeed, we observed fewer flies with the strong phenotype, *i.e* blistered wings (33.2% and 57% respectively, instead of 92.4% for *sd::gal4>UAS::rl*<sup>Sem</sup> alone), and more flies with the mild phenotype, *i.e* ectopic veins only (66.8% and 43% respectively, instead of 7.6% for *sd::gal4>UAS::rl*<sup>Sem</sup> alone) (Table 1). We also combined *EloC* alleles with the *bs*<sup>EY23316</sup> loss-of-function allele, which alone induced a strong ectopic vein phenotype in most flies (92%) (Figure 3G, Table 1). This phenotype results from the ectopic expression of *rho* in intervein cells due to insufficient *bs* expression (Montagne et al., 1996; Roch et al., 1998). As shown in Figure 3H and in Table 1, *EloC*<sup>SH1520</sup> and

*EloC*<sup>SH1299</sup> alleles reduced both expressivity and penetrance of the ectopic vein phenotype induced by *bs*<sup>EY23316</sup>, since less flies presented the strong phenotype (17% and 24.2%, respectively), and some of them even had no ectopic veins (9.5% of *EloC*<sup>SH1299</sup>/*bs*<sup>EY23316</sup> flies).

All together, these results show that the Elongin complex participates in wing tissue development. In *Drosophila*, EloA associates with transcriptionally active sites on polytene chromosomes, which strongly supports a role of the Elongin complex as an RNA-PolIII elongation factor *in vivo* (Gerber et al., 2004). The phenotypes induced by deregulation of the *Elo* genes, as well as the genetic interactions with *rl* and *bs*, strongly suggest that this complex participates in transcriptional activation of one (or several) gene(s) involved in vein formation. In *Elo* loss-of-function mutants, down-regulation of this/these target(s) in vein cells could lead to truncated veins. Over-expression of *EloA* in intervein cells could, on the other hand, induce its(their) ectopic expression and thus formation of ectopic veins. Since *Elo* and *rho* loss-of-function as well as over-expression phenotypes are very similar, *rho* might be a target of the Elongin complex.

## ***Elo* mutants antagonize wing phenotypes of *corto* and several *trxG* mutants**

To understand the functional relationships between the Elongin complex and Corto, which both are involved in wing tissue development, we analyzed their genetic interactions. Flies heterozygous for *corto*<sup>L1</sup> or *corto*<sup>07128</sup> loss-of-function alleles exhibit ectopic veins (Figure 3I, Table 2) (Mouchel-Vielh et al., 2011). We found that *Elo*

loss-of-function alleles drastically reduced penetrance of this phenotype in trans-heterozygous flies (Table 2).

Next, we looked for genetic interactions between *Elo* genes and the *trxG* genes *moira* (*mor*), *kis* and *trithorax* (*trx*). *mor* encodes a core-component of the Brm BAP complex. *kis* and *mor* genetically interact with *corto* during wing tissue development (Lopez et al., 2001; Marena et al., 2004). *trx* encodes a SET-domain methylase belonging to the TAC1 TrxG complex (Nagy et al., 2002; Petruk et al., 2001) that physically interacts with Snr1, a component of BAP (Rozenblatt-Rosen et al., 1998). TAC1, Brm and Kis act sequentially during the transcription cycle, where TAC1 and Brm are involved in RNA-PolIII recruitment to promoters, while Kismet facilitates an early step of transcriptional elongation (Srinivasan et al., 2005). Ectopic veins were observed in wings of flies heterozygous for *mor*<sup>1</sup> or *kis*<sup>1</sup> loss-of-function alleles (Figure 3J-K, Table 3) as previously described (Curtis et al., 2011; Terriente-Felix et al., 2011). The *trx*<sup>E2</sup> loss-of-function allele also induced this phenotype (Figure 3L, Table 3). When combining each of these *trxG* alleles with different loss-of-function *Elo* alleles, ectopic veins were always significantly reduced, as with *corto* alleles (Table 3).

The presence of ectopic veins within intervein tissue in *corto* and *trxG* loss-of-function mutants suggests that these proteins contribute to intervein fate, possibly by repressing directly or indirectly one or several vein-promoting genes. Corto was previously shown to participate in ERK-mediated wing tissue development through direct interaction with ERK on chromatin, thus potentially regulating gene expression (Mouchel-Vielh et al., 2011). The BAP complex might differentially regulate expression of the vein-promoting gene *rho* in future vein and intervein cells (Marena et al., 2004). In addition, Bap170, a subunit of the PBAP complex, antagonizes ERK

signaling in intervein tissue by repressing *rho* transcription (Rendina et al., 2010). We show here that *Elo* loss-of-function antagonizes the ectopic vein phenotype induced by *corto* and several *trxG* loss-of-function mutants. Since the ectopic vein phenotype could reflect ectopic *rho* expression in intervein cells, the Elongin complex might be involved in ectopic activation of *rho* transcription, downstream of Corto and TrxG complexes. This conclusion agrees with our analysis of the *Elo* deregulation wing phenotypes as well as with our genetic interaction data between *EloC*, *rl* and *bs*.

## **EloC binds polytene chromosomes and shares a few sites with Corto**

*Drosophila* EloA binds polytene chromosomes at many sites, and extensively co-localizes with RNA-PolIII phosphorylated on serine 5 (RNA-PolIII-S5p, paused form) as well as on serine 2 (RNA-PolIII-S2p, elongating form) (Gerber et al., 2004). However, the EloA and phospho-RNA-PolIII overlap was not complete, suggesting that the Elongin complex may not have a general role in transcription, but instead acts as a transcriptional activator for a subset of genes. Indeed, EloA is rapidly recruited to heat-shock loci in response to heat-shock, and *EloA* down-regulation induces a strong reduction of *Hsp70* mRNA, suggesting that the Elongin complex plays a critical role in regulating *Hsp70* gene expression in *Drosophila* (Gerber et al., 2005). To determine whether EloC, as EloA, binds chromatin and whether EloC and Corto interact on chromatin, we performed co-immunostainings of polytene chromosomes from larvae expressing the Myc-EloC fusion protein driven by the ubiquitous *da::Gal4* transgene (Figure 4). Myc-EloC bound polytene chromosomes at many sites preferentially located at DAPI interbands, suggesting that it localized in open chromatin. Consistently, Myc-EloC extensively co-localized with H3K36me3

that correlates with transcriptional elongation (Joshi and Struhl, 2005; Pokholok et al., 2005) (Figure 4A). Interestingly, only a few of the Myc-EloC sites were shared with Corto (yellow arrows on Figure 4B). The chromatin landscape of Corto on polytene chromosomes has been analyzed using antibodies against epigenetic marks (H3K27me3, a repressive mark; H3K4me3, an activation mark) and phospho-RNA-PolII (Coleno et al., submitted). Corto does not overlap with H3K27me3 but shows many co-localizations with H3K4me3. In addition, Corto shares many sites with paused RNA-PolII-S5p and very few with elongating RNA-PolII-S2p. These data strongly suggest that Corto mostly binds transcriptionally permissive chromatin. Corto might control the balance between paused and active transcription. The fact that Corto and the Elongin complex physically interact but showed only few co-localizations on chromatin suggests that they interact only transiently or on a few target genes only. It is tempting to speculate that their interaction could manage the switch between paused and active transcription. Corto and the Elongin complex may have opposite functions in the transcription process of some particular genes, the former as a pause maintenance factor and the latter as an elongation factor. This proposal would agree with our genetic interaction data, which showed antagonistic roles for Corto and the Elongin complex during wing tissue development.

### ***rho* could be a common transcriptional target of Corto and the Elongin complex during wing tissue development**

Our phenotypic and genetic interaction data suggest that the vein-promoting gene *rho* could be transcriptionally regulated by the Elongin complex during wing tissue development. In addition, two independent genome-wide studies have shown



that *rho* bears paused RNA-PolIII within the promoter-proximal region, which suggests that its expression could be regulated at the level of transcriptional elongation (Muse et al., 2007; Zeitlinger et al., 2007). We therefore hypothesized that differential *rho* expression in vein and intervein cells may involve Corto and the Elongin complex in a transcriptional pause mechanism. In future vein cells, the Elongin complex may participate in *rho* transcriptional elongation. In this tissue, *rho* expression seems independent of Corto, since *corto* deregulation (either loss-of-function or over-expression) induced only ectopic veins within intervein tissue and never truncated veins (Mouchel-Vielh et al., 2011). On the other hand, in future intervein cells, Corto and some TrxG proteins (possibly recruited by Corto), may interact on chromatin with the Elongin complex to maintain *rho* in a paused transcriptional state. Decreasing Corto level may disrupt the Corto-EloC interaction, thereby releasing RNA-PolIII from the paused state and thus inducing *rho* ectopic expression and formation of ectopic veins.

To test this hypothesis, we performed chromatin immunoprecipitation experiments on third instar wing imaginal discs from larvae that express the Myc-EloC fusion protein using the wing-specific driver *sd::Gal4*. In this tissue, *rho* expression is restricted to a few cells that will give rise to the veins and the wing margin (Sturtevant et al., 1993). We can therefore consider that *rho* is globally in an “OFF” transcription state in wing imaginal discs. As shown on Figure 5, Myc-EloC bound preferentially near the *rho* transcription start site (*rho*-225 and *rho*+79 regions), whereas no enrichment was observed in the coding sequence (*rho*Cds region), or in an untranscribed region located 4.5kb upstream from *rho* (*rho*Nt region). Binding of EloC near the *rho* promoter, but not in the coding sequence, suggests that *rho* is paused in intervein cells. Analysis of RNA-PolIII distribution (either RNA-PolIII-

S5p or RNA-PolIII-S2p) on *rho* will permit to test this hypothesis. We will also study Corto binding on *rho* in wing discs from larvae expressing a tagged version of Corto. Lastly, we will test whether the EloC binding pattern is modified in wing discs of larvae in which the ERK signaling pathway is up-regulated through expression of the *rt<sup>Sem</sup>* transgene.

## Conclusion

We show here that the Elongin complex is involved in *Drosophila* wing tissue development, and propose that this complex may interact with the chromatin factor Corto at some target genes to regulate their transcription in a tissue-specific manner. Genetic analyses as well as chromatin immunoprecipitation experiments suggest that one of these target genes could be the vein-promoting gene *rho*. We therefore propose that the Elongin complex participates in *rho* transcriptional activation in vein cells. In intervein cells, paused RNA-PolIII could be maintained at the *rho* promoter by binding of Corto to the Elongin complex. Corto, as an ETP, could allow recruitment onto *rho* of other chromatin factors, such as the BAP chromatin remodeling complex, that was previously proposed to inhibit *rho* expression in intervein cells. Further chromatin immunoprecipitation experiments are in progress to fully analyze this model.

## Material and methods

### ***Drosophila* strains and genetic crosses**

Flies were raised on standard yeast-cornmeal medium at 25°C. *w*<sup>1118</sup> was used as control strain. All the *Drosophila* lines used were from the Bloomington Stock Center except the *UAS::rolled*<sup>Sem</sup> transgenic line that was a gift from Dr. K. Moses (Kumar and Moses, 2001). Characterization of *corto*<sup>07128</sup> and *corto*<sup>L1</sup> wing phenotypes was previously published (Mouchel-Vielh et al., 2011). Transgenic lines allowing Myc-EloC over-expression were generated by standard *P*-element mediated transformation, after cloning of the whole *EloC* (CG9291) coding region into the *pUASp::Myc Gateway*<sup>TM</sup> vector (a gift from Dr. T. Murphy, <https://dgrc.cgb.indiana.edu/vectors>). Lines containing a transgene controlled by *UAS* sequences were crossed with the ubiquitous *daughterless::Gal4* (*Gal4*<sup>daG32</sup>) and the wing-specific *scalloped::Gal4* (*sd*<sup>SG29.1</sup>) drivers (Roy et al., 1997; Wodarz et al., 1995). All crosses were performed at 25°C, except those between *UAS::rt*<sup>Sem</sup> and *sd::Gal4* that were performed at 20°C to decrease Gal4 activity and therefore lower transgene expression. Wing phenotypes were analyzed in females, but they also arose in males, although less pronounced.

### **Q-RT PCR experiments**

Q-RT PCR experiments were carried out on a CFX96<sup>TM</sup> system (Biorad) using SsoFast EvaGreen<sup>TM</sup> Supermix (Biorad) on cDNA synthesized from total RNA of third instar larvae, as previously described (Mouchel-Vielh et al., 2011). Quantification was done with the standard curve method, using *rp49* and *rpL12* levels for normalization. Primers used were:

EloA-F, 5'-GTGGAATCAGACTGCTGCTGTCG-3';  
EloA-R, 5'-CGACCCAGCGGGATGCAACA-3';  
EloB-F, 5'-CCGAGCTGAAGCGAATGATTGAG-3';  
EloB-R, 5'-GTGGACACCGTCACGCCGTA-3';  
EloC-F, 5'-TCGTCAAACGCGAGCACGCT-3';  
EloC-R, 5'-GGCAAACGACCCGGTCCGG-3';  
rp49-F, 5'-CCGCTTCAAGGGACAGTATC-3';  
rp49-R, 5'-GACAATCTCCTTGCGCTTCT-3';  
rpL12-F, 5'-CCTCCCAAATTCGACCCAA-3';  
rpL12-R, 5'-CACGCAACGCAGGTACACC-3'.

## **S2 cell transfections and co-immunoprecipitations**

*EloA* (CG6755), *EloB* (CG4204), *EloC* (CG9291) and *corto* (CG2530) cDNA were cloned into Gateway™ *Drosophila* vectors (gifts from Dr. T. Murphy, <https://dgrc.cgb.indiana.edu/vectors>) allowing expression of fusion proteins with either Myc or FLAG tag, under control of the *actin5C* promoter. These vectors were transiently transfected into S2 cells (Mouchel-Vielh et al., 2008). Total protein extracts were prepared as previously described (Mouchel-Vielh et al., 2008). For cross-linking, cells were treated with paraformaldehyde (1%) for 10 minutes prior to protein extraction. Co-immunoprecipitation experiments were carried out as previously described, using anti-FLAG (F3165, Sigma) or anti-Myc (sc-40, Santa Cruz Biotechnology) antibodies (Mouchel-Vielh et al., 2011).

## **Immunolocalization on polytene chromosomes**

Co-immunostaining experiments of polytene chromosomes were performed on *da::Gal4>Myc-EloC* salivary glands as previously described (Salvaing et al., 2003) using mouse anti-Myc (1:60) (sc-40, Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-H3K36me3 (1:60) (pAB-058-050, Diagenode) or rabbit anti-Corto (1:20) (Salvaing et al., 2003) as primary antibodies. Secondary antibodies (Alexa<sup>TM</sup> Fluor 488 anti-mouse IgG and Alexa<sup>TM</sup> Fluor 594 anti-rabbit IgG, Molecular Probe) were used at 1:1000 dilutions.

## **Chromatin Immunoprecipitations (X-ChIP)**

X-ChIP experiments were performed on wing discs from *sd::Gal4>UAS::Myc-EloC* or *sd::Gal4/+* third instar larvae, using rabbit anti-Myc antibody (A00172, GenScript). The protocol was modified from Pérez-Lluch *et al.* (Perez-Lluch et al., 2011). 100 discs were fixed in PBS-1% paraformaldehyde for 10 minutes at 20°C, fixation was stopped by addition of glycine to 0.125M final followed by three washes in PBS. Discs were pelleted by centrifugation and rapidly frozen in liquid nitrogen. Sonication was carried out in lysis buffer-1% SDS (lysis buffer: 140mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA, 1% Triton X100, 0.1% sodium-deoxycholate, protease inhibitors) using a Bioruptor<sup>TM</sup> sonicator (Diagenode) to obtain chromatin fragments from 200 to 1000bp. Immunoprecipitation of chromatin from 20 discs was performed in lysis buffer-0.1% SDS using 1µg of antibody and protein-A magnetic beads (Diagenode). After overnight incubation at 4°C, beads were washed 5 times (10 minute washes) in lysis buffer-0.1% SDS, once in LiCl buffer (10mM Tris-HCl pH8, 0.25M LiCl, 0.5% NP40, 0.5% sodium-deoxycholate, 1mM EDTA) and twice in TE buffer. DNA was

purified and eluted in 50µl using the IPure kit (Diagenode). Each Q-PCR reaction was performed on 5µl of eluted DNA using CFX96™ system (Biorad) and SsoFast EvaGreen™ Supermix (Biorad). *rho* primer pairs were located: 225bp upstream from the transcription start site (rho-225), in the 5'UTR region 79bp downstream from the transcription start site (rho+79), in the coding sequence about 1.1kb from the initiation codon (rhoCds), in a non-transcribed intergenic region about 4.5kb upstream from *rho* (rhoNt). Their sequences were:

rho-225F, 5'-TGTGGCAAGGCGGCAGATGG-3';

rho-225R, 5' –TGTGTGGGTGGGTGGGGTGT-3';

rho+79F, 5'-AGTCAGTTGCGTGCGAGCCG-3';

rho+79R, 5'-CAGTCCGACTTTCTCAGTTTGA-3';

rhoCdsF, 5'-CGTCGGATTCGGTGCTGGTC-3';

rhoCdsR, 5'-GGTGGAACCAGTTGGCGTGC-3';

rhoNtF, 5'-CTGCACTTGGTCGCTGGGCA-3';

rhoNtR 5'-GGGGAGGGGGCTCACCCATT-3';

The immunoprecipitated chromatin was quantified by PCR and expressed as the percentage of input chromatin. Fold-enrichments were obtained by dividing the percentage of input of *sd::Gal4>UAS::Myc-EloC* larvae by the one of *sd::Gal4/+* control larvae.

## References

- Aso, T., Conrad, M. N., 1997. Molecular cloning of DNAs encoding the regulatory subunits of elongin from *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun.* 241, 334-40.
- Aso, T., et al., 1996. The inducible elongin A elongation activation domain: structure, function and interaction with the elongin BC complex. *Embo J.* 15, 5557-66.
- Aso, T., et al., 1995. Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science.* 269, 1439-43.
- Aso, T., et al., 2000. Identification and characterization of Elongin A2, a new member of the Elongin family of transcription elongation factors, specifically expressed in the testis. *J Biol Chem.* 275, 6546-52.
- Beck, S., et al., 2010. Maintenance of Hox gene expression patterns. *Adv Exp Med Biol.* 689, 41-62.
- Bellen, H. J., et al., 2004. The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics.* 167, 761-81.
- Blair, S. S., 2007. Wing vein patterning in *Drosophila* and the analysis of intercellular signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23, 293-319.
- Bradsher, J. N., et al., 1993. RNA polymerase II transcription factor SIII. I. Identification, purification, and properties. *J Biol Chem.* 268, 25587-93.
- Brower, C. S., et al., 2002. Mammalian mediator subunit mMED8 is an Elongin BC-interacting protein that can assemble with Cul2 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 10353-8.
- Brunner, D., et al., 1994. A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell.* 76, 875-88.
- Chopra, V. S., et al., 2009. Stalled Hox promoters as chromosomal boundaries. *Genes Dev.* 23, 1505-9.
- Coisy, M., et al., 2004. Cyclin A repression in quiescent cells is associated with chromatin remodeling of its promoter and requires Brahma/SNF2alpha. *Mol Cell.* 15, 43-56.
- Conaway, J. W., et al., 1998. The Elongin BC complex and the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta.* 1377, M49-54.
- Crosby, M. A., et al., 1999. The trithorax group gene moira encodes a brahma-associated putative chromatin-remodeling factor in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol.* 19, 1159-70.
- Curtis, B. J., et al., 2011. Histone lysine demethylases function as co-repressors of SWI/SNF remodeling activities during *Drosophila* wing development. *Dev Biol.* 350, 534-47.
- Daubresse, G., et al., 1999. The *Drosophila* kismet gene is related to chromatin-remodeling factors and is required for both segmentation and segment identity. *Development.* 126, 1175-87.

- Fristrom, D., et al., 1994. Blistered: a gene required for vein/intervein formation in wings of *Drosophila*. *Development*. 120, 2661-71.
- Gerber, M., et al., 2004. In vivo requirement of the RNA polymerase II elongation factor elongin A for proper gene expression and development. *Mol Cell Biol*. 24, 9911-9.
- Gerber, M., et al., 2005. Regulation of heat shock gene expression by RNA polymerase II elongation factor, Elongin A. *J Biol Chem*. 280, 4017-20.
- Grimaud, C., et al., 2006. From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Res*. 14, 363-75.
- Guichard, A., et al., 1999. rhomboid and Star interact synergistically to promote EGFR/MAPK signaling during *Drosophila* wing vein development. *Development*. 126, 2663-76.
- Joshi, A. A., Struhl, K., 2005. Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol Cell*. 20, 971-8.
- Kamura, T., et al., 2001. Muf1, a novel Elongin BC-interacting leucine-rich repeat protein that can assemble with Cul5 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 276, 29748-53.
- Kamura, T., et al., 1999. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science*. 284, 657-61.
- Kamura, T., et al., 1998. The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev*. 12, 3872-81.
- Klambt, C., et al., 1991. The midline of the *Drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell*. 64, 801-15.
- Kumar, J. P., Moses, K., 2001. EGF receptor and Notch signaling act upstream of Eyeless/Pax6 to control eye specification. *Cell*. 104, 687-97.
- Lee, J. R., et al., 2001. Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell*. 107, 161-71.
- Lim, Y. M., et al., 1999. Genetic analysis of rolled, which encodes a *Drosophila* mitogen-activated protein kinase. *Genetics*. 153, 763-71.
- Lopez, A., et al., 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, 572-83.
- Marenda, D. R., et al., 2004. The *Drosophila* Brahma (SWI/SNF) chromatin remodeling complex exhibits cell-type specific activation and repression functions. *Dev Biol*. 267, 279-93.
- Marenda, D. R., et al., 2003. The *Drosophila* SNR1 (SNF5/INI1) subunit directs essential developmental functions of the Brahma chromatin remodeling complex. *Mol Cell Biol*. 23, 289-305.
- Martin-Blanco, E., et al., 1999. A temporal switch in DER signaling controls the specification and differentiation of veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development*. 126, 5739-47.



- Montagne, J., et al., 1996. The *Drosophila* Serum Response Factor gene is required for the formation of intervein tissue of the wing and is allelic to blistered. *Development*. 122, 2589-97.
- Mouchel-Vielh, E., et al., 2008. Involvement of the MP1 scaffold protein in ERK signaling regulation during *Drosophila* wing development. *Genes Cells*. 13, 1099-111.
- Mouchel-Vielh, E., et al., 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.
- Muse, G. W., et al., 2007. RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat Genet*. 39, 1507-11.
- Nagy, P. L., et al., 2002. A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 90-4.
- Oh, S. W., et al., 2003. A P-element insertion screen identified mutations in 455 novel essential genes in *Drosophila*. *Genetics*. 163, 195-201.
- Perez-Lluch, S., et al., 2011. Genome-wide chromatin occupancy analysis reveals a role for ASH2 in transcriptional pausing. *Nucleic Acids Res*. 39, 4628-39.
- Petruk, S., et al., 2001. Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science*. 294, 1331-4.
- Pokholok, D. K., et al., 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*. 122, 517-27.
- Rendina, R., et al., 2010. Bap170, a subunit of the *Drosophila* PBAP chromatin remodeling complex, negatively regulates the EGFR signaling. *Genetics*. 186, 167-81.
- Roch, F., et al., 1998. Genetic interactions and cell behaviour in blistered mutants during proliferation and differentiation of the *Drosophila* wing. *Development*. 125, 1823-32.
- Rorth, P., 1996. A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 12418-22.
- Roy, S., et al., 1997. Muscles in the *Drosophila* second thoracic segment are patterned independently of autonomous homeotic gene function. *Curr Biol*. 7, 222-7.
- Rozenblatt-Rosen, O., et al., 1998. The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 4152-7.
- Salvaing, J., et al., 2003. The *Drosophila* Corto protein interacts with Polycomb-group proteins and the GAGA factor. *Nucleic Acids Res*. 31, 2873-82.
- Salvaing, J., et al., 2008. The enhancer of trithorax and polycomb corto interacts with cyclin G in *Drosophila*. *PLoS One*. 3, e1658.
- Schuettengruber, B., et al., 2011. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12, 799-814.

- Srinivasan, S., et al., 2005. The *Drosophila* trithorax group protein Kismet facilitates an early step in transcriptional elongation by RNA Polymerase II. *Development*. 132, 1623-35.
- Sturtevant, M. A., et al., 1993. The *Drosophila* rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes Dev*. 7, 961-73.
- Takagi, Y., et al., 1995. A novel activity associated with RNA polymerase II elongation factor SIII. SIII directs promoter-independent transcription initiation by RNA polymerase II in the absence of initiation factors. *J Biol Chem*. 270, 24300-5.
- Takagi, Y., et al., 1996. Characterization of elongin C functional domains required for interaction with elongin B and activation of elongin A. *J Biol Chem*. 271, 25562-8.
- Tamkun, J. W., et al., 1992. brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell*. 68, 561-72.
- Terriente-Felix, A., de Celis, J. F., 2009. Osa, a subunit of the BAP chromatin-remodelling complex, participates in the regulation of gene expression in response to EGFR signalling in the *Drosophila* wing. *Dev Biol*. 329, 350-61.
- Terriente-Felix, A., et al., 2011. A conserved function of the chromatin ATPase Kismet in the regulation of hedgehog expression. *Dev Biol*. 350, 382-92.
- Therrien, M., et al., 2000. A genetic screen for modifiers of a kinase suppressor of Ras-dependent rough eye phenotype in *Drosophila*. *Genetics*. 156, 1231-42.
- Urban, S., et al., 2001. *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell*. 107, 173-82.
- Wodarz, A., et al., 1995. Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell*. 82, 67-76.
- Yamazaki, K., et al., 2002. Identification and biochemical characterization of a novel transcription elongation factor, Elongin A3. *J Biol Chem*. 277, 26444-51.
- Zeitlinger, J., et al., 2007. RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat Genet*. 39, 1512-6.
- Zraly, C. B., et al., 2003. SNR1 is an essential subunit in a subset of *Drosophila* brm complexes, targeting specific functions during development. *Dev Biol*. 253, 291-308.

## Figure legends

### Figure 1: Corto interacts with the Elongin complex *in vivo*.

(A, B): EloC-FLAG co-immunoprecipitates with EloA-Myc (A) and EloB-Myc (B). (C, D, E): Corto-FLAG co-immunoprecipitates with EloC-Myc (C), EloA-Myc (D) and EloB-Myc (E). For D and E, co-immunoprecipitations were performed after cross-link treatment. For E, the exposure time for the lower panel was 50 times longer than for the upper panel. In A to E, immunoprecipitations were performed with anti-Myc (Myc-IP), anti-FLAG (FLAG-IP) or anti-HA (Mock-IP) antibodies. Immunoprecipitated proteins were revealed by Western blot using anti-FLAG or anti-Myc antibodies. Arrows show immunoprecipitated proteins, and black asterisks point to heavy or light IgG chains. In A, white asterisks indicate a non-specific band. S: supernatant after immunoprecipitation; IP: protein G-agarose beads. 5% of the input and 50% of the immunoprecipitate were loaded onto the gel. (F): Sequences and positions of the two putative BC boxes identified in the C-terminal half of Corto that may mediate direct interaction with EloC.

### Figure 2: *P*-element insertions in *EloA*, *EloB* or *EloC* induce loss-of-function, and allow over-expression of *EloA* and *EloB*

(A): Structure of *EloA*, *EloB* and *EloC* genes showing localization of the *P*-elements. Exons are represented by rectangles and introns by lines. Black arrowheads show positions of the primer pairs used to quantify *Elo* gene expressions. (B, C): Quantification of *Elo* gene expression by Q-RT PCR in *EloA*<sup>G4930</sup>, *EloB*<sup>EP3132</sup>, *EloC*<sup>SH1520</sup> and *EloC*<sup>SH1299</sup> homozygous or heterozygous larvae (B), or in *EloA*<sup>G4930</sup>/*da::Gal4* or *EloB*<sup>EP3132</sup>/*da::Gal4* larvae (C). The relative *Elo* expression level

was obtained by normalization on *rp49* (black bars) or *rpL12* (grey bars). In B, the normalized level was compared to that of wild type *w<sup>1118</sup>* larvae, and in C to that of the *P*-insertion line without the *Gal4* driver.

**Figure 3: Wing phenotypes associated with deregulation of *Elo* genes and their genetic interactors**

(A): Wing from wild type *w<sup>1118</sup>* fly (L1-L5: longitudinal veins; ACV and PCV: anterior and posterior cross-veins). (B, C): Wings from *+/EloB<sup>EP3132</sup>* and *+/rho<sup>ve1</sup>* flies exhibit similar truncated L5 phenotypes. (D, E): Wings from flies over-expressing *EloB* or *rho* exhibit similar ectopic vein and margin phenotypes. (F): Blister phenotype induced by *rl<sup>Sem</sup>* over-expression. (G, H): The *EloC<sup>SH1520</sup>* loss-of-function allele diminishes expressivity of the ectopic vein phenotype induced by the *bs<sup>EY23316</sup>* loss-of-function allele. (I, J, K, L): Ectopic vein phenotypes induced by *corto*, *mor*, *kis* or *trx* loss-of-function alleles. In B to L, asterisks mark wing phenotypes.

**Figure 4: EloC binds polytene chromosomes and shares a few sites with Corto**

EloC-Myc exhibits many co-localizations with H3K36me3 (A) but only a few with Corto (B). In B, yellow arrows marks co-localizations on the merge view. On this picture, polytene chromosomes from two nuclei are shown. DNA was stained with DAPI.

**Figure 5: EloC binds near the *rhomboid* promoter in wing imaginal discs**

Bottom: Schematic structure of *rho* with exons represented by rectangles and introns by lines. Black arrows show primer pairs used for X-ChIP experiments. Up: X-ChIP results are presented as fold-enrichments in *sd::Gal4>UAS::Myc-EloC* wing imaginal

discs as compared to control *sd::Gal4/+* wing imaginal discs (see Material and Methods).

## Tables

**Table 1: *EloC* loss-of-function suppresses ectopic vein phenotypes induced by blistered loss-of-function and *rolled*<sup>Sem</sup> over-expression**

The upper allele was always brought by the mother. Numbers of females with ectopic vein phenotype among flies containing both an *EloC* mutation and the *bs*<sup>EY23316</sup> or *rl*<sup>Sem</sup> allele were compared to numbers of flies containing the *bs*<sup>EY23316</sup> or *rl*<sup>Sem</sup> allele alone (Z-test, <sup>a</sup>p<0.001). For *rl*<sup>Sem</sup> flies, the mild phenotype was ectopic veins only, whereas the strong phenotype was formation of blisters (Figure 3F). For *bs*<sup>EY23316</sup>, the mild ectopic vein phenotype was ectopic veins under the posterior cross-vein only (Figure 3H), whereas the strong ectopic vein phenotype was ectopic veins everywhere in the wing (Figure 3G).

Genotype	Total females observed	% females with no ectopic vein	% females with mild ectopic vein phenotype	% females with strong ectopic vein phenotype
<i>sd::Gal4/+;+/UAS::rl</i> <sup>Sem</sup>	198	0	7.6	92.4
<i>sd::Gal4/+; EloC</i> <sup>SH1520</sup> / <i>+/+/UAS::rl</i> <sup>Sem</sup>	232	0	66.8 <sup>a</sup>	33.2 <sup>a</sup>
<i>sd::Gal4/+; EloC</i> <sup>SH1299</sup> / <i>+/+/UAS::rl</i> <sup>Sem</sup>	144	0	43 <sup>a</sup>	57 <sup>a</sup>
<i>+/bs</i> <sup>EY23316</sup>	125	0	8	92
<i>EloC</i> <sup>SH1520</sup> / <i>bs</i> <sup>EY23316</sup>	112	0	83 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>
<i>EloC</i> <sup>SH1299</sup> / <i>bs</i> <sup>EY23316</sup>	95	9.5 <sup>a</sup>	66.3 <sup>a</sup>	24.2 <sup>a</sup>

**Table 2: *EloA*, *EloB* and *EloC* loss-of-function partially suppress ectopic vein phenotypes induced by *corto* loss-of-function**

The upper allele was always brought by the mother. Numbers of females with ectopic vein phenotype among flies containing *Elo* and *corto* mutations were compared to those of flies containing a *corto* mutation only (Z-test, <sup>a</sup>p<0.001).

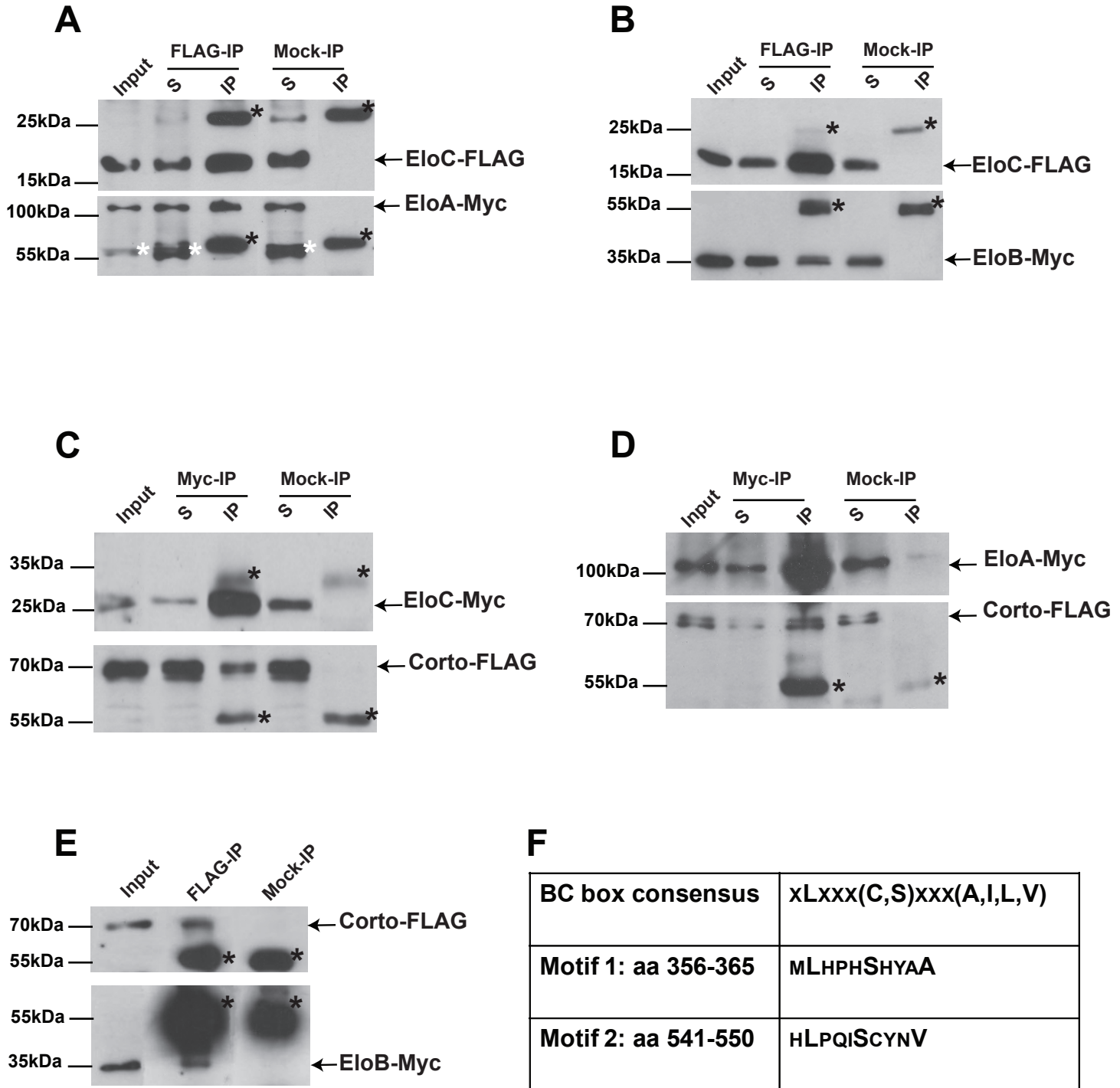
Genotype	Total females observed	% females with ectopic veins
<i>+/corto</i> <sup>07128</sup>	96	93.8
<i>corto</i> <sup>07128</sup> / <i>+</i>	78	97.4
<i>corto</i> <sup>07128</sup> / <i>EloA</i> <sup>G4930</sup>	183	38.3 <sup>a</sup>
<i>corto</i> <sup>07128</sup> / <i>EloB</i> <sup>EP3132</sup>	128	26.6 <sup>a</sup>
<i>EloC</i> <sup>SH1520</sup> / <i>+</i> ; <i>+/corto</i> <sup>07128</sup>	156	14.8 <sup>a</sup>
<i>EloC</i> <sup>SH1299</sup> / <i>+</i> ; <i>+/corto</i> <sup>07128</sup>	69	27.5 <sup>a</sup>
<i>+/corto</i> <sup>L1</sup>	164	40.2
<i>corto</i> <sup>L1</sup> / <i>+</i>	51	49
<i>corto</i> <sup>L1</sup> / <i>EloA</i> <sup>G4930</sup>	191	0 <sup>a</sup>
<i>corto</i> <sup>L1</sup> / <i>EloB</i> <sup>EP3132</sup>	129	0.8 <sup>a</sup>
<i>EloC</i> <sup>SH1520</sup> / <i>+</i> ; <i>+/corto</i> <sup>L1</sup>	119	0 <sup>a</sup>
<i>EloC</i> <sup>SH1299</sup> / <i>+</i> ; <i>+/corto</i> <sup>L1</sup>	114	0 <sup>a</sup>

**Table 3: *EloA* and *EloC* loss-of-function partially suppress ectopic vein phenotypes induced by loss-of-function of *trxG* genes**

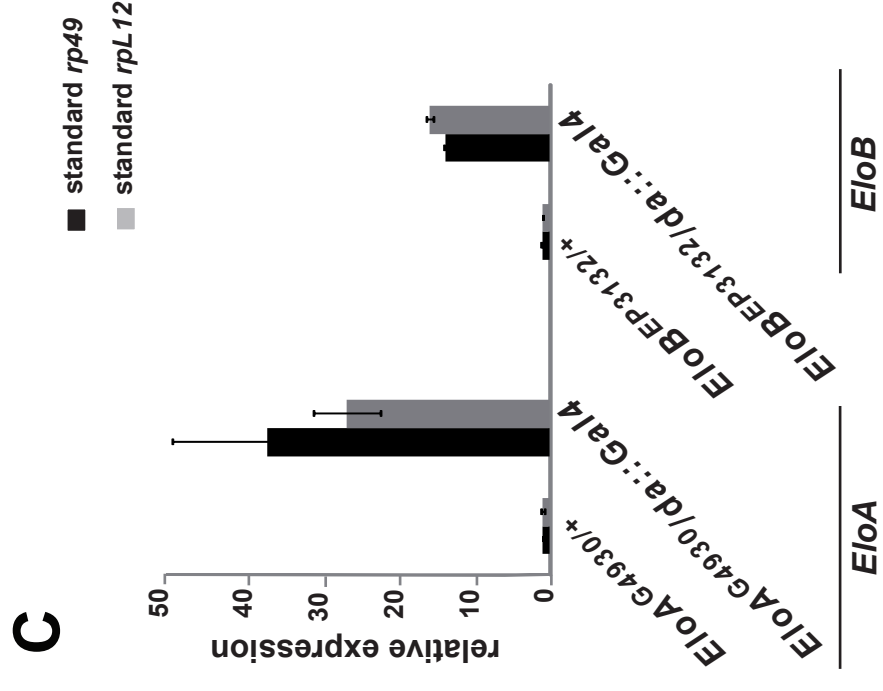
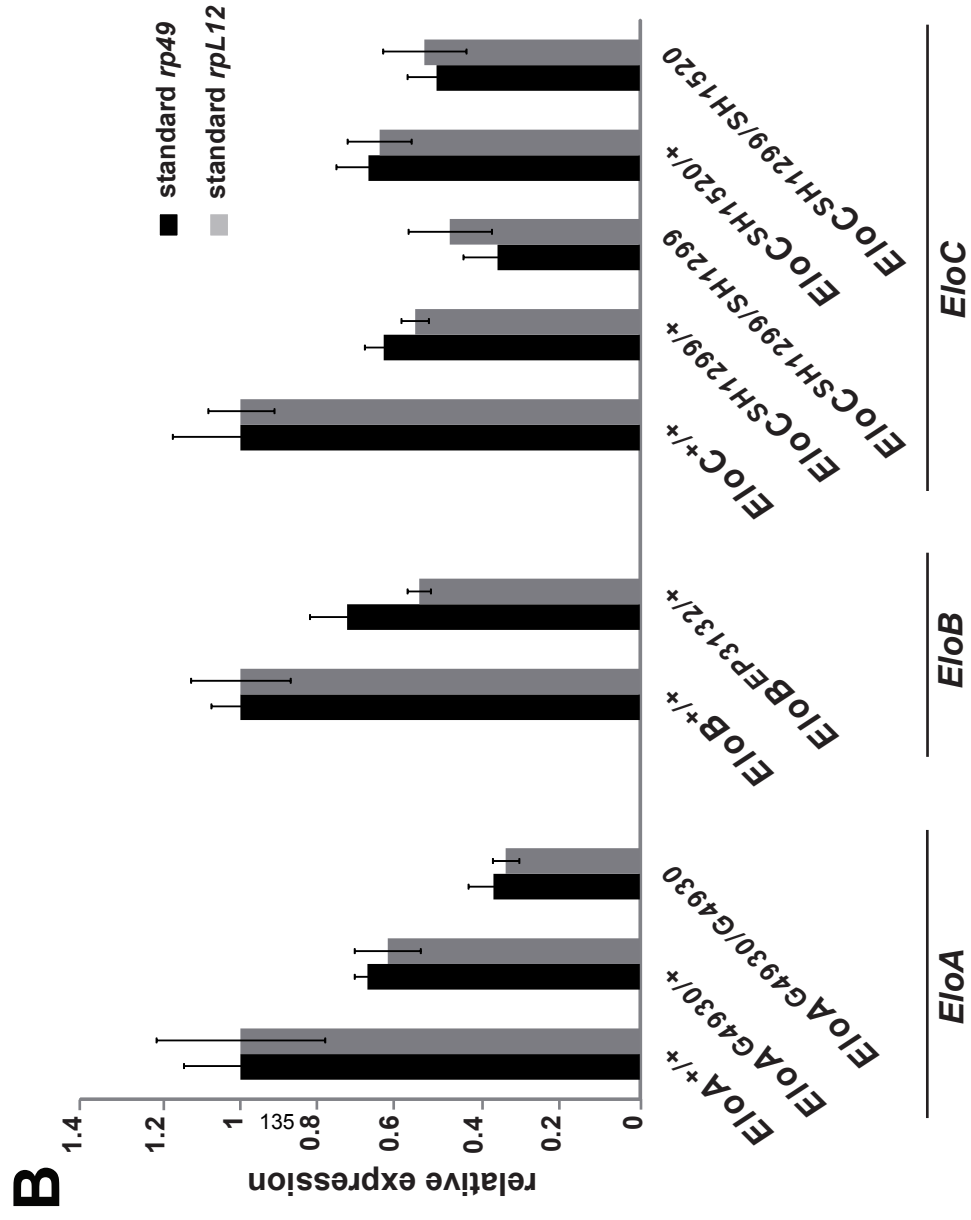
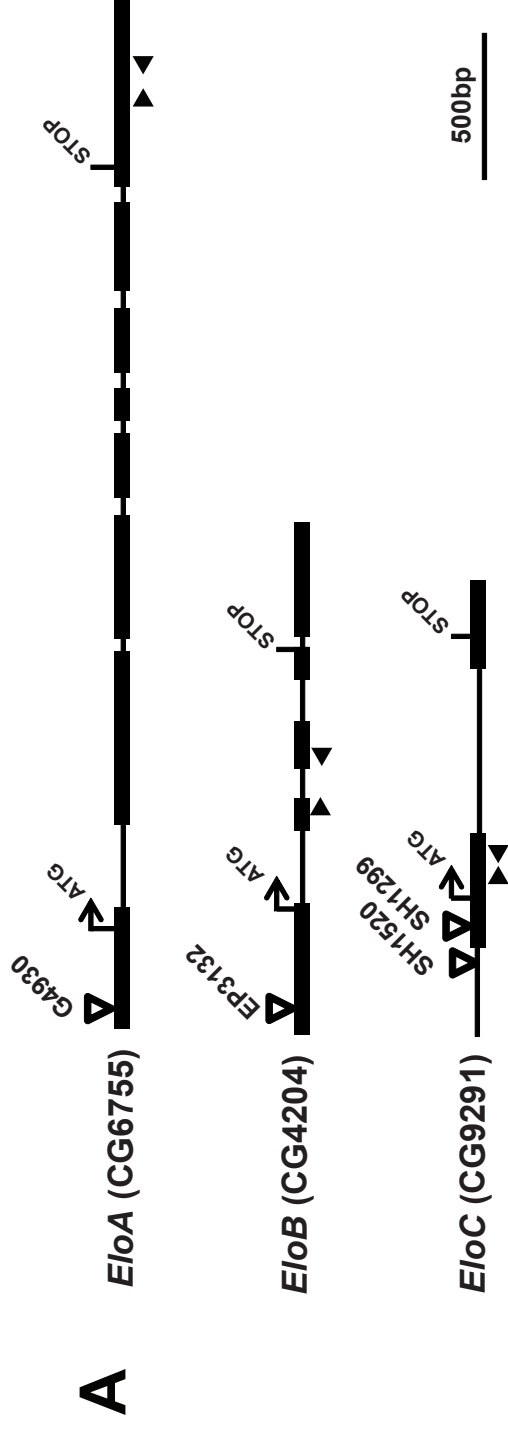
The upper allele was always brought by the mother. Numbers of females with ectopic vein phenotype among flies containing *Elo* and *trxG* mutations were compared to those of flies containing a *trxG* mutation only (Z-test, <sup>a</sup>p<0.001).

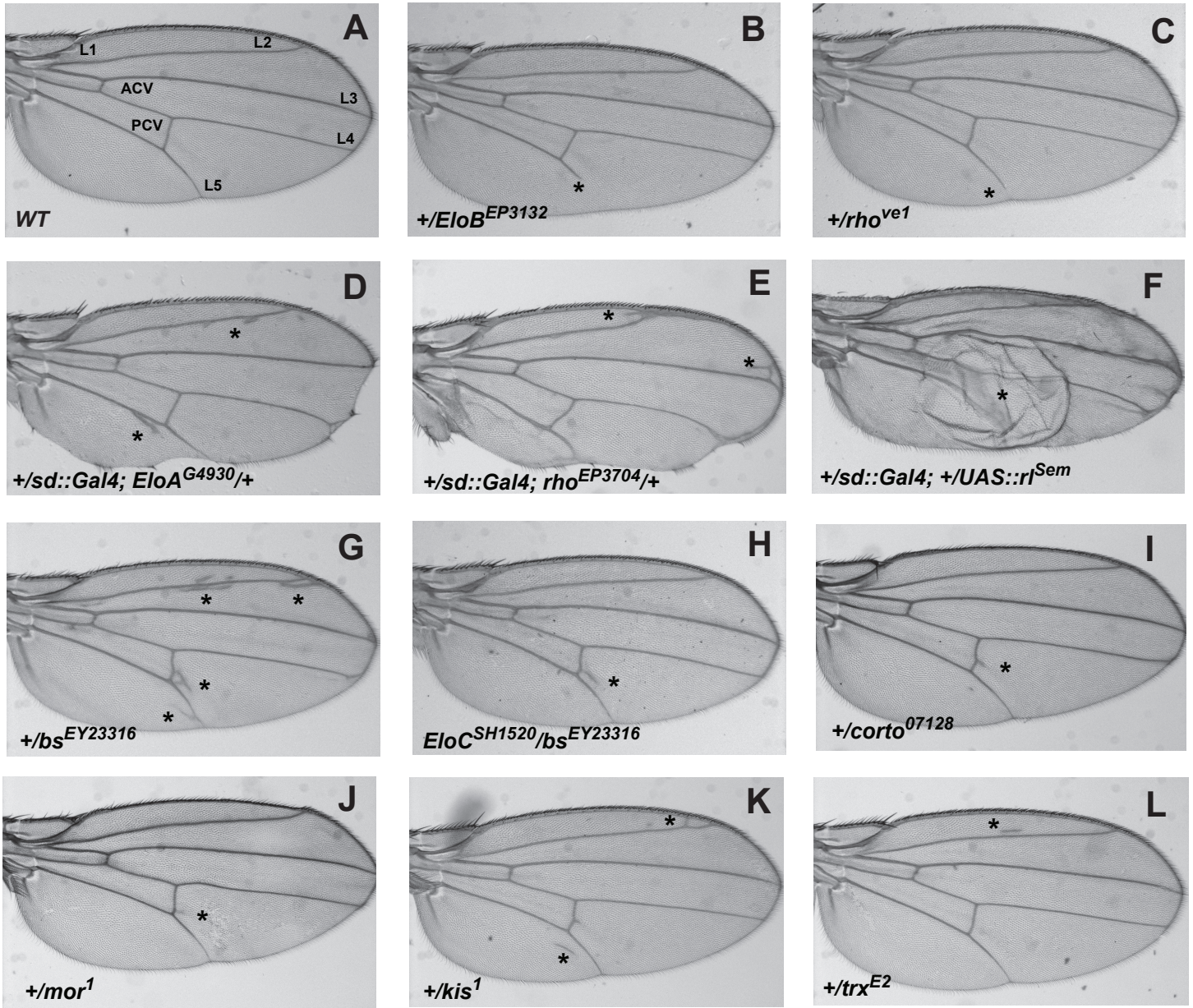
Genotype	Total females observed	% females with ectopic veins
<i>+/mor<sup>1</sup></i>	93	22.5
<i>EloA<sup>G4930</sup>/mor<sup>1</sup></i>	110	5.5 <sup>a</sup>
<i>EloC<sup>SH1520</sup>/+; +/mor<sup>1</sup></i>	132	1.5 <sup>a</sup>
<i>EloC<sup>SH1299</sup>/+; +/mor<sup>1</sup></i>	78	6.4 <sup>a</sup>
<i>+/kis<sup>1</sup></i>	81	81.5
<i>+/kis<sup>1</sup>; EloA<sup>G4930</sup>/+</i>	94	48.8 <sup>a</sup>
<i>EloC<sup>SH1520</sup>/kis<sup>1</sup></i>	80	17.5 <sup>a</sup>
<i>EloC<sup>SH1299</sup>/kis<sup>1</sup></i>	54	9.2 <sup>a</sup>
<i>+/trx<sup>E2</sup></i>	89	53.9
<i>EloA<sup>G4930</sup>/trx<sup>E2</sup></i>	96	10.4 <sup>a</sup>
<i>EloC<sup>SH1520</sup>/+; +/trx<sup>E2</sup></i>	93	5.4 <sup>a</sup>
<i>EloC<sup>SH1299</sup>/+; +/trx<sup>E2</sup></i>	54	16.7 <sup>a</sup>



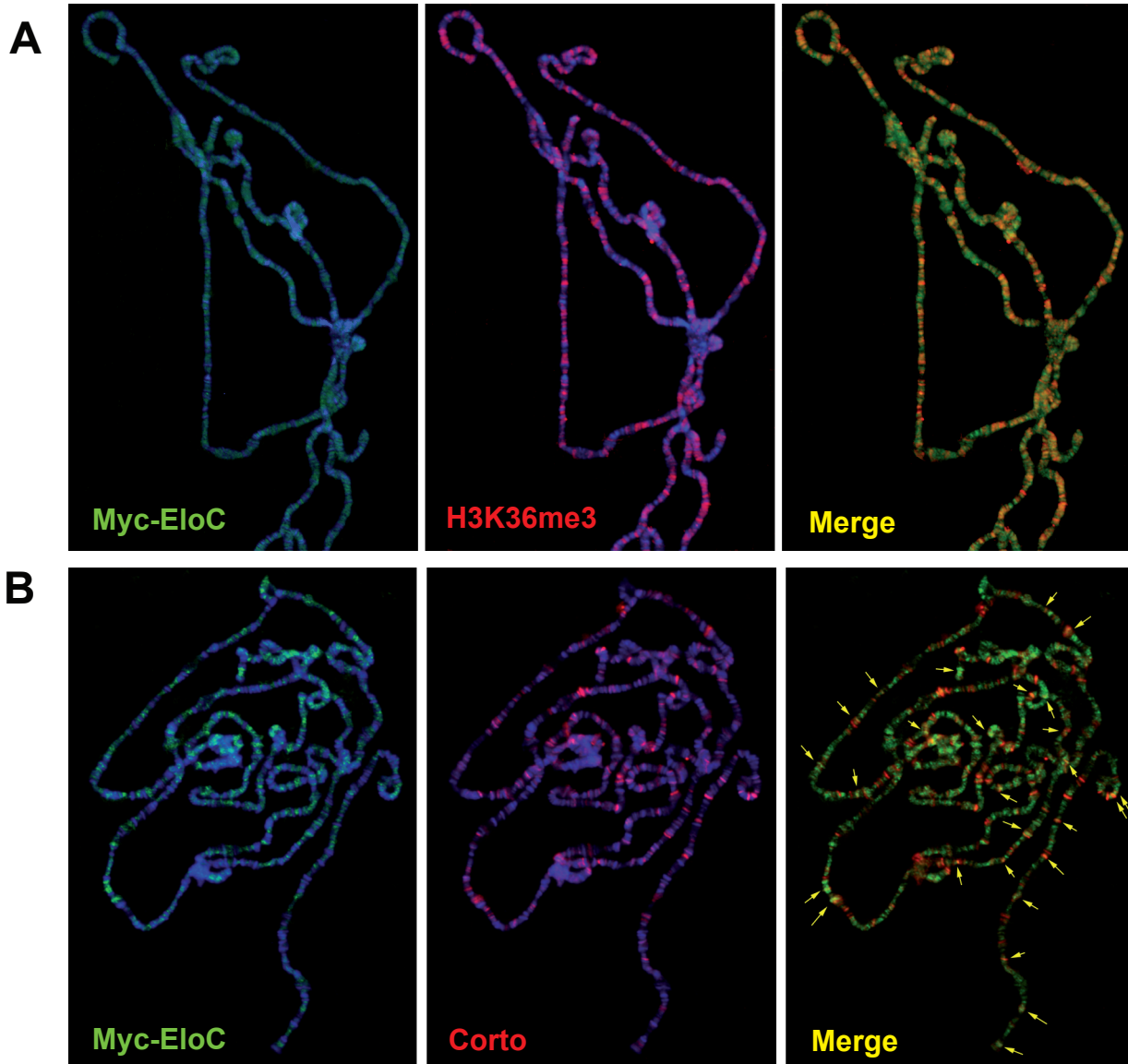


Rougeot et al\_ Figure 1

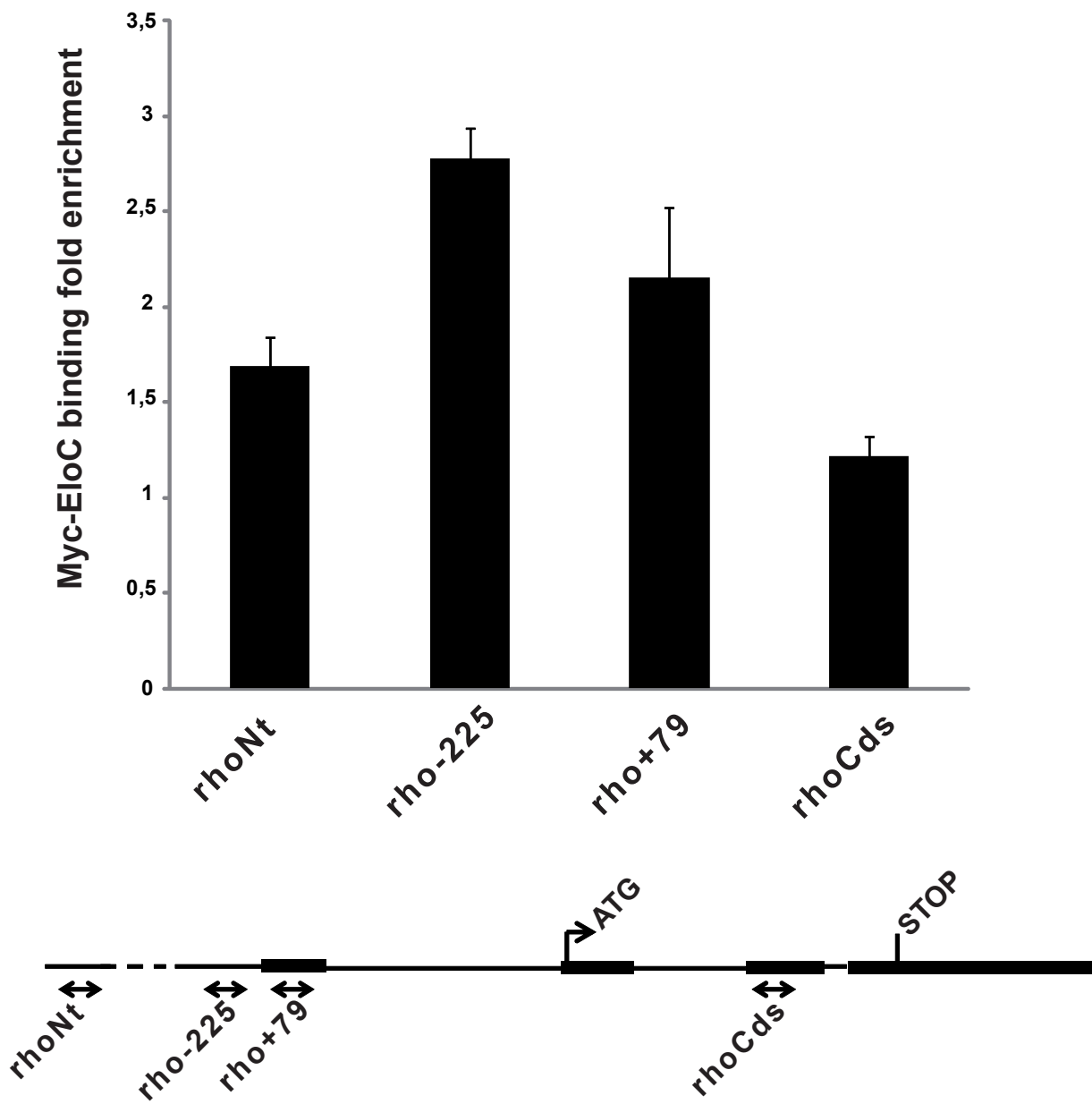




Rougeot et al\_ Figure 3



Rougeot et al\_ Figure 4



Rougeot et al\_ Figure 5

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans les parties I et II nous ont permis de mettre en évidence plusieurs éléments du mécanisme de régulation de la transcription par l'ETP Corto au cours du développement des tissus de l'aile.

### **I. Corto, ERK et MP1 formeraient un complexe chromatinien impliqué dans la régulation transcriptionnelle au cours du développement de l'aile**

Les phénotypes d'individus présentant une dérégulation de *corto*, ainsi que les résultats d'interactions génétiques avec différents gènes de la voie DER/ERK, nous ont permis de montrer que la fonction de *corto*, en synergie avec *MP1*, est de promouvoir le destin d'interveine et/ou de bloquer, dans le tissu d'interveine, le destin de veine. Cette action passerait par une répression de l'activité pro-veine de la MAPK ERK. Nos résultats suggèrent que les trois protéines Corto, ERK et MP1 forment un complexe chromatinien qui pourrait contrôler l'expression de certains gènes. Ce mécanisme est à rapprocher de celui des MAPK p38 des mammifères et Hog1 de levure (Aziz et al., 2010; de Nadal and Posas, 2010). Chez les mammifères, les MAPK, en se fixant à la chromatine, permettent la phosphorylation et l'échange de protéines PcG et TrxG (Rampalli et al., 2007; Simone et al., 2004; Voncken et al., 2005). Dans le cas de Corto, nous avons montré que sa phosphorylation est modifiée en fonction de l'état d'activation de la voie ERK. Il est donc possible que Corto soit phosphorylée directement par ERK. Cette phosphorylation pourrait influencer le recrutement de Corto sur la chromatine ou changer son affinité pour certains partenaires, comme les protéines PcG et TrxG. L'activité de la voie ERK ferait alors pencher la balance soit vers la répression, soit vers l'activation de la transcription.

Différents sites de phosphorylation de Corto par ERK sont prédits *in silico*. Ceux-ci pourraient être confirmés par spectrométrie de masse à partir d'une forme étiquetée de Corto produite dans des cellules S2 soumises à différents niveaux d'activation de ERK. Il serait également possible de modifier ces sites par mutagenèse dirigée de manière à tester leur implication dans l'interaction entre Corto et ERK.

Afin de confirmer l'existence d'un complexe Corto-MP1-ERK, il faudrait vérifier par immunoprécipitation de chromatine la présence de ces protéines sur les mêmes gènes cibles. Ceci peut se faire par une approche de gènes candidats. Nous sommes en train de tester si le gène pro-veine *rho* est une cible directe de Corto dans le disque imaginal d'aile (voir la partie II des résultats). Si c'est le cas, il faudra analyser la présence de ERK et de MP1 sur ce gène. Il serait également possible de tester certains gènes candidats sur la base d'analyses globales. En effet, notre équipe a réalisé, en collaboration avec Stéphane Le Crom (UPMC/ENS), une étude par RNA-seq du transcriptome de disques imaginaux d'aile d'individus perte de fonction pour *corto* (génotype *corto*<sup>L1/420</sup>) ou sur-exprimant *corto* dans le disque d'aile (génotype *sd::Gal4/+ ; +/UAS-corto*). En complément, nous avons entrepris une analyse globale par CHIP-seq des sites de fixation de Corto dans le disque imaginal d'aile. La comparaison des résultats de ces deux études nous permettra d'identifier des cibles directes de Corto dans le disque imaginal d'aile, qui pourront ensuite être testées pour la présence de ERK, mais également de certaines protéines TrxG.

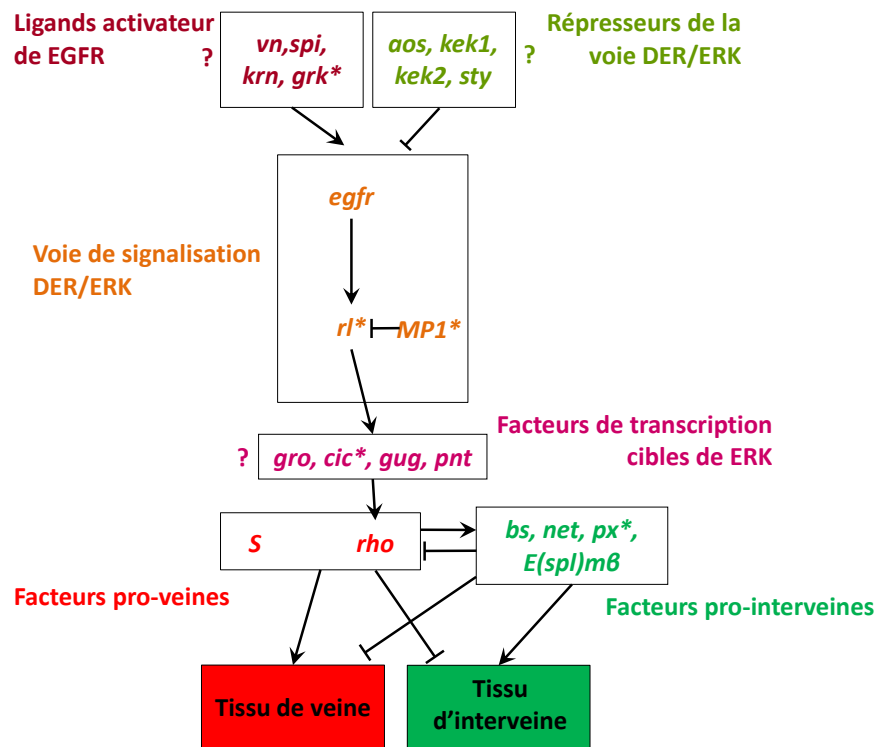
## **II. Identification des gènes cibles de Corto dans le disque imaginal d'aile**

Afin d'identifier des gènes régulés par Corto au cours du développement des tissus de l'aile, je me suis concentré, parmi les résultats de l'étude transcriptomique, sur les gènes connus pour participer à la différenciation des tissus de l'aile ainsi que sur certains gènes de la voie

DER/ERK. La liste des gènes étudiés et les résultats obtenus pour certains d'entre-eux sont présentés dans la **Figure 22** et le **Tableau 5**. Parmi les résultats intéressants, on peut noter qu'une isoforme de *MP1* est surexprimée en condition de perte de fonction pour *corto* et qu'une isoforme de *rl* est sous-exprimée en condition de surexpression de *corto*. Une isoforme du gène pro-interveine *plexus* (*px*) ainsi que plusieurs isoformes de *capicua* (*cic*), qui code un facteur de transcription cible de ERK, sont surexprimées pour les deux génotypes de dérégulation de *corto*. L'expression de *gurken* (*grk*), qui code un ligand de DER dont une forme dominant négatif cause l'apparition d'un excès de veines (Ghiglione et al., 2002; Queenan et al., 1999), est diminuée dans les deux conditions. Toutefois, la validité de certaines de ces observations, comme la surexpression de *MP1* et de certaines isoformes de *cic*, est limitée par des valeurs de *P*-value relativement faibles ( $P\text{-adj} \leq 10 \times 10^{-5}$ ). Ces gènes pourraient potentiellement être des cibles transcriptionnelles directes de Corto, mais seuls les résultats de l'analyse des sites de fixation de Corto par CHIP-seq pourront le confirmer.

Dans cette analyse, nous n'avons pas détecté de variation significative du niveau d'expression du gène pro-veine *rho*. Ce résultat peut paraître surprenant, puisque la formation de veines ectopiques implique forcément, comme nous avons pu le constater par hybridation *in situ*, une expression ectopique de *rho*. Cependant, les phénotypes de veines ectopiques des individus présentant une dérégulation de *corto* sont assez discrets. Par ailleurs, *rho* est globalement très faiblement exprimé dans le disque d'aile, car sa transcription ne concerne que le tissu minoritaire des veines. Par conséquent, il est possible que les variations d'expression de *rho* dans les contextes de dérégulation de *corto* n'apparaissent pas significatives avec les critères utilisés pour cette analyse.





**Figure 22 : Cascade de régulations géniques impliquée dans la mise en place des tissus de l'aile.**

Ce schéma représente les différents gènes dont l'expression a été analysée à partir des données du transcriptome de disques imaginaux d'aile de mutants de dérégulation de *corto*. Ces gènes sont regroupés selon la fonction des protéines qu'ils codent dans la voie DER/ERK ou au cours du développement des tissus de veine et d'interveine de l'aile. *vein* (*vn*), *spitz* (*spi*), *keren* (*krn*) et *gurken* (*grk*) codent les quatre ligands connus du récepteur DER. *argos* (*aos*), *kekkon1*, 2, 3 (*kek1*, 2, 3) et *sprouty* (*sty*) codent différents répresseurs de la voie DER/ERK. *egfr*, *rolled* (*rl*) et *MP1* codent respectivement le récepteur DER, la MAPK ERK et une de ses protéines d'échafaudage. Les protéines codées par *gro* (*groucho*), *capicua* (*cic*), *grunge* (*gug*, aussi appelé *atro*) et *pointed* (*pnt*) sont des facteurs de transcription phosphorylés par ERK. *Star* (*S*) et *rhomboïd* (*rho*) codent des facteurs pro-veine impliqués dans le clivage des ligands de DER. *blistered* (*bs*), *net*, *plexus* (*px*) et *E(spl)mβ* codent des facteurs pro-interveine. Les points d'interrogation signifient que la fonction précise dans le développement de l'aile de certains gènes de ces groupes n'est pas connue. Les \* indiquent les gènes dérégulés dans l'analyse du transcriptome des mutants *corto*.

### III. Il pourrait exister d'autres complexes chromatinien contenant ERK

De nombreux sites de fixation de MP1 sur les chromosomes polytènes ne sont pas partagés par Corto, alors que ERK colocalise parfaitement avec MP1. Ceci indique que Corto n'est sans doute pas la seule protéine qui interagit avec ERK et MP1 sur la chromatine. D'autres partenaires de ERK pourraient être des facteurs de transcription ou des complexes phosphorylant les histones. En effet, l'histone H3 est rapidement phosphorylée en réponse à des signaux mitogènes (Barratt et al., 1994; Mahadevan et al., 1991). En particulier, chez l'homme, les kinases MSK1 et 2 (Mitogen and Stress activated Kinases), qui sont des cibles de ERK, phosphorylent la sérine 28 de l'histone H3. Ceci a pour effet de décrocher les complexes PcG de la lysine 27 triméthylée et d'activer la transcription (Gehani et al., 2010). La kinase Aurora B, chez la drosophile, phosphoryle la lysine 10 de l'histone H3 au cours de la mitose, ce qui permet de décrocher HP1 de la marque H3K9me3 et induit la condensation des chromosomes (Fischle et al., 2005; Hirota et al., 2005). Cette dernière phosphorylation se trouve aussi sur des sites de transcription actifs, comme les gènes de réponse au choc thermique activés ou le chromosome X hypertranscrit du mâle, où elle est déposée par JIL-1, l'homologue des kinases MSK 1 et 2 (Ivaldi et al., 2007; Jin et al., 2000; Nowak and Corces, 2000). ERK pourrait lui-aussi phosphoryler différents composants de la chromatine, contrôlant ainsi sa structure et l'expression des gènes en réponse à des signaux externes. Ces hypothèses pourraient être testées en comparant la localisation de ERK avec celle des histones phosphorylées sur les chromosomes polytènes et sur certains gènes cibles. Il serait aussi possible d'étudier l'effet d'un changement de l'activation de la voie ERK sur ces marques épigénétiques. D'autres partenaires nucléaires de ERK pourraient être identifiés en

Gène	Isoformes	$\log_2(\text{corto}^{L1/420}/w^{1118})$	$\log_2(\text{sd}::\text{Gal4} > \text{UAS-corto}/\text{sd}::\text{gal4})$
<i>MP1</i>	RA	1,32*	0,71
	RA+RB	1,25	0,62
<i>rl</i>	RB	-0,32	-1,23**
	RB+RF	0,02	-0,53
	RA+RB+RC+RD+RE+RF	-0,12	-0,43
	RB+RC+RD+RE+RF	0,26	-0,24
	RB+RC+RD	0,20	-0,30
	RF	-0,10	-0,93
	RE	-0,16	-0,89
	RC+RE	0,05	-0,52
	RA	0,09	-0,67
	RA+RD	-0,02	-0,71
	RC	NA	NA
	<i>rho</i>	RA	0,64
<i>bs</i>	RA	0,81	0,37
	RA+RB	0,85	0,01**
<i>net</i>	RA	0,76	-0,43**
<i>px</i>	RA	1,42**	1,27**
	RA+RB	0,75	0,68**
	RA+RB+RC	1,51	0,83
<i>grk</i>	RA	-1,30**	-1,37**
<i>cic</i>	RA+RB+RC+RD+RE	1,09**	0,82**
	RA+RB+RC+RD+RE+RF	1,12**	0,94**
	RA+RB+RC+RE+RF	1,14	1,52*
	RA+RB+RD+RF	0,90	0,76*
	RA+RB+RF	-0,18**	-0,26**
	RA+RC+RD+RE	1,39	1,23*
	RB	1,60*	1,18*
	RC	0,14**	0,04**
	RD	1,21**	1,19**
	RE	-0,57**	-0,63**

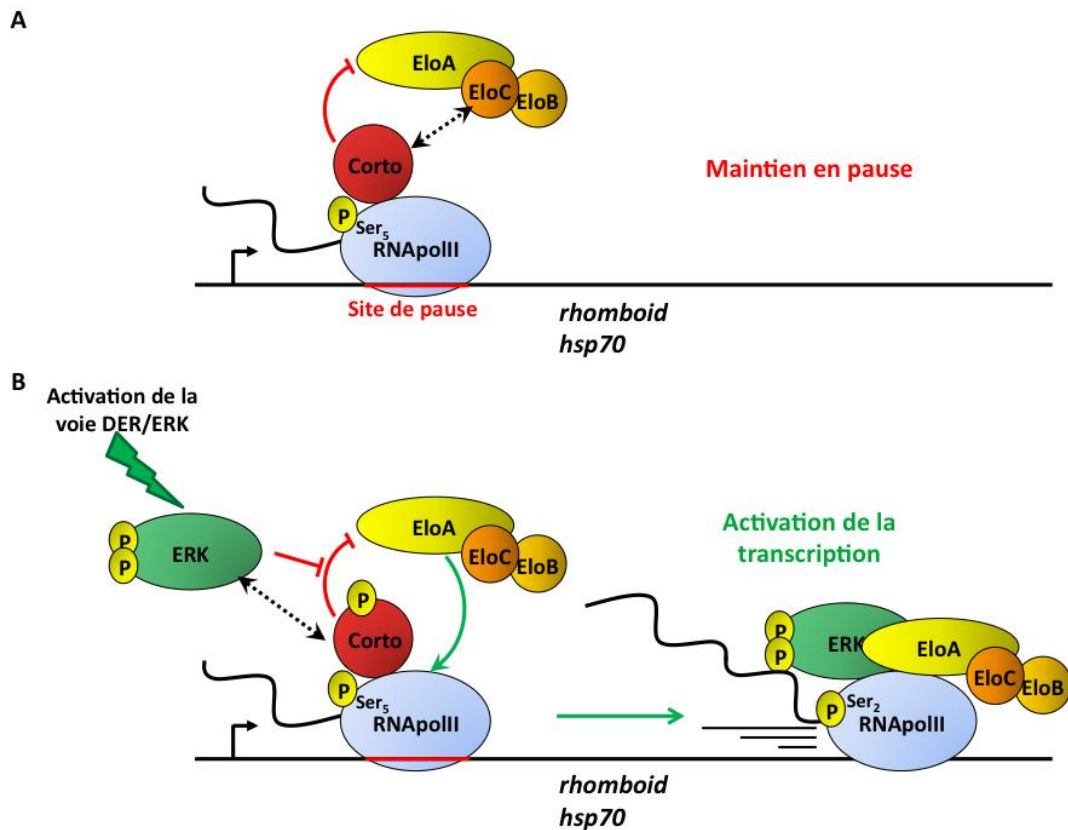
**Tableau 5 : Certains acteurs de la voie DER/ERK sont dérégulés dans des disques d'aile de mutants de dérégulation de *corto***

Dans ce tableau sont présentées les variations d'expression de certains gènes codants des éléments de la voie DER/ERK en conditions de perte de fonction (génotype *corto*<sup>L1/420</sup>) ou de surexpression (génotype *sd::Gal4 >UAS-corto*) de *corto*. La comparaison a été faite par rapport au niveau d'expression dans des disques imaginaux d'ailes d'individus *w*<sup>1118</sup> et *sd::Gal4/+*, respectivement. Les gènes dérégulés de façon significative sont surlignés en jaune. *P*-value ajustée \* : *P*-adj ≤ 10x10<sup>-5</sup> ; \*\* : *P*-adj ≤ 10x10<sup>-10</sup>

analysant par spectrométrie de masse les protéines co-précipitées avec ERK dans un extrait protéique nucléaire.

#### **IV. Corto et le complexe Elongin contrôleraient de façon antagoniste l'expression de gènes cibles**

Nos résultats montrent que Corto interagit avec les différentes sous-unités du complexe d'élongation de la transcription Elongin. Cette interaction se traduit par un rôle opposé dans le contrôle du développement des tissus de veine et d'interveine. Ainsi, si Corto favorise le développement du tissu d'interveine, le complexe Elongin favorise le développement du tissu de veine. L'analyse de la localisation d'Elongin C et de Corto sur chromosomes polytènes montre que ces deux protéines ne présentent que quelques sites de colocalisation. Ce résultat suggère que leur interaction sur la chromatine est transitoire ou limitée à certaines cibles. Nous sommes actuellement en train de tester l'hypothèse selon laquelle le gène pro-veine *rho* serait une cible commune de Corto et du complexe Elongin dans le disque imaginal d'aile. *rho* a été décrit comme un gène en pause transcriptionnelle dans deux études (Muse et al., 2007; Zeitlinger et al., 2007). De plus, sur les chromosomes polytènes, Corto colocalise préférentiellement avec des marques épigénétiques activatrices (H3K4me3) plutôt que des marques épigénétiques répressives (H3K27me3), ainsi qu'avec l'ARN Pol II phosphorylée sur la sérine 5 (en pause) plutôt qu'avec l'ARN Pol II phosphorylée sur la sérine 2 (en élongation) (Coléno *et al.*, soumis). Ces résultats suggèrent donc que Corto et Elongin joueraient un rôle antagoniste dans le maintien en pause de *rho* dans le tissu d'interveine et dans son entrée en élongation productive dans le tissu de veine (**Figure 23**). Sur d'autres gènes cibles, on peut imaginer que l'interaction Corto-Elongin pourrait avoir



**Figure 23 : Modèle de mécanisme de contrôle des promoteurs en pause par Corto**

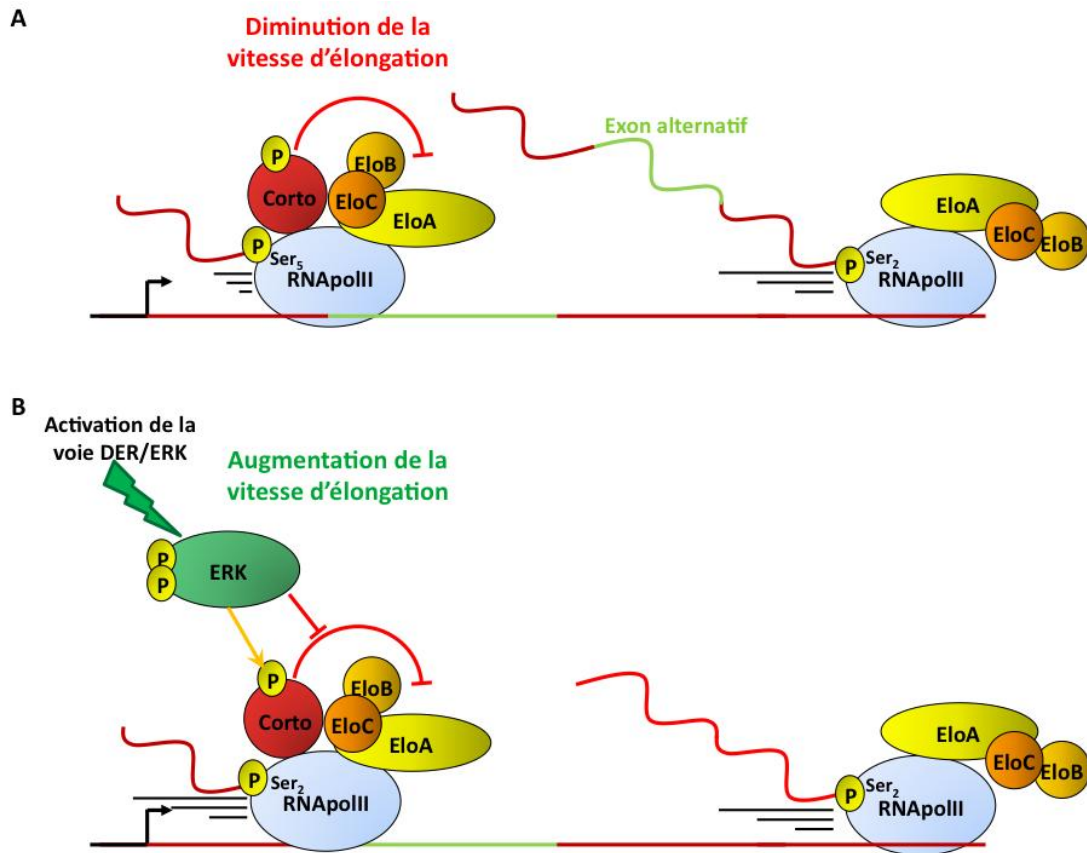
**A :** En absence d'activation de la voie DER/ERK, Corto est présent sur les promoteurs en pause contenant une ARN polymérase phosphorylée sur la sérine 5, tels que les promoteurs de *rho* ou de *hsp70*. Corto participe alors au maintien de la pause en bloquant l'élongation de la transcription par le complexe Elongin. Cette répression implique une interaction directe de Corto avec Elongin C (représentée par une double flèche en pointillés).

**B :** Lorsque la voie DER/ERK est activée, la forme di-phosphorylée de ERK est transloquée dans le noyau où elle phosphoryle Corto. Cette modification inhibe la répression du complexe Elongin par Corto et favorise l'entrée en élongation productive. L'ARN Pol II en élongation, phosphorylée sur la sérine 2, peut être accompagnée par Elongin, qui diminue les temps de pause le long de la séquence transcrite, et par ERK, qui pourrait modifier des co-facteurs de la polymérase ou des résidus des histones.

une fonction différente et contrôlerait la vitesse d'élongation de la transcription, Corto freinant et Elongin augmentant la vitesse d'élongation processive. Ce mécanisme permettrait d'accroître la production d'ARN, mais également, dans certains cas, de générer des transcrits alternatifs (**Figure 24**). En effet, diminuer la vitesse d'élongation de la transcription permet à la machinerie d'épissage d'utiliser des sites d'épissage alternatifs (Alexander and Beggs, 2010; Batsche et al., 2006).

Plusieurs expériences pourraient permettre de tester ces hypothèses. Analyser la fixation de Corto sur différentes régions d'un gène cible comme *rho* permettrait de savoir si elle s'associe préférentiellement au promoteur, dans la région transcrite ou à proximité des sites d'épissage. En ce qui concerne le contrôle de la pause transcriptionnelle, il faudrait comparer la localisation de Corto sur la chromatine avec celle de protéines qui maintiennent les gènes en pause, comme NELF, ou qui favorisent l'entrée en élongation productive, comme P-TEFb. En complément des marques épigénétiques déjà observées, nous pourrions étudier la localisation de Corto par rapport à l'acétylation des histones H3 et H4, présentes sur des gènes en pause et en élongation, et la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3, présente sur les gènes en cours d'élongation uniquement (Nowak and Corces, 2000). Enfin, l'analyse du transcriptome des mutants perte de fonction Corto peut permettre de détecter l'inclusion d'exons spécifiques dans ces conditions, ce qui indiquerait une fonction de Corto dans le contrôle de l'épissage.

Nous venons d'étudier ici la relation entre Corto et le facteur d'élongation de la transcription Elongin. Mais Elongin C et B font également partie de différents complexes E3-ubiquitin ligase de type ECS. Certains de ces complexes poly-ubiquitinent l'ARN Pol II, ce qui induit sa dégradation (Yasukawa et al., 2008), et mono-ubiquitinent l'histone H2A, ce qui constitue



**Figure 24 : Modèle de mécanisme de contrôle de la vitesse d'élongation de la transcription par Corto**

**A :** En absence d'activation de la voie DER/ERK, Corto freine l'élongation de l'ARN Pol II en inhibant le complexe Elongin. L'ARN Pol II ralentie ou en pause pourrait alors inclure des exons alternatifs dans le transcrit. La transcription reprendrait ensuite une élongation plus rapide dans le reste de la séquence du gène.

**B :** Lorsque la voie DER/ERK est activée, la forme di-phosphorylée de ERK est transloquée dans le noyau où elle phosphoryle Corto. Cette modification inhibe la répression du complexe Elongin par Corto et permet le maintien d'une vitesse d'élongation élevée. Dans ces conditions, la production d'ARN serait plus importante et l'exon alternatif ne serait pas inclus dans le transcrit.

une marque épigénétique activatrice de la transcription (Li et al., 2010). Le lien entre Corto, les complexes ECS et le contrôle de la transcription pourrait à son tour être exploré.

## V. Existe-t-il un lien entre la kinase ERK et le complexe Elongin ?

Nos résultats montrent que Corto interagit d'une part avec ERK et sa protéine d'échafaudage MP1 et d'autre part avec le complexe Elongin. Il est tentant d'imaginer qu'il existerait un lien entre ces deux interactions, qui pourraient participer à la régulation de l'expression des mêmes gènes cibles au cours du développement des tissus de l'aile. On peut imaginer que la fixation de ERK sur la chromatine régule la pause transcriptionnelle (**Figure 23**) et augmente la vitesse d'élongation (**Figure 24**). Ceci pourrait impliquer un blocage de la répression du complexe Elongin par Corto, ou la phosphorylation de différentes cibles telles que des facteurs de remodelage de la chromatine ou des histones.

## VI. Les gènes de choc thermique : un modèle possible d'étude du rôle de Corto, Elongin et ERK dans la régulation de la pause transcriptionnelle

Parmi les résultats de notre analyse transcriptomique, je me suis intéressé aux gènes de réponse au choc thermique, dont les promoteurs ont été décrits en pause transcriptionnelle en absence de choc thermique. La majorité d'entre eux est fortement sur-exprimée en condition de perte de fonction mais également de surexpression de *corto* (**Tableau 6**). Il est intéressant de noter que pour ces gènes, comme pour certains autres cités plus haut (**Tableau 5**), la perte et la surexpression de *corto* ont le même effet. Cette observation



Gène	Isoformes	$\log_2(\text{corto}^{L1/420}/w^{1118})$	$\log_2(\text{sd}::\text{Gal4} > \text{UAS-corto}/\text{sd}::\text{gal4})$
<i>Hsp22</i>	RA	3,34**	2,26**
	RB	3,41**	2,34**
<i>Hsp23</i>	RA	1,15**	0,85**
<i>Hsp26</i>	RA	2,20**	1,97**
<i>Hsp27</i>	RA	0,81	0,36**
<i>Hsp60B</i>	RA	NA	0,00
<i>Hsp60C</i>	RA	1,00	1,58
<i>Hsp60D</i>	RA	NA	NA
	RB	NA	NA
<i>Hsp60</i>	RA	2,09**	1,13**
	RA+RB	1,54**	1,24**
	RB	0,00	1,58
<i>Hsp67</i>	RA	0,92*	0,78**
<i>Hsp67Bb</i>	RA+RB	-1,00	1,36
	RA+RB+RC+RD	-0,58	0,71
	RA+RC+RD	NA	1,00
	RB	3,39**	2,33**
	RC	0,00	1,78
	RD	0,00	1,58
<i>Hsp67Bc</i>	RA	2,13**	1,73**
<i>Hsp68</i>	RA	3,65**	2,08**
<i>Hsp70Aa</i>	RA	3,58**	2,26**
<i>Hsp70Ab</i>	RA	3,44**	2,26**
<i>Hsp70Ba</i>	RA	4,91**	2,75**
<i>Hsp70Bbb</i>	RA	4,93**	3,09**
<i>Hsp70Bb</i>	RA	4,97**	3,41**
<i>Hsp70Bc</i>	RA	4,81**	2,91**
<i>Hsp83</i>	RA	1,23**	1,20**
<i>HSPC300</i>	RA	1,74**	-0,39**

**Tableau 6 : De nombreux gènes de réponse au choc thermique sont dérégulés dans les disques d'aile de mutants de dérégulation de *corto***

Dans ce tableau sont présentées les variations d'expression de certains gènes codants des gènes de réponse au choc thermique en conditions de perte de fonction (génotype *corto*<sup>L1/420</sup>) ou de surexpression (génotype *sd::Gal4 >UAS-corto*) de *corto*. La comparaison a été faite par rapport au niveau d'expression dans des disque imaginaux d'ailes d'individus *w*<sup>1118</sup> et *sd::Gal4/+*, respectivement. Les gènes dérégulés de façon significative sont surlignés en jaune. *P*-value ajustée \* :  $P\text{-adj} \leq 10 \times 10^{-5}$  ; \*\* :  $P\text{-adj} \leq 10 \times 10^{-10}$

conforte l'idée que Corto agirait au sein d'un ou plusieurs complexes. La formation de ceux-ci pourrait être altérée soit par une diminution, soit par une forte augmentation de la quantité de Corto. Le rôle de Corto dans l'expression des gènes de réponse au choc thermique pourrait être indirect, si la dérégulation de *corto* génère un stress important conduisant à l'activation de leur transcription. Il est également possible que ces gènes soient des cibles directes de Corto. Les résultats de l'analyse par CHIP-seq nous permettront de trancher entre ces deux hypothèses. J'ai également vérifié que la dérégulation de Corto n'entraîne pas de surexpression de HSF (Heat Shock Factor), le facteur de transcription responsable de l'activation de ces gènes. En effet, celui-ci doit former un homo-trimère pour être actif, ce qui pourrait être favorisé par sa surexpression. Or, dans notre expérience, le niveau d'expression du gène codant le HSF reste inchangé. La cartographie précise des sites de fixation de Corto sur les chromosomes polytènes (Salvaing et al., 2006) révèle sa présence sur les bandes 87C et 95D, deux locus contenant des gènes de réponse au choc thermique. L'étude précise par immunoprécipitation de chromatine de la localisation de Corto sur ces locus avant et après choc thermique, ainsi que celle de ERK et d'Elongin C, pourrait permettre de tester l'hypothèse de l'implication de ces différentes protéines dans le contrôle de la pause transcriptionnelle.



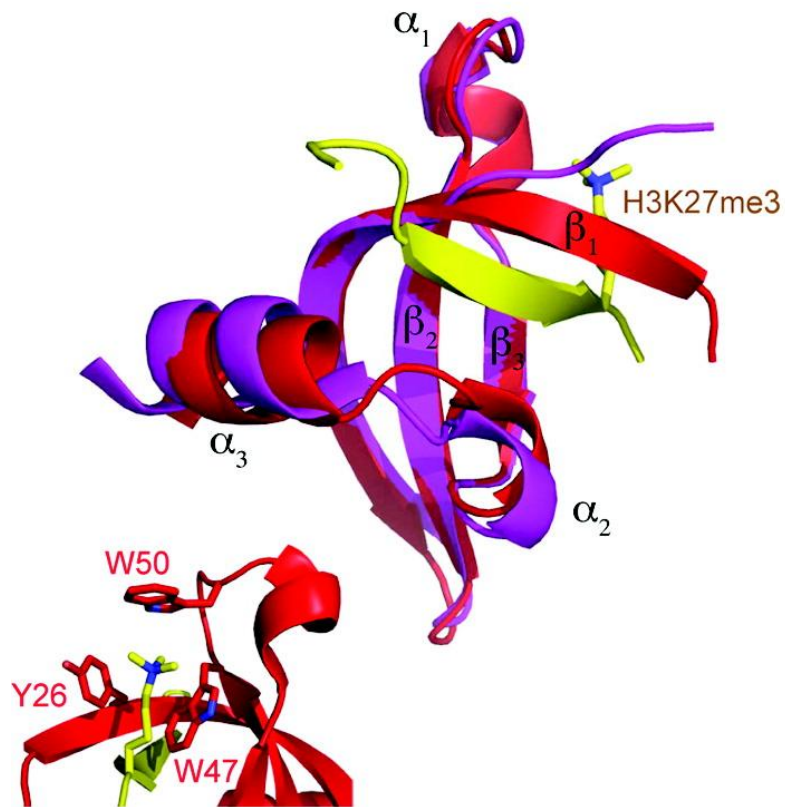
## PARTIE III

### I. Introduction

Comme indiqué dans l'introduction, le seul domaine fonctionnel identifié dans l'ETP Corto, qui est conservé chez tous les homologues connus, est un chromodomaine (Salvaing et al., 2003). Les chromodomains sont retrouvés dans des protéines de la chromatine et jouent un rôle important dans le recrutement de ces protéines sur leurs cibles. Nous avons donc étudié les propriétés de ce domaine afin de comprendre la fonction de Corto.

#### A. Structure et fonction des chromodomains

Les chromodomains sont des domaines de recrutement à la chromatine capables de fixer des lysines tri-méthylées présentes par exemple dans des histones. Il existe également quelques protéines à chromodomains fixant des lysines tri-méthylées d'autres protéines que les histones. Ainsi, notre équipe a montré que le chromodomaine de Corto fixe une lysine tri-méthylée de la protéine ribosomique RpL12 (Coléno *et al.*, soumis). Les chromodomains appartiennent à la famille Royal, qui contient les domaines de type Tudor, Chromo, Malignant Brain Tumor (MBT), PWWP et Agenet. Ces domaines partagent tous une structure composée de trois feuillets  $\beta$  incurvés ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ) et une hélice  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ) située entre  $\beta 2$  et  $\beta 3$ . Les chromodomains possèdent également deux hélices  $\alpha$  ( $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ) après le feuillet  $\beta 3$  (**Figure 25**) (Yap and Zhou, 2011). L'alignement de la séquence des chromodomains permet de classer les protéines les contenant, qui sont toutes des protéines de la chromatine, en trois sous-familles. La sous-famille Heterochromatin Protein 1 (HP1)/Chromobox (CBX) est la mieux caractérisée. Ce type de chromodomaine reconnaît les histones tri-méthylées de type H3K27me3 ou H3K9me3. L'interaction avec la lysine tri-



**Figure 25 : Structure du chromodomaine de HP1 $\beta$  et de PC**

Ce schéma représente la superposition du chromodomaine de HP1 $\beta$  libre (en magenta) avec celui de Polycomb (Pc) (en rouge) complexé avec un peptide H3K27me3 (en jaune). On distingue les trois feuillets  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) ainsi que les trois hélices  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ) caractéristiques de la structure des chromodomaines. Le grossissement en bas à gauche montre l'interaction entre les trois résidus de la cage aromatique de Pc (Y26, W47, W50) et la lysine 27 tri-méthylée. (D'après Yap et Zhou, 2011).

méthylée se fait grâce à une cage composée de trois résidus aromatiques (**Figure 25**). HP1 possède aussi un domaine chromo-shadow, qui ne diffère des chromodomaines que par une hélice  $\alpha$  supplémentaire en N-terminal de  $\beta 1$  (Cowieson et al., 2000). La sous-famille Chromodomain-Helicase-DNA-binding (CHD) est atypique car tous ses membres possèdent deux chromodomaines en tandem. La troisième sous-famille, contenant notamment la protéine MSL3, est constituée de protéines possédant un domaine "chromo-barrel". Ces domaines diffèrent des chromodomaines typiques par un feuillet  $\beta$  supplémentaire ( $\beta 0$ ), le remplacement de  $\alpha 2$  par un autre feuillet  $\beta$  ( $\beta 4$ ) et la conservation du deuxième résidu de la cage aromatique uniquement (Yap and Zhou, 2011).

Les domaines "chromo-barrel" ont également été identifiés comme des domaines de fixation aux ARN. Cette propriété a ensuite été étendue à des chromodomaines appartenant aux deux autres sous-familles. Dans plusieurs exemples bien caractérisés chez les mammifères et la drosophile, cette propriété est importante pour le recrutement de ces protéines à des régions génomiques précises.

### **B. Recrutement des complexes de modification de la chromatine par des ARN chez les mammifères**

Chez les mammifères, des ARN permettent de recruter sur la chromatine des protéines à chromodomaine ainsi que des complexes de modification de la chromatine, et ce au cours de différents mécanismes de régulation de l'expression des gènes (**Figure 26**).

## 1 Exemple de l'interaction des protéines Cbx avec les ARN

Les protéines Cbx2, 4, 6, 7 et 8, qui sont les homologues de la protéine Polycomb (PC) de drosophile, possèdent des chromodomaines très conservés. Chaque chromodomaine présente pourtant des affinités différentes pour plusieurs marques épigénétiques ainsi que pour les ARN. Cbx4, 6, 7 et 8 fixent notamment les ARN *in vitro* alors que Cbx2 ne le peut pas. Bien qu'aucune spécificité de séquence dans les ARN fixés par ces protéines n'ait été identifiée *in vitro*, elles possèdent une plus grande affinité pour les ARN simple-brin que pour les ARN double-brin ou l'ADN double-brin (Bernstein et al., 2006). De plus, une mutation des résidus aromatiques du chromodomaine indispensables à la fixation des lysines tri-méthylées ne perturbe pas la fixation aux ARN, indiquant que la région du chromodomaine nécessaire pour leur reconnaissance est différente de celle nécessaire à la reconnaissance des lysines tri-méthylées (Bernstein et al., 2006).

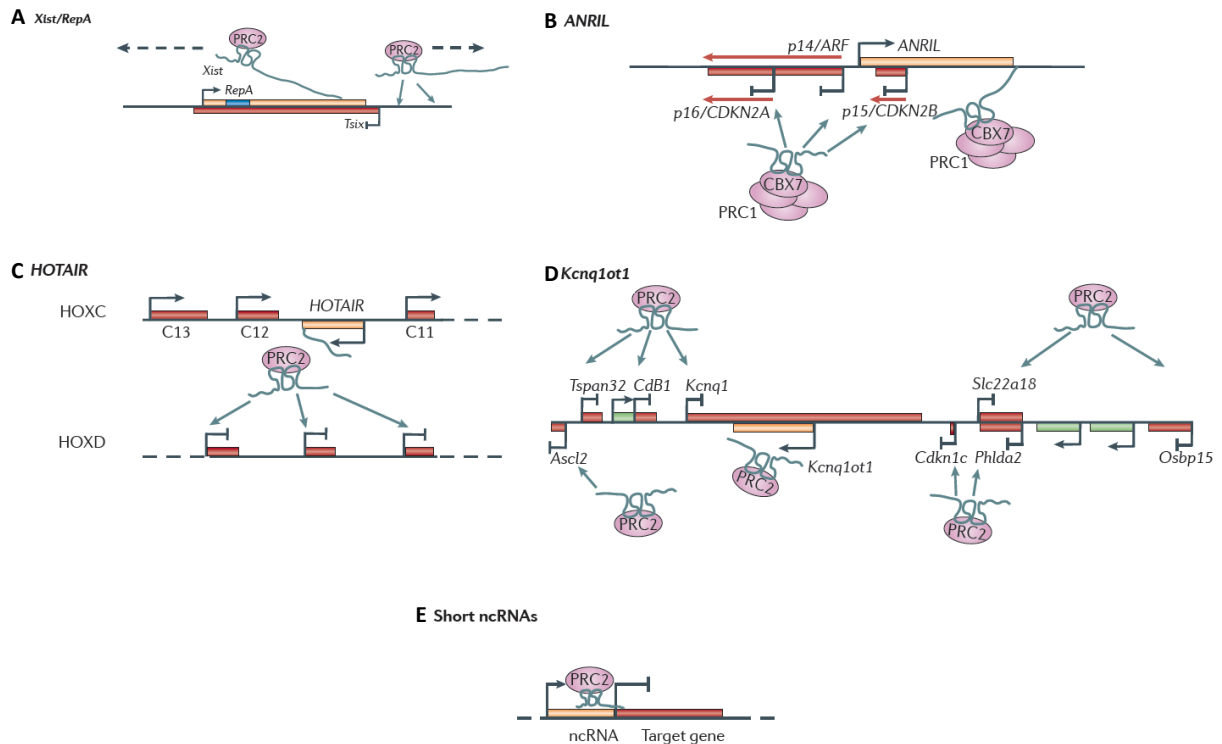
Le chromodomaine de Cbx7 est en particulier important pour sa localisation sur le chromosome X inactivé chez la femelle, la mutation ponctuelle d'un des résidus aromatiques entraînant la délocalisation de Cbx7 de ce chromosome (Bernstein et al., 2006). Chez les mammifères, l'un des deux chromosomes X de la femelle est inactivé. Un niveau de transcription global identique à celui du mâle, qui ne possède qu'un seul chromosome X, est ainsi atteint. Ce mécanisme implique un ARN non-codant appelé *Xist*, qui est produit par le chromosome à inactiver et qui le recouvre intégralement. L'accumulation de *Xist* sur le chromosome X est suivie d'une disparition de l'ARN Pol II et des marques épigénétiques activatrices, puis du recrutement des complexes PcG PRC2 et PRC1 qui déposent la marque répressive H3K27me3 (Wutz, 2011e). Les protéines EZH2 et SUZ12 du complexe PRC2, bien qu'elles ne possèdent pas de chromodomaine, interagissent directement avec un motif

particulier de *Xist* appelé *repA*, suggérant que cet ARN est directement impliqué dans le recrutement de PRC2 sur le chromosome X (**Figure 26A**) (Zhao et al., 2008). Cbx7 fait partie des protéines PcG localisées sur le chromosome X inactif, et en est délocalisée après un traitement à la RNase (Bernstein et al., 2006). Ceci suggère que son recrutement dépend aussi de son interaction avec l'ARN *Xist*. Cbx7 est également impliquée dans la répression du locus *INK4b/ARF/INK4a* par le long ARN non-codant *ANRIL*, qui est un ARN de plusieurs kilobases anti-sens de *INK4a/ARF*. *ANRIL* est fixé par le chromodomaine de Cbx7 et est requis pour le recrutement de PRC2 sur *INK4b/ARF/INK4a*, permettant ainsi la répression des gènes *p14/ARF*, *p16/CDKN2A* et *p15/CDKN2B* (**Figure 26B**) (Kotake et al., 2011; Yap et al., 2010).

## 2 Rôle général des ARN dans le recrutement des complexes PcG et TrxG

D'une façon similaire aux exemples des ARN *Xist* et *ANRIL*, de nombreux autres longs ARN non-codants permettent le recrutement de complexes PcG et TrxG sur la chromatine, même s'il n'a pas toujours été prouvé qu'ils interagissent spécifiquement avec des protéines à chromodomaine. Par exemple, l'ARN non-codant *HOTAIR* est transcrit par le locus *HOXC* et permet le recrutement des complexes PRC2 et LSD1/coREST/REST en *trans* sur le locus *HOXD*, induisant ainsi sa répression (**Figure 26C**) (Rinn et al., 2007; Tsai et al., 2010). L'ARN *HOTTIP* est transcrit par le locus *HOXA* et recrute MLL en *cis*, qui tri-méthyle l'histone H3 sur la lysine 4 et active la transcription sur ce locus (Wang et al., 2011). De même, dans le mécanisme de l'empreinte parentale, les longs ARN non-codants *Air* et *Kcnq1ot1* sont transcrits par les locus à inactiver et y recrutent différents modificateurs de la chromatine tels que le complexe PRC2 ou la méthylase G9a, qui dépose la marque répressive H3K9me3 (**Figure 26D**) (Nagano and Fraser, 2009).





**Figure 26 : Exemples de recrutement des complexes PcG sur la chromatine par des ARN non-codants chez les mammifères**

A : Recrutement du complexe PRC2 par l'ARN *Xist* et son motif répété *RepA* au cours de l'inactivation du chromosome X. *Xist* adresse PRC2 sur son propre locus et sur l'ensemble du chromosome. *Tsix* est un second ARN non-codant anti-sens de *Xist* impliqué dans la répression de la transcription de celui-ci par le X actif.

B : Interaction entre CBX7 et l'ARN *ANRIL*. CBX7 permet de recruter le complexe PRC2 sur le locus des gènes *INK4b/ARF/INK4a*, induisant ainsi la répression de ces derniers.

C : Interaction entre le complexe PRC2 et l'ARN *HOTAIR* transcrit par le locus *HOXC*. Cette interaction permet le recrutement de PRC2 sur le locus *HOXD* en *trans* et induit sa répression.

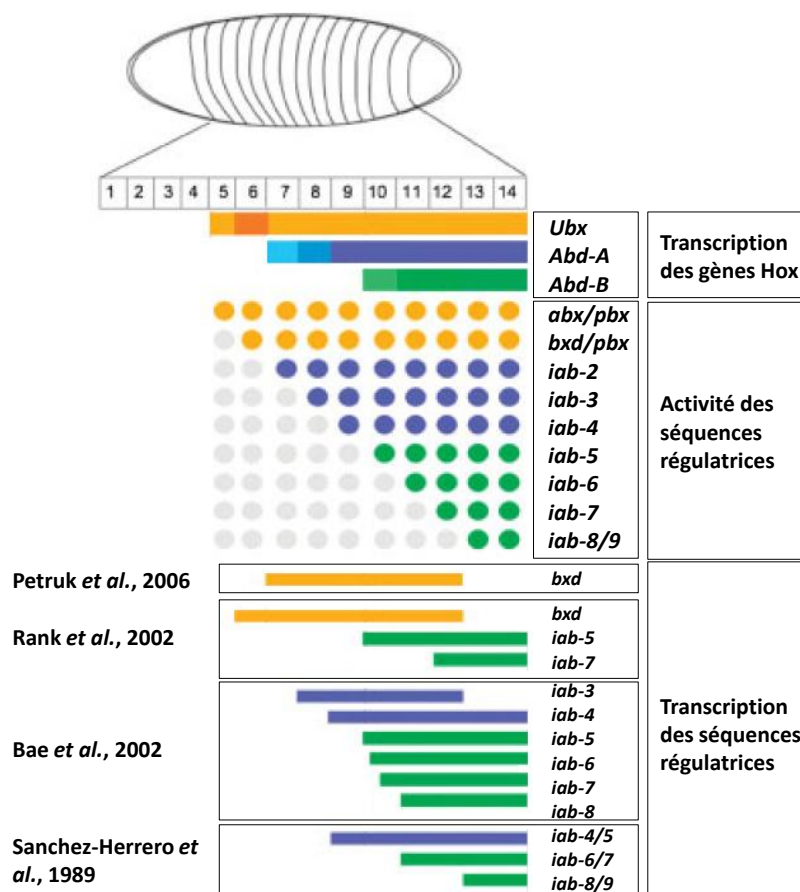
D : Recrutement du complexe PRC2 au locus *Kcnq1* par l'ARN *Kcnq1ot1* au cours de la mise en place de l'empreinte parentale. Ce modèle est similaire à celui proposé pour *Xist* mais est restreint à un locus précis. Les gènes soumis à l'empreinte parentale et réprimés par PRC2 sont représentés en rouge. Les gènes qui ne sont pas soumis à l'empreinte parentale sont représentés en vert.

E : Recrutement du complexe PRC2 par des petits ARN transcrits à partir d'un promoteur spécifique en amont de celui d'un gène cible de PRC2.

(D'après Beisel et Paro, 2011)

Une analyse à large échelle des ARN fixés par le complexe PRC2 a été réalisée dans des cellules souches embryonnaires murines grâce à une immunoprécipitation d'EZH2 suivie d'une analyse globale des ARN co-précipités. Cette étude a permis d'identifier plus de 9000 ARN. Ceux-ci sont de nature très variable, comprenant des ARN anti-sens, intergéniques, associés aux promoteurs ou non-annotés (Zhao et al., 2010). Une autre étude focalisée sur des transcrits courts a mis en évidence une population d'ARN d'une taille de 50 à 200 nucléotides, transcrits par un promoteur en amont de celui des promoteurs des gènes réprimés par les complexes PcG et s'associant à SUZ12 *via* une structure en boucle. Ces ARN seraient impliqués dans le recrutement de PRC2 sur ses cibles (**Figure 26E**) (Kanhere et al., 2010). Chez l'homme, une autre équipe s'est concentrée sur les longs ARN non-codants intergéniques comme *HOTAIR*. Environ 3300 ARN de ce type ont été identifiés, 20% d'entre eux étant fixés par PRC2 et une quantité importante par d'autres complexes de modification de la chromatine comme le complexe coREST. La perte de fonction de ces ARN par ARN interférence conduit à la dérégulation de certains gènes (Khalil et al., 2009). Il est proposé que tous ces ARN soient impliqués dans le recrutement des complexes de modification de la chromatine sur leurs cibles.

Enfin, la protéine de l'hétérochromatine HP1, qui contient un chromodomaine, est également capable de fixer les ARN. Cette propriété semble nécessaire à la localisation de HP1 sur la chromatine puisqu'un traitement à la RNase induit une délocalisation de HP1 de l'hétérochromatine ainsi que de l'euchromatine (Muchardt et al., 2002; Piacentini et al., 2003). Toutefois cette fixation est dépendante d'une région charnière située entre le chromodomaine et le domaine chromo-shadow (Muchardt et al., 2002).



**Figure 27 : Expression des ARN codants et non-codants dans le locus *BX-C* au cours de l'embryogenèse**

Schématisation des 14 parasegments d'un embryon de 2-3 heures (stade 5) avec le pôle antérieur à gauche. Les trois gènes *Hox* du complexe *BX-C* sont différenciellement exprimés dans les parasegments 5 à 14. Chaque gène est représenté d'une couleur spécifique et l'intensité de la couleur correspond à son niveau d'expression. Chaque élément régulateur, quand il est actif dans un parasegment, est représenté par un cercle de couleur identique au gène qu'il contrôle, le gris correspondant à l'état inactif de l'élément. Par exemple, *abx/pbx* est actif dans les parasegments 5 à 14 et y contrôle l'expression d'*Ubx*. L'expression des différents ARN non-codants exprimés par les éléments régulateurs est représentée par des barres. La présence des transcrits correspond à l'activité des séquences régulatrices correspondantes. (D'après Lempradl et Ringrose, 2008)

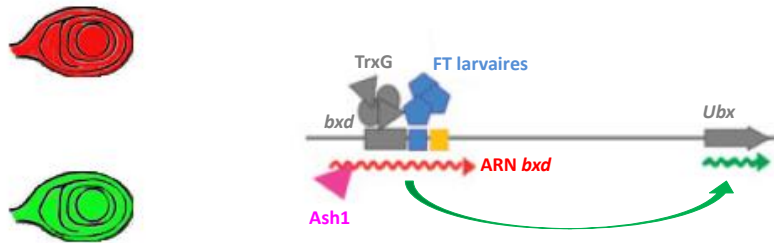
## C. Recrutement des complexes de modification de la chromatine par des ARN chez la drosophile

Cette fonction des ARN dans le recrutement de protéines sur la chromatine n'est pas restreinte aux mammifères. Différents exemples ont été identifiés chez la drosophile ainsi que chez la levure, suggérant une conservation de ces mécanismes au cours de l'évolution. Chez *S. cerevisiae* par exemple, des transcrits instables anti-sens de nombreux gènes, comme *PHO84*, *GAL1-10* ou le transposon *Ty1*, possèdent leur propre promoteur et inhibent la transcription par un mécanisme impliquant le recrutement de l'histone méthyl-transférase Set1 et d'histones dé-acétylases (Berretta et al., 2008; Camblong et al., 2007; Houseley et al., 2008; Pinskaya et al., 2009). Chez la drosophile, différents exemples ont également été caractérisés.

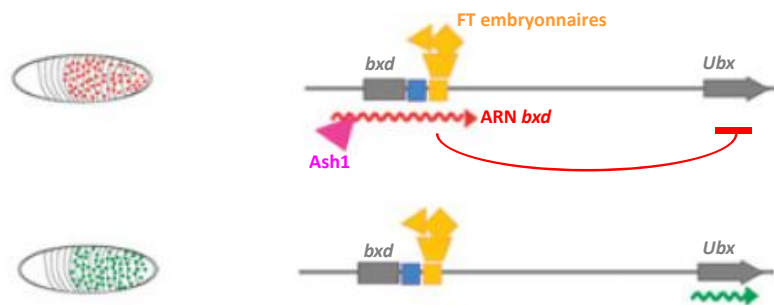
### 1 Exemple de la compensation de dose

Le premier exemple décrit chez la drosophile impliquant la fixation d'une protéine à chromodomaine à un ARN concerne la compensation de dose. Dans cette espèce comme chez les mammifères, le mâle ne possède qu'un seul chromosome X, alors que la femelle en possède deux. Pour pallier à cette différence, l'unique chromosome X du mâle est hypertranscrit. Ce mécanisme est contrôlé par le complexe MSL (Male Specific Lethal), appelé aussi DCC (Dosage Compensation Complex), constitué des protéines MOF (Males absent on the first), MLE (Maleless), MSL1, 2 et 3. Ce complexe, spécifique du mâle, est adressé au chromosome X où il acétyle la lysine 16 des histones H4, ce qui constitue une marque épigénétique activatrice. Le complexe DCC permet principalement d'activer l'élongation de la transcription après l'étape de pause (Larschan et al., 2011). Parmi les

**B – Disques imaginaux de 3ème patte ou de balancier de larve L3**



**A – Embryons 2 à 6 heures**



**Figure 28 : Modèles de régulation de l'expression d'Ubx par les transcrits de bxd**

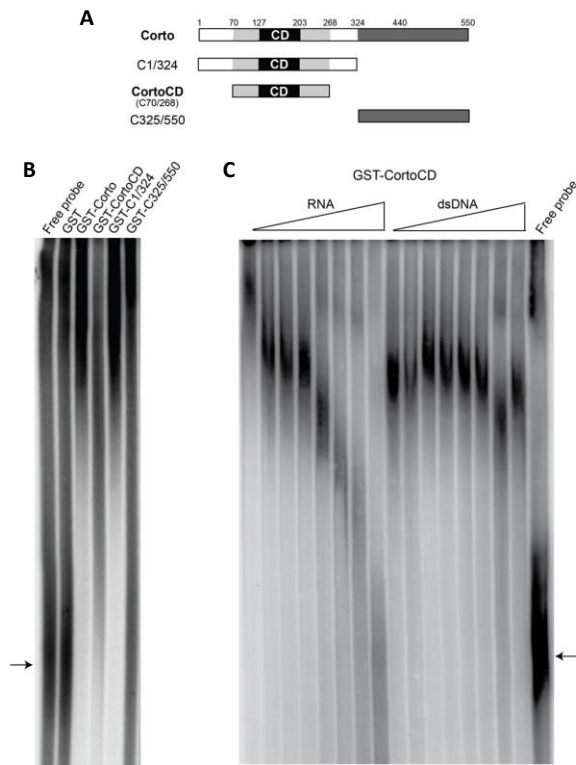
A – Dans le disque de troisième paire de patte et dans le disque de balancier, les ARN de *bxd* activeraient la transcription d'*Ubx*. A gauche, schéma d'un disque de troisième paire de patte dans lequel les transcrits de *bxd* (en rouge) et d'*Ubx* (en vert) sont présents simultanément. A droite, schéma du gène *Ubx* et de ses éléments de contrôle. Les boîtes bleues et jaunes représentent les « enhancers » larvaires et embryonnaires respectivement. En bleu sont représentés les facteurs de transcription (FT) larvaires. Un modèle propose que les transcrits de *bxd* permettraient le recrutement de ASH1 (en rose) qui active la transcription d'*Ubx*.

B – Dans l'embryon, les ARN de *bxd* réprimerait la transcription d'*Ubx*. A gauche, schéma d'un embryon dans lequel les ARN de *bxd* (rouge) et d'*Ubx* (vert) ne sont pas transcrits dans les mêmes cellules. A droite, schéma du gène *Ubx* et de ses éléments de contrôle. En jaune sont représentés les facteurs de transcription (FT) embryonnaires. Ce modèle propose que la transcription des ARN de *bxd* réprimerait la transcription d'*Ubx* par un mécanisme d'interférence avec le promoteur. (D'après Lempradl et Ringrose, 2008)

protéines du complexe MSL, trois contiennent des domaines de fixation aux ARN. MLE, une ARN/ADN hélicase, possède un domaine de fixation aux ARN double-brin alors que MOF, l'acétyltransférase de H4K16, et MSL3 possèdent chacune un domaine « chromo-barrel » (Ilik and Akhtar, 2009). Tout comme les protéines Cbx, MOF et MSL3 interagissent *in vitro* avec des ARN simple-brin plutôt que des ARN ou de l'ADN double-brin, et aucune spécificité de fixation sur une séquence particulière n'a été identifiée. Toutefois, *in vivo*, MOF et MSL3 interagissent spécifiquement avec deux ARN non-codants transcrits à partir du chromosome X chez le mâle, *roX1* et *roX2* (Akhtar et al., 2000). *roX1* et *roX2*, recouvrent intégralement le chromosome X du mâle (Meller et al., 1997) et font partie intégrante du complexe MSL, en permettant son recrutement correct sur le chromosome X (Ilik and Akhtar, 2009).

## 2 Exemple des ARN transcrits dans les séquences régulatrices PRE/TRE

Des ARN sont aussi impliqués dans le recrutement des protéines PcG et TrxG sur la chromatine. Un exemple bien documenté concerne les gènes *Hox*, dont l'expression est contrôlée par la fixation de complexes PcG et TrxG au niveau de séquences régulatrices appelées séquences PRE/TRE. Ces séquences sont transcrites de manière très contrôlée spatio-temporellement (**Figure 27**). Toutefois la fonction précise de ces ARN est encore sujet à discussion (Brock et al., 2009). Une étude basée sur un transgène rapporteur contrôlé par le PRE *Fab7* du gène *Abd-B* a permis de proposer que la transcription de cet élément régulateur permettrait de passer d'un état réprimé de la transcription par les PcG à un état activé par les TrxG (Schmitt et al., 2005). De plus, les ARN *TRE-1*, *2* et *3* transcrits dans le PRE/TRE *bxd* du gène *Ubx* permettent de recruter la protéine TrxG ASH1 et d'activer la transcription d'*Ubx* dans les disques imaginaux de pattes et de balanciers (**Figure 28A**)



**Figure 29 : Corto fixe les ARN *in vitro* grâce à son chromodomaine**

**A :** Schéma représentant Corto et les différents domaines utilisés pour l'étude de la fixation aux ARN *in vitro*. CD: chromodomaine (acides aminés 127 à 203). Le chromodomaine élargi utilisé dans la protéine de fusion GST-CD couvre les acides aminés 70 à 268.

**B :** Expériences de retard sur gel avec les protéines de fusion GST, GST-Corto, GST-CortoCD, GST-C1/324 et GST-C325/550 incubées avec un ARN radioactif. La sonde libre est indiquée par une flèche. Elle est retenue par les protéines de fusion GST-Corto, GST-CortoCD et GST-C1/324.

**C :** Expérience de retard sur gel avec la protéine GST-CD incubée avec un ARN radioactif, avec ajout de quantités croissantes d'ARN ou ADN double brin non marqués. Une compétition n'est observée qu'avec l'ARN non marqué.

(D'après Coléno *et al.*, soumis)

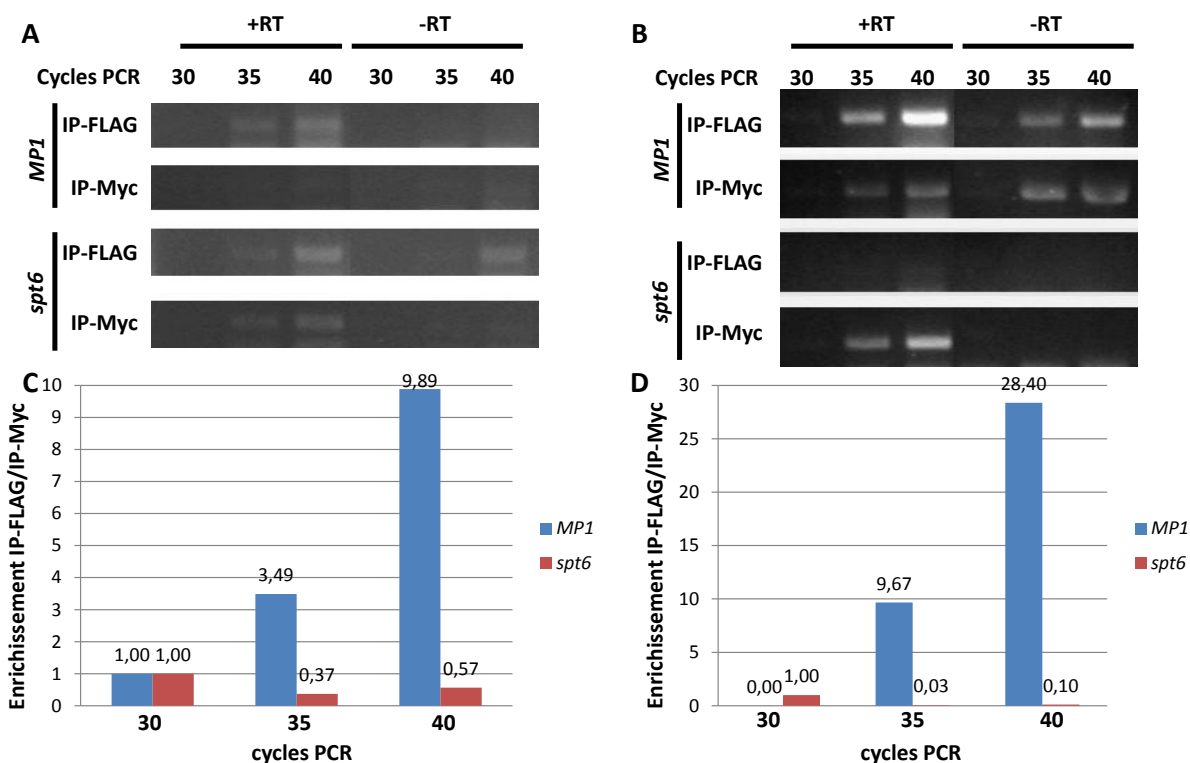
(Sanchez-Elsner et al., 2006). Ces résultats ont cependant été remis en cause par une autre étude montrant que les ARN de *bxd* ne sont pas exprimés dans les mêmes cellules que l'ARNm *Ubx* dans l'embryon. Les auteurs proposent que la transcription de *bxd*, plutôt que d'activer l'expression d'*Ubx*, la bloquerait (**Figure 28B**) (Petruk et al., 2006).

#### **D. Le chromodomaine de Corto est un domaine d'interaction avec les ARN**

Il est difficile de tirer un consensus des différents exemples cités précédemment et sans doute plusieurs mécanismes distincts co-existent-ils. Au laboratoire, la mise en évidence d'un chromodomaine dans la protéine Corto nous a amenés à nous demander si ce domaine était lui aussi capable d'interagir avec les ARN.

Des expériences de retard sur gel à l'aide de protéines de fusion GST avec différents sous-domaines de Corto et une sonde ARN radioactive, réalisées avec ou sans molécules compétitrices (ARN ou ARN), ont permis de montrer que Corto fixe les ARN simple-brin (**Figure 29**). Cette interaction requiert le chromodomaine additionné de quelques acides aminés de part et d'autre (chromodomaine élargi), permettant sans doute de stabiliser sa structure. Tout comme les chromodomains cités précédemment, il n'a cependant été identifié aucune spécificité de séquence ou de structure pour les ARN fixés *in vitro* (Coléno et al. soumis). Toutefois, une expérience de « RNA-pulldown » à l'aide d'une protéine de fusion GST-Corto incubée avec des ARN totaux larvaires a permis d'identifier quelques ARN qui seraient des cibles spécifiques de Corto. Il s'agit de fragments des ARNm de *ciboulot* et de *MP1* ainsi que des ARN ribosomiaux 28S et 18S. Bien qu'aucune structure particulière n'ait été identifiée dans ces ARN, toute fixation est perdue lorsque les ARN larvaires sont dénaturés avant incubation, ce qui suggère l'existence de structures secondaires spécifiquement reconnues par Corto. De façon tout à fait surprenante, l'un des ARN





**Figure 30 : Corto interagit spécifiquement avec l'ARN *MP1* *in vivo***

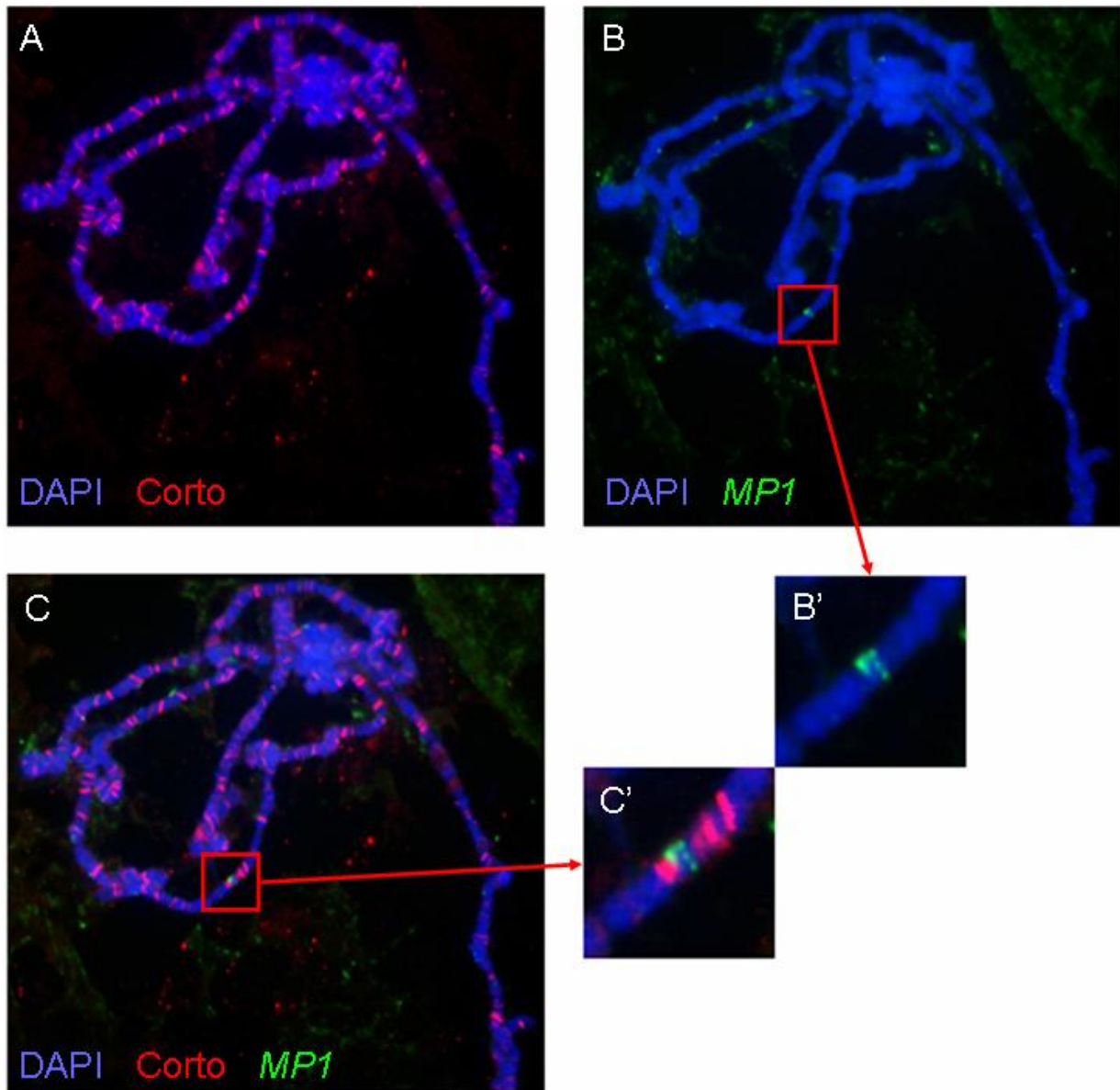
Analyse par RT-PCR semi-quantitative des ARN co-immunoprécipités avec la protéine de fusion FLAG-CortoCD dans des embryons transgéniques (**A, C**) ou avec la protéine de fusion FLAG-Corto exprimée transitoirement dans des cellules S2 (**B, D**) avec des primers *MP1* ou *spt6*. La protéine de fusion est immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps anti-FLAG (IP-FLAG) ou d'un anticorps contrôle (IP-Myc). Après extraction, les ARN sont rétro-transcrits et amplifiés par PCR (+RT). La contamination en ARN génomique est analysée à l'aide de témoins sans rétro-transcription (-RT). En **C** et **D**, la quantification a été réalisée par mesure de l'intensité des bandes observées sur gel à l'aide du logiciel ImageJ. Les chiffres indiquent les valeurs d'enrichissement (voir les matériels et méthodes pour le calcul du taux d'enrichissement).

identifiés par cette expérience code MP1, la protéine d'échafaudage de la voie MAPK ERK interagissant physiquement avec Corto (voir la première partie des résultats). Nous nous sommes par conséquent demandés si cette interaction pouvait refléter l'existence d'un contrôle de la transcription de *MP1* par Corto. Je me suis donc attaché à étudier cette interaction *in vivo* et à essayer d'en élucider la fonction.

## II. Résultats

### A. Corto interagit spécifiquement avec un transcrit de *MP1 in vivo*

Afin de confirmer *in vivo* les résultats de l'expérience de « RNA-pulldown » réalisée à partir d'une protéine de fusion GST-Corto produite en bactéries, j'ai réalisé des expériences d'immunoprécipitation d'ARN (RIP) sur des extraits d'embryons âgés de 0 à 24 heures et de cellules S2. Ces expériences consistent en l'immunoprécipitation d'une forme étiquetée de Corto suivie par l'extraction des ARN co-précipités et leur analyse par RT-PCR semi-quantitative. Les embryons sont issus d'une lignée transgénique sur-exprimant de manière ubiquitaire une forme étiquetée par l'épitope FLAG de la forme élargie du chromodomaine de Corto, fusionnée à une séquence NLS de manière à assurer sa localisation nucléaire. En effet, il n'a pas été possible d'étudier la protéine Corto entière en lignée transgénique car plusieurs tentatives visant à obtenir ces lignées ont échoué. A défaut de l'obtention de telles lignées, j'ai utilisé des cellules S2 issues d'ectoderme embryonnaire transfectées transitoirement par un vecteur permettant la surexpression d'une forme étiquetée par un épitope FLAG de la protéine Corto entière. L'enrichissement en ARN *MP1* obtenu après immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti-FLAG a été rapporté à celui obtenu après

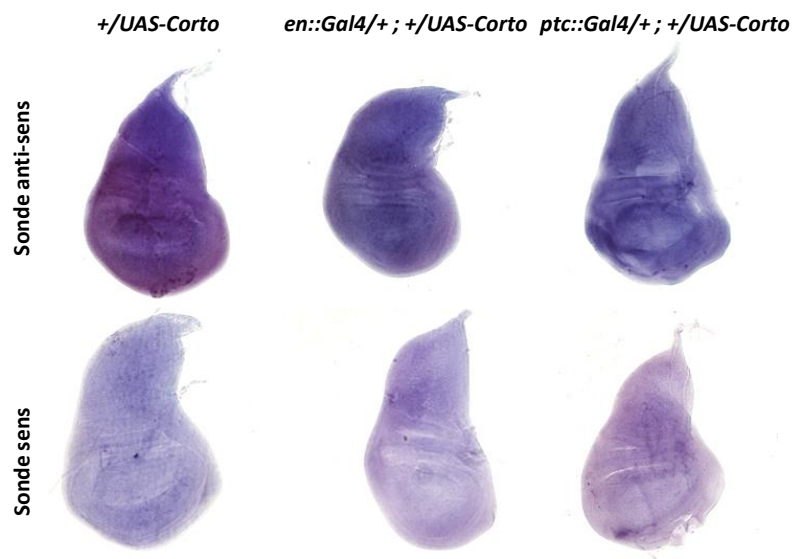


**Figure 31 : Visualisation de la localisation de Corto et du locus *MP1* sur les chromosomes polytènes.** Rouge : protéine Corto. Vert : locus *MP1*. Bleu : marquage de l'ADN au DAPI. **B'** et **C'**, agrandissement de portions de B et C respectivement.

immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps contrôle. Ce rapport a été ensuite comparé à celui obtenu pour un ARN contrôle, *spt6*. Cette expérience a été réalisée trois fois et des résultats similaires ont été obtenus (**Figure 30**). Cependant, aucune barre d'erreur ne peut être représentée, les enrichissements étant variables d'une expérience à l'autre, comme cela a été remarqué dans d'autres expériences de RIP (Khalil et al., 2009; Rinn et al., 2007). En embryons comme en cellules S2, Corto fixe spécifiquement un ARN *MP1*. Ces résultats confirment également que, *in vivo* comme *in vitro*, le chromodomaine élargi est suffisant pour cette interaction. Une des amorces utilisées pour l'analyse par RT-PCR est située à cheval sur les deux exons de *MP1* et l'amplicon obtenu par PCR correspond effectivement à une forme épissée, ce qui suggère que le transcrit *MP1* fixé par Corto n'est pas un ARN naissant.

## **B. La triste histoire de l'ARN anti-sens de *MP1***

Pour mieux caractériser le transcrit *MP1* fixé par Corto, j'ai réalisé de nouvelles expériences de RIP en utilisant, comme amorces de rétro-transcription, des séquences spécifiques des formes sens et anti-sens de l'ARNm *MP1*. J'ai alors obtenu un enrichissement très important avec l'amorce spécifique de la séquence anti-sens, ce qui nous a conduits à penser qu'un ARN anti-sens de *MP1* était fixé par Corto. Toutefois, la réalisation d'un contrôle complémentaire consistant en une réaction de rétro-transcription sans ajout d'aucune amorce m'a également permis de détecter un transcrit *MP1* immunoprécipité par Corto ! Cette activité aspécifique des enzymes de rétro-transcription a déjà été rapportée dans la littérature, et peut être diminuée en utilisant une enzyme possédant une activité RNaseH couplée à une élévation de la température et une diminution du temps de réaction (Haddad



**Figure 32 : Analyse de l'expression de *MP1* par hybridation *in situ* sur des disques imaginaux d'ailes de larves sur-exprimant Corto grâce au système UAS/Gal4**

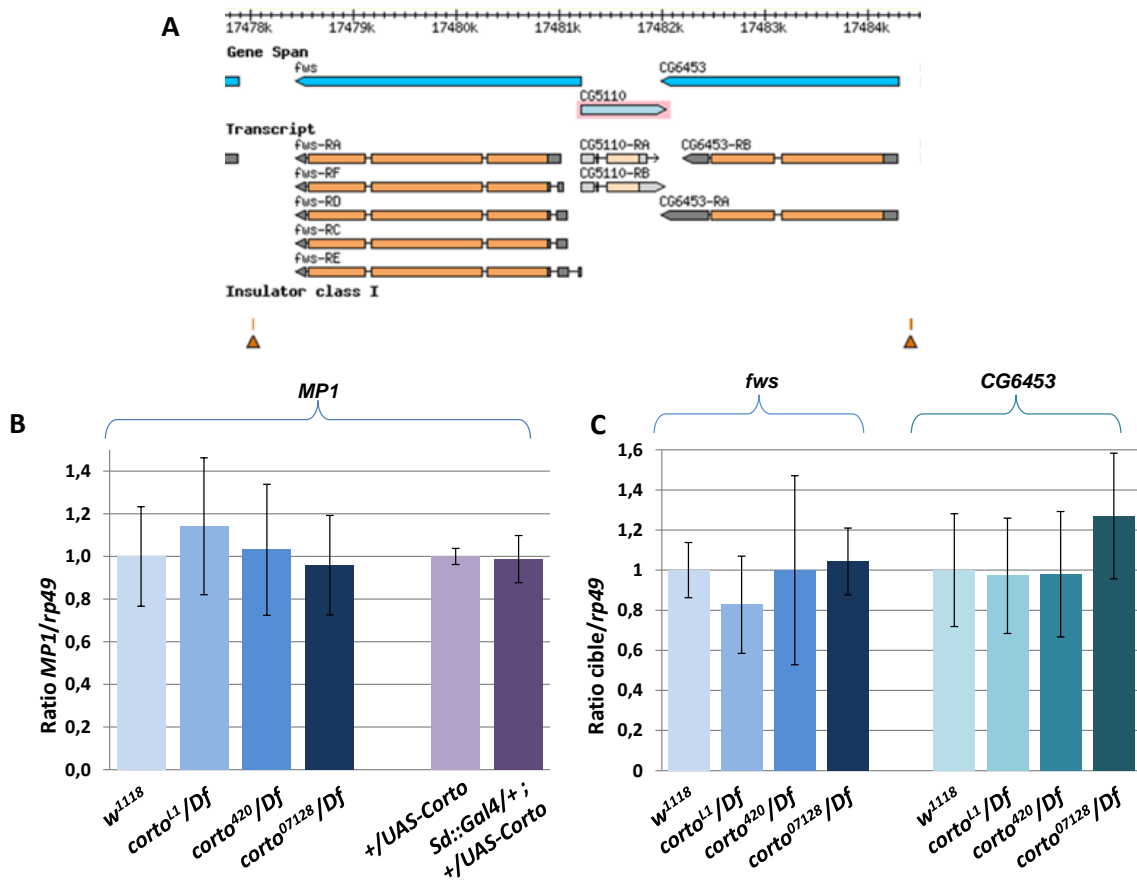
Haut : Sonde anti-sens *MP1* hybridée sur des disques imaginaux d'aile d'individus contrôles (+/UAS-Corto), sur-exprimant Corto dans le compartiment postérieur (*en::Gal4/+ ; +/UAS-Corto*) ou dans le centre organisateur A/P (*ptc::Gal4/+ ; +/UAS-Corto*). Bas : sonde sens *MP1* sur les mêmes génotypes.

et al., 2007). En suivant ce protocole, la quantité d'amplicons détectée a fortement diminué dans les réactions réalisées sans amorce et avec une amorce anti-sens. En parallèle, j'ai réalisé des expériences de RACE-PCR qui ne m'ont pas permis de mettre en évidence un ARN *MP1* anti-sens. Ces résultats nous ont donc amenés à conclure que Corto fixe un transcrit sens de *MP1* et qu'il n'existe pas d'ARN anti-sens à ce locus.

### **C. Corto n'est pas localisée sur le locus de *MP1* sur des chromosomes polytènes de glandes salivaires de larves de troisième stade larvaire**

Les ARN fixés par les protéines à chromodomaine étant généralement impliqués dans leur localisation sur la chromatine, nous avons voulu savoir si l'ARN *MP1* pouvait permettre le recrutement de Corto au locus *MP1* et permettre ainsi la régulation transcriptionnelle de ce gène ou de ses voisins.

Afin de tester la présence de Corto sur le locus de *MP1*, j'ai tout d'abord réalisé des expériences d'immuno-FISH sur chromosomes polytènes de glandes salivaires de troisième stade larvaire à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine endogène et d'une sonde génomique de *MP1*. Comme le montre la **figure 31**, cette expérience montre que la protéine Corto n'est pas présente sur le locus *MP1*. Il est cependant possible que le tissu des glandes salivaires, qui est à un stade terminal de différenciation, ne reflète pas la localisation de Corto sur la chromatine dans l'embryon ou le disque imaginal d'aile. Pour tester la présence de Corto sur le locus *MP1* dans ce dernier tissu, je suis actuellement en train de mettre au point un protocole d'immunoprécipitation de la chromatine.



**Figure 33 : Corto ne semble pas contrôler l'expression de *MP1* et des gènes voisins**

**A** : Représentation de la région génomique couvrant environ 7 kb autour de *MP1* (CG5110). Les positions des différents gènes, les ARNm correspondant et la position des insulateurs présents dans la région y sont figurés. (Source : <http://flybase.org>)

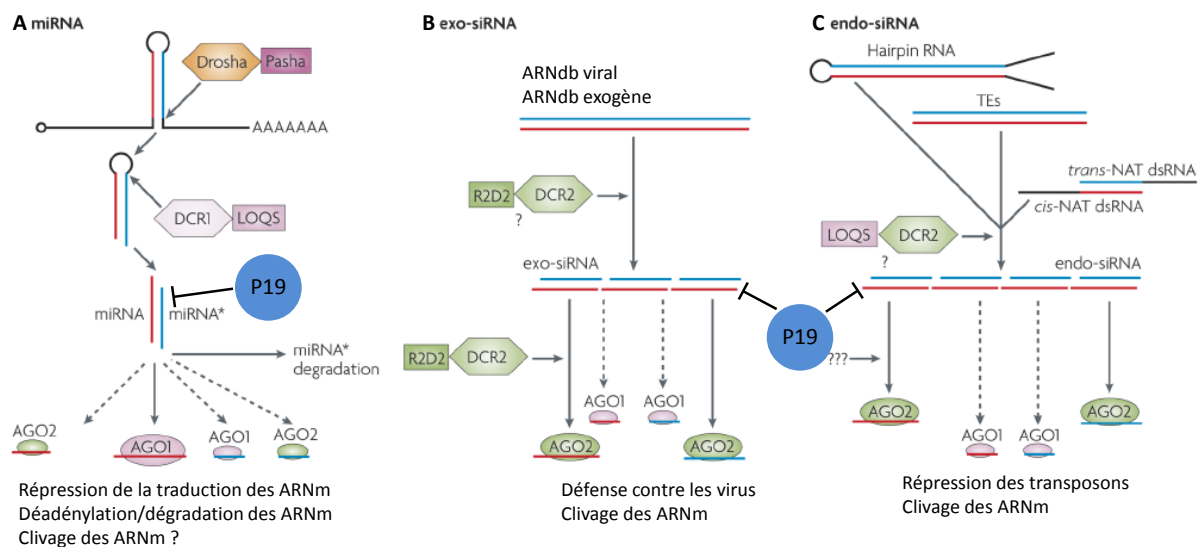
**B, C** : Analyse par RT-qPCR des niveaux d'expressions des transcrits de *MP1* (B) et de *fws* et *CG6453* (C) dans des disques imaginaux d'aile d'individus présentant une dérégulation de *corto* (perte de fonction ou surexpression). La normalisation a été réalisée par rapport à l'expression de *rp49*. Des résultats similaires sont obtenus avec une normalisation par rapport à l'expression de *spt6*.

#### D. Corto ne semble pas contrôler la transcription de *MP1* et des gènes à son voisinage

Afin de savoir si Corto contrôle la transcription de *MP1* ou des gènes voisins, nous avons étudié leur expression par différentes techniques. *MP1* permet la synthèse de deux ARNm de 568 et 749 nucléotides. Il est entouré de deux gènes transcrits dans le sens opposé avec lesquelles il est partiellement chevauchant (**Figure 33A**). Du côté de sa région 5'-UTR, *MP1* partage deux paires de bases avec la région 5'-UTR de *four way stop (fws)*. Ce gène code l'homologue de Cog5, une sous-unité du complexe COG intervenant dans le fonctionnement de l'appareil de Golgi chez la levure et les mammifères, qui est requise pour la cytokinèse au cours de la spermatogénèse chez la drosophile (Farkas et al., 2003). Du côté de sa région 3'-UTR, *MP1* est superposé sur 50 paires de bases avec la région 3'-UTR de *CG6453*, un gène prédit pour coder une alpha-glucosidase. De plus, il existe deux insulateurs de part et d'autre de ces trois transcrits qui pourraient éventuellement permettre de maintenir une structure de la chromatine commune à ces trois gènes.

Pour tester si *MP1* et les gènes voisins sont des cibles transcriptionnelles de Corto, j'ai analysé leur expression dans des mutants perte et gain de fonction *corto*. Cette étude a été réalisée sur le disque d'aile de larves de troisième stade larvaire, puisque nos travaux ont montré que Corto intervient dans la différenciation de cette structure en collaboration avec ERK et *MP1*. *MP1* est exprimé de façon ubiquitaire dans tous les disques imaginaux (Mouchel-Vielh et al., 2008). L'analyse de son expression par hybridation *in situ* dans des disques d'aile d'individus sur-exprimant Corto dans différentes régions n'a révélé aucune différence entre les territoires sur-exprimant et ne sur-exprimant pas Corto (**Figure 32**). Cette technique n'étant peut être pas assez sensible pour détecter des variations faibles d'un ARN peu exprimé, j'ai analysé les variations d'expression de *MP1* et de ses voisins par





**Figure 34 : Les différentes voies de petits ARN chez la drosophile**

Les différentes voies des petits ARN présentent un schéma d'organisation proche. Les ARN précurseurs double-brin sont clivés par une enzyme appartenant à la famille des RNases de type III associée à un partenaire fixant les ARN double brin. Les petits ARN produits sont ensuite chargés par une protéine effectrice appartenant à la famille Argonaute (AGO). La protéine P19 est représentée par un disque bleu et les étapes à laquelle elle inhibe les différentes voies des petits ARN sont indiquées.

**A :** La transcription des gènes des miRNA produit un pri-miRNA formant une structure en tige-boucle, qui est clivée en pré-miRNA par la RNase Drosha associée à Pasha. La boucle du pré-miRNA est clivée par la RNase DCR1 associée à LOQS permettant la production du miRNA de 22 nucléotides associé à son brin complémentaire (miRNA\*). Le miRNA est chargé par la protéine effectrice AGO1 alors que le miRNA\* est dégradé.

**B :** Les ARN double-brin introduits dans la cellule par un virus ou de façon expérimentale sont clivés en petits ARN d'environ 21 nucléotides par la RNase DCR2 associée à son partenaire R2D2. Ces petits ARN sont ensuite pris en charge par AGO2.

**C :** Dans les cellules de drosophiles et les ovocytes de mammifères, des structures tige-boucle, des éléments transposables (TE) transcrits dans les deux sens et des transcrits chevauchants (*trans-NAT* et *cis-NAT dsRNA*) servent de précurseurs pour la production d'endo-siRNA. Ces différents ARN double-brin sont clivés en ARN de 21 nucléotides par la RNase DCR2 associée à LOQS puis pris en charge par AGO2.

(D'après Okamura et Lai, 2008)

RT-PCR quantitative (RT-qPCR). Cette expérience a été réalisée sur des disques d'ailes de larves hétéroalléliques portant un des trois allèles perte de fonction *corto* (*corto*<sup>07128</sup>, *corto*<sup>L1</sup>, *corto*<sup>420</sup>: voir la partie I des résultats pour la caractérisation de ces allèles) et une délétion contenant *corto* (*Df(3R)6-7*), ainsi que de larves sur-exprimant *corto* dans l'aile grâce à la lignée pilote *scalloped::Gal4* (*sd::Gal4*) et au transgène *UAS-corto*. Par comparaison avec des individus contrôles (*w*<sup>1118</sup> ou *+/UAS-corto*), aucune variation significative du niveau d'expression de *MP1* n'a été détectée pour ces quatre génotypes (**Figure 33B**). L'expression des gènes voisins de *MP1* ne semble pas non plus varier de manière significative pour les trois génotypes perte de fonction (**Figure 33C**). Il est cependant possible que les variations induites par une dérégulation de *corto* ne soient pas suffisamment fortes pour apparaître significatives. En effet, si l'expression de *MP1* n'est dérégulée que dans le tissu précurseur des veines ectopiques, et reste inchangée dans le reste du tissu d'interveine sous l'influence de mécanismes compensatoires, cette variation sera difficilement détectable par RT-qPCR.

#### **E. Implication de la voie des microARN dans la différenciation des tissus de l'aile**

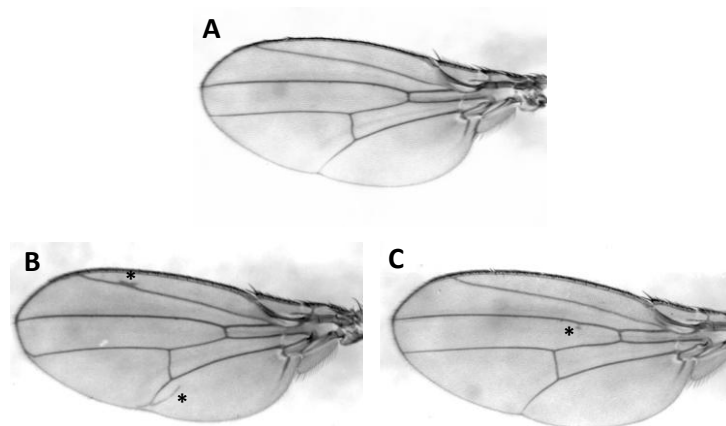
Avant de devenir caduque, l'hypothèse de l'existence d'un ARN anti-sens de *MP1* nous a amenés à penser que celui-ci pourrait être à l'origine de la production de petits ARN interférents. Chez la drosophile et la souris, il existe une voie de petits ARN interférents endogènes, appelé endo-siRNA, produits par des transcrits anti-sens. Les endo-siRNA sont impliqués dans la répression des éléments répétés du génome dans la lignée somatique ainsi que dans le contrôle de l'expression de certains gènes (**Figure 34**) (Okamura et al., 2008). De plus, une interaction génétique a été rapportée entre *corto* et *piwi*, le gène codant la protéine Piwi impliquée dans la voie des piRNA, de petits ARN spécifiques de la lignée

	génotype	nombre de femelles observées	nombre de femelles avec des veines ectopiques	Pourcentage
perte de fonction <i>loqs</i>	<i>loqs</i> <sup>F00791/+</sup>	55	2	3,64
	<i>loqs</i> <sup>+/KO</sup>	84	8	9,52
	<i>loqs</i> <sup>F00791/KO</sup>	46	26	56,52
perte de fonction <i>Dcr-2</i>	<i>Dcr-2</i> <sup>L811FSX/+</sup>	46	2	4,35
	<i>Dcr-2</i> <sup>+/G31R</sup>	70	0	0,00
	<i>Dcr-2</i> <sup>L811FSX/G31R</sup>	48	0	0,00
perte de fonction <i>AGO2</i>	<i>AGO2</i> <sup>51B/+</sup>	136	10	7,35
	<i>AGO2</i> <sup>51B/414</sup>	58	0	0,00
trans-hétéroalléliques <i>loqs</i> ; <i>Dcr-2</i>	<i>loqs</i> <sup>F00791</sup> / <i>Dcr-2</i> <sup>G31R</sup>	69	1	1,45
	<i>loqs</i> <sup>F00791</sup> / <i>Dcr-2</i> <sup>L811FSX</sup>	16	0	0,00
	<i>loqs</i> <sup>KO</sup> / <i>Dcr-2</i> <sup>G31R</sup>	80	1	1,25
	<i>loqs</i> <sup>KO</sup> / <i>Dcr-2</i> <sup>L811FSX</sup>	53	0	0,00

**Tableau 7 : Analyse des phénotypes d'ailes induits par des mutations perte-de-fonction de *loqs*, *Dicer2*, *AGO2***

germinale (Smulders-Srinivasan et al., 2010). Afin d'étudier l'implication de la voie des endo-siRNA dans la différenciation des tissus de l'aile, j'ai utilisé une lignée transgénique contenant un transgène *UAS-P19*. P19 est un inhibiteur des voies des petits ARN issu d'un virus de plante, le tombusvirus. Dans l'hôte du virus, cette protéine inhibe aussi bien la voie des microARN (miRNA) que les voies des siRNA exogènes et endogènes (**Figure 34**) (Chapman et al., 2004). J'ai utilisé deux formes de cette protéine : la forme sauvage, adressée au cytoplasme, et une forme fusionnée à un domaine NLS d'adressage nucléaire (Fagegaltier et al., 2009). La surexpression de NLS-P19 dans l'aile grâce à la lignée pilote *sd::Gal4* conduit à l'apparition de veines ectopiques pour 87,1% des individus (**Figure 35**). Ce phénotype semble spécifique de la forme nucléaire de P19, puisque seulement 3,6% des individus sur-exprimant la forme cytoplasmique présentent ce phénotype.

Afin de confirmer et compléter ces observations, j'ai étudié les phénotypes d'aile de mutants hétéroalléliques perte de fonction pour les gènes *loquacious (loqs)*, *Dicer-2 (Dcr-2)* et *Argonaute 2 (AGO2)*, codant des protéines nécessaires à la biosynthèse des endo-siRNA (**Figure 34**) (Okamura and Lai, 2008). Seuls les individus hétéroalléliques perte de fonction pour *loqs* présentent, dans 56% des cas, un phénotype peu expressif de veines ectopiques (**Tableau 7 et Figure 35**). L'absence de phénotype de veines ectopiques avec les individus hétéroalléliques perte de fonction de *Dcr-2* et *AGO2* suggère que la voie des miRNA, et non pas celle des endo-siRNA, serait impliquée dans le contrôle de la différenciation des tissus de l'aile. En effet, alors que *Dcr-2* et *AGO2* sont impliqués uniquement dans la biosynthèse des siRNA (endogènes ou exogènes), *loqs* est impliqué dans la production des endo-siRNA et également des miRNA (**Figure 34**) (Hartig et al., 2009). L'analyse des autres gènes spécifiques de la voie des miRNA est donc nécessaire pour confirmer cette hypothèse.



**Figure 35 : Phénotypes de veines ectopiques induits par une perturbation de la voie des petits ARN**

Aile d'un individu contrôle ( $w^{118}$ ) (A), d'un individu sur-exprimant la forme nucléaire de P19 (génotype  $sd::Gal4/+ ; +/UAS-NLS-P19$ ) (B), d'un individu hétéroallèle perte de fonction pour *loqs* ( $loqs^{K01-53/F00791}$ ) (C). Les astérisques indiquent le tissu de veines ectopiques.

### III. Discussion

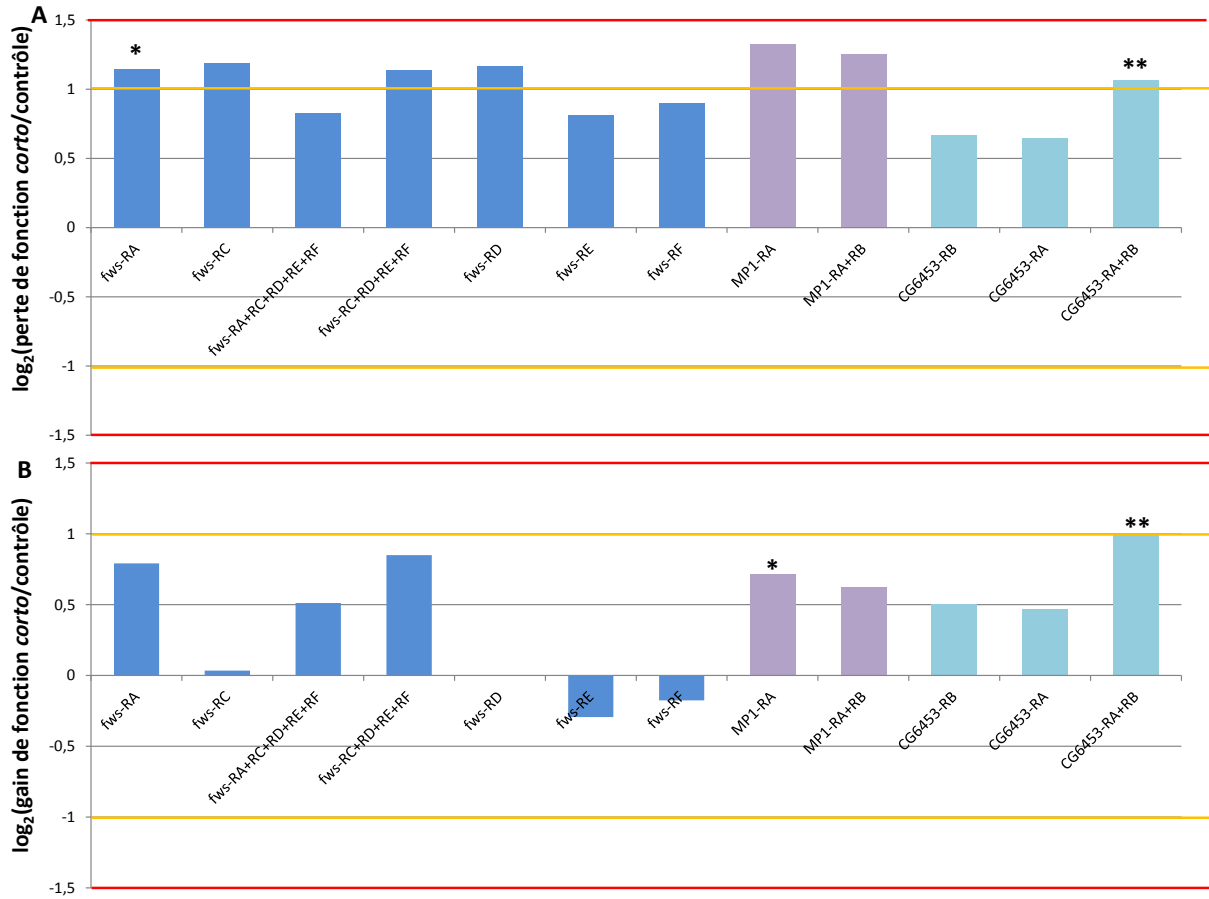
En conclusion, mes travaux ont permis de confirmer que Corto fixe spécifiquement *in vivo* un transcrit sens de *MP1* par l'intermédiaire de son chromodomaine. La recherche du rôle fonctionnel de cette interaction, sans toutefois aboutir à un scénario complet, m'a permis d'identifier quelques pistes qui pourront faire l'objet de futurs travaux.

#### A. Caractérisation précise de l'ARN *MP1* fixé par Corto

Les expériences de RIP indiquent que l'ARN *MP1* fixé par Corto est un ARN sens qui semble être épissé. Afin de confirmer qu'il s'agit bien d'un ARNm mature, la même expérience pourrait être réalisée en utilisant comme amorce de rétro-transcription une séquence poly-dT. De plus, l'utilisation d'oligonucléotides situés de part et d'autre des bornes des ARNm *MP1* permettrait de vérifier qu'il s'agit bien des messagers décrits et non pas d'un hypothétique ARN plus long transcrit à travers plusieurs gènes. Enfin, une expérience de RIP réalisée sur des extraits protéiques cytoplasmiques ou nucléaires serait, elle aussi, informative. En effet, en cas de contrôle transcriptionnel, l'interaction entre Corto et l'ARN *MP1* devrait logiquement prendre place dans le noyau plutôt que dans le cytoplasme.

#### B. La protéine Corto joue-t-elle un rôle dans la régulation transcriptionnelle des gènes du locus *MP1* ?

En se basant sur les exemples déjà connus d'interactions entre des ARN et des protéines de la chromatine, nous avons émis l'hypothèse que, grâce à cette interaction, Corto pourrait



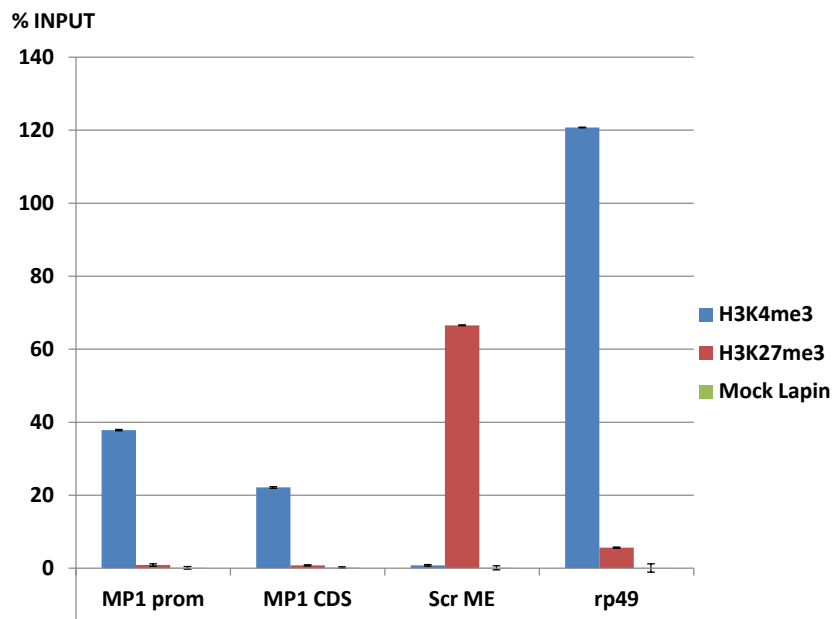
**Figure 36 : Analyse par RNA-seq du niveau d'expression de *MP1* et des gènes voisins en contexte de dérégulation de *corto***

Analyse par RNA-seq de l'expression de *MP1*, *fws* et *CG6453* dans des disques d'ailes de larves mutantes perte de fonction pour *corto* (génotype *corto*<sup>L1/420</sup>) (A) ou sur-exprimant *corto* dans l'aile (génotype *sd::Gal4* /+ ; +/*UAS-corto*) (B). En A, normalisation par rapport à la lignée de référence *w*<sup>1118</sup>. En (B), normalisation par rapport aux individus *sd::Gal4*/+.

p-value ajustée \* :  $P\text{-adj} \leq 10 \times 10^{-5}$  ; \*\* :  $P\text{-adj} \leq 10 \times 10^{-10}$

être adressée au locus *MP1* pour contrôler sa transcription. L'analyse du niveau d'expression de *MP1* et des gènes voisins *CG6453* et *fws* par RT-qPCR n'a pas permis de montrer de variation notable de leur expression en contexte de dérégulation de *corto*. En complément de cette expérience, j'ai analysé les résultats d'une étude globale par RNA-seq réalisée par notre équipe sur des disques imaginaux d'aile d'individus perte de fonction pour *corto* (*corto*<sup>L1/420</sup>) ou sur-exprimant *corto* dans le disque d'aile (*sd::Gal4/+ ; +/UAS-corto*). L'expression de certaines isoformes de *MP1*, *fws* et *CG6453* semble en légère augmentation (facteur un peu supérieur à 2) chez les individus mutants perte de fonction comparés aux individus contrôles. Cependant, la validité de cette observation est limitée par des valeurs de *P*-value relativement faibles (**Figure 36A**). En revanche, aucune dérégulation de l'expression de ces gènes n'est observée chez les individus sur-exprimant *corto* (**Figure 36B**). Une analyse plus précise de l'ensemble de ces données est nécessaire pour définir un seuil statistique validant ou non ces différences. Toutes les analyses transcriptionnelles réalisées sur le locus *MP1* l'ont été dans notre modèle d'étude, le disque d'aile, en conditions de dérégulation de *corto* (perte de fonction ou surexpression). Or les phénotypes de veines ectopiques induits dans ces conditions sont peu expressifs, et donc la quantité de tissu veineux n'est pas beaucoup plus importante que dans le tissu sauvage. Si la variation d'expression des cibles de Corto se limite à ces tissus, celle-ci pourrait passer inaperçue dans des expériences de RT-qPCR. Il faudrait donc étudier l'expression de *MP1* dans un tissu homogène. Des cellules en culture dans lesquelles *corto* serait inactivé par ARN interférence, et dans lesquelles l'interaction entre Corto et l'ARN *MP1* a été détectée, constitueraient sans doute un bon modèle d'étude. Des cellules S2, d'origine embryonnaire, ou des cellules « clone 8 », issues de la poche du disque imaginal d'aile, pourraient être utilisées.





**Figure 37 : Immunoprécipitation de la chromatine pour analyser la présence des marques H3K4me3 et H3K27me3 sur *MP1* dans le disque imaginal d'aile d'individus  $w^{1118}$**

Les régions de *MP1* étudiées sont situées 80 paires de bases avant le +1 de transcription (*MP1 prom*) et dans la séquence codante (*MP1 CDS*). Une région de l'élément de maintien de *Scr* (*Scr ME*) sert de contrôle de séquence non transcrite, et la séquence codante de *rp49* de contrôle de séquence transcrite.

### C. Corto est-il présent sur la chromatine au locus *MP1* ?

Les expériences d'immuno-FISH sur les chromosomes polytènes des glandes salivaires s'étant avérées négatives, la fixation de Corto sur *MP1* pourrait être analysée dans des disques imaginaux d'aile d'individus sur-exprimant une forme étiquetée du chromodomaine élargi de Corto par immunoprécipitation de chromatine. De plus, notre équipe envisage de réaliser, sur ce même matériel, une expérience de ChIP-seq. Si ces expériences mettent en évidence la présence du chromodomaine de Corto sur le locus *MP1*, il sera alors intéressant d'observer l'effet d'une perte de fonction de *corto* sur les différentes marques épigénétiques de ce locus et sur le recrutement de l'ARN polymérase II. J'ai réalisé une expérience de ChIP à partir de disques d'ailes d'individus contrôles (**Figure 37**), qui montre la présence de la marque activatrice H3K4me3 et l'absence de la marque répressive H3K27me3 sur *MP1* confirmant ainsi les résultats d'une étude de ChIP-seq à partir de disques d'ailes (Perez-Lluch et al., 2011).

### D. Existe-t-il d'autres ARN cibles de Corto ?

Si nous savons maintenant que Corto fixe spécifiquement l'ARN *MP1 in vivo*, nous ne savons pas si Corto possède d'autres cibles. Bien que plusieurs hypothèses soient envisagées, la fonction de cette interaction reste également inconnue. Une expérience de RIP suivie d'un séquençage massif de tous les ARN précipités par Corto permettrait d'identifier *in vivo* les ARN cibles de Corto. L'obtention d'un plus grand nombre de cibles pourrait permettre d'identifier une séquence consensus de fixation par Corto. De même, la découverte de la majorité des ARN fixés par Corto permettrait sans doute d'identifier une population d'ARN

particuliers à partir de laquelle une fonction précise pourrait être envisagée et de nombreuses cibles testées.

#### **E. Rôle de la voie des miRNA dans la différenciation des tissus de l'aile : y-a-t-il une relation fonctionnelle avec Corto?**

Mes résultats ont montré que des mutants perte de fonction de *loqs* présentent un phénotype de veines ectopiques à faible expressivité mais assez pénétrant, suggérant une implication de la voie des miRNA au cours du développement des veines de l'aile. L'inhibiteur des petits ARN P19 induit lui aussi un phénotype de veines ectopiques lorsqu'il est adressé au noyau. Cet inhibiteur permet au tombusvirus de restreindre la réponse de la plante à l'infection en séquestrant les duplex de siRNA produits contre le virus, mais aussi les complexes formés entre le miRNA et son brin complémentaire (miRNA\*) produits par la plante, inhibant leur incorporation dans le complexe RISC (RNA-induced Silencing Complex) (**Figure 34**) (Chapman et al., 2004). Cet inhibiteur a été sur-exprimé dans des lignées transgéniques de drosophile, mais l'utilisation de transgènes rapporteurs de l'activation des voies des siRNA et des miRNA n'a révélé aucune inhibition significative de ces deux voies (Chou et al., 2007). P19 et sa forme localisée dans le noyau ont aussi été utilisées chez la drosophile afin d'isoler et séquencer une population de petits ARN nucléaires. L'analyse par séquençage en masse de ces petits ARN montre, de façon surprenante, que si seulement 3,4% des ARN associés à la forme cytoplasmique sont des miRNA, cette proportion s'élève à 26,7% pour la forme nucléaire (Fagegaltier et al., 2009). Il serait donc intéressant de réanalyser l'effet de P19 sur les transgènes rapporteurs de l'activité de la voie des miRNA avec cette forme nucléaire. La protéine P19 adressée au noyau étant la seule à induire un

phénotype de veines ectopiques dans l'aile, ce résultat suggère lui aussi une implication de la voie des miRNA dans le développement de l'aile.

Les résultats des interactions génétiques que j'ai réalisées entre des allèles perte de fonction de *loqs* et *corto* ne permettent pas de conclure à une implication commune de Corto et de la voie des miRNA dans la mise en place des tissus de l'aile. Il faudrait poursuivre ces analyses avec d'autres gènes de la voie des miRNA, tels que *droscha* et *pasha*, codant les protéines impliquées dans le clivage du pri-miRNA, *Dicer-1*, codant la protéine clivant le pre-miRNA, et *Argonaute 2*, codant la protéine qui charge le miRNA (**Figure 34**). Si ces résultats confirment l'implication de la voie des miRNA dans la mise en place des tissus de l'aile mais ne montrent aucune synergie avec *corto*, cela signifierait que la voie des miRNA et Corto agissent indépendamment. Si une interaction génétique est mise en évidence, on peut imaginer que Corto serait directement impliquée dans la voie des miRNA. En effet, certaines protéines possédant des domaines de fixation aux ARN sont impliquées dans la régulation de l'accessibilité des ARNm par les miRNA (Kedde and Agami, 2008; Kedde et al., 2010).

## IV. Matériel et méthodes

Dans cette partie, seuls sont décrits les protocoles expérimentaux qui ne l'ont pas déjà été dans les parties I et II de ce manuscrit.

### A. Expérience de co-immunoprécipitation d'ARN

Cette expérience a été réalisée soit à partir d'extraits d'embryons âgés de 0 à 15 heures exprimant une protéine de fusion FLAG-Corto<sub>CD</sub> (chromodomaine élargi de Corto) grâce au pilote ubiquitaire *daughterless::Gal4*, soit à partir de cellules S2 exprimant de manière transitoire une protéine de fusion FLAG-Corto. Dans le premier cas, les embryons ont été fixés au paraformaldéhyde avant l'extraction protéique de manière à stabiliser les interactions moléculaires (« cross-linking »).

**Fixation des embryons au formaldéhyde.** Les embryons (1 gramme) sont déchorionnés pendant 5 minutes dans un bain d'eau de javel (NaOCl 3%). Ils sont ensuite rincés abondamment avec de l'eau puis avec une solution de rinçage EWB (Triton X-100 0,03%, NaCl 0,4%) et enfin avec du PBS, Triton X-100 0,01%. La fixation est réalisée pendant 15 minutes sous agitation vigoureuse dans 10ml de solution de formaldéhyde (formaldéhyde 1,8%, HEPES 50mM, EDTA 1mM, EGTA 0,5mM, NaCl 100mM, pH8) à laquelle sont ajoutés 30ml de n-heptane. Les embryons sont ensuite centrifugés 1 minute à 9000g et 4°C et la réaction stoppée par rinçage dans 50ml de PBS 1X, glycine 0,125M, Triton X-100 0,01%. Après sédimentation sans centrifugation, les embryons sont rincés 10 minutes sous agitation dans 15ml de tampon I (HEPES 10mM pH7,6, EDTA 10mM pH8, EGTA 0,5mM pH8, Triton X-100 0,25%) puis 10 minutes dans 15ml de tampon II (HEPES 10mM pH7,6, 200mM NaCl,

EDTA 1mM pH8, EGTA 0,5mM pH8, Triton X-100 0,01%). Finalement, les embryons sont égouttés, congelés instantanément dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

**Extraction protéique totale à partir embryons.** 1 gramme d'embryons fixés est broyé dans 3ml de tampon RIPA (50mM Tris-HCl pH7,5, 150mM NaCl, 0,5% NP40, 0,1% SDS, 50mM Tris pH7,5) supplémenté en inhibiteurs de Protéase (complete Mini, EDTA-free, Roche) ainsi qu'en inhibiteurs de RNase (RiboLock™ RNase Inhibitor, Fermentas). Le broyat est ensuite centrifugé 10 minutes à 16000g et 4°C et le surnageant contenant toutes les protéines est récupéré. La quantité de protéine est ensuite évaluée par un dosage colorimétrique avec le réactif de Bradford.

**Transfection et extraction protéique totale à partir de cellules S2.**  $5 \cdot 10^6$  cellules S2 sont transfectées avec 2µg d'ADN d'un vecteur permettant l'expression de la protéine de fusion Corto-FLAG sous contrôle du promoteur actine. Le protocole de transfection et d'extraction est identique à celui décrit dans l'article de la partie I.

**Immunoprécipitation des complexes protéines/ARN.** 500µg d'extraits protéiques d'embryons ou 250 µg d'extraits protéiques de cellules S2 transfectées sont incubés toute la nuit à 4°C avec 3µg d'anticorps monoclonal anti-FLAG (M2, Sigma), ou anti-Myc (9E10, Santa Cruz) dans un volume final de 500µl de tampon RIPA. Parallèlement, 30µl de billes magnétiques couplées à la protéine G (Ademtech) sont incubés toute la nuit dans 100µl de tampon RIPA avec 10µg d'ARNt dénaturés 10min à 65°C. Le lendemain, le surnageant est retiré et les billes sont incubées 2 heures à 4°C sous agitation avec les extraits protéiques. A la fin de l'incubation, le tube est placé sur un portoir aimanté, le surnageant est conservé et les billes sont lavées cinq fois dans 300µl de tampon RIPA. Les billes sont ensuite resuspendues dans 100µl de tampon RIPA. 20µl de billes sont conservés pour vérification de

l'efficacité d'immunoprécipitation par Western-blot. Le reste est transféré dans un tube propre et soumis à une extraction des acides nucléiques.

**Extraction des ARN.** De manière à récupérer les acides nucléiques éventuellement co-immunoprécipités, des extractions au Trizol® (Invitrogen) puis au chloroforme sont réalisées sur les billes. A la fin de ces extractions, la phase aqueuse est récupérée et les acides nucléiques sont précipités à l'éthanol 100% en présence de 200µg de glycogène servant d'entraîneur. Après centrifugation, le culot est rincé avec de l'éthanol 70%, séché et resuspendu dans 20µl d'H<sub>2</sub>O-DEPC.

**Réaction de RT-PCR.** La moitié des ARN extraits est rétro-transcrite avec des hexamères « random » à l'aide du kit Quantitec Reverse Transcription (Qiagen), l'autre moitié est traitée de la même façon mais l'enzyme de rétro-transcription est omise afin de réaliser un contrôle de contamination par l'ADN génomique. Dans le cas de l'analyse des brins sens et anti-sens de *MP1*, la réaction de rétro-transcription a été réalisée à l'aide du kit Superscript II (Invitrogen), permettant de réaliser la réaction en plusieurs étapes et d'ajouter des oligonucléotides spécifiques des brins sens (*MP1down*) et anti-sens (*MP1T4*), ou à l'aide du kit Sensiscript® (Qiagen). Avec ce dernier, la température de réaction est élevée à 50°C et le temps diminué à 30 minutes, comme indiqué dans (Haddad et al., 2007). Afin de détecter la présence d'ADNc de *MP1* ou de *spt6* (témoin négatif), une amplification par PCR semi-quantitative est réalisée sur la réaction de rétro-transcription en utilisant des amorces spécifiques de *MP1* et *spt6* (couples *MP1T4/MPRT2* et *spt6F/spt6R* respectivement). La PCR semi-quantitative est réalisée sur 4µl de réaction de rétro-transcription avec 1 unité de Taq polymérase (Taq DNA polymerase recombinante, Fermentas). 50 cycles de PCR (30 secondes à 94°C ; 45 secondes à 52°C ; 45 secondes à 72°C) sont réalisés et un aliquot de 10µl de

réaction est prélevé à 30, 35, 40, 45 et 50 cycles. Ces aliquots sont ensuite déposés sur gel d'agarose 2%. Celui-ci est mis à migrer et coloré au BET en fin de migration.

**Analyse de l'enrichissement en ARN.** L'intensité de chaque bande est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ et l'intensité du bruit de fond est retirée. Le cas échéant, l'intensité de la bande correspondant à une contamination par l'ADN génomique est également soustraite. Le rapport entre les intensités obtenues après immunoprécipitation de la protéine d'intérêt par rapport à l'immunoprécipitation contrôle est réalisé pour chaque cycle. A partir de 35 cycles, le signal dépasse celui du bruit de fond et un enrichissement en *MP1* dans l'immunoprécipitation du chromodomaine ou de la protéine Corto entière par rapport à l'immunoprécipitation contrôle est détecté. L'inverse est obtenu pour le contrôle *spt6*. Après 40 cycles, la réaction de PCR atteint un plateau et plus aucun enrichissement n'est mesurable.

## **B. Expérience d'immuno-FISH sur les chromosomes polytènes**

Le principe de cette expérience est de marquer la protéine Corto fixée aux chromosomes polytènes ainsi que le locus *MP1*, de façon à savoir si Corto se fixe sur ce locus. Pour cela, le locus *MP1* est révélé par hybridation d'une sonde spécifique biotinylée. La protéine Corto est révélée par immunohistochimie.

**Clonage d'une région de l'ADN génomique de *MP1* et synthèse d'une sonde d'ADN biotinylée par "Nick Translation".** La sonde d'ADN biotinylée est synthétisée à partir d'une région génomique de 2,4 kb autour de *MP1*. Pour cloner cette région, l'ADN génomique de mouches *w<sup>1118</sup>* est extrait à partir de 30 individus. Ceux-ci sont broyés dans 400µl de tampon



A (Tris-HCl pH7,5 100mM, EDTA 100mM, NaCl 100mM, SDS 0,5%). Le broyat est incubé 30 minutes à 65°C. L'ajout de 800µl de tampon B (1 volume d'Acétate de Potassium 5M, 2,5 volumes de Chlorure de Lithium 6M) suivi d'une incubation de 10 minutes sur la glace permet la précipitation des protéines et des débris. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et l'ADN qu'il contient est précipité à l'isopropanol. Après centrifugation, rinçage à l'éthanol 70% et séchage, le culot est resuspendu dans 100µl de TE-RNase (Tris pH8 10mM, EDTA 1mM, RNase 50µg/ml). La région génomique de *MP1* choisie est amplifiée par PCR avec 0,5 unités de *Pfu DNA polymérase* (Fermentas) et les amorces GM3 et GM4. Le produit d'amplification est ensuite purifié sur colonne (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). A partir de ce produit, la sonde d'ADN biotinylée est synthétisée par "Nick Translation" en intégrant du dATP biotinylé, selon les instructions du fabricant (BioNick™ Labeling System, Invitrogen). A la fin de cette réaction et après purification sur colonne, la sonde est conservée à -20°C dans 200µl de tampon d'hybridation (SSC 2X, Dextran Sulfate 10%, Formamide 50%, ADN de sperme de saumon 8%).

**Immunodétection de Corto sur les chromosomes polytènes.** Les expériences d'immunodétection sur les chromosomes polytènes ont été réalisées sur des larves des mouches *w<sup>1118</sup>* comme décrit précédemment (Salvaing et al., 2003). Les larves sont élevées à 18°C dans un milieu riche afin de favoriser l'endoréplication des chromosomes. Les glandes salivaires sont disséquées dans du PBS 1X, Triton X-100 0,1%. Elles sont ensuite fixées dans du PBS 1X, Triton X-100 0,1%, paraformaldéhyde 3,7% pendant 30 secondes puis dans de l'acide acétique 50%, paraformaldéhyde 3,7% pendant 2 minutes. Les glandes salivaires sont placées entre une lame couverte de poly-lysine et une lamelle et sont dissociées, en tapant légèrement sur la lamelle à l'aide de la mine d'un crayon, de manière à casser les cellules qu'elles contiennent. Une forte pression est appliquée sur la lamelle et l'étalement des

chromosomes est vérifié au microscope à contraste de phase. Après un bain de quelques secondes dans de l'azote liquide, la lamelle est retirée à l'aide d'un rasoir. La lame est ensuite rincée deux fois 15 minutes dans du PBS 1X puis incubée toute la nuit dans une solution de blocage (BSA 3%, NP40 0,2%, Tween 0,2%, lait écrémé 10%). Après deux rinçages en PBS 1X, 20µl d'une solution d'anticorps anti-Corto (anticorps polyclonal de lapin, dilution 1/30) sont déposés sur la lame. Celle-ci est incubée pendant 1 heure à température ambiante puis rincée 5 minutes en PBS 1X, 15 minutes en PBS 1X, NaCl 300mM, NP40 0,2%, Tween 0,2% et enfin 15 minutes en PBS 1X, NaCl 400mM, NP40 0,2%, Tween 0,2%. Après rinçage en PBS 1X, 30µl d'une solution d'anticorps secondaires couplés à un fluorochrome (anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre les IgG de lapin : Alexa Fluor® 568, Molecular Probes, dilution au 1/1000) sont déposés sur la lame puis incubés pendant 1 heure à l'abri de la lumière. La lame est ensuite rincée comme précédemment puis incubée pendant 10 minutes dans une solution de DAPI (1µg/µl) de manière à colorer l'ADN des chromosomes. Après un rinçage de 5 minutes en PBS 1X, les étalements de chromosomes sont montés dans du Mowiol (Tris 0,1M pH8,5, glycérol 25%, Mowiol 10%, DABCO 2,5%) et photographiés au microscope à fluorescence (LEICA, objectif 40X).

**Expérience de "Fluorescent In-Situ Hybridization" (FISH).** Après analyse de la lame, le Mowiol est dépolymérisé dans un bain de PBS 1X pendant 2 heures à température ambiante suivi d'un bain de PBS 1X à 37°C toute la nuit. Le lendemain, la lame est rincée trois fois 5 minutes en SSC 2X puis déshydratée dans des bains successifs d'éthanol et séchée à l'air. Elle est ensuite incubée deux fois 30 minutes dans du SSC 2X à 70°C puis déshydratée comme précédemment. Les chromosomes sont dénaturés dans un bain de NaOH 0,07M pendant 6 minutes, rincés en SSC 2X et déshydratés de nouveau. 20µl de sonde biotinylée dénaturée par chauffage à 80°C sont déposés sur la lame. Celle-ci est recouverte d'une lamelle scellée

avec du "Rubber Cement" et incubée toute la nuit à 37°C. Le lendemain, la lamelle est retirée et la lame est rincée trois fois en SSC 2X à 42°C. 25µl de streptavidine couplée au FITC (Vector Laboratories, dilution au 1/50<sup>ème</sup> en solution de détection Tris-HCl 50mM pH 7.5, BSA 4%) sont déposés puis la lame est incubée 1 heure à température ambiante et enfin rincée en SSC 2X puis en PBS 1X. De manière à amplifier le signal, la lame est à nouveau incubée pendant 1 heure avec 25µl d'anticorps anti-streptavidine biotinylés (Vector Laboratories, dilution au 1/50<sup>ème</sup> en solution de détection), rincée en PBS, réincubée avec 25µl de streptavidine comme précédemment et à nouveau rincée. Les chromosomes sont ensuite colorés au DAPI, la lame montée dans du Mowiol et photographiée de nouveau. Les clichés ainsi obtenus sont alors superposés aux clichés obtenus après immunodétection de Corto.

### C. Analyse de l'expression de *MP1* par hybridation *in situ*

Ces expériences sont réalisées sur des disques imaginaux d'aile de larves chez qui *corto* est sur-exprimé dans une région spécifique du disque grâce au système UAS-Gal4 : le pilote *engrailed::Gal4* permet une surexpression dans le compartiment postérieur, et le pilote *patched::Gal4* dans le centre organisateur A/P.

**Synthèse de la sonde *MP1*.** Un plasmide *pBS-KS* contenant la moitié 5' de l'ADNc de *MP1* est linéarisé en 3' par Pst1 pour la synthèse de la sonde sens et en 5' par HindIII pour la sonde anti-sens. La sonde marquée à la digoxigénine (DIG) avec le kit DIG RNA labelling Mix (Roche) est synthétisée à l'aide de l'ARN polymérase T3 (Proméga) pour la sonde sens et T7 (Proméga) pour la sonde anti-sens selon le protocole du constructeur. Les sondes sont ensuite purifiées sur des colonnes Mini Quick Spin RNA columns (Roche).

**Hybridation *in situ* de disques imaginaux.** Des larves de troisième stade larvaires sont disséquées sur la glace dans du PBS 1X. Les moitiés antérieures des carcasses contenant les disques imaginaux sont fixées 15 minutes dans du PBS 1X pH7, formaldéhyde 4%, puis 15 minutes dans du PBS 1X pH7, formaldéhyde 4%, Triton X-100 0,6%. Elles sont ensuite lavées 3 fois 5 minutes dans du PBT (PBS 1X, Tween 20 0,1%), digérées 5 minutes à température ambiante dans du PBS 1X + 4µg/ml de protéinase K, lavées de nouveau 3 fois dans du PBT, fixées une dernière fois dans du PBS 1X, formaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0,6%, et lavées 5 fois en PBT. Les carcasses sont pré-hybridées 10 minutes à température ambiante dans le milieu d'hybridation (50% formamide désionisée, 5X SSC, 200µg/ml de tRNA, 100µg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué, 50µg/ml d'héparine) puis 60 minutes à 66°C. La sonde est ensuite ajoutée à une concentration de 90ng/100µl et les carcasses sont incubées une nuit à 70°C. Le lendemain, elles sont lavées 20 minutes dans du tampon d'hybridation à 70°C, 20 minutes dans un mélange volume à volume de tampon d'hybridation et de PBT à 70°C puis 4 fois 20 minutes et enfin quelques heures dans du PBT à 70°C. Les carcasses sont incubées toute la nuit à température ambiante avec des anticorps anti-DIG, préalablement pré-adsorbés 60 minutes à 4°C sur des tissus larvaires fixés, à la dilution de 1/2000 dans 1ml de PBT. Elles sont ensuite lavées 4 fois 30 minutes dans du PBT puis 20 minutes dans du tampon de coloration (100 mM TrisHCl pH9, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>). La coloration est réalisée pendant environ 30 minutes dans 1ml de tampon de coloration contenant 10µl de solution de NBT/BCIP (0,4mg/ml de NBT, 0,19mg/ml de BCIP, 100mM Tris buffer pH 9,5, 50mM MgSO<sub>4</sub> - Roche) dans l'obscurité. La coloration est stoppée par plusieurs lavages dans du PBT et les carcasses sont mises à incuber dans un mélange volume à volume de PBS glycérol sur la nuit. Le lendemain, les disques imaginaux sont disséqués et montés dans du Citifluor (Biovalley).

#### **D. RT-PCR quantitative à partir de disque d'aile**

20 disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade larvaire de chaque génotype sont disséqués dans du PBS 1X. Après centrifugation, le PBS est retiré et les disques sont congelés dans l'azote liquide. Les ARN sont ensuite extraits à l'aide du kit Pure Link™ RNA micro kit (Invitrogen). 1µg d'ARN est rétro-transcrit à l'aide du kit SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen). L'analyse des ADNc est effectuée par PCR quantitative avec le kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Biorad) sur un CFX96 (Biorad) en utilisant des couples d'amorces spécifiques de *MP1* (amorces *MPRT1/MPRT2*), *fws* (*MPASid1F/MPASid1R*) et *CG6453* (*MPASid6F/MPASid6R*). Les réactions sont réalisées sur 5µl d'ADNc dilués au 1/50 dans une réaction de 20µl, et 40 cycles de PCR (5 secondes à 95°C, 5 secondes à 60°C) sont effectués. La concentration correspondant à chaque Ct est obtenue par la méthode de la courbe standard grâce à la réalisation d'une gamme de calibration, puis les concentrations relatives pour chaque gène sont calculées par rapport aux deux gènes de références *rp49* (amorces *RP49F/RP49R*) et *spt6* (amorces *spt6F/spt6R*).

#### **E. Immunoprécipitation de la chromatine (X-ChIP) à partir de disque imaginaux d'aile pour la détection des marques épigénétiques H3K4me3 et H3K27me3**

**Dissection et fixation des disques imaginaux d'aile.** 50 disques sont disséqués dans du milieu Schneider sans sérum puis centrifugés 5 minutes à 3000g et 4°C et fixés dans 500µl de PBS1X, 1% paraformaldéhyde pendant 20 minutes à 4°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 50µl de Glycine 1,25M suivi d'une incubation de 5 minutes à 4°C. Les disques sont ensuite lavés trois fois dans 400µl de PBS1X puis le culot est congelé dans l'azote liquide avant d'être stocké à -80°C.

**Préparation et immunoprécipitation de la chromatine.** La préparation de la chromatine et l'immunoprécipitation sont effectués à l'aide du kit LowCell ChIP kit (Diagenode) comme suit. 50 disques sont resuspendus dans 50µl de tampon B complété en inhibiteur de protéases (complete Mini, EDTA-free, Roche) et incubés 10 minutes sur glace. Les disques sont soniqués pendant 12 cycles (30 secondes ON/ 30 secondes OFF, puissance maximale) à l'aide d'un Bioruptor (Diagenode), afin d'obtenir des fragments de chromatine de 0,2 à 1 kb. Les différents tubes de chromatine éventuellement préparés sont réunis, centrifugés 10 minutes à 3000g et 4°C et le surnageant, contenant la chromatine soluble, est congelé dans l'azote liquide en aliquots de 50µl et conservé à -80°C. Une expérience d'immunoprécipitation avec un anticorps nécessite l'utilisation de chromatine issue de 20 disques. Pour chaque immunoprécipitation, 10µl de billes magnétiques couplées à la protéine A sont lavés dans 20µl de tampon A complété en inhibiteurs de protéases puis incubés dans 100µl de tampon A avec les anticorps (voir **tableau 8** pour la description des anticorps utilisés) pendant deux heures à 4°C avec agitation. Le surnageant est ensuite retiré. 150µl de chromatine diluée 7,5 fois dans du tampon A complété en inhibiteur de protéases sont ajoutés au complexe billes-anticorps puis mis à incuber la nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, le surnageant est retiré et les billes sont lavées trois fois 5 minutes en tampon A et une fois en tampon C.

**Purification de l'ADN et analyse par PCR quantitative.** L'ADN immunoprécipité est purifié à l'aide du kit I-Pure (Diagenode) comme suit. Le culot de bille obtenu après immunoprécipitation est resuspendu dans un mélange 1 pour 25 de tampon B dans du tampon A et maintenu en suspension à 65°C toute la nuit à l'aide d'un thermomixer (eppendorf). 22,5µl de chromatine avant immunoprécipitation (soit 15% de la quantité immunoprécipitée et constituant l'INPUT) sont traités de la même façon. Le lendemain, le

surnageant est récupéré et 60µl d'isopropanol, 2µl d'entraîneur et 15µl de billes magnétiques y sont ajoutés. Le tout est incubé 1 heure sous agitation à température ambiante puis les billes sont lavées pendant 5 minutes dans 100µl de Wash buffer 1 puis dans 100µl de Wash buffer 2. L'ADN est élué des billes par deux incubations successives dans 25µl de tampon C pendant 15 minutes à température ambiante. 5µl de l'ADN élué est analysé par PCRq dans des réactions de 20µl à l'aide du kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Biorad) sur un CFX96. 40 cycles PCR (5 secondes à 98°C, 5 secondes à 60°C) sont effectués. L'enrichissement pour chaque immunoprécipitation est calculé par rapport à l'INPUT en prenant en compte l'efficacité de chaque couple d'amorces selon le calcul suivant :

Enrichissement en %INPUT =  $(\text{efficacité}^{(Ct_{\text{INPUT}} - Ct_{\text{échantillon}})}) \times 100$ .

<b>Tableau 8 : Liste des anticorps utilisés</b>						
Nom	Référence	Lot	Fournisseur	Type	Origine	Concentration - Quantité utilisée
Anti-H3K27me3	pAb069-050	A299-00241	Diagenode	polyclonal	lapin	0,84µg/µl – 5,9µl
Anti-H3K4me3	pAb-003-050	A3152-003P	Diagenode	polyclonal	lapin	1,1µg/µl – 1,8µl
IgG lapin	Kch-803-015	D006	Diagenode	polyclonal	lapin	1µg/µl - 3µl

## F. Séquences des amorces utilisées

Nom	Séquence
MP1T4	5'-ACGGCCTGCTGCAAAAGGTC-3'
MPRT2	5'-CACAAAGGTCAGGATGAGCG-3'
MPRT1	5'-GTTTCATACCCACATTCACCAC-3'
MP1down	5'-GTGAATGTGGGTATGAACGAGGGC-3'
GM3	5'-CACCCATCTGCGTGAGGTTCTTATC-3'
GM4	5'-TACACCCTTTGTCCCTTCGATC-3'
MPASid1F	5'-CCACGCAACCAAAAACAGGCTGT-3'
MPASid1R	5'-GCGGAAAAAGGATGCGGCTAGT-3'
MPASid4F	5'-CTGACCTTTGTGGGCGCGGA-3'
MPASid4R	5'-GGCCTCGGTGACAGCCTGTT-3'
MPASid1F	5'-CCACGCAACCAAAAACAGGCTGT-3'
MPASid1R	5'-GCGGAAAAAGGATGCGGCTAGT-3'
MPASid6F	5'-TGGTTTTCTGCTGCAGTTTGGGA-3'
MPASid6R	5'-TGCTTGGCATGCGTAGACCAGA-3'
spt6F	5'-CGGAGGAGCTCTTCGATATG-3'
spt6R	5'-GACAGCTCTGGGAAGTCGTC-3'
rp49F	5'-CCGCTTCAAGGGACAGTATC-3'
rp49R	5'-GACAATCTCCTTGCCTTCT-3'
ScrF	5'-CCGTTCAAGCTCGGTCCGCTC-3'
ScrR	5'-GACGCTGGTCGGGCAATCGTT-3'



## G. Lignées de drosophile utilisées

Génotype	Description	Localisation	Référence/numéro de stock Bloomington
<i>da::Gal4</i> ( <i>Gal4<sup>daG32</sup></i> )	Expression ubiquitaire de Gal4	II	BL5460
<i>en::Gal4</i>	Expression de Gal4 dans le compartiment postérieur du disque d'aile	II	BL1973
<i>ptc::Gal</i>	Expression de Gal4 dans l'organisateur A/P du disque d'aile	II	BL2017
<i>sd::Gal4</i> ( <i>sd<sup>SG29.1</sup></i> )	Expression de Gal4 dans la poche du disque d'aile	X	BL8609
<i>corto<sup>L1</sup></i>	Allèle perte de fonction obtenu par mutagénèse EMS	III	(Marenda et al., 2004; Mouchel-Vielh et al., 2011)
<i>corto<sup>420</sup></i>	Allèle perte de fonction obtenu par excision d'élément P	III	(Kodjabachian et al., 1998; Lopez et al., 2001; Mouchel-Vielh et al., 2011)
<i>corto<sup>07128</sup></i>	Allèle perte de fonction obtenu par insertion d'un élément P 0,5 kb en amont du TSS	III	(Mouchel-Vielh et al., 2011; Smulders-Srinivasan et al., 2010)
<i>Df(3R)6-7</i>	Délétion couvrant <i>corto</i>	III	(Castrillon et al., 1993)
<i>UAS-corto</i>	Lignée de surexpression de Corto	III	(Kodjabachian et al., 1998)
<i>FHCD23.1</i>	Lignée de surexpression du chromodomaine élargi de Corto additionné d'une séquence NLS	II	Coléno et al. soumis
<i>UAS-P19</i>	Lignée de surexpression de P19	II	(Chou et al., 2007)
<i>UAS-NLS-P19</i>	Ligné de surexpression de P19 additionné d'une séquence NLS	III	(Fagegaltier et al., 2009)
<i>loqs<sup>F00791</sup></i>	Allèle perte de fonction par insertion d'un transposon piggyBac dans la région 5'-UTR de <i>loquacious</i>	II	(Forstemann et al., 2005)

<i>loqs</i> <sup>KO</sup>	Allèle perte de fonction par délétion totale du gène	II	(Park et al., 2007)
<i>Dcr-2</i> <sup>L811FSX</sup>	Allèle perte de fonction par insertion (L811 remplacée par 19 acides aminés)	II	(Lee et al., 2004)
<i>Dcr-2</i> <sup>G31R</sup>	Allèle perte de fonction par substitution (R416X)	II	(Lee et al., 2004)
<i>AGO2</i> <sup>51B</sup>	Allèle perte de fonction par excision d'élément P	III	(Xu et al., 2004)
<i>AGO2</i> <sup>414</sup>	Allèle perte de fonction par excision d'élément P	III	(Okamura et al., 2004)
<i>w</i> <sup>1118</sup>	Lignée de référence		



## CONCLUSION

En conclusion, nos travaux ont montré que le facteur chromatinien Corto interagit avec, d'une part, la MAPK ERK et sa protéine d'échafaudage MP1 et, d'autre part, avec le complexe d'élongation de la transcription Elongin. Ces interactions sont toutes les deux impliquées dans le développement des tissus de veine et d'interveine de l'aile, et pourraient participer à la régulation transcriptionnelle des mêmes gènes cibles. L'interaction entre Corto et le complexe Elongin pourrait réguler de manière tissu-spécifique la pause de transcription et/ou la régulation de la vitesse d'élongation en réponse à la voie de signalisation ERK. Un de ces gènes cibles pourrait être le gène pro-veine *rhomboid*, codant une protéine régulant elle-même l'activité de la voie ERK. L'analyse du transcriptome de disques imaginaires perte de fonction pour *corto* ou sur-exprimant *corto* suggère également que d'autres gènes de la voie ERK pourraient être régulés par Corto. C'est en particulier le cas de *MP1*. De manière intéressante, nous avons mis en évidence une interaction entre Corto et l'ARN *MP1*, sans avoir réussi à en élucider clairement la fonction. L'existence d'un complexe entre Corto et les protéines ERK et MP1 couplée à la fixation de Corto à l'ARN *MP1* pourrait être à l'origine d'un mécanisme de contrôle de l'homéostasie de la voie ERK au cours du développement des tissus de l'aile chez la Drosophile.



## ANNEXES

Cet article, en cours de soumission, porte sur l'étude des caractéristiques fonctionnelles du chromodomaine de Corto. Nous avons tout d'abord montré, grâce à des lignées de drosophiles transgéniques sur-exprimant une forme étiquetée du chromodomaine de Corto, qu'il s'agissait bien d'un domaine de recrutement sur la chromatine. Par ailleurs, ce chromodomaine, comme beaucoup d'autres, est capable de fixer *in vitro* des ARN. Les chromodomains étant également des domaines d'interactions avec les lysines tri-méthylées, principalement situées sur des histones, nous avons cherché à identifier les partenaires nucléaires du chromodomaine de Corto par spectrométrie de masse. Alors que nous nous attendions à trouver des histones tri-méthylées, les seuls partenaires ainsi identifiés furent des protéines ribosomiques. L'étude plus particulière de l'une d'entre elle, RPL12, a montré que son interaction avec Corto implique une lysine tri-méthylée. L'étude de la localisation de Corto et RPL12 sur les chromosomes polytènes de glandes salivaires révèle que ces deux protéines sont situées sur des sites de transcription actifs. Enfin, les transcriptomes de disques d'aile de drosophiles transgéniques sur-exprimant RPL12 ou le chromodomaine de Corto ont été réalisés par RNA-seq, et montrent que beaucoup de gènes sont dérégulés de façon commune par la sur-expression de ces deux protéines. Ces résultats suggèrent donc que Corto et RPL12 participeraient à la régulation transcriptionnelle de gènes communs.

J'ai participé à la réalisation de ces travaux en prenant part à la conception des expériences de RNA-seq. J'ai également participé à l'isogénisation de certaines lignées utilisées pour cette expérience et aux dissections des disques imaginaux d'aile nécessaires à leur réalisation.



**New partners in epigenetic regulation of gene expression : the Enhancer of Trithorax and Polycomb Corto interacts with methylated Ribosomal Protein L12 *via* its chromodomain.**

Anne Coléno-Costes<sup>1</sup>, Suk-Min Jang<sup>2</sup>, Augustin de Vanssay<sup>3</sup>, Julien Rougeot<sup>1</sup>, Neel B. Randsholt<sup>1</sup>, Stéphane Le Crom<sup>4</sup>, Emmanuèle Mouchel-Vielh<sup>1</sup>, Sébastien Bloyer<sup>1,†</sup> and Frédérique Peronnet<sup>1,†,\*</sup>.

<sup>1</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR7622 Paris, F-75005 France; Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7622, Laboratoire de Biologie du Développement, Equipe Chromatine et Développement, Paris, F-75005 France.

<sup>2</sup>Institut Pasteur, Département de Biologie du Développement, Unité de Régulation Epigénétique, Paris, France; Centre National de la Recherche Scientifique, URA2578, Paris, France; INSERM Avenir, Paris, France.

<sup>3</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR7622 Paris, F-75005 France; Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7622, Laboratoire de Biologie du Développement, Répression Epigénétique et Eléments Transposables, Paris, F-75005 France.

<sup>4</sup>École Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS, IBENS, Paris, F-75005 France. Inserm, U1024, Paris, F-75005 France. CNRS, UMR 8197, Paris, F-75005 France



† These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author.

## **RUNNING TITLE**

The Corto chromodomain recognizes RPL12K3me3.

## INTRODUCTION

Chromatin structure strongly impacts on epigenetic regulation of gene expression. Indeed, post-translational histone modifications (methylations, acetylations, phosphorylations *etc...*), called epigenetic marks, are recognized by protein complexes that shape the 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  $\beta$ -sheet supported by an  $\alpha$ -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), two important constituents of *Drosophila* facultative and constitutive heterochromatin, respectively (Paro and Hogness, 1991). Chromodomains 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 and mediate different functions. 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 H3K9me3, which is an epigenetic mark characteristic of heterochromatin, and thus participates in heterochromatin shaping (Ebert et al., 2006). EAF3, a subunit of the Rpd3 HDAC and NuA4 HAT complexes, contains a chromodomain that binds H3K36me3 during transcriptional elongation (Joshi and Struhl, 2005). Very few cases of non-histone chromodomain substrates are known. The HP1 chromodomain also recognizes an autocatalytically methylated residue of the G9a histone H3 methyl-transferase that automethylates (Sampath et al., 2007). The chromodomain of the *Tf1* transposon integrase (IN) interacts with no known histone or histone modification but promotes an indirect interaction of IN with DNA, suggesting involvement of an unidentified factor (Chatterjee et al., 2009).

Nucleic acid binding is also a 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 CHD protein dMi-2, an ATPase belonging to a nucleosome remodelling complex, bind DNA (Bouazoune et al., 2002). Several chromodomains bind RNA, notably non-coding RNA. The chromodomain of mouse Polycomb protein CBX7 binds RNA and association of CBX7 with the inactive X chromosome depends partly upon this interaction (Bernstein et al., 2006). Moreover, by binding the *ANRIL* non-coding RNA,

antisense to the *INK4b/ARF/INK4a* locus, the CBX7 chromodomain participates in repression of this locus (Yap et al., 2010). Finally, MOF histone acetyl-transferase, involved in dosage compensation in *Drosophila*, has a chromodomain that binds the *roX2* non-coding RNA and enables 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 *D. 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 (Lopez et al., 2001; Gildea et al., 2000). Indeed, *corto* participates in transcriptional regulation of several homeotic genes together with several PcG and TrxG complexes and with 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. This chromodomain mediates Corto dimerization and interacts with PcG proteins E(Z) and SCM, that belong to the PRC2 and PRC1 complexes, respectively (Salvaing et al., 2003). It is therefore probably an essential element for Corto function. 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 S2 cells. 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 tri-methylated on lysine 3 (RPL12K3me<sub>3</sub>). 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). 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 with 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 of *S. cerevisiae* to construct transgenic flies expressing either full-length *corto*, *corto* $\Delta$ CD deleted of the chromodomain, or *corto*CD fused to a nuclear localization signal encoding sequence to force its entry into nuclei. Whereas transgenic flies ubiquitously overexpressing *corto* deleted of its chromodomain (*Actin5C: Act::Gal4>UAS::FH-corto* $\Delta$ CD or *daughterless: da::Gal4>UAS::FH-corto* $\Delta$ CD) 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). 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 1998. Males over-expressing *corto*CD 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 essential 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 using the *escargot* Gal4 driver (*esg::Gal4>UAS::FH-cortoCD*) and 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.

#### *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). Although ribosomal proteins might be contaminants, their consistent enrichment in peptide pull-down experiments performed with nuclear extracts, but not in the ones performed with cytoplasmic extracts prompted us to consider their binding to CortoCD. 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 $\Delta$ 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 $\Delta$ 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). 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 (data not shown). However, these "Corto bodies" did not overlap with Polycomb bodies as shown by co-immunostaining of transfected cells with anti-Polyhomeotic (PH) antibodies showing that they are different structures (data not shown). 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).

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 mutated on lysine 3 (RPL12K3A)] were assayed for their binding to GST-CortoCD or GST (Table 3, 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).

### *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* over-expression 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 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). In agreement with our Biacore™ analyses, Corto did not bind 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 Brogna 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). Total RNA from the assays, the *sd::Gal4/+* control or a *w<sup>1118</sup>* 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 *w<sup>1118</sup>* 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 1% of transcripts as significantly expressed. By doing so, we obtained an adjusted *P*-value cut-off of  $4 \cdot 10^{-18}$ . 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" and "structural constituent of ribosomes" categories (Figure 11 and Suppl. Tables 6 to 9).

## DISCUSSION

Chromodomains play a critical role in addressing transcriptional regulators to chromatin. Investigating the role of the ETP Corto's 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). Binding sites of RPL12 on polytene chromosomes enclose many Corto sites but also Corto-free sites, suggesting that RPL12 might recruit Corto at chromatin, possibly using RPL12K3me3 as a docking site. 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 epigenetic 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.

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). Indeed, RPs modulate the trans-activation function of important regulatory proteins such as NF- $\kappa$ B, p53 or c-Myc (Dai et al., 2007a, 2007b; Wan et al., 2007 ; Kim et al., 2008).

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 several PcG complexes {Saurin 2001; W. Voncken, personal communication), 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 and trxG mutants by lengthening development, thus globally counteracting homeosis. However, several *Minute* mutants exhibit PcG or trxG mutant phenotypes, which is at variance with this assumption. Indeed, like flies over-expressing *cortoCD*, *RPS3* mutants present rotated genitalia (Saebøe-Larssen et al., 1998) and 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 epigenetic 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 and 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 ubiquitylations, phosphorylations, acetylations and methylations (Carroll et al., 2008 and references therein). We showed here that Corto chromodomain binds RPL12K3me3. Strikingly, the chromodomain protein CBX1, a human homolog of *Drosophila* HP1 $\alpha$ , 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, a mechanism that might be analogous to the way by which histone methylation marks, such as H3H27me3, recruit the PRC1 complex *via* 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 methyltransferase 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, Komili 2007 proposed that selective mRNA translation might depend on a ribosome code similar to the histone code. 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, upregulation 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*; (Wodarz et al., 1995); *Actin5C (Act)::Gal4*, NP3121, DGRC Kyoto)], salivary gland-specific [*escargot (esg)::Gal4*; (Goto and Hayashi, 1999)], or wing-specific [*scalloped::Gal4 (sd)::Gal4*; BL-8609]. Five females bearing the *Gal4* driver were crossed with three males *UAS::FH-cortoCD*, *UAS::FH-cortoΔCD* or *w<sup>1118</sup>* 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 *w<sup>1118</sup>* 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 MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Igepal, 20 mM Hepes, 300 mM KCl, 10% glycerol, protease

inhibitor cocktail (Roche)] for one 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<sup>-1</sup> 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  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  solution in NaOAc pH5 buffer. GST-CortoCD and GST-HP1CD were immobilized by injecting a 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  solution in the same buffer. Binding tests were performed by injecting peptides at 1 or 10  $\mu\text{M}$  in running buffer at a flow rate of 25  $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$  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  $\mu\text{M}$  in running buffer and dilutions were injected sequentially at a flow rate of 25  $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$  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 ka/kd (1:1 binding; Langmuir algorithm). Sequences of the RPL12 peptides are shown on Table 3. 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  $46 \pm 11$

million reads were obtained for each of the 4 samples ( $w^{1118}$ ,  $sd::Gal4/+$ ;  $sd::Gal4>UAS::cortoCD$ ;  $sd::Gal4>UAS::RpL12$ ). Before mapping, poly N read tails were trimmed, reads  $\leq 11$  bases were removed, and reads with quality mean  $\leq 12$  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 (Li et al., 2009). 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 (Benjamini and Hochberg, 1995).



## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank V. Ribeiro for excellent technical assistance, all members of the Chromatin and Development team for fruitful discussions and comments on the manuscript, Dr. F. Faradji for preliminary pull-down experiments, A. Esta for preliminary polytene chromosome immunostainings, Pr. Y. Andéol for the *Awnt1* RNA, M. Bocquet for RNA quality assessment by Bioanalyser, Dr. I. Le Disquet for Scanning Electron Microscopy ("Electron Microscopy" department, IFR83, Paris), T. Bouceba for Biacore™ experiments ("Real-time Biomolecular Interactions" department, IFR83, Paris), Dr. C. Piesse for RPL12 peptide synthesis ("Peptide Synthesis" department, IFR83, Paris), the Diagenode company (Liège, Belgium) for histone peptides and Dr. V. Labas for mass spectrometry analyses (INRA, Tours, France). This work was supported by CNRS and UPMC to F.P., PEPS (CNRS) to S.B. and "Appel à projets" (IFR 83) to F.P.

## REFERENCES

1. Ajuh, P., Kuster, B., Panov, K., Zomerdijk, 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.
2. Akhtar, A., Zink, D., and Becker, P.B. 2000. Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* **407**:405-409.
3. 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.
4. Bannister, A.J., and Kouzarides, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**:381-395.
5. 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.
6. 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.
7. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 289-300.
8. 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.

9. Bhavsar, R.B., Makley, L.N., and Tsonis, P.A. 2010. The other lives of ribosomal proteins. *Hum Genomics* **4**:327-344.
10. 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.
11. 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.
12. Brogna, S., Sato, T.A., and Rosbash, M. 2002. Ribosome components are associated with sites of transcription. *Mol Cell* **10**:93-104.
13. 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.
14. 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.
15. Chatterjee, A.G., Leem, Y.E., Kelly, F.D., and Levin, H.L. 2009. The chromodomain of Tf1 integrase promotes binding to cDNA and mediates target site selection. *J Virol* **83**:2675-2685.
16. 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.
17. Dahlberg, J.E., Lund, E., and Goodwin, E.B. 2003. Nuclear translation: What is the evidence? *RNA* **9**:1-8.

18. 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.
19. Dai, M.S., Sears, R., and Lu, H. 2007b. Feedback regulation of c-Myc by ribosomal protein L11. *Cell Cycle* **6**:2735-2741.
20. De, S., and Brogna, S. 2010. Are ribosomal proteins present at transcription sites on or off ribosomal subunits? *Biochem Soc Trans* **38**:1543-1547.
21. De, S., Varsally, W., Falciani, F., and Brogna, S. 2011. Ribosomal proteins' association with transcription sites peaks at tRNA genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *RNA* .
22. 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.
23. Denell, R.E. 1978. Homoeosis in *Drosophila*. II. a Genetic Analysis of Polycomb. *Genetics* **90**:277-289.
24. Ebert, A., Lein, S., Schotta, G., and Reuter, G. 2006. Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Res* **14**:377-392.
25. 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.
26. 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* .

27. 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.
28. 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.
29. Goto, S., and Hayashi, S. 1999. Proximal to distal cell communication in the *Drosophila* leg provides a basis for an intercalary mechanism of limb patterning. *Development* **126**:3407-3413.
30. Graveley, B.R., Brooks, A.N., Carlson, J.W., Duff, M.O., Landolin et al. 2011. The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* **471**:473-479.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Li, H., Okamoto, K., Peart, M.J., and Prives, C. 2009. Lysine-independent turnover of cyclin G1 can be stabilized by B' alpha subunits of protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol* **29**:919-928.
41. Lopez, A., Higuete, 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.
42. 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.

43. 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.
44. 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.
45. Müller, J., and Verrijzer, P. 2009. Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Curr Opin Genet Dev* **19**:150-158.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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* .
50. Polevoda, B., and Sherman, F. 2007. Methylation of proteins involved in translation. *Mol Microbiol* **65**:590-606.
51. Porras-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.

52. Porras-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.
53. Robinson, M.D., and Oshlack, A. 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* **11**:R25.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. Salvaing, J., Decoville, M., Mouchel-Vielh, E., Bussièrè, 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.
58. 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.
59. 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.



60. 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.
61. Schroder, P.A., and Moore, M.J. 2005. Association of ribosomal proteins with nascent transcripts in *S. cerevisiae*. *RNA* **11**:1521-1529.
62. 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.
63. Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F.H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S., Timm, J., Mintzlaff, S., Abraham, C., Bock, N., Kietzmann, S., Goedde, A., Toksöz, E., Droege, A., Krobitsch, S., Korn, B., Birchmeier, W., Lehrach, H., and Wanker, E.E. 2005. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **122**:957-968.
64. Struhl, G. 1982. Spineless-aristopedia: a homeotic gene that does not control the development of specific compartments in *Drosophila*. *Genetics* **102**:737-749.
65. 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.
66. 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.
67. Wan, F., Anderson, D.E., Barnitz, R.A., Snow, A., Bidere, N., Zheng, L., Hegde, V., Lam, L.T., Staudt, L.M., Levens, D., Deutsch, W.A., and Lenardo, M.J. 2007.

- Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation. *Cell* **131**:927-939.
68. Warner, J.R., and McIntosh, K.B. 2009. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell* **34**:3-11.
69. 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.
70. Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M., and Knust, E. 1995. Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**:67-76.
71. 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.
72. 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.
73. Zeng, L., and Zhou, M.M. 2002. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* **513**:124-128.
74. Zhao, T., Heyduk, T., Allis, C.D., and Eisenberg, J.C. 2000. Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA in vitro. *J Biol Chem* **275**:28332-28338.

## FIGURE LEGENDS

### 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.

### 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 size.

**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).

**(B)** Magnifications of the tip of polytene chromosome 3L from either an *esg::Gal4>UAS::FH-cortoCD-231* third instar larva immunostained with anti-FLAG antibody or a *w<sup>1118</sup>* third instar larva immunostained with anti-Corto antibody (DAPI, immunostaining, merge). Bottom: conformity between endogenous Corto and FH-CortoCD binding sites.

**Figure 4: Corto interacts with nuclear ribosomal proteins.**

**(A)** Silver stained polyacrylamide gel showing peptides pulled down by 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 $\Delta$ CD and Myc-RPL12. Immunoprecipitations were performed with either anti-FLAG ( $\alpha$ -FLAG) or anti-Myc ( $\alpha$ -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 $\Delta$ CD did not co-immunoprecipitate with Myc-RPL12 and conversely.

**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), *Cænorhabditis 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 *S.p.* (Sadaie et al., 2008); arginine 66 was shown to be  $\delta$ -monomethylated in *S.c.* and *S.p.* (Chern et al., 2002; Porras-Yakushi et al., 2006; 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  $\mu$ m.

**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  $\mu$ M (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  $\mu$ M. For RPL12 and H3K27me3 peptide concentrations were increased from 0 to 10  $\mu$ M. NB: no binding; nd: not determined.

**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 of A, showing numerous co-localizations of Corto and RPL12.

### **Figure 8: Epigenetic landscape of Corto.**

Co-immunostainings of salivary gland polytene chromosomes from *w<sup>118</sup>* 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.

### **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.

### **Figure 10: Comparison of genes deregulated by *cortoCD* or *RpL12* over-expression.**

Global view of genes deregulated in wing imaginal discs of flies over-expressing either *RpL12-Myc* or *FH-cortoCD* (*sd::Gal4>UAS::RpL12-Myc* or *sd::Gal4>UAS::FH-cortoCD*). See Suppl. Tables 1 to 5 for detailed gene lists.

**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 (RPL12M2) or CortoCD (FHCD231). 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.



Genotype	Number of flies observed	Lethality (%)	Duplicated macrochaetae (%)	Aristapedia (%)	Mean number of sex comb teeth (n=number of male first leg observed)	Rotated genitalia (%) (n=number of male observed)
<i>Act::Gal4&gt;UAS::FH-cortoCD-231</i>	73	63.0	32.8	35.6	8.8 ± 0.8 (n=46)	nd
<i>Act::Gal4&gt;UAS::FH-cortoCD-41</i>	143	79.0	30.0	34.3	9.2 ± 1.1 (n = 35)	nd
<i>Act::Gal4&gt;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&gt;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&gt;UAS::FH-cortoCD-41</i>	34	nd	8.8	67.6	8.7 ± 0.9 (n=30)	59.0 (n=27)
<i>da::Gal4&gt;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: Phenotypes of flies overexpressing *cortoCD* using ubiquitous *Gal4* drivers.**

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

nd: not determined.

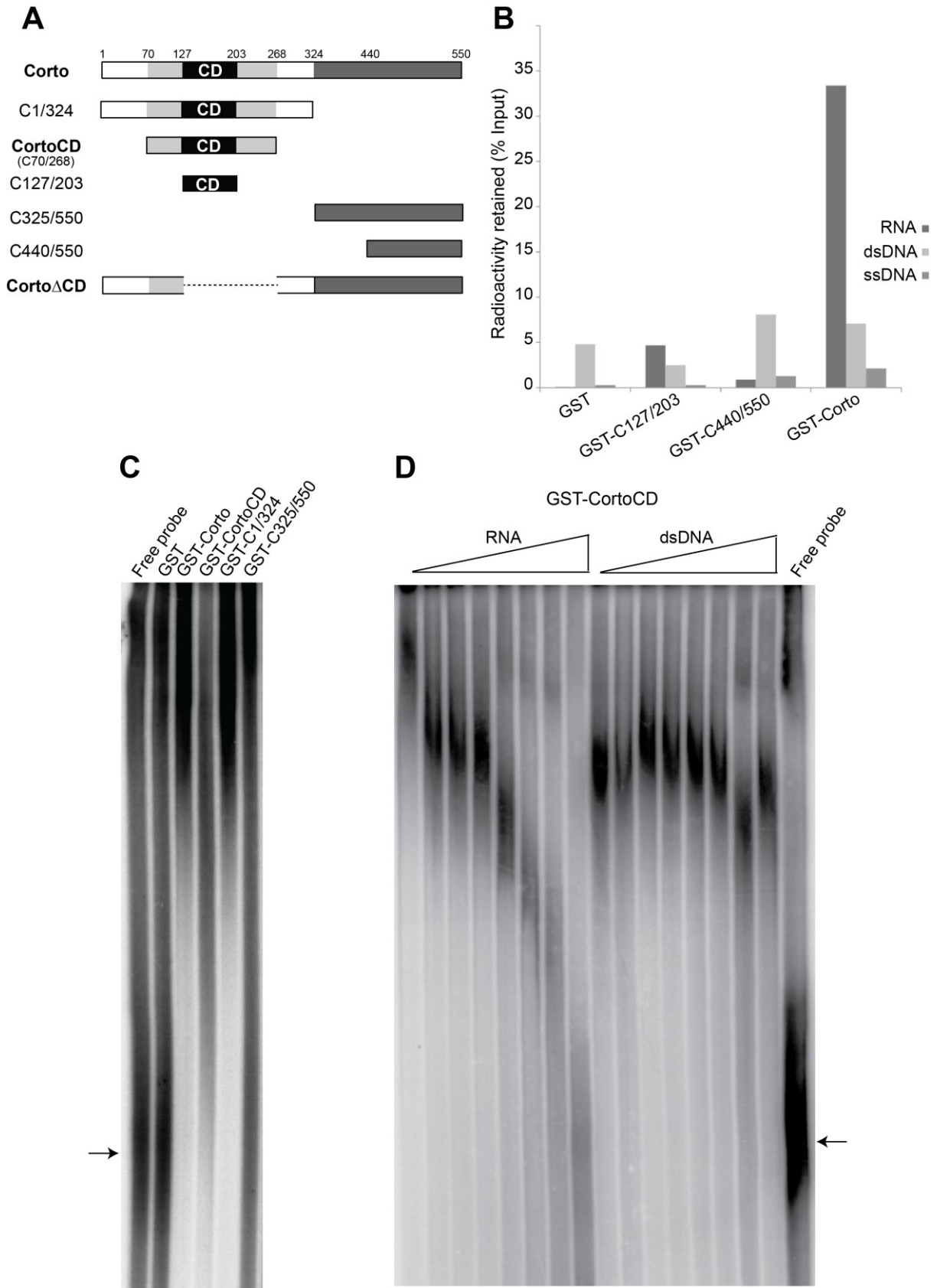
Band	Protein	CG	MW (Da)	Score	Peptides	Coverage %	Sequences
P30	RpL7	CG4897-PA	29534	107	2	10	R.QRVPITDNFVIER.KR.IAEPYITWGYPNLK.S
P21	RpS11	CG8857	18101	38	2	9	K.QFGVNLNR.K R.DYLHFVR.K
P20	RpS10	CG14206-PC	17867	42	1	8	K.GDVGPAGEVEFR.G
	RpL12	CG3195-PA	17585	56	2	14	K.IGPLGLSPK.K R.CVGGEVGATSSLAPK.I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

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

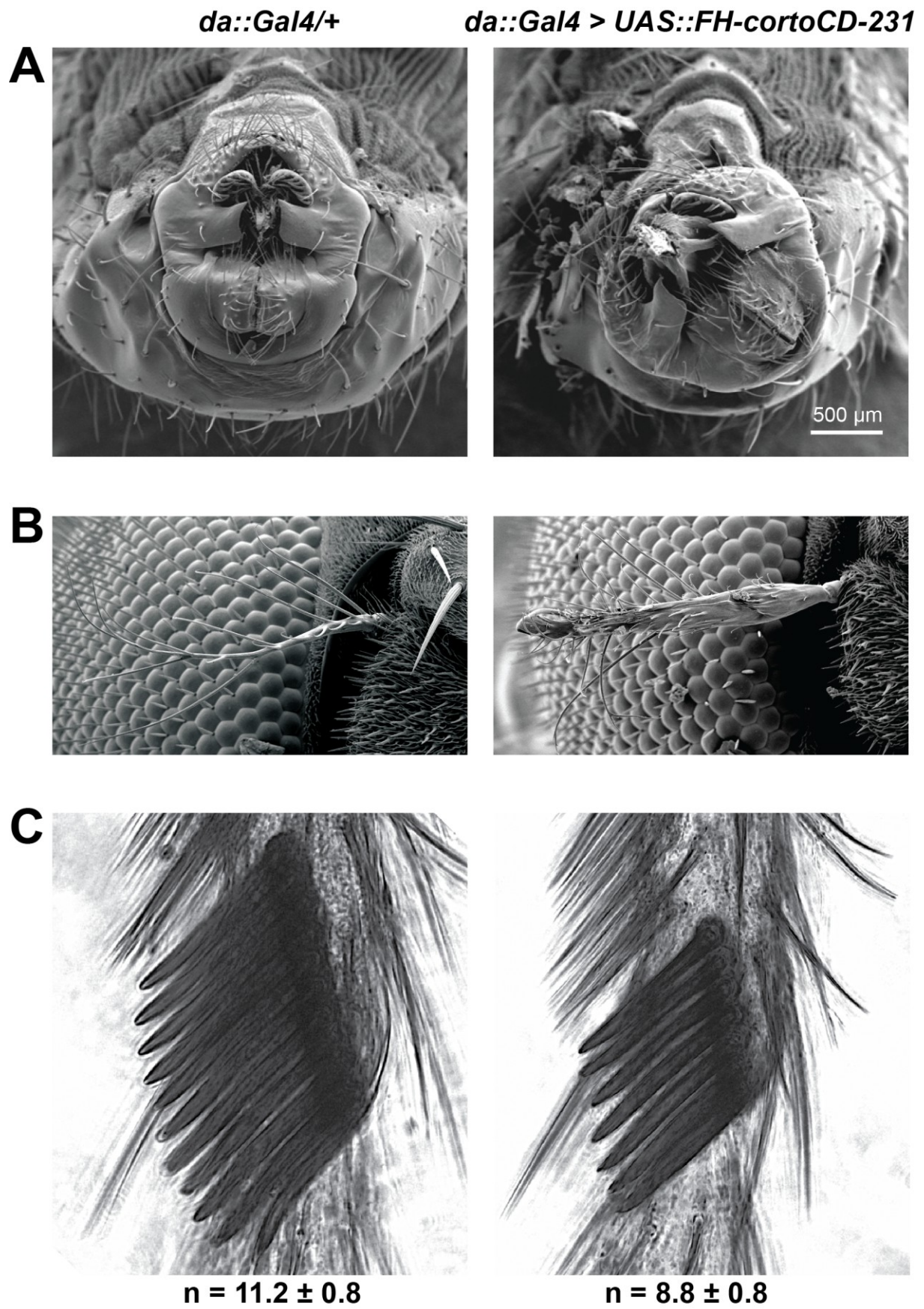
The four bands (P30, P21, P20 and P15) were excised from the gel (see Figure 4) and analyzed by mass spectrometry.

<b>Name</b>	<b>Sequence</b>
RpL12um	NH2-PPKFDPTEV <del>KLVYLRCVGG</del> EVGA-COOH
RpL12K3me2	NH2-PPK(me2)FDPTEV <del>KLVYLRCVGG</del> EVGA-COOH
RpL12K3me3	NH2-PPK(me3)FDPTEV <del>KLVYLRCVGG</del> EVGA-COOH
RpL12K10me3	NH2-PPKFDPTEV <del>K</del> (me3)LVYLRCVGGEVGA-COOH
RpL12K3A	NH2-PPAFDPTEV <del>KLVYLRCVGG</del> EVGA-COOH

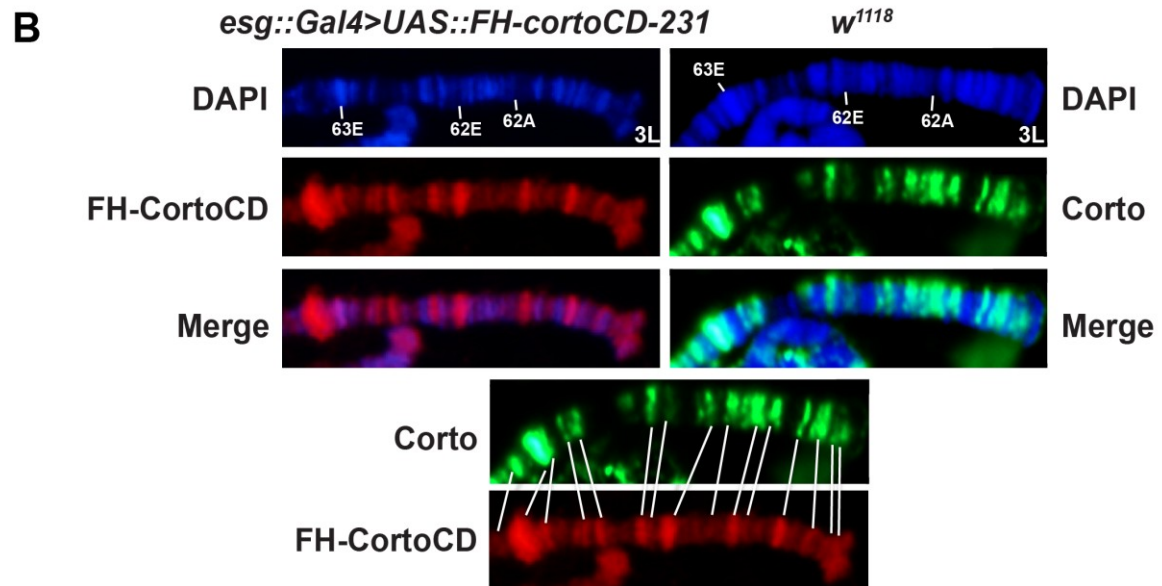
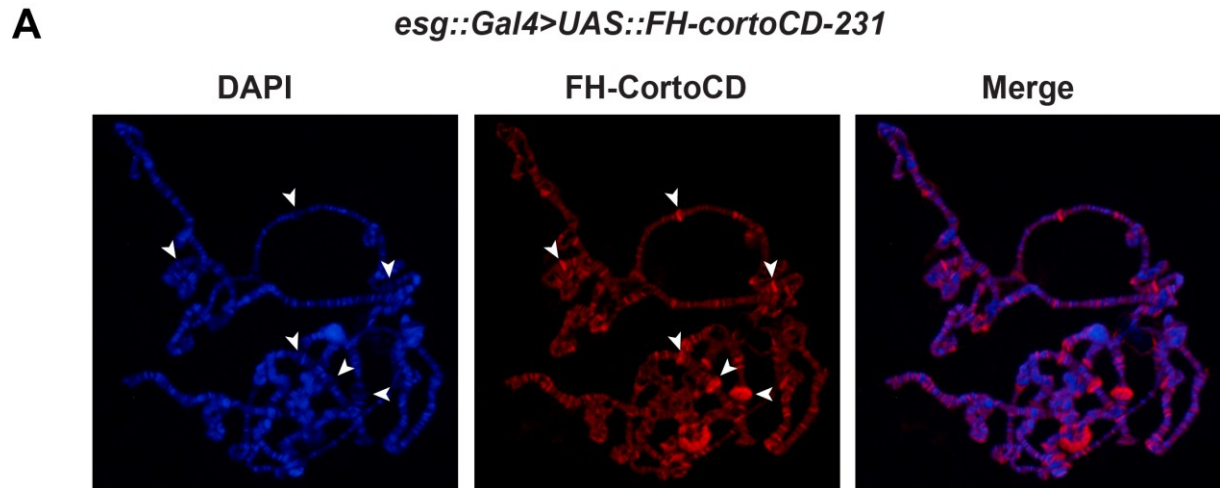
**Table 3: Sequences of the RpL12 peptides used in this study.**



**Figure 1**



**Figure 2**



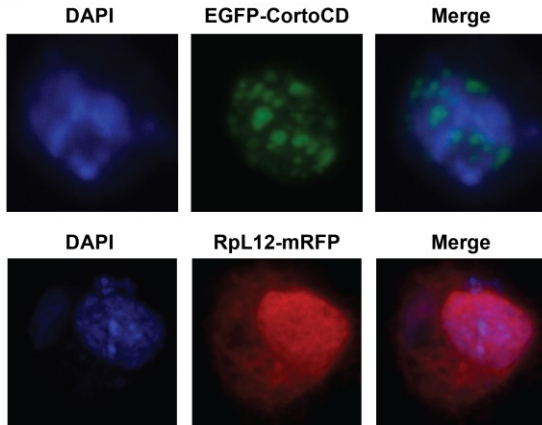
**Figure 3**



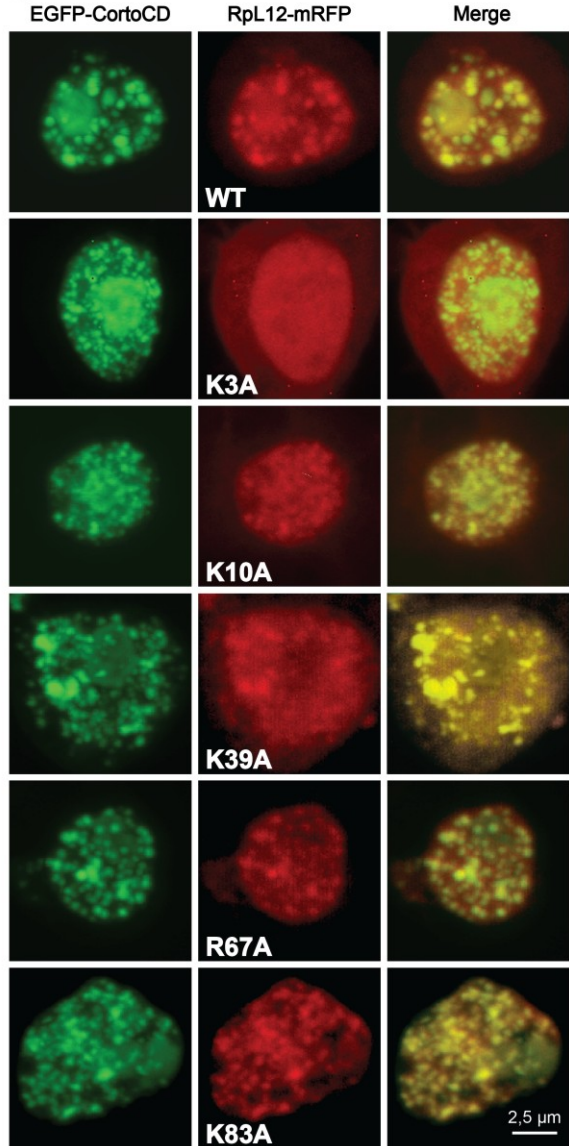
**A**



**B**

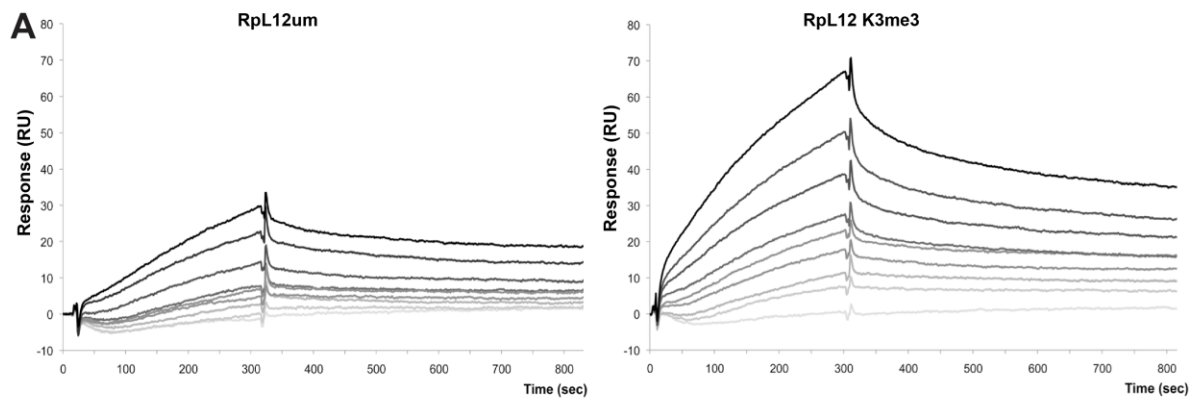


**C**



**Figure 5**





**B**

CortoCD	$K_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$K_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ ( $\mu M$ )
RpL12um	1.2	$7.6 \cdot 10^{-4}$	624
RpL12K3me2	4.1	$9.9 \cdot 10^{-4}$	238
RpL12K3me3	106	$8.2 \cdot 10^{-4}$	8

**C**

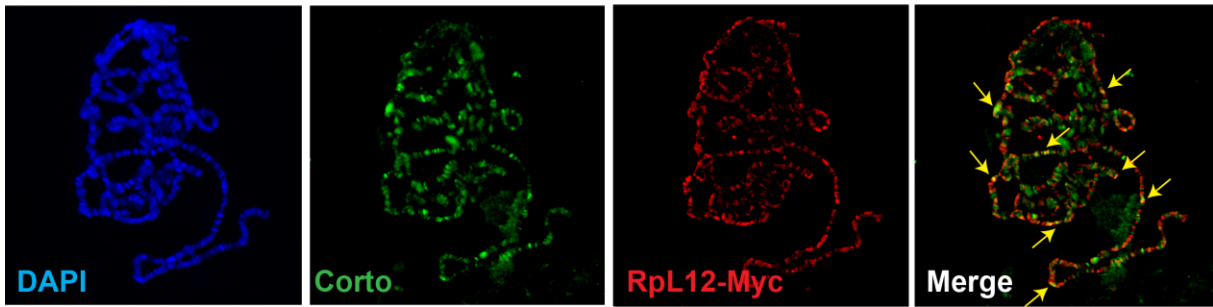
	RpL12um	RpL12K3me2	RpL12K3me3	RpL12K10me3	RpL12K3A
CortoCD	624	238	8	NB	NB
HP1CD	> 1000	nd	292	NB	NB

**D**

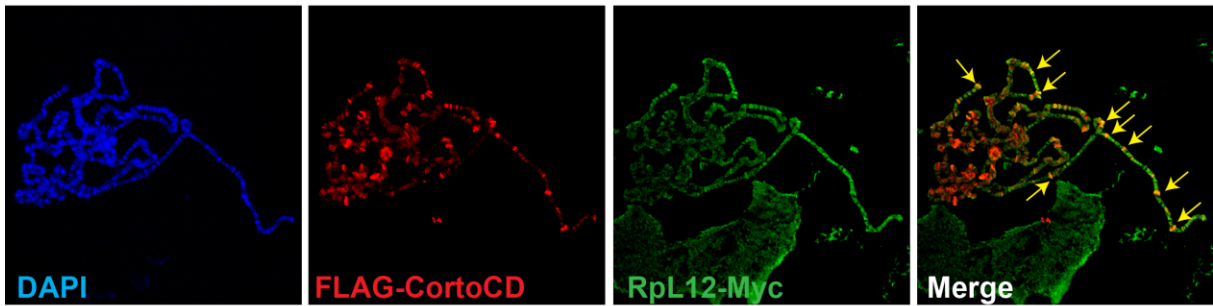
	H3K4me3	H3K9me3	H3K27me3	H3um	H3K27um
CortoCD	NB	NB	NB	NB	NB
HP1CD	NB	0.4	0.7	NB	NB

**Figure 6**

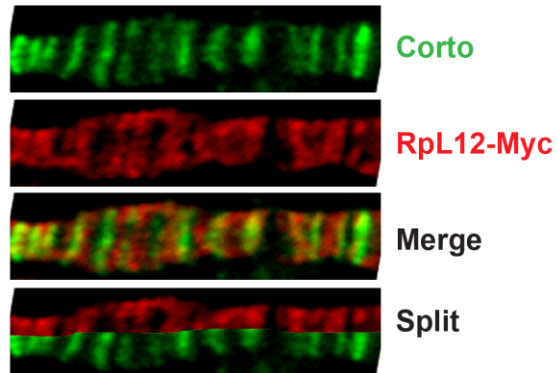
**A**



**B**



**C**



**Figure 7**

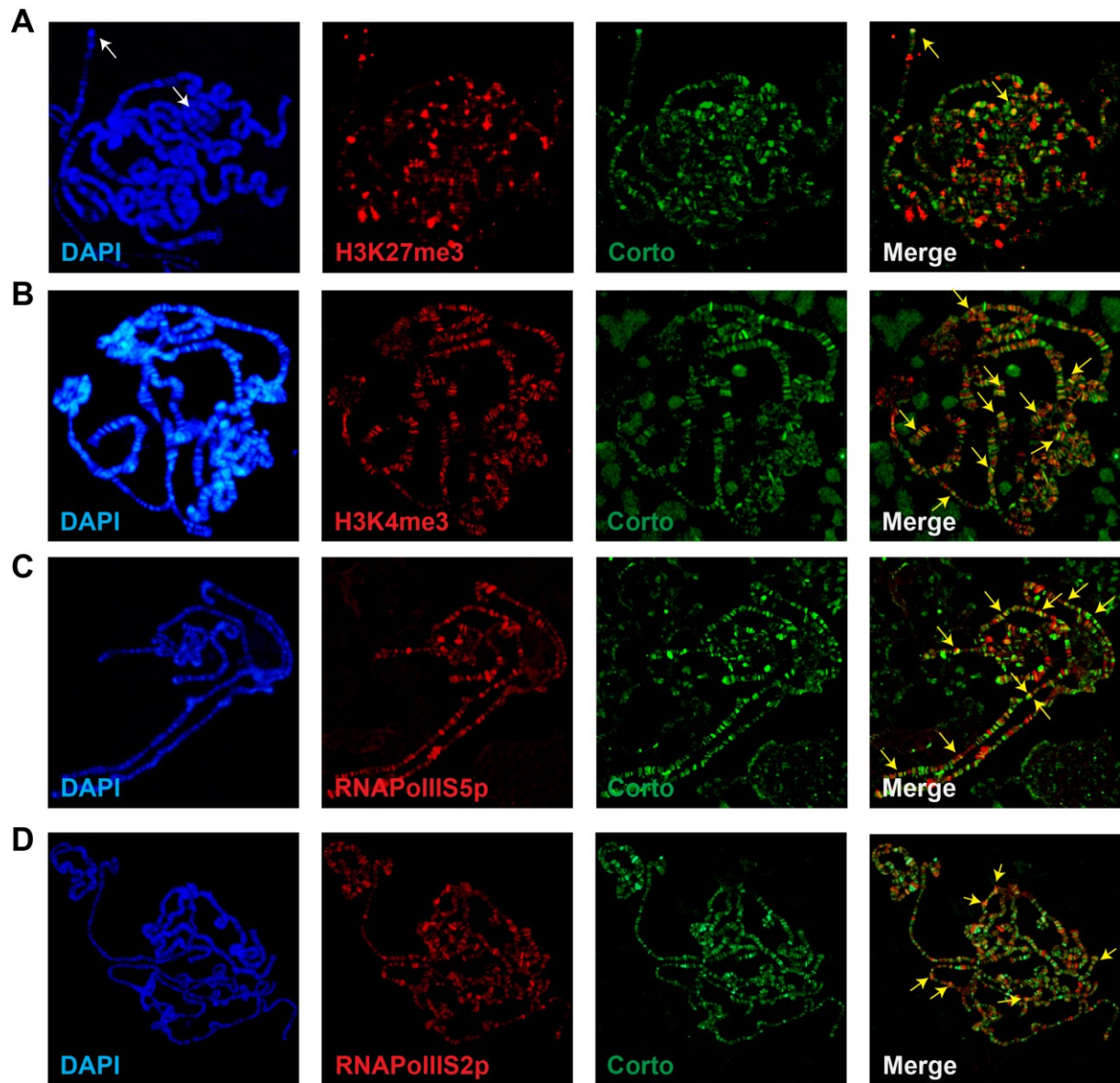


Figure 8

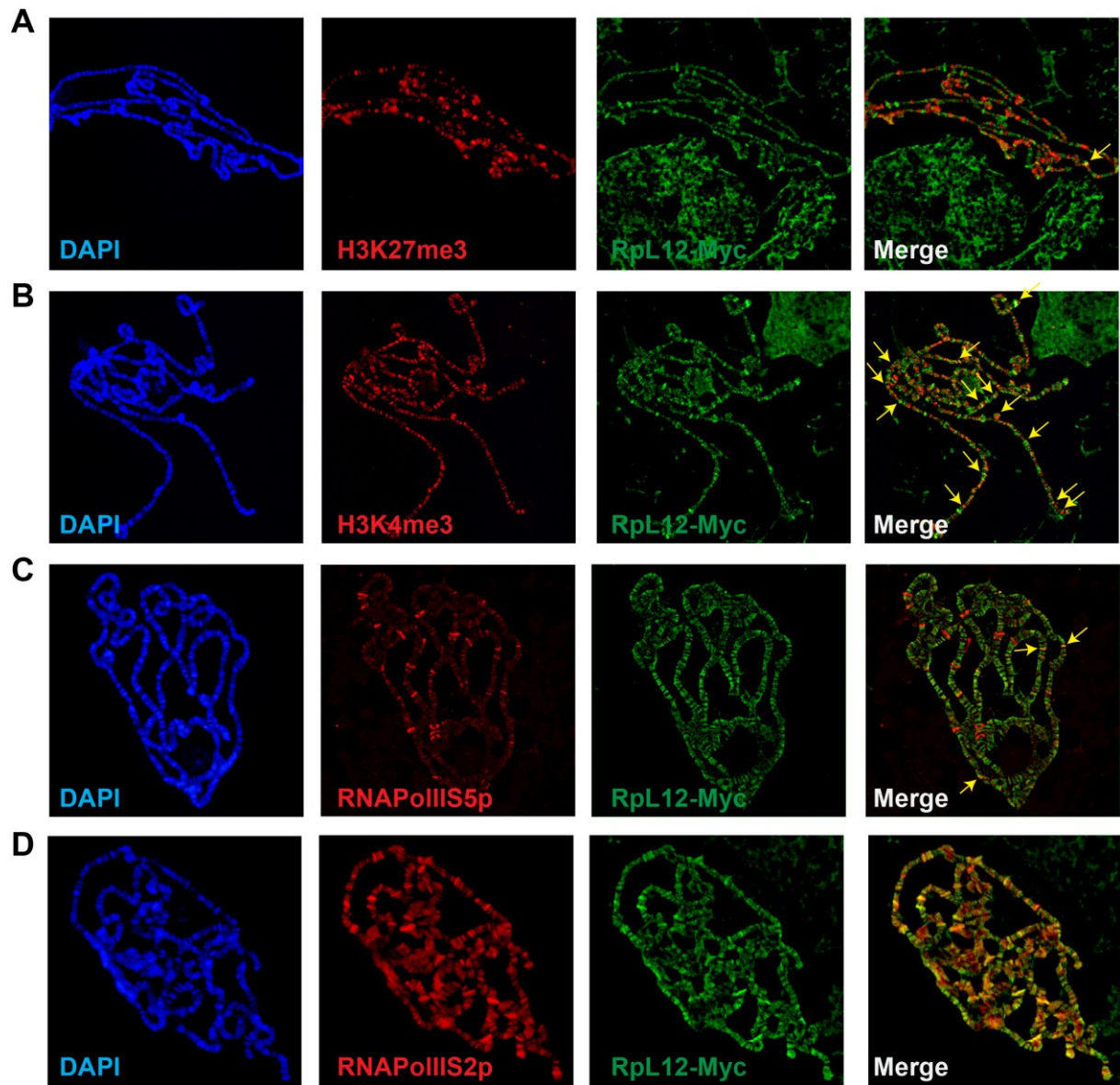
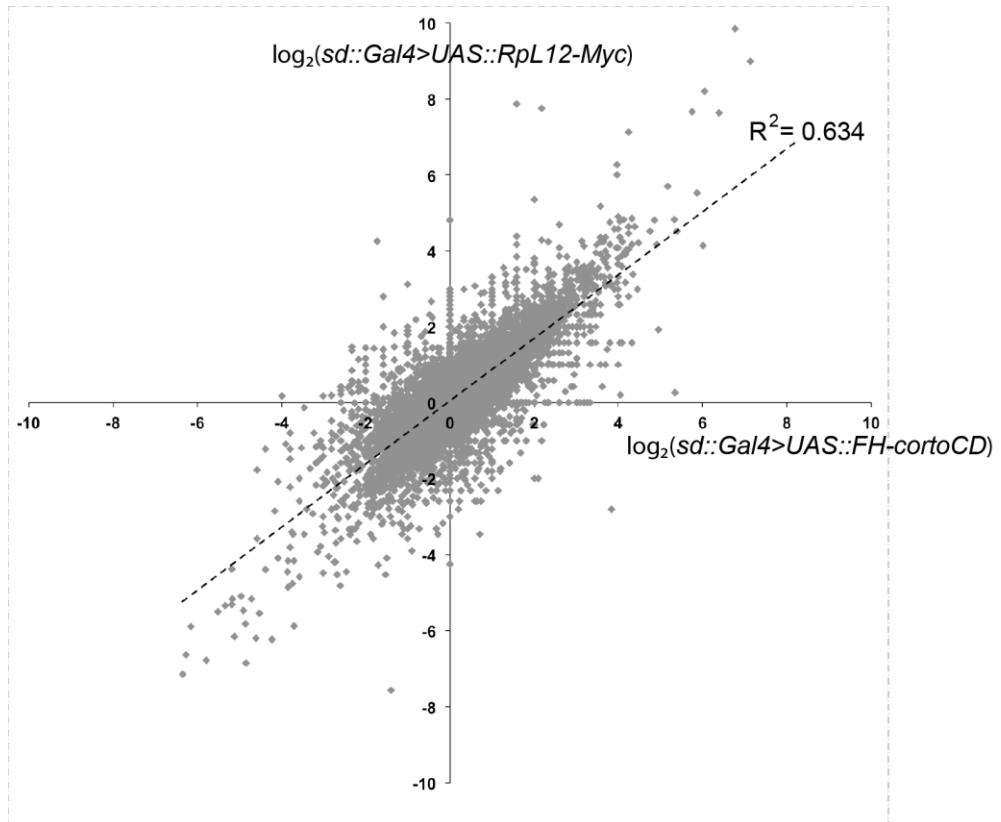
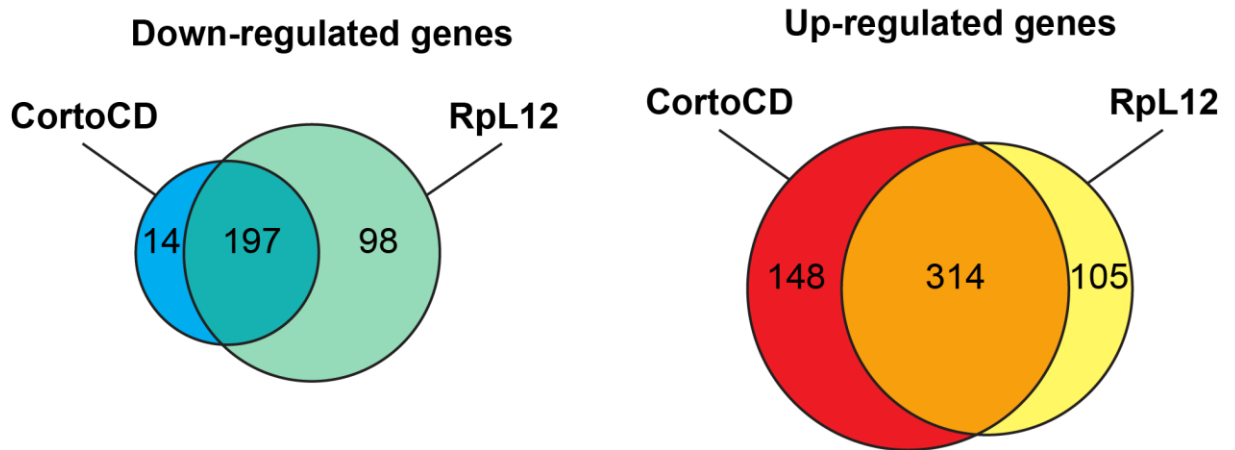


Figure 9

**A****B****Figure 10**

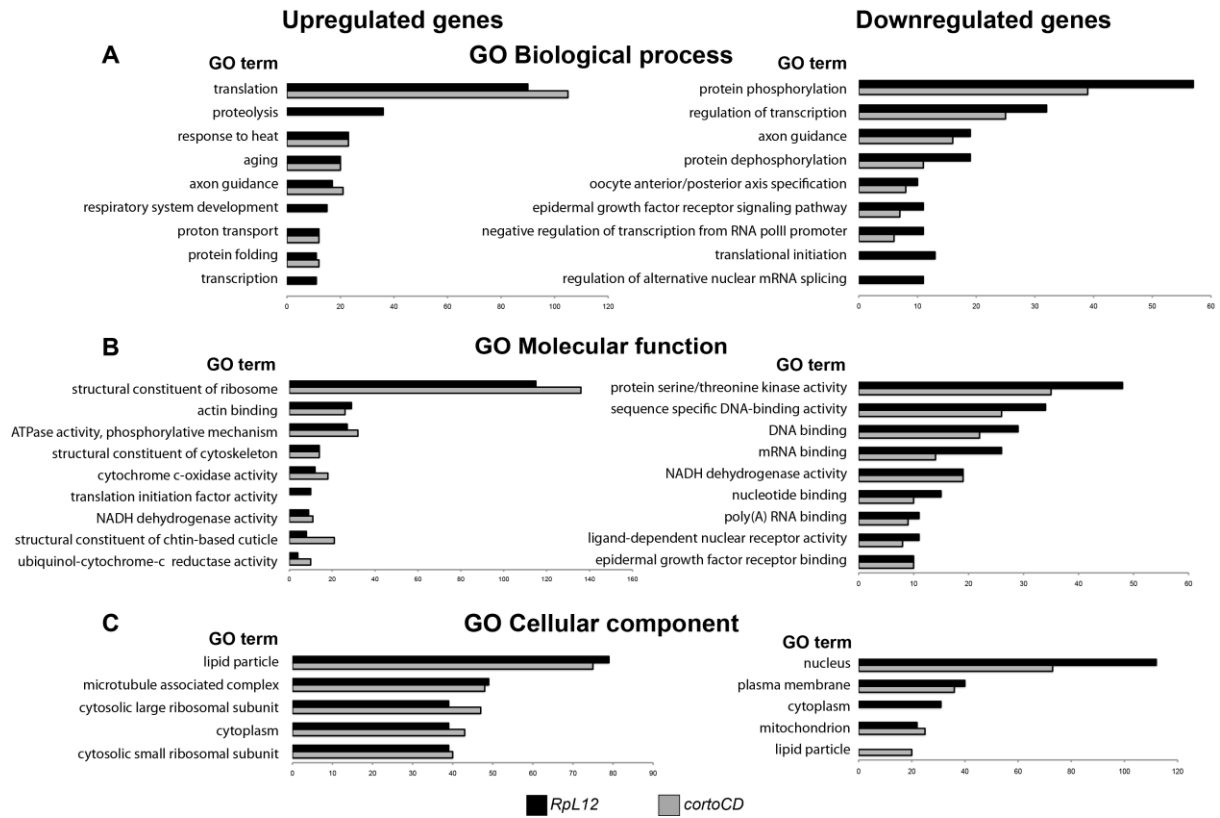


Figure 11



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akhtar, A., et al., 2000. Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature*. 407, 405-9.
- Alepuz, P. M., et al., 2003. Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *Embo J*. 22, 2433-42.
- Alepuz, P. M., et al., 2001. Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell*. 7, 767-77.
- Alexander, R., Beggs, J. D., 2010. Cross-talk in transcription, splicing and chromatin: who makes the first call? *Biochem Soc Trans*. 38, 1251-6.
- Armstrong, J. A., et al., 2002. The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *Embo J*. 21, 5245-54.
- Aso, T., Conrad, M. N., 1997. Molecular cloning of DNAs encoding the regulatory subunits of elongin from *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun*. 241, 334-40.
- Aso, T., et al., 1996. The inducible elongin A elongation activation domain: structure, function and interaction with the elongin BC complex. *Embo J*. 15, 5557-66.
- Aso, T., et al., 1995. Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science*. 269, 1439-43.
- Aso, T., et al., 2000. Identification and characterization of Elongin A2, a new member of the Elongin family of transcription elongation factors, specifically expressed in the testis. *J Biol Chem*. 275, 6546-52.
- Aziz, A., et al., 2010. Regulating a master regulator: establishing tissue-specific gene expression in skeletal muscle. *Epigenetics*. 5, 691-5.
- Badenhorst, P., et al., 2005. The *Drosophila* nucleosome remodeling factor NURF is required for Ecdysteroid signaling and metamorphosis. *Genes Dev*. 19, 2540-5.
- Bang, A. G., Kintner, C., 2000. Rhomboid and Star facilitate presentation and processing of the *Drosophila* TGF- $\alpha$  homolog Spitz. *Genes Dev*. 14, 177-86.
- Barratt, M. J., et al., 1994. Mitogen-stimulated phosphorylation of histone H3 is targeted to a small hyperacetylation-sensitive fraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 4781-5.
- Bate, M., M. A. A., 2004. *The development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Batsche, E., et al., 2006. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol*. 13, 22-9.
- Battaglioli, E., et al., 2002. REST repression of neuronal genes requires components of the hSWI.SNF complex. *J Biol Chem*. 277, 41038-45.
- Beck, S., et al., 2010. Maintenance of Hox gene expression patterns. *Adv Exp Med Biol*. 689, 41-62.
- Beisel, C., et al., 2002. Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature*. 419, 857-62.



- Belotserkovskaya, R., et al., 2003. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science*. 301, 1090-3.
- Bender, T. P., et al., 1987. Differential expression of c-myb mRNA in murine B lymphomas by a block to transcription elongation. *Science*. 237, 1473-6.
- Bernstein, E., et al., 2006. Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol*. 26, 2560-9.
- Berretta, J., et al., 2008. A cryptic unstable transcript mediates transcriptional trans-silencing of the Ty1 retrotransposon in *S. cerevisiae*. *Genes Dev*. 22, 615-26.
- Bier, E., 2000. Drawing lines in the *Drosophila* wing: initiation of wing vein development. *Curr Opin Genet Dev*. 10, 393-8.
- Boehm, A. K., et al., 2003. Transcription factor and polymerase recruitment, modification, and movement on dhsp70 in vivo in the minutes following heat shock. *Mol Cell Biol*. 23, 7628-37.
- Boettiger, A. N., Levine, M., 2009. Synchronous and stochastic patterns of gene activation in the *Drosophila* embryo. *Science*. 325, 471-3.
- Bortvin, A., Winston, F., 1996. Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science*. 272, 1473-6.
- Bradsher, J. N., et al., 1993a. RNA polymerase II transcription factor SIII. I. Identification, purification, and properties. *J Biol Chem*. 268, 25587-93.
- Bradsher, J. N., et al., 1993b. RNA polymerase II transcription factor SIII. II. Functional properties and role in RNA chain elongation. *J Biol Chem*. 268, 25594-603.
- Brehm, A., et al., 2004. The many colours of chromodomains. *Bioessays*. 26, 133-40.
- Breiling, A., et al., 2001. General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins. *Nature*. 412, 651-5.
- Brentrup, D., et al., 2000. Regulation of *Drosophila* wing vein patterning: net encodes a bHLH protein repressing rhomboid and is repressed by rhomboid-dependent Egfr signalling. *Development*. 127, 4729-41.
- Bres, V., et al., 2008. The multi-tasking P-TEFb complex. *Curr Opin Cell Biol*. 20, 334-40.
- Brock, H. W., et al., 2009. Regulatory noncoding RNAs at Hox loci. *Biochem Cell Biol*. 87, 27-34.
- Brown, J. L., et al., 2003. The *Drosophila* pho-like gene encodes a YY1-related DNA binding protein that is redundant with pleiohomeotic in homeotic gene silencing. *Development*. 130, 285-94.
- Brown, M. D., Sacks, D. B., 2009. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cell Signal*. 21, 462-9.
- Brunner, D., et al., 1994. A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell*. 76, 875-88.
- Buratowski, S., 2009. Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell*. 36, 541-6.

- Cacace, A. M., et al., 1999. Identification of constitutive and ras-inducible phosphorylation sites of KSR: implications for 14-3-3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR overexpression. *Mol Cell Biol.* 19, 229-40.
- Camblong, J., et al., 2007. Antisense RNA stabilization induces transcriptional gene silencing via histone deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell.* 131, 706-17.
- Caretto, G., et al., 2004. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* 18, 2627-38.
- Castrillon, D. H., et al., 1993. Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics.* 135, 489-505.
- Chapman, E. J., et al., 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.* 18, 1179-86.
- Chen, R. E., Thorner, J., 2007. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1773, 1311-40.
- Chopra, V. S., et al., 2009a. Stalled Hox promoters as chromosomal boundaries. *Genes Dev.* 23, 1505-9.
- Chopra, V. S., et al., 2009b. Regulation of Hox gene activity by transcriptional elongation in *Drosophila*. *Curr Biol.* 19, 688-93.
- Chou, Y. T., et al., 2007. Transgenic inhibitors of RNA interference in *Drosophila*. *Fly (Austin).* 1, 311-6.
- Chow, C. W., Davis, R. J., 2006. Protein kinases: chromatin-associated enzymes? *Cell.* 127, 887-90.
- Collart, M. A., et al., 1991. c-fos gene transcription in murine macrophages is modulated by a calcium-dependent block to elongation in intron 1. *Mol Cell Biol.* 11, 2826-31.
- Collins, R. T., et al., 1999. Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. *Embo J.* 18, 7029-40.
- Conaway, J. W., et al., 1998. The Elongin BC complex and the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta.* 1377, M49-54.
- Cook, O., et al., 2004. brinker and optomotor-blind act coordinately to initiate development of the L5 wing vein primordium in *Drosophila*. *Development.* 131, 2113-24.
- Core, L. J., et al., 2008. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science.* 322, 1845-8.
- Cowieson, N. P., et al., 2000. Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr Biol.* 10, 517-25.
- Crozatier, M., et al., 2002. Connecting Hh, Dpp and EGF signalling in patterning of the *Drosophila* wing; the pivotal role of collier/knot in the AP organiser. *Development.* 129, 4261-9.
- Crozatier, M., et al., 2004. Patterns in evolution: veins of the *Drosophila* wing. *Trends Genet.* 20, 498-505.

- Curtis, B. J., et al., 2011. Histone lysine demethylases function as co-repressors of SWI/SNF remodeling activities during *Drosophila* wing development. *Dev Biol.* 350, 534-47.
- De Celis, J. F., 2003. Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins. *Bioessays.* 25, 443-51.
- de Celis, J. F., Barrio, R., 2000. Function of the spalt/spalt-related gene complex in positioning the veins in the *Drosophila* wing. *Mech Dev.* 91, 31-41.
- de Celis, J. F., et al., 1997. Notch signalling regulates veinlet expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development.* 124, 1919-28.
- De Celis, J. F., Diaz-Benjumea, F. J., 2003. Developmental basis for vein pattern variations in insect wings. *Int J Dev Biol.* 47, 653-63.
- de La Serna, I. L., et al., 2000. Mammalian SWI-SNF complexes contribute to activation of the hsp70 gene. *Mol Cell Biol.* 20, 2839-51.
- de Nadal, E., Posas, F., 2010. Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *Embo J.* 29, 4-13.
- De Nadal, E., et al., 2004. The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature.* 427, 370-4.
- Dhillon, A. S., et al., 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 26, 3279-90.
- Duan, D. R., et al., 1995. Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science.* 269, 1402-6.
- Elfring, L. K., et al., 1998. Genetic analysis of brahma: the *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics.* 148, 251-65.
- Fagegaltier, D., et al., 2009. The endogenous siRNA pathway is involved in heterochromatin formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 21258-63.
- Faradji, F., et al., 2011. *Drosophila melanogaster* Cyclin G coordinates cell growth and cell proliferation. *Cell Cycle.* 10, 805-18.
- Farkas, R. M., et al., 2003. The *Drosophila* Cog5 homologue is required for cytokinesis, cell elongation, and assembly of specialized Golgi architecture during spermatogenesis. *Mol Biol Cell.* 14, 190-200.
- Fischle, W., et al., 2005. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature.* 438, 1116-22.
- Forstemann, K., et al., 2005. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol.* 3, e236.
- Fristrom, D., et al., 1994. Blistered: a gene required for vein/intervein formation in wings of *Drosophila*. *Development.* 120, 2661-71.
- Garrett, K. P., et al., 1995. Positive regulation of general transcription factor SIII by a tailed ubiquitin homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 7172-6.
- Garrett, K. P., et al., 1994. Molecular cloning of an essential subunit of RNA polymerase II elongation factor SIII. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 5237-41.

- Gehani, S. S., et al., 2010. Polycomb group protein displacement and gene activation through MSK-dependent H3K27me3S28 phosphorylation. *Mol Cell*. 39, 886-900.
- Gerber, M., et al., 2004. In vivo requirement of the RNA polymerase II elongation factor elongin A for proper gene expression and development. *Mol Cell Biol*. 24, 9911-9.
- Gerber, M., et al., 2005. Regulation of heat shock gene expression by RNA polymerase II elongation factor, Elongin A. *J Biol Chem*. 280, 4017-20.
- Ghiglione, C., et al., 2002. Mechanism of activation of the Drosophila EGF Receptor by the TGF $\alpha$  ligand Gurken during oogenesis. *Development*. 129, 175-86.
- Giacinti, C., et al., 2006. MyoD recruits the cdk9/cyclin T2 complex on myogenic-genes regulatory regions. *J Cell Physiol*. 206, 807-13.
- Gildea, J. J., et al., 2000. A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the Drosophila melanogaster homologue of human retinoblastoma binding protein 2. *Genetics*. 156, 645-63.
- Gilmour, D. S., 2009. Promoter proximal pausing on genes in metazoans. *Chromosoma*. 118, 1-10.
- Gilmour, D. S., 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, 3984-9.
- Golembo, M., et al., 1996. Argos transcription is induced by the Drosophila EGF receptor pathway to form an inhibitory feedback loop. *Development*. 122, 223-30.
- Gonzalez, A., et al., 2006. Dynamical analysis of the regulatory network defining the dorsal-ventral boundary of the Drosophila wing imaginal disc. *Genetics*. 174, 1625-34.
- Guichard, A., et al., 1999. rhomboid and Star interact synergistically to promote EGFR/MAPK signaling during Drosophila wing vein development. *Development*. 126, 2663-76.
- Haddad, F., et al., 2007. Potential pitfalls in the accuracy of analysis of natural sense-antisense RNA pairs by reverse transcription-PCR. *BMC Biotechnol*. 7, 21.
- Hampsey, M., Reinberg, D., 2003. Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell*. 113, 429-32.
- Hargreaves, D. C., Crabtree, G. R., 2011. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res*. 21, 396-420.
- Harrison, R. E., et al., 2004. Leukocyte-specific protein 1 targets the ERK/MAP kinase scaffold protein KSR and MEK1 and ERK2 to the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 117, 2151-7.
- Hartig, J. V., et al., 2009. Endo-siRNAs depend on a new isoform of loquacious and target artificially introduced, high-copy sequences. *Embo J*. 28, 2932-44.
- Hendrix, D. A., et al., 2008. Promoter elements associated with RNA Pol II stalling in the Drosophila embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 7762-7.
- Hirota, T., et al., 2005. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*. 438, 1176-80.
- Houseley, J., et al., 2008. A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast GAL gene cluster. *Mol Cell*. 32, 685-95.
- Huppert, S. S., et al., 1997. Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for Drosophila wing vein morphogenesis. *Development*. 124, 3283-91.

- Ilik, I., Akhtar, A., 2009. roX RNAs: non-coding regulators of the male X chromosome in flies. *RNA Biol.* 6, 113-21.
- Ivaldi, M. S., et al., 2007. Phosphorylation of histone H3 at Ser10 facilitates RNA polymerase II release from promoter-proximal pausing in *Drosophila*. *Genes Dev.* 21, 2818-31.
- Jin, Y., et al., 2000. JIL-1, a chromosomal kinase implicated in regulation of chromatin structure, associates with the male specific lethal (MSL) dosage compensation complex. *J Cell Biol.* 149, 1005-10.
- Kanhere, A., et al., 2010. Short RNAs are transcribed from repressed polycomb target genes and interact with polycomb repressive complex-2. *Mol Cell.* 38, 675-88.
- Kao, S. Y., et al., 1987. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature.* 330, 489-93.
- Kedde, M., Agami, R., 2008. Interplay between microRNAs and RNA-binding proteins determines developmental processes. *Cell Cycle.* 7, 899-903.
- Kedde, M., et al., 2010. A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3' UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility. *Nat Cell Biol.* 12, 1014-20.
- Khalil, A. M., et al., 2009. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 11667-72.
- Kim, E. K., Choi, E. J., 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1802, 396-405.
- Kim, W., Kaelin, W. G., Jr., 2003. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 13, 55-60.
- Kodjabachian, L., et al., 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, 1063-75.
- Kotake, Y., et al., 2011. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene.* 30, 1956-62.
- Lagarou, A., et al., 2008. dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing. *Genes Dev.* 22, 2799-810.
- Larschan, E., et al., 2011. X chromosome dosage compensation via enhanced transcriptional elongation in *Drosophila*. *Nature.* 471, 115-8.
- Lawrence, M. C., et al., 2008. Chromatin-bound mitogen-activated protein kinases transmit dynamic signals in transcription complexes in beta-cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 13315-20.
- Lawrence, M. C., et al., 2009. Multiple chromatin-bound protein kinases assemble factors that regulate insulin gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 22181-6.
- Lee, C., et al., 2008. NELF and GAGA factor are linked to promoter-proximal pausing at many genes in *Drosophila*. *Mol Cell Biol.* 28, 3290-300.
- Lee, Y. S., et al., 2004. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell.* 117, 69-81.

- Levine, M., 2011. Paused RNA polymerase II as a developmental checkpoint. *Cell*. 145, 502-11.
- Lewis I. Held, J., 2002. Imaginal discs : The genetic and cellular logic of pattern formation. Cambridge University Press.
- Li, X. S., et al., 2010. Mammalian SWI/SNF--a subunit BAF250/ARID1 is an E3 ubiquitin ligase that targets histone H2B. *Mol Cell Biol*. 30, 1673-88.
- Lis, J. T., et al., 2000. P-TEFb kinase recruitment and function at heat shock loci. *Genes Dev*. 14, 792-803.
- Lopez, A., et al., 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, 572-83.
- Mahadevan, L. C., et al., 1991. Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell*. 65, 775-83.
- Marenda, D. R., et al., 2004. The *Drosophila* Brahma (SWI/SNF) chromatin remodeling complex exhibits cell-type specific activation and repression functions. *Dev Biol*. 267, 279-93.
- Marenda, D. R., et al., 2003. The *Drosophila* SNR1 (SNF5/INI1) subunit directs essential developmental functions of the Brahma chromatin remodeling complex. *Mol Cell Biol*. 23, 289-305.
- Martens, J. A., Winston, F., 2003. Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev*. 13, 136-42.
- Mas, G., et al., 2009. Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *Embo J*. 28, 326-36.
- Matakatsu, H., et al., 1999. Repression of the wing vein development in *Drosophila* by the nuclear matrix protein plexus. *Development*. 126, 5207-16.
- Max, T., et al., 2007. Hyperphosphorylation of the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II facilitates dissociation of its complex with mediator. *J Biol Chem*. 282, 14113-20.
- Meller, V. H., et al., 1997. *roX1* RNA paints the X chromosome of male *Drosophila* and is regulated by the dosage compensation system. *Cell*. 88, 445-57.
- Mohler, J., et al., 2000. Activation of *knot* (*kn*) specifies the 3-4 intervein region in the *Drosophila* wing. *Development*. 127, 55-63.
- Mohrmann, L., et al., 2004. Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related *Drosophila* chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol*. 24, 3077-88.
- Montagne, J., et al., 1996. The *Drosophila* Serum Response Factor gene is required for the formation of intervein tissue of the wing and is allelic to *blistered*. *Development*. 122, 2589-97.
- Moreland, R. J., et al., 1998. Mechanism of action of RNA polymerase II elongation factor Elongin. Maximal stimulation of elongation requires conversion of the early elongation complex to an Elongin-activable form. *J Biol Chem*. 273, 26610-7.

- Mouchel-Vielh, E., et al., 2008. Involvement of the MP1 scaffold protein in ERK signaling regulation during *Drosophila* wing development. *Genes Cells*. 13, 1099-111.
- Mouchel-Vielh, E., et al., 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.
- Muchardt, C., et al., 2002. Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO Rep*. 3, 975-81.
- Muse, G. W., et al., 2007. RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat Genet*. 39, 1507-11.
- Nagano, T., Fraser, P., 2009. Emerging similarities in epigenetic gene silencing by long noncoding RNAs. *Mamm Genome*. 20, 557-62.
- Nechaev, S., 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., et al., 2010. Global analysis of short RNAs reveals widespread promoter-proximal stalling and arrest of Pol II in *Drosophila*. *Science*. 327, 335-8.
- Nguyen, A., et al., 2002. Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Mol Cell Biol*. 22, 3035-45.
- Nowak, S. J., Corces, V. G., 2000. Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. *Genes Dev*. 14, 3003-13.
- Nussbaumer, U., et al., 2000. Expression of the blistered/DSRF gene is controlled by different morphogens during *Drosophila* trachea and wing development. *Mech Dev*. 96, 27-36.
- Okamura, K., et al., 2008. Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*. *Nat Struct Mol Biol*. 15, 581-90.
- Okamura, K., et al., 2004. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev*. 18, 1655-66.
- Okamura, K., Lai, E. C., 2008. Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9, 673-8.
- Park, J. K., et al., 2007. The miRNA pathway intrinsically controls self-renewal of *Drosophila* germline stem cells. *Curr Biol*. 17, 533-8.
- Perez-Lluch, S., et al., 2011. Genome-wide chromatin occupancy analysis reveals a role for ASH2 in transcriptional pausing. *Nucleic Acids Res*. 39, 4628-39.
- Peterlin, B. M., Price, D. H., 2006. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell*. 23, 297-305.
- Petruk, S., et al., 2006. Transcription of *bxd* noncoding RNAs promoted by *trithorax* represses *Ubx* in cis by transcriptional interference. *Cell*. 127, 1209-21.
- Piacentini, L., et al., 2003. Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *J Cell Biol*. 161, 707-14.
- Pinskaya, M., et al., 2009. H3 lysine 4 di- and tri-methylation deposited by cryptic transcription attenuates promoter activation. *Embo J*. 28, 1697-707.

- Pokholok, D. K., et al., 2006. Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science*. 313, 533-6.
- Proft, M., et al., 2006. The stress-activated Hog1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic stress. *Mol Cell*. 23, 241-50.
- Proft, M., Struhl, K., 2002. Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell*. 9, 1307-17.
- Queenan, A. M., et al., 1999. The transmembrane region of Gurken is not required for biological activity, but is necessary for transport to the oocyte membrane in *Drosophila*. *Mech Dev*. 89, 35-42.
- Ramos, J. W., 2008. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 40, 2707-19.
- Rampalli, S., et al., 2007. p38 MAPK signaling regulates recruitment of Ash2L-containing methyltransferase complexes to specific genes during differentiation. *Nat Struct Mol Biol*. 14, 1150-6.
- Rasmussen, E. B., 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, 7923-7.
- Reich, A., Shilo, B. Z., 2002. Keren, a new ligand of the *Drosophila* epidermal growth factor receptor, undergoes two modes of cleavage. *Embo J*. 21, 4287-96.
- Rendina, R., et al., 2010. Bap170, a subunit of the *Drosophila* PBAP chromatin remodeling complex, negatively regulates the EGFR signaling. *Genetics*. 186, 167-81.
- Rinn, J. L., et al., 2007. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 129, 1311-23.
- Roch, F., et al., 1998. Genetic interactions and cell behaviour in blistered mutants during proliferation and differentiation of the *Drosophila* wing. *Development*. 125, 1823-32.
- Roy, F., et al., 2002. KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev*. 16, 427-38.
- Salvaing, J., et al., 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., et al., 2003. The *Drosophila* Corto protein interacts with Polycomb-group proteins and the GAGA factor. *Nucleic Acids Res*. 31, 2873-82.
- Salvaing, J., et al., 2008a. Regulation of Abd-B expression by Cyclin G and Corto in the abdominal epithelium of *Drosophila*. *Hereditas*. 145, 138-46.
- Salvaing, J., et al., 2008b. The enhancer of trithorax and polycomb corto interacts with cyclin G in *Drosophila*. *PLoS One*. 3, e1658.
- Sanchez-Elsner, T., et al., 2006. Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit *Drosophila* Ash1 to Ultrabithorax. *Science*. 311, 1118-23.
- Sapir, A., et al., 1998. Sequential activation of the EGF receptor pathway during *Drosophila* oogenesis establishes the dorsoventral axis. *Development*. 125, 191-200.



- Schaeffer, H. J., et al., 1998. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science*. 281, 1668-71.
- Scheuermann, J. C., et al., 2010. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature*. 465, 243-7.
- Schmitt, S., et al., 2005. Intergenic transcription through a polycomb group response element counteracts silencing. *Genes Dev*. 19, 697-708.
- Schnepf, B., et al., 1996. Vein is a novel component in the Drosophila epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev*. 10, 2302-13.
- Schuettengruber, B., et al., 2007. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*. 128, 735-45.
- Schwartz, Y. B., Pirrotta, V., 2007. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet*. 8, 9-22.
- Schwartz, Y. B., Pirrotta, V., 2008. Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr Opin Cell Biol*. 20, 266-73.
- Schweitzer, R., et al., 1995. Secreted Spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination. *Genes Dev*. 9, 1518-29.
- Seenundun, S., et al., 2010. UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis. *Embo J*. 29, 1401-11.
- Selth, L. A., et al., 2010. Transcript Elongation by RNA Polymerase II. *Annu Rev Biochem*. 79, 271-93.
- Shilo, B. Z., 2003. Signaling by the Drosophila epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp Cell Res*. 284, 140-9.
- Shimmi, O., et al., 2005. The crossveinless gene encodes a new member of the Twisted gastrulation family of BMP-binding proteins which, with Short gastrulation, promotes BMP signaling in the crossveins of the Drosophila wing. *Dev Biol*. 282, 70-83.
- Shopland, L. S., et al., 1995. HSF access to heat shock elements in vivo depends critically on promoter architecture defined by GAGA factor, TFIID, and RNA polymerase II binding sites. *Genes Dev*. 9, 2756-69.
- Sikorski, T. W., Buratowski, S., 2009. The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr Opin Cell Biol*. 21, 344-51.
- Simon, J. A., Kingston, R. E., 2009. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10, 697-708.
- Simone, C., et al., 2004. p38 pathway targets SWI-SNF chromatin-remodeling complex to muscle-specific loci. *Nat Genet*. 36, 738-43.
- Sims, R. J., 3rd, et al., 2004. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev*. 18, 2437-68.
- Smith, E. R., et al., 2008. Regulation of the transcriptional activity of poised RNA polymerase II by the elongation factor ELL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 8575-9.
- Smith, S. T., et al., 2004. Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. *Nat Cell Biol*. 6, 162-7.

- Smulders-Srinivasan, T. K., et al., 2010. A *Drosophila* chromatin factor interacts with the Piwi-interacting RNA mechanism in niche cells to regulate germline stem cell self-renewal. *Genetics*. 186, 573-83.
- Sole, C., et al., 2011. Control of Ubp3 ubiquitin protease activity by the Hog1 SAPK modulates transcription upon osmostress. *Embo J*. 30, 3274-84.
- Sotillos, S., De Celis, J. F., 2005. Interactions between the Notch, EGFR, and decapentaplegic signaling pathways regulate vein differentiation during *Drosophila* pupal wing development. *Dev Dyn*. 232, 738-52.
- Srinivasan, S., et al., 2005. The *Drosophila* trithorax group protein Kismet facilitates an early step in transcriptional elongation by RNA Polymerase II. *Development*. 132, 1623-35.
- Srinivasan, S., et al., 2008. *Drosophila* Kismet regulates histone H3 lysine 27 methylation and early elongation by RNA polymerase II. *PLoS Genet*. 4, e1000217.
- Stock, J. K., et al., 2007. Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat Cell Biol*. 9, 1428-35.
- Strahl, B. D., Allis, C. D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403, 41-5.
- Strobl, L. J., Eick, D., 1992. Hold back of RNA polymerase II at the transcription start site mediates down-regulation of c-myc in vivo. *Embo J*. 11, 3307-14.
- Sturtevant, M. A., Bier, E., 1995. Analysis of the genetic hierarchy guiding wing vein development in *Drosophila*. *Development*. 121, 785-801.
- Sturtevant, M. A., et al., 1993. The *Drosophila* rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes Dev*. 7, 961-73.
- Tan, S., et al., 1994. Roles for both the RAP30 and RAP74 subunits of transcription factor IIF in transcription initiation and elongation by RNA polymerase II. *J Biol Chem*. 269, 25684-91.
- Teis, D., et al., 2002. Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell*. 3, 803-14.
- Terriente-Felix, A., de Celis, J. F., 2009. Osa, a subunit of the BAP chromatin-remodelling complex, participates in the regulation of gene expression in response to EGFR signalling in the *Drosophila* wing. *Dev Biol*. 329, 350-61.
- Torii, S., et al., 2004. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell*. 7, 33-44.
- Tripura, C., et al., 2011. Regulation and activity of JNK signaling in the wing disc peripodial membrane during adult morphogenesis in *Drosophila*. *Int J Dev Biol*. 55, 583-90.
- Tsai, M. C., et al., 2010. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*. 329, 689-93.
- Tsruya, R., et al., 2002. Intracellular trafficking by Star regulates cleavage of the *Drosophila* EGF receptor ligand Spitz. *Genes Dev*. 16, 222-34.
- Vignali, M., et al., 2000. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol*. 20, 1899-910.

- Voncken, J. W., et al., 2005. MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1. *J Biol Chem.* 280, 5178-87.
- Wang, K. C., et al., 2011. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature.* 472, 120-4.
- Wang, S., et al., 2002. Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *Embo J.* 21, 3019-28.
- Wang, X., et al., 2007. Transcription elongation controls cell fate specification in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 21, 1031-6.
- Wu, C. H., et al., 2003. NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes Dev.* 17, 1402-14.
- Wunderlich, W., et al., 2001. A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Biol.* 152, 765-76.
- Wutz, A., 2011. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. *Nat Rev Genet.* 12, 542-53.
- Xu, K., et al., 2004. The fragile X-related gene affects the crawling behavior of *Drosophila* larvae by regulating the mRNA level of the DEG/ENaC protein pickpocket1. *Curr Biol.* 14, 1025-34.
- Yamaguchi, Y., et al., 1999. NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell.* 97, 41-51.
- Yamazaki, K., et al., 2002. Identification and biochemical characterization of a novel transcription elongation factor, Elongin A3. *J Biol Chem.* 277, 26444-51.
- Yap, K. L., et al., 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, 662-74.
- Yap, K. L., Zhou, M. M., 2011. Structure and mechanisms of lysine methylation recognition by the chromodomain in gene transcription. *Biochemistry.* 50, 1966-80.
- Yasukawa, T., et al., 2008. Mammalian Elongin A complex mediates DNA-damage-induced ubiquitylation and degradation of Rpb1. *Embo J.* 27, 3256-66.
- Yuan, W., et al., 2011. H3K36 methylation antagonizes PRC2-mediated H3K27 methylation. *J Biol Chem.* 286, 7983-9.
- Zapater, M., et al., 2007. Selective requirement for SAGA in Hog1-mediated gene expression depending on the severity of the external osmotic stress conditions. *Mol Cell Biol.* 27, 3900-10.
- Zawel, L., et al., 1995. Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 9, 1479-90.
- Zeitlinger, J., et al., 2007. RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat Genet.* 39, 1512-6.
- Zhang, Z. K., et al., 2002. Cell cycle arrest and repression of cyclin D1 transcription by INI1/hSNF5. *Mol Cell Biol.* 22, 5975-88.

- Zhao, J., et al., 2010. Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq. *Mol Cell*. 40, 939-53.
- Zhao, J., et al., 2008. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*. 322, 750-6.
- Zraly, C. B., et al., 2003. SNR1 is an essential subunit in a subset of *Drosophila* brm complexes, targeting specific functions during development. *Dev Biol*. 253, 291-308.