

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biologie cellulaire

Formation doctorale : Biologie et Santé

Ecole Doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé

Présentée et soutenue publiquement par

Emilie LIABEUF – LE GOFF

Le 18 Décembre 2012

**Implications des complexes Polycomb et Trithorax au
cours du développement précoce chez *Ciona intestinalis***

Jury

M. Joly Jean-Stéphane, Directeur de recherche CNRS
M. Yasuo Hitoyoshi, Directeur de recherche CNRS
M. Escriva Hector, Directeur de recherche CNRS
M. Baghdiguian Stephen, Professeur UM II
M. Cavalli Giacomo, Directeur de recherche CNRS
Mme Martinand-Mari Camille, Chargée de recherche CNRS

Rapporteur
Rapporteur
Président
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse
Membre invité

Résumé :

Implications des complexes Polycomb et Trithorax au cours du développement précoce chez *Ciona intestinalis*

Les protéines des groupes Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG) ont été initialement découvertes chez *Drosophila melanogaster*. Ces deux groupes sont classiquement connus pour leurs rôles respectifs de répresseurs et d'activateurs épigénétiques qui contrôlent et maintiennent les états chromatinien au cours du temps. Ces facteurs régulent de nombreux gènes cibles dont les gènes homéotiques. Au cours de ma thèse, j'ai étudié trois composants de ces deux groupes : Enhancer of zeste (E(z)), appartenant au complexe PRC2 du PcG et responsable du dépôt de la marque de répression génique H3K27me₃, Polyhomeotic (Ph), appartenant au complexe PRC1 du PcG et Trithorax (Trx), appartenant au complexe TAC1 du TrxG et responsable du dépôt de la marque d'activation génique H3K4me₃. Jusqu'à présent, aucune étude n'a abordé la régulation épigénétique via les PcG et TrxG chez l'ascidie solitaire *Ciona intestinalis*. Cette espèce présente un cluster des gènes *Hox* désorganisé et ne possède pas la protéine Polycomb (Pc) du PRC1, responsable de la reconnaissance de la marque de répression H3K27me₃ déposée par la protéine E(z).

Nos travaux montrent que la protéine E(z) est fonctionnelle et conserve son activité méthyltransférase sur le résidu H3K27 chez *Ciona intestinalis*. Nous avons ensuite observé, par des expériences de knockdown par micro-injection de morpholinos, que les inhibitions protéiques d'E(z), Ph et Trx ont des conséquences dramatiques sur la différenciation et la mise en place des différents tissus au cours du développement larvaire, notamment sur la mise en place de la notochorde puisque celle-ci est totalement absente chez les morphants E(z) et Ph. Les défauts de phénotype du morphant E(z) sont corrélés à la perte du dépôt d'H3K27me₃ et nous avons mis en évidence, lors de l'inhibition d'E(z), une dérégulation des gènes tissu-spécifiques impliqués dans le développement embryonnaire précoce alors que les gènes tardivement exprimés sont réprimés. De plus, l'expression des gènes *Hox* n'est pas significativement modifiée au cours du développement embryonnaire lorsque la protéine E(z) est inhibée, à l'exception du gène *Hox12* qui est dérégulé, comme attendu.

L'ensemble de ces résultats permet d'émettre l'idée innovante selon laquelle les protéines des PcG et TrxG jouent un rôle déterminant dans la régulation de l'expression génique lors de l'embryogénèse de *Ciona intestinalis* tout en ayant une implication mineure dans la régulation de l'expression des gènes *Hox* à ce stade du développement.

Mots-clés : *Ciona intestinalis*, développement embryonnaire, épigénétique, Enhancer of zeste, régulation génique, gènes *Hox*.

Abstract :

Implications of Polycomb and Trithorax complexes in the early development of *Ciona intestinalis*

Polycomb and Trithorax group (PcG and TrxG) proteins were discovered originally in *Drosophila melanogaster*. Both groups are classically known for their roles in the maintenance of silenced and active chromatin states over time, respectively. These factors regulate many target genes including the homeotic genes. During my PhD, I studied three components of these two groups: Enhancer of zest (E(z)), belonging to the PRC2 complex of PcG and responsible for H3K27me3 mark deposit for gene repression, Polyhomeotic (Ph), belonging to the PRC1 complex of PcG and Trithorax (Trx), belonging to the TAC1 complex of TrxG and responsible for H3K4me3 mark deposit for gene activation. Until now, no study addresses the epigenetic regulation mediated by PcG and TrxG in the solitary ascidian *Ciona intestinalis*. This specie has a disorganized *Hox* cluster and in which the Polycomb (Pc) protein of PRC1, responsible for the recognition of the repressive H3K27me3 mark, is absent.

Our work shows that the E(z) protein is functional and retains its methyltransferase activity on H3K27 residue in *Ciona intestinalis*. Then, we demonstrated, by knockdown experiments with morpholino microinjection, that the inhibition of E(z), Ph and Trx has dramatic consequences on differentiation and on the establishment of different tissues during larval development, particularly on the notochord establishment since it is totally absent in E(z) and Ph morphants. E(z) morphant phenotypic defects are correlated with lack of H3K27me3 mark deposit and we highlighted that, during the E(z) inhibition, tissue-specific genes implied in early development are de-repressed while late-expressed genes are down-regulated. In addition among *Hox* genes, only *Hox12* expression is significantly modified and found to be de-repressed in E(z) morphant context, as expected.

Altogether, our results present the innovative idea that the PcG and TrxG proteins play a major role in the gene expression regulation during embryogenesis of *Ciona intestinalis* while having a minor involvement in the regulation of *Hox* genes expression at this stage of development.

Keywords : *Ciona intestinalis*, embryonic development, epigenetic, Enhancer of zeste, gene regulation, *Hox* genes.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Hector Escriva qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse ainsi que Hitoyoshi Yasuo et Jean-Stéphane Joly pour avoir accepté de juger ce mémoire. Je les remercie d'avoir pris de leur temps pour lire et évaluer ce travail.

Je remercie sincèrement Jean-Christophe Auffray, directeur de l'Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier, pour avoir donné son accord à mon inscription en thèse malgré mon statut d'ingénieur d'études ITRF au sein de l'unité.

Je remercie Stephen Baghdiguan et Giacomo Cavalli d'avoir co-dirigé cette thèse.

Stephen, quel bonheur il y a 6 ans d'intégrer ton équipe !!! Je t'adresse un grand merci et je te suis très reconnaissante de m'avoir proposée de m'inscrire en thèse sur la thématique de recherche que je développais au sein de notre équipe. Merci pour ta confiance, tes idées et ta passion des livres anciens. Tu as toujours été pour moi un « Dieu des sciences », ton incroyable culture scientifique ainsi que ta pédagogie m'ont toujours fascinée. Malgré tes côtés « trompette-man », Monsieur Indestructible (cf. dessin animé) et il faut le dire... un peu hypochondriaque et ronchon sur les bords, ta sensibilité m'a souvent aidée dans les moments plus difficiles.

Merci Giacomo d'avoir initié ce projet il y a quelques années et de m'avoir fait confiance. Merci de m'avoir accueillie au sein de ton équipe pour les expériences de ChIP et de m'avoir fait partager ton expertise en épigénétique.

J'adresse un remerciement tout particulier à Camille Martinand-Mari qui a encadré ma thèse de manière officieuse... allez hop hop hop il faut la passer cette HDR. ;-) Merci Camille pour ton enthousiasme, ton optimisme, ta générosité et ta tolérance. Merci pour ta vision si collective, si rare dans ce milieu. Merci pour ton soutien permanent et sans faille, dans les moments difficiles. Merci Camille pour l'excellence de tes conseils autant scientifiques que personnels. Je pourrais te consacrer une page entière pour te remercier pour TOUT (dont ta délicieuse tarte noix/roquefort et tous nos moments extra-labo passés ensemble) mais en résumé : tu es une perle.

Un grand merci également à Nelly Godefroy pour son soutien scientifique et personnel. Nelly, tu as toujours su m'apporter beaucoup de sagesse et de sensibilité, je t'en suis très reconnaissante. Tu as d'énormes qualités humaines et scientifiques et je suis toujours émerveillée par ta pédagogie. Merci pour ta qualité d'écoute et ton crumble pomme-rhubarbe... c'est de la tuerie !

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe « Biologie du développement et évolution », c'est un bonheur de travailler avec vous tous... et de partager les gâteaux de Mélanie en réunion d'équipe !

Karim, merci pour ton soutien et ta gentillesse... je te souhaite sincèrement beaucoup de bonheur et un bon job après ton post-doc, tu le mérites. Merci à Mélanie Debiais-Thibault pour ta relecture et surtout pour ton expertise en évo-dévo. Merci aussi pour ton animation d'équipe et vive les petites hybridations in situ en perspective...!!!

Je remercie Patrick Lemaire, Paul Mangeat et Bernd Schuettengruber pour leur participation à mes comités de thèse. Bernd, merci beaucoup de m'avoir fait partager ton expertise des ChIP. Ta disponibilité et ta sympathie ont toujours été très appréciables.

Merci à Marianne Martin pour sa précieuse aide scientifique et son professionnalisme.

Merci à Yvan Boublík, responsable de la plateforme ProRec de Montpellier. J'adresse un remerciement particulier à Jérôme Feuillard qui a réalisé un travail remarquable lors de la production et la purification des protéines recombinantes utilisées pour la production d'anticorps Ciona. Ce fût un pur bonheur de travailler avec toi. Merci également à Mélanie et Chloé pour leur soutien et leur gentillesse.

Je remercie également Vicky Diakou, responsable de la plateforme de microscopie MRI-UM2, Philippe Clerc, responsable de la plateforme de qPCR de l'UM2 ainsi que Véronique Richard et Franck Godiard de la plateforme de MET de l'UM2. Merci à Michel Cantou, plongeur professionnel à la station marine de Sète.

Merci à Alain Sahuquet pour son expertise en analyse d'images.

Merci à Georges Lutfalla qui m'a donné libre accès à son matériel de micro-injection au début de notre étude.

Merci à Anne-Marie Martinez pour son expertise en épigénétique et sa disponibilité.

Merci à Guy Charmentier pour son aide lors des acquisitions d'images des coupes semi-fines.

Je souhaite adresser un remerciement particulier à Marie-Christine Lebart pour son aide lors de la purification de l'anticorps Ci-E(z). M-C, 7 ans se sont déjà écoulés depuis mon départ du « 4^{ème} » et pourtant tu t'es toujours montrée très disponible et attentionnée, je te remercie très sincèrement pour tout ce que tu as fait pour moi.

Merci à Gilbert, tu me manques... quelle idée de partir à la retraite !!!

Merci Fred pour ton soutien quotidien et les cours de qi gong qui me font tant de bien.

Je remercie également toutes les personnes de l'ISEM qui m'ont aidée et soutenue et plus particulièrement l'ensemble de la partie ISEM du bâtiment 24 ainsi que tout le personnel administratif. J'adresse une tendre et affectueuse pensée à Brigitte Zattara qui m'apportait toujours un soutien sans faille.

Je remercie du fond du cœur TOUTE ma famille. On dit souvent qu'on ne la choisit pas et je me rends compte de la chance que j'ai de vous avoir tous à mes côtés, vous êtes merveilleux, Merci donc aux clans Agut, Le Goff, Savelli, Freydier, Joly et Desbordes.

Merci à Papé et Mamée de m'avoir depuis toujours donné votre amour et votre soutien, vous êtes mes deux pierres précieuses.

Merci Maman de m'avoir soutenue inconditionnellement et d'avoir su si justement trouver les mots pour me consoler ou me « coacher » dans les moments difficiles. Merci d'avoir su me rendre plus forte et tout simplement d'être comme tu es. Merci pour mon sponsor officiel de thèse : la saucisse sèche de l'épicier de Claret !!!

Merci Papa de m'avoir toujours fait confiance et de ne m'avoir imposé aucun choix, Merci Chantal;-)

J'adresse un grand merci à ma petite sœur Olivia, merci ma petite princesse pour ton réconfort et toute ta joie de vivre. Un grand merci à mon grand frère Nico qui a toujours su prendre soin de moi. Vous êtes supers !!!

Merci à mes petits chouchous Marie-pierre et Jean-Jacques. Merci pour votre grand cœur, votre générosité et votre amour tout simplement. Merci pour tous les merveilleux moments que nous passons ensemble depuis mon enfance.

J'adresse un grand merci à toute la famille Liabeuf-Allaoui : Brigitte, Michel, Ghislain, Linda, Fred, Ka, Paul et Valou. Merci à tous pour votre gentillesse et tous nos fous rires (je reviens dans le top du tableau pour la Champions League des crochets... tenez-vous prêts !).

Merci à Mimi qui m'a toujours apporté beaucoup d'attention.

Merci Fabrice pour ta sagesse, ton humour et ton écoute lors de nos midis-cantine.

Je tiens à remercier Anne, ma petite Anouchka, pour tous nos papotages qui m'apportent tellement de réconfort depuis des années, merci pour ta bonne humeur et ton extrême gentillesse.

Merci à Laeti et Denis, mes petits chickens préférés. Tu me manques ma Poulette, merci d'être toujours là pour moi.

Merci également à Julie et Vincent, Elo et Yann, Pierre-Yves, Amélie et Seb, Alain et Guillaume, Denis et Anne-Laure. Merci pour tous les jolis moments que nous passons ensemble et surtout que cela dure...

Un petit clin d'œil pour ma Léia qui est toujours d'une humeur constante : joueuse et ronfleuse ;-)

Enfin, je remercie Rémi qui a eu à subir le « pire » de moi ces derniers temps !!! Tu es mon plus grand soutien et tellement précieux, Toujours droit, juste et attentionné. Merci pour tout ce que tu m'apportes, sans toi je n'y serais jamais arrivée. Merci d'être comme tu es.

Carpe diem quam minimum credula postero - Horace

Liste des abréviations

| | |
|---------------|------------------------------------|
| Ach | Acétylcholinestérase |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AGZ | Activation du génome zygotique |
| ANT-C | complexe Antennapedia |
| A-P | Antéro-postérieur |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| ATP | Adénosine-5'-triphosphate |
| BAF | Brahma associated factor |
| BMP | Bone morphogenetic protein |
| BrCN | Bromure de cyanogène |
| BrdU | Bromodeoxyuridine |
| brm | brahma |
| BX-C | complexe Bithorax |
| CAB | Centrosome attracting body |
| CBP | CREB binding protein |
| ChIP | Immuno-précipitation de chromatine |
| CMM | module de mémoire cellulaire |
| DNMT | méthyltransférase |
| ESC | Cellule souche embryonnaire |
| Esc | Extra sex comb |
| E(z) | Enhancer of zeste |
| Epi1 | Epidermis specific protein 1 |
| FGF | Fibroblast growth factor |
| FITC | Fluoresceine isothiocyanate |
| GLP | G9a related protein |
| GST | Gluthation S-transférase |
| GTPase | Guanidine triphosphate hydrolase |
| H | Histone |
| HAT | Histone acétyltransférase |
| HDAC | Histone désacétylase |
| HLH | Helix-Loop-Helix |
| HMT | Histone méthyltransférase |
| Hox | Homéotique |
| hpf | hour post fertilization |
| HP1 | Heterochromatin protein 1 |
| JHDM1A | déméthylase 1A à domaine JmjC |
| JmjC | domaine Jumonji C-terminal |
| K | Lysine |
| LSD1 | Lysine specific demethylase 1 |

| | |
|-------------------|--|
| MAP kinase | Mitogen activated protein kinase |
| me | méthylation |
| mor | mora |
| Pc | Polycomb |
| PcG | groupe Polycomb |
| Pcl | Polycomb like |
| Pem | Posterior end mark |
| Ph | Polyhomeotic |
| PhoRC | Pho repressive complex |
| PRC | Polycomb repressive complex |
| PR-DUB | Polycomb repressive deubiquitinase |
| PRE | Polycomb response element |
| PRMT | Protein arginine methyltransferase |
| Psc | Posterior sex comb |
| RT-qPCR | Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction |
| SAAF | Sperm activating and attracting factor |
| Scx | Sex comb extra |
| Scm | Sex comb on midleg |
| Ser | Sérine |
| SNP | Système nerveux périphérique |
| Suv3-9h | Suppressor of variegation 3-9 |
| Su(z)12 | Suppressor of zeste 12 |
| TAF | TATA binding protein associated factor |
| TGFb | Transforming growth factor |
| Thr | Thréonine |
| TMZ | Transition maternelle-zygotique |
| TPM | Tropomyosine |
| TRE | Trithorax response element |
| TRITC | Rhodamine isothiocyanate |
| TrxG | groupe Trithorax |
| Ub | Ubiquitine |
| Wnt MMTV | Wingless-type MMTV integration site |
| Xist | X-inactive specific transcript |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Représentation schématique des différents niveaux de compaction de la chromatine..... | 18 |
| Figure 2 : Schéma d'un nucléosome..... | 20 |
| Figure 3 : Schéma représentatif de la structure du nucléosome. | 22 |
| Figure 4 : Schéma des modifications post-traductionnelles possibles des queues d'histones..... | 23 |
| Figure 5 : Schématisation des différents modes de remodelage des nucléosomes..... | 34 |
| Figure 6 : Protéines du PcG chez la drosophile et l'homme..... | 37 |
| Figure 7 : Protéines du TrxG chez la drosophile et l'homme..... | 41 |
| Figure 8 : Mécanisme d'action des complexes Polycomb chez la drosophile..... | 45 |
| Figure 9 : Schéma récapitulatif des principaux acteurs et marques de la régulation transcriptionnelle des PcG et TrxG. | 46 |
| Figure 10 : Représentation schématique du patron d'expression des gènes homéotiques chez l'embryon de drosophile..... | 48 |
| Figure 11 : Représentation de l'organisation des gènes homéotiques chez les mammifères, amphioxus, <i>Ciona intestinalis</i> et <i>Drosophila melanogaster</i> | 50 |
| Figure 12 : Implication des PcG et TrxG dans de nombreux processus biologiques. | 52 |
| Figure 13 : Dynamique des domaines bivalents lors de la différenciation cellulaire. | 54 |
| Figure 14 : Points de contrôle du cycle cellulaire régulés par les protéines du PcG. | 55 |
| Figure 15 : Schéma comparatif de la transition maternelle-zygotique chez différentes espèces..... | 59 |
| Figure 16 : Statuts des marques épigénétiques lors de la TMB du xénope.. | 60 |
| Figure 17 : Statuts des marques épigénétiques lors de l'AGZ chez la souris..... | 61 |
| Figure 18 : Expressions, mutations et translocations chromosomales des gènes du PcG dans les cancers..... | 63 |
| Figure 19 : Distribution phylogénétique de PRC1, PRC2 et des clusters des gènes <i>Hox</i> chez les eucaryotes..... | 65 |
| Figure 20 : Planche d'Ernst Haeckel illustrant les différentes espèces d'ascidies. | 68 |
| Figure 21 : Arbre phylogénique des deutérostomes. | 69 |
| Figure 22 : Distribution géographique des sous-espèces A (rose) et B (bleu) de <i>Ciona intestinalis</i> . .. | 70 |
| Figure 23 : Cycle de vie de <i>Ciona intestinalis</i> | 71 |
| Figure 24 : Présentation d'un œuf mature de <i>Ciona intestinalis</i> | 72 |
| Figure 25 : Schéma représentatif des différents axes de polarité dans un œuf d'ascidie. | 74 |
| Figure 26 : Stades du développement embryonnaire de <i>Ciona intestinalis</i> à 18°C..... | 77 |
| Figure 27 : Schéma du stade 8 cellules lors du clivage embryonnaire chez <i>Ciona intestinalis</i> | 78 |
| Figure 28 : Lignage cellulaire de l'embryon d' <i>Halocynthia roretzi</i> | 79 |
| Figure 29 : Carte représentant les territoires du déterminisme tissulaire chez <i>Ciona intestinalis</i> après la ségrégation ooplasmique et au stade 8 cellules. | 81 |
| Figure 30 : Schéma d'une larve de <i>Ciona intestinalis</i> | 82 |
| Figure 31 : Schéma représentatif des différents lignages de la notochorde lors du développement larvaire de <i>Ciona intestinalis</i> | 83 |
| Figure 32 : Schéma représentatif de la formation de la notochorde lors du développement larvaire de <i>Ciona intestinalis</i> | 84 |
| Figure 33 : Schéma représentatif du lignage du muscle lors du développement larvaire de <i>Ciona intestinalis</i> | 85 |
| Figure 34 : Schéma du système nerveux de la larve de <i>Ciona intestinalis</i> | 86 |
| Figure 35 : Photos des neurones sensoriels épidermiques de la larve de <i>Ciona intestinalis</i> | 88 |

| | |
|---|-----|
| Figure 36 : Schéma d'une larve mature de <i>Ciona intestinalis</i> | 90 |
| Figure 37 : Individu adulte de <i>Ciona intestinalis</i> | 92 |
| Figure 38 : Vue d'ensemble des réactions enzymatiques des PcG (en bleu) et TrxG (en rouge) sur le résidu H3K27. | 122 |
| Figure 39 : Immunofluorescence sur des échantillons late tailbud contrôle et morphant-E(z). | 123 |
| Figure 40 : Western blot réalisé avec l'Ac anti-Ci-E(z) au stade mi-têtard sauvage..... | 124 |
| Figure 41 : Comparaison de séquences des protéines E(z) de drosophile, de Ciona et humaine. | 125 |
| Figure 42 : Immunofluorescence sur des échantillons aux stades larvaires contrôle et morphant pour les protéines Ph et Trx. | 127 |
| Figure 43 : Immunofluorescence sur des échantillons larvaire des morphants MO-Ph et MO-Trx... 128 | |
| Figure 44 : Observation microscopique de coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine des morphants MO-Ph et MO-Trx au stade larvaire..... | 129 |
| Figure 45 : Observation au MET de coupes ultra-fines d'échantillons larvaires sauvages et morphants MO-Ph..... | 130 |
| Figure 46 : Séquences protéiques de Ci-Ph (A) et Ci-Trx (B).. | 130 |
| Figure 47 : Réseau de régulation des gènes impliqués en amont et en aval de <i>Brachyury</i> dans la mise en place de la notochorde chez <i>Ciona intestinalis</i> | 134 |

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| PREAMBULE | 13 |
| INTRODUCTION | 16 |
| CHAPITRE 1 : REGULATION EPIGENETIQUE DE LA CHROMATINE PAR LES PROTEINES DES GROUPES POLYCOMB ET TRITHORAX.... | 17 |
| <i>I – Organisation de la chromatine et expression génique</i> | 17 |
| I-1- La chromatine..... | 17 |
| I-1-1- L'hétérochromatine et l'euchromatine | 18 |
| I-1-2- Le nucléosome..... | 20 |
| I-2- Les histones | 21 |
| I-2-1- Les modifications post-traductionnelles des queues d'histones | 23 |
| a) Méthylation / Déméthylation | 24 |
| b) Acétylation / Désacétylation | 27 |
| c) Ubiquitylation..... | 29 |
| d) Phosphorylation..... | 30 |
| I-2-2- Le code histone | 31 |
| I-2-3- Remodelage de la chromatine et modification des histones | 33 |
| I-2-4- Méthylation de l'ADN..... | 34 |
| <i>II- Le système de mémoire cellulaire des groupes Polycomb et Trithorax.....</i> | 36 |
| II-1- Le groupe Polycomb..... | 36 |
| II-1-1- Les gènes du PcG | 36 |
| II-1-2- Les complexes du PcG | 37 |
| a) Le complexe PRC2 | 37 |
| b) Le complexe PRC1..... | 38 |
| c) Le complexe PhoRC | 39 |
| d) Les autres complexes du PcG..... | 39 |
| II-2- Le groupe Trithorax | 40 |
| II-2-1- Les gènes du TrxG..... | 40 |
| II-2-2- Les complexes du TrxG | 40 |
| a) Les complexes remodelateurs de la chromatine..... | 41 |
| b) Les complexes modificateurs d'histones..... | 41 |
| II-3- Les modèles d'action des groupes Polycomb et Trithorax | 42 |
| II-3-1- PRE / TRE | 42 |
| II-3-2- Recrutement des complexes protéiques des PcG et TrxG..... | 44 |
| a) Répression de la transcription..... | 44 |
| b) Activation de la transcription..... | 45 |
| II-4- Les gènes cibles | 47 |
| a) Les gènes homéotiques..... | 47 |
| b) Les autres gènes cibles..... | 51 |
| II-5- Fonctions biologiques..... | 52 |
| a) Implication des PcG et TrxG dans la différenciation cellulaire | 53 |
| b) Implication des protéines du PcG dans le contrôle du cycle cellulaire | 55 |
| c) Le PcG et les voies de signalisation..... | 56 |
| d) Rôle des marques épigénétiques lors de l'activation du génome zygotique | 58 |
| e) PcG et cancer | 62 |
| II-6- Aspects évolutifs des interactions géniques des PcG et TrxG..... | 65 |
| CHAPITRE 2 : L'ASCIDIE <i>CIONA INTESTINALIS</i> | 68 |
| <i>I- Position phylogénétique.....</i> | 68 |
| <i>II- Cycle de vie</i> | 71 |
| II-1- Libération des gamètes et fécondation | 71 |
| II-2- Composante maternelle et ségrégation ooplasmique | 73 |
| II-3- Développement embryonnaire | 77 |

| | |
|--|------------|
| II-3-1- Le clivage et la morphogénèse | 77 |
| II-3-2- Le déterminisme tissulaire | 80 |
| a) La notochorde | 82 |
| b) Les muscles | 84 |
| c) L'épiderme | 85 |
| d) Le système nerveux..... | 86 |
| e) L'endoderme | 88 |
| II-3-3- L'éclosion larvaire..... | 89 |
| II-3-4- La métamorphose..... | 90 |
| RESULTATS | 93 |
| I- <i>Positionnement du sujet</i> | 94 |
| II- <i>Implication d'E(z) au cours du développement embryonnaire de <i>Ciona intestinalis</i></i> | 96 |
| II-1- Défauts du développement associés à l'inactivation d'E(z) chez <i>Ciona intestinalis</i> | 96 |
| II-2- Statut de l'acétylation de H3K27 chez les morphants MO-E(z) | 122 |
| II-3- Caractérisation de l'anticorps dirigé contre Ci-E(z) | 123 |
| III- <i>Implication de Ph et Trx au cours du développement embryonnaire de <i>Ciona intestinalis</i></i> | 126 |
| III-1- Caractérisation des phénotypes morphants MO-Ph et MO-Trx par microscopie confocale | 126 |
| III-2- Caractérisation ultrastructurale des phénotypes des morphants MO-Ph et MO-Trx..... | 129 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... | 132 |
| MATERIELS ET METHODES..... | 140 |
| 1- <i>Matériel biologique</i> | 141 |
| 2- <i>Déchoriation des œufs</i> | 141 |
| 3- <i>Micro-injection de morpholinos</i> | 141 |
| 4- <i>Fixation et perméabilisation</i> | 142 |
| 5- <i>Immunofluorescence indirecte</i> | 142 |
| 6- <i>Marquage TUNEL</i> | 143 |
| 7- <i>Microscopie électronique en transmission et optique</i> | 143 |
| 8- <i>Production et purification d'anticorps polyclonaux</i> | 144 |
| 9- <i>Préparation d'extraits protéiques d'histones</i> | 144 |
| 10- <i>SDS-PAGE et Western Blot</i> | 145 |
| 11- <i>Préparation d'extraits d'ARN totaux et RT-qPCR</i> | 146 |
| 12- <i>Analyses bioinformatiques</i> | 147 |
| BIBLIOGRAPHIE | 148 |

Préambule

« L'idée d'évolution apparaît à plusieurs reprises dans les écrits ou les traditions orales des sociétés humaines mais sans que ces concepts ne résultent d'une démarche scientifique. Dans les pays occidentaux, une interprétation littérale du livre de la Genèse, associée à la jeunesse supposée de la Terre, constituait des obstacles majeurs au concept d'évolution de la vie.

Au siècle des lumières, en France, Buffon fut le premier à estimer un âge de la Terre compatible avec l'idée d'évolution. Il définit l'espèce par l'isolement reproducteur et proposa les premiers modèles de spéciation. Cuvier expliqua l'existence d'espèces fossiles inconnues aujourd'hui par leur disparition suite à des catastrophes, alors que Lamarck considérait que ces espèces n'avaient pas disparu mais qu'elles s'étaient transformées. Selon lui, cette transformation se réalisait sous le double effet de l'usage et du non-usage.

Darwin affirma que les espèces évoluent et qu'elles descendent toutes d'un ancêtre commun. Il proposa un mécanisme de cette transformation : la sélection naturelle. Selon ce modèle, les individus les mieux adaptés à un environnement sont ceux qui ont le plus de descendants. Cette adaptation étant transmissible à la descendance, ce caractère se répand au fil des générations dans la population et conduit à son évolution au cours du temps.

Au 20^{ème} siècle, les progrès de la génétique permirent de comprendre la nature et le mode de transmission des caractères héréditaires ainsi que les mécanismes de la sélection naturelle.

L'association de la génétique, de la paléontologie, de la biogéographie conduisit à l'élaboration de la Théorie synthétique de l'évolution en 1947 qui proposait un modèle à l'origine de la biodiversité par le mécanisme de la sélection naturelle.

Le recours à la biologie du développement permit d'amorcer la compréhension des processus évolutifs (l'évo-dévo).

La théorie de l'évolution a révolutionné les classifications du vivant. En polarisant les caractères, les méthodes cladistiques ont conduit à des taxonomies compatibles avec l'histoire de la vie. Les espèces sont regroupées en fonction de leur ancêtre commun et non plus en fonction de leurs ressemblances souvent trompeuses et philosophiquement orientées.

La biologie du développement permet d'identifier des gènes, comme les gènes à homéoboîte, qui contrôlent la mise en place des plans d'organisation, en particulier la régionalisation du corps ainsi que les différentes polarités. Ces gènes sont conservés au cours de l'évolution.

Les résultats de la génétique du développement montrent que l'évolution ne fonctionne pas par des mutations sur les gènes qui contrôlent le développement mais plutôt sur les séquences régulatrices non codantes de ces gènes. Un tel mécanisme conduit à une évolution des organismes à partir d'un nombre réduit de gènes à effet pléiotropique.

Les mécanismes de modification des plans d'organisation constituent un domaine d'étude. Leur élucidation est nécessaire à la compréhension de ces grands sauts évolutifs. »

Extraits du livre « Faits et mécanismes de l'évolution biologique », Louis Allano et Alex Clamens, 2010.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'implication des complexes Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG) au cours du développement embryonnaire de l'ascidie *Ciona intestinalis*.

Ces deux complexes, classiquement étudiés chez la drosophile, sont connus pour réguler l'expression des gènes homéotiques au cours du temps.

Le premier chapitre de l'introduction porte sur le rôle des protéines de ces deux groupes dans la régulation épigénétique de la chromatine. J'y aborde les aspects généraux de l'organisation structurale de la chromatine et de son rôle sur l'expression génique puis décris les différentes modifications épigénétiques des histones et des nucléosomes. Ensuite, je présente les mécanismes de régulation de la chromatine qui dépendent des protéines des PcG et TrxG. Cette description mécanistique est basée sur les données connues chez la drosophile puisqu'aucune description n'a été faite à ce jour chez *Ciona*. Enfin, je fais un point sur les aspects évolutifs de la régulation des gènes homéotiques par ces deux groupes protéiques aux rôles antagonistes et mets en évidence l'intérêt d'étudier cette régulation génique chez *Ciona*.

Le second chapitre porte de manière générale sur *Ciona intestinalis*, modèle d'étude classiquement utilisé dans notre laboratoire. Son cycle de vie et plus précisément son développement embryonnaire y sont présentés.

La partie présentant les résultats obtenus comporte deux chapitres étroitement connectés traitant de l'implication de trois protéines des PcG et TrxG au cours du développement embryonnaire de *Ciona* : le premier chapitre (sous forme d'un article en préparation) étudie l'implication de la protéine Enhancer of zeste (E(z)), appartenant au PcG, et le second concerne les implications des protéines Polyhomeotic (Ph) et Trithorax (Trx).

Une partie « discussion et perspectives » est consacrée à une réflexion venant étayer les résultats.

Une dernière partie décrit les matériels et méthodes utilisés.

Introduction

CHAPITRE 1 : Régulation épigénétique de la chromatine par les protéines des groupes Polycomb et Trithorax

I – Organisation de la chromatine et expression génique

I-1- La chromatine

Les noyaux des cellules eucaryotes contiennent le patrimoine génétique constitué par l'ADN. Cet ADN génomique est porté par les chromosomes qui sont facilement observables en microscopie optique. L'ADN est condensé dans une structure, découverte en 1880 par Walther Flemming, nommée chromatine. Elle possède deux niveaux de compaction : l'euchromatine, peu compacte et donc moins dense à la lumière et l'hétérochromatine, très compacte et plus dense à la lumière.

Cette structure reflète la relation structuro-fonctionnelle de la chromatine : l'euchromatine correspond à une zone riche en gènes et est active transcriptionnellement tandis que l'hétérochromatine représente une zone pauvre en gènes et est peu transcrite. Cependant la chromatine n'est pas une structure figée, elle est modifiée au cours des cycles cellulaires.

L'ADN nu présent dans une cellule humaine diploïde ($2 \times 3,3 \cdot 10^9$ paires de bases) mesure environ deux mètres (Maeshima and Eltsov, 2008). Tel quel, sans protéine chromatinienne, il serait impossible qu'il soit contenu dans un noyau de 5 à 20 μm de diamètre. Dans le vivant, l'ADN nu n'existe pas, il est toujours associé à des protéines chromatiniennes qui jouent un rôle architectural fondamental pour la régulation des gènes. Ces protéines sont appelées les histones (Kornberg and Lorch, 1999), et permettent le repliement de l'ADN en structures hiérarchisées et ordonnées (**Figure 1**).

La structure chromatinienne a fait l'objet de nombreuses études afin de déterminer les caractéristiques physico-chimiques de cette organisation et d'identifier les différents types de modification que cette structure peut subir.

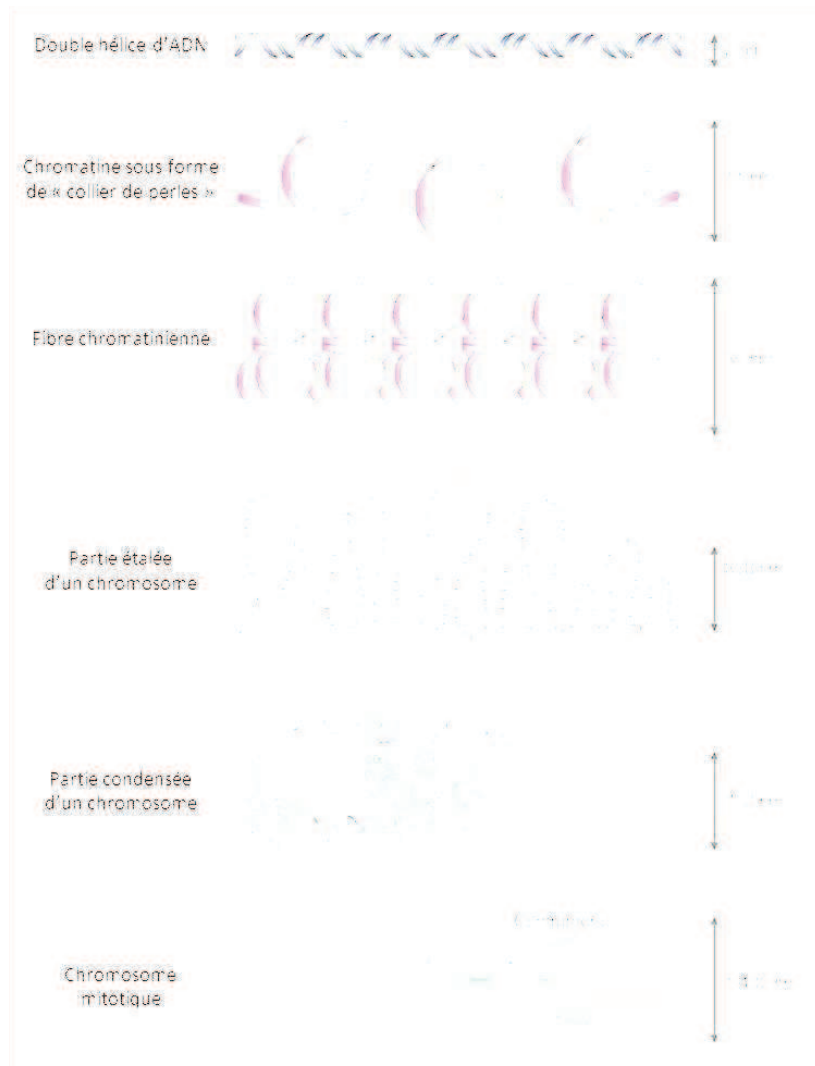


Figure 1 : Représentation schématique des différents niveaux de compaction de la chromatine. (Schlissel, 2003)

Les différentes structures chromatiniennes dictent les propriétés biologiques du génome. Selon le niveau de compaction, la structure chromatinienne permet un accès à l'ADN plus ou moins facile pour les machineries protéiques régulant les grandes fonctions du génome dont la transcription des gènes et la réplication de l'ADN. Cette structure n'est donc pas figée et peut être modifiée en fonction du cycle cellulaire et des besoins de la cellule grâce à des modifications post-traductionnelles des histones ainsi que par des enzymes de remodelage.

I-1-1- L'hétérochromatine et l'euchromatine

En 1928, Heitz observe des noyaux de lichen et note deux niveaux de densité à la lumière de la chromatine. Il nomme l'hétérochromatine, les segments de chromosomes qui apparaissent

très condensés. Le deuxième type de chromatine, plus diffus et plus clair fut nommée euchromatine en 1979 (Passarge, 1979). Depuis il a été montré que ces états chromatiniens ont en effet des différences de structure et qu'il s'agit de compartiments fonctionnels à part entière.

L'hétérochromatine est la partie la plus dense de la chromatine, elle contient peu de gènes exprimés. Elle se trouve généralement en périphérie du noyau et empêche l'activation des gènes. L'hétérochromatine se trouve sous deux formes :

- la forme constitutive, les gènes qui se trouvent sous cette forme sont très peu transcrits. Chez la majorité des organismes, l'hétérochromatine constitutive se forme principalement au niveau du centromère et des télomères des chromosomes. Par exemple, les chromosomes humains 1, 9, 16 et Y contiennent de vastes régions de cette forme constitutive.

- la forme facultative se réfère à des séquences d'ADN qui ne sont pas compactées de manière équivalente entre les différents types cellulaires d'une même espèce. C'est ainsi qu'un même gène peut être réprimé dans certaines cellules et être déréprimé dans d'autres cellules. La formation de l'hétérochromatine facultative peut être modulable durant le développement ou lors de phases du cycle cellulaire, elle est souvent associée à la morphogénèse et la différenciation. Le chromosome X des mammifères est un exemple d'hétérochromatine facultative : il y a une seule copie présente et toujours active dans les cellules mâles tandis que l'un des deux exemplaires de ce chromosome présent dans les cellules femelles est inactivé (Heard, 2005). Les protéines du groupe Polycomb ainsi que des ARN non codants tels que *Xist* (*X-inactive specific transcript*) font partie des composants moléculaires qui régulent la propagation de l'hétérochromatine facultative.

L'euchromatine est la partie la moins dense qui contient le plus grand nombre de gènes transcrits du génome. Elle se trouve essentiellement dans le centre du noyau et se condense uniquement lors de la mitose. Sa structure « ouverte » favorise l'accès à la machinerie de transcription permettant ainsi l'activation des gènes. Contrairement à l'hétérochromatine, l'euchromatine est présente chez les procaryotes et les eucaryotes. Ceci indique que l'hétérochromatine a évolué plus tard avec le noyau en générant probablement un mécanisme capable de traiter l'augmentation de la taille du génome.

I-1-2- Le nucléosome

Le nucléosome est l'unité structurelle de la chromatine. La structure du cœur du nucléosome a été déterminée par cristallographie aux rayons X à haute résolution en 1997 (Luger et al., 1997). Chaque nucléosome est constitué d'un octamère d'histones autour duquel s'entoure 146 +/- 2 paires de bases de la double hélice d'ADN ; cette dernière s'enroule en 1,7 tours autour de l'octamère.

Les histones sont des protéines riches en acides aminés basiques qui permettent l'agencement de la double hélice d'ADN dans les nucléosomes. Elles sont regroupées en deux classes :

- les histones internucléosomales : H1 et H5,
- les histones de la particule cœur du nucléosome : H2A, H2B, H3 et H4.

L'octamère d'histones du nucléosome comprend un hétérotétramère d'histones H3/H4 flanqué de deux hétérodimères d'histones H2A et H2B (**Figure 2**).

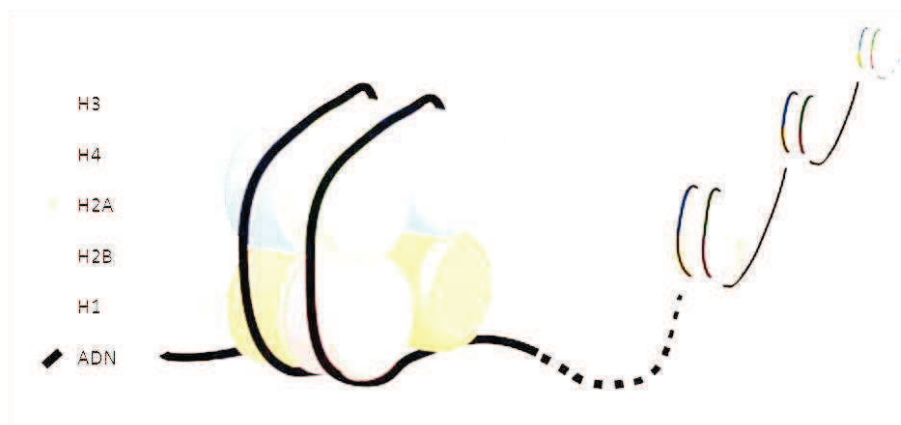


Figure 2 : Schéma d'un nucléosome. (Hamon and Cossart, 2008)

Les nucléosomes se répartissent régulièrement et sont séparés par environ 20-60 paires de bases d'ADN, pour former un collier de perles d'un diamètre d'environ 11 nm. Ce collier présente un taux de compaction de 5 à 10 fois par rapport à l'échelle linéaire (Oudet et al., 1975).

L'histone H1, dite « de liaison », lie l'ADN à l'endroit où celui-ci rentre et sort de la particule de cœur, et scelle ainsi le nucléosome.

Cette chaîne de nucléosomes s'organise en une fibre chromatinienne de 30 nm d'épaisseur (**Figure 1**). Cette structure est plus compacte et présente un ratio d'emballage d'environ 50. Elle résulte du rapprochement des nucléosomes pour former un solénoïde contenant 6 nucléosomes par tour de spire (Finch and Klug, 1976). La stabilisation de cette fibre

chromatinienne est réalisée grâce à la fixation d'histones « de liaison » telle que l'histone H1 dont la partie C-terminale, fortement chargée positivement, interagit avec les charges négatives des groupements phosphates des nucléotides de l'ADN « de liaison », qui n'est pas entouré autour d'un nucléosome, ce qui permet un maintien des nucléosomes dans la fibre chromatinienne (Thoma et al., 1979; Felsenfeld and Groudine, 2003).

Les niveaux de compaction supérieurs pour obtenir un chromosome mitotique, dont le taux de compaction est d'environ 20 000 par rapport à une molécule d'ADN linéaire (Belmont, 2002), restent encore à être étudiés.

I-2- Les histones

Les histones ont été découvertes en 1884 par Albecht Kossel, mais ce n'est qu'à la fin du 20^{ème} siècle que la structure du cœur du nucléosome a été déterminée par cristallographie aux rayons X à haute résolution (Luger et al., 1997; Wood et al., 2005). Ceci a constitué un support essentiel à la découverte des modifications post-traductionnelles que les histones peuvent subir (**Figure 3**).

Les histones nucléosomales (H2A, H2B, H3 et H4) sont des protéines très riches en acides aminés basiques qui permettent l'empaquetage de l'ADN dans les nucléosomes. Elles sont de petite taille (environ une centaine d'acides aminés) et sont très conservées au cours de l'évolution. Elles comportent deux domaines :

- Un corps globulaire central, composé de trois hélices alpha reliées par deux boucles, qui est localisé au centre du nucléosome. Ce corps permet l'interaction avec les autres histones et l'assemblage de l'octamère formant le nucléosome.
- Une extrémité N-terminale, non structurée et très basique car riche en résidus lysine et arginine, qui est disposée à l'extérieur du cœur nucléosomal. Contrairement aux autres histones, l'histone H2A a également sa queue C-terminale disposée à l'extérieur du cœur.

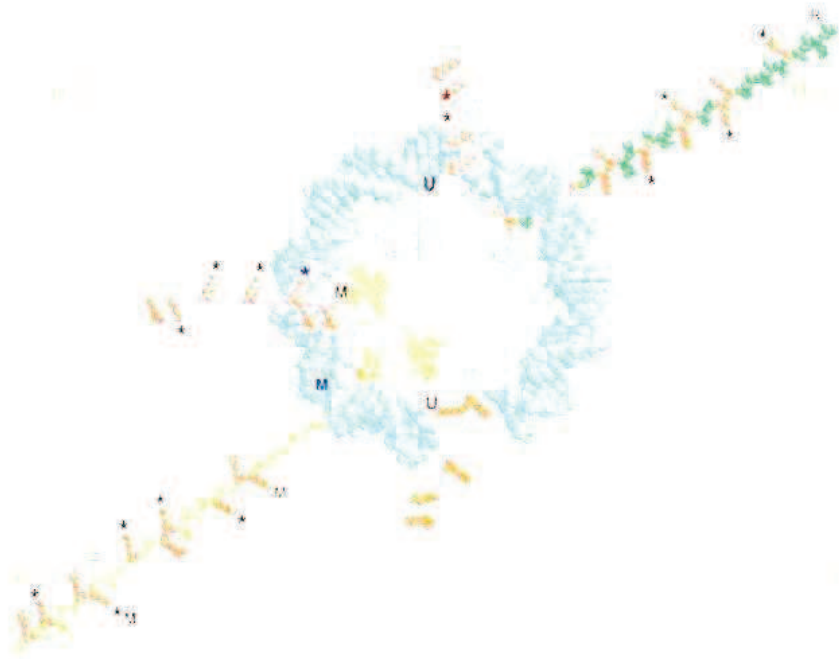


Figure 3 : Schéma représentatif de la structure du nucléosome. (Wolffe and Hayes, 1999)
 L'ADN, en bleu foncé, s'enroule autour des domaines globulaires de l'octamère d'histones. Les queues N-terminales des histones sont représentées en étoile autour de l'ADN. Les résidus arginine et lysine pouvant être soumis à des modifications post-traductionnelles sont marqués en rouge.

Les résidus basiques peuvent interagir avec les résidus phosphates de l'ADN, les autres histones du même nucléosome ou les nucléosomes voisins. Ces interactions renforcent la stabilité de la chromatine alors que leurs perturbations peuvent au contraire la déstabiliser. Des changements dans la charge des queues d'histones *via* des modifications post-traductionnelles vont ainsi modifier ces contacts et moduler les propriétés de la chromatine. Ces queues N-terminales d'histones présentent également des interactions avec des protéines non histones.

Les histones internucléosomales, contrairement aux histones du cœur du nucléosome, sont peu conservées parmi les espèces et ne présentent aucun lien évolutif avec les histones nucléosomales (Shen et al., 1995). Elles sont représentées par l'histone H1 composée par un domaine central non polaire, essentiel pour les interactions avec l'ADN, et deux extrémités N- et C-terminales non structurées, fortement basiques, soumises à des modifications post-traductionnelles. Les histones internucléosomales jouent un rôle dans l'espacement des nucléosomes adjacents ainsi que dans la compaction de l'ADN au sein du nucléosome. Elles peuvent ainsi réguler l'expression génique en influant sur l'accessibilité des facteurs de

transcription spécifiques à leurs sites de liaison, en particulier sur les régions promotrices (Parseghian and Hamkalo, 2001).

I-2-1- Les modifications post-traductionnelles des queues d'histones

La chromatine subit plusieurs types de changements dans sa structure qui influencent la régulation de l'expression des gènes. En effet, les queues d'histones subissent plusieurs modifications post-traductionnelles qui auront pour conséquence de réprimer ou d'induire l'expression d'un gène en fonction des besoins cellulaires.

Depuis la découverte des différents niveaux d'organisation de la chromatine, la question de la compatibilité de cet empaquetage avec la « lecture » de l'ADN a fait l'objet de nombreux travaux. Il est alors apparu que de nombreux aspects de la structure de la chromatine dépendent de mécanismes tels que les modifications dynamiques et réversibles des histones. Ces modifications sont principalement des méthylations, acétylations et ubiquitinylations des résidus lysine et arginine et des phosphorylations des résidus sérine et thréonine (**Figure 4A**).



Figure 4 : Schéma des modifications post-traductionnelles possibles des queues d'histones. (Gräff and Mansuy, 2008) **A)** Représentation schématique des queues N- et C-terminales des histones nucléosomales et de leurs résidus qui subissent des modifications épigénétiques. **B)** « *Cross-talk* » entre les modifications épigénétiques sur la queue N-terminale de l'histone H3. L'influence positive d'une modification sur une autre est représentée par une flèche et les effets négatifs par un trait plat.

Ces modifications post-traductionnelles réversibles sont utilisées par les cellules afin de réguler l'accessibilité de la chromatine et donc de l'expression de l'ADN (Berger, 2002). De plus, ces marques épigénétiques peuvent interagir entre elles pour modifier l'expression génique, ce phénomène est appelé « cross-talk » (**Figure 4B**).

a) Méthylation / Déméthylation

D'un point de vue chimique, la méthylation est une forme d'alkylation avec un ajout d'un groupe méthyl qui remplace un atome d'hydrogène. En biologie, la méthylation contribue à la régulation de l'expression génique ainsi qu'à la fonction des protéines et au métabolisme de l'ARN. Dans le cas de l'expression génique, sa transmission est assurée soit par méthylation de l'ADN, soit par méthylation des histones.

La méthylation des histones se produit sur les résidus lysine et arginine et est catalysée par des enzymes histones méthyltransférases (HMT) appartenant à trois familles de protéines : la famille PRMT (Protein Arginine MethylTransferase), la famille des protéines contenant un SET domaine et les protéines DOT1/DOT1L sans domaine SET (Lachner et al., 2003).

La méthylation des arginines est catalysée par la famille des PRMT et peut avoir des effets activateurs ou répresseurs sur la fonction de la chromatine. Les arginines peuvent être mono et di-méthylées mais la fonction biologique de ces modifications est encore peu connue.

Dans le cas de la méthylation des lysines, il existe six résidus lysines connus comme sites de méthylation : les lysines 4, 9, 27, 36, et 79 de l'histone H3 et la lysine 20 de l'histone H4. La lysine peut être mono-, di- ou triméthylée en fonction de la méthyltransférase associée (Martin and Zhang, 2005). Ces modifications changent les propriétés stériques des histones et induisent la répression ou l'activation des gènes cibles. En règle générale, les méthylations de H3K27, H3K9 et H4K20 sont étroitement liées à la répression de la chromatine tandis que les méthylations de H3K4, H3K36 et H3K79 sont étroitement liées à son activation (Upadhyay and Cheng, 2011). Trois domaines protéiques capables d'interagir spécifiquement avec les lysines méthylées ont été identifiés : le chromodomaine (Fischle et al., 2003; Pray-Grant et al., 2005), le domaine Tudor (Huyen et al., 2004) et le domaine répété WD40 (Wysocka et al., 2005).

Les marques de répression de la transcription : H3K27, H3K9 et H4K20

La méthylation de H3K27 est corrélée à plusieurs processus de répression tels que la répression des gènes homéotiques, l'inactivation du chromosome X ou l'empreinte génomique (Lachner et al., 2001; Margueron and Reinberg, 2011). Au centre de ce système de répression se trouvent les protéines du groupe Polycomb (PcG) (Ringrose and Paro, 2004). La protéine du PcG à domaine SET responsable de cette méthylation est Enhancer of zeste (E(z)) ou son orthologue humain EZH2, et appartient au complexe appelé PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) (Margueron and Reinberg, 2011). H3K27me3 est également un site de liaison pour une autre protéine du PcG, la protéine à chromodomaine Polycomb (Pc) (Fischle et al., 2003; Min et al., 2003). Le mécanisme de répression impliquant cette modification sera développé dans le chapitre II. L'analyse de la distribution des différents statuts de méthylation de H3K27 montre que ce résidu est triméthylé dans les régions cibles des protéines du PcG telles que les gènes homéotiques et est diméthylé de manière ubiquitaire dans l'euchromatine (Ebert et al., 2004).

Le résidu H3K9 peut être mono-, di- ou triméthylé. La triméthylation de H3K9 est catalysée par le domaine SET de la protéine suppressor of variegation 3-9 (Suv3-9h), créant ainsi un site de liaison pour le chromodomaine de la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1) nécessaire à la formation de l'hétérochromatine (Lachner et al., 2001; Nielsen et al., 2001). Cette voie de formation de l'hétérochromatine est très conservée au cours de l'évolution.

H3K9 mono- et diméthylés semblent restreints aux régions euchromatiniennes chez les mammifères (Peters et al., 2003; Rice et al., 2003). Les protéines GLP (G9a related protein), EuHMTase1 chez l'humain, sont les HMT majeures de H3K9 dans ces régions (Tachibana et al., 2005).

La triméthylation de H4K20 est une marque d'hétérochromatine. Les deux protéines à domaine SET, Suv4-20h1 et Suv4-20h2 sont responsables de cette modification et sont localisées dans les régions péri-centriques. Ces deux protéines sont capables d'interagir directement avec des isoformes spécifiques de HP1 (Schotta et al., 2004).

Le niveau de méthylation de H4K20 constitue également une information importante. En effet, H4K20 sous les formes mono- et diméthylée sont trouvées dans des régions non hétérochromatiniennes (Peters et al., 2003; Rice et al., 2003; Schotta et al., 2004).

Le niveau de méthylation dicterait ensuite le recrutement de protéines spécifiques. Cette hypothèse est cohérente avec les différentes localisations des isoformes de HP1 ; HP1 α et β sont localisés au niveau de l'hétérochromatine péricentrique, alors que HP1 γ est localisé au niveau de l'euchromatine (Eissenberg and Elgin, 2000).

Les marques d'activation de la transcription : H3K4, H3K36 et H3K79

Les modifications H3K4 di- et triméthylée sont enrichies sur les gènes transcriptionnellement actifs (Pokholok et al., 2005). H3K4me₂ est distribuée préférentiellement le long du gène alors que H3K4me₃ est plutôt localisée au niveau de l'extrémité 5' des gènes comportant les promoteurs (Bernstein et al., 2002; Santos-Rosa et al., 2002).

Il a été montré, chez *S. cerevisiae*, que la lysine méthyltransférase Set1 est responsable des états de méthylation de H3K4 (Nagy et al., 2002). Cette protéine a ensuite été identifiée chez la drosophile (Ardehali et al., 2011) et l'homme possède également une famille de protéines Set1 HMT (Cosgrove and Patel, 2010).

Chez la drosophile et l'homme, les protéines du groupe Trithorax (TrxG) Trx/MLL et Ash-1 contiennent un domaine SET et présentent une activité HMT dont le mécanisme sera détaillé dans le chapitre II.

Contrairement à la méthylation de H3K4, on connaît très peu de choses sur la fonction des méthylations H3K36 et H3K79. Chez *S. cerevisiae*, la protéine Set2 est responsable de la méthylation de H3K36 et s'associe avec l'ARN polymérase II au cours de l'étape d'élongation (Krogan et al., 2003). La drosophile possède aussi un homologue de Set2 qui joue également un rôle dans la méthylation de H3K36 (Bell et al., 2007).

En ce qui concerne H3K79, l'enzyme responsable de sa méthylation est Dot-1 et ses homologues (Feng and Zhang, 2003). Ce sont les seules lysines méthyltransférases ne possédant pas de domaine SET.

La déméthylation des lysines d'histones

L'identification des enzymes responsables de la déméthylation des lysines d'histones est très récente par rapport à celle des HMT. En effet, l'existence même de ces enzymes avait été mise en question et un mécanisme alternatif à la déméthylation avait été proposé, établissant le remplacement des histones par un variant ou le clivage des queues d'histones (Bannister et

al., 2002). Désormais, l'identification de ces enzymes a permis de montrer que la méthylation des histones est une modification réversible, au même titre que l'acétylation et la phosphorylation.

L'enzyme PAD4, capable de convertir une méthyl-arginine en une citrulline, fut la première découverte dans ce domaine (Wang et al., 2004b). Depuis, deux catégories de déméthylases spécifiques de la lysine des histones ont été découvertes : les enzymes amine flavine-dépendantes et les enzymes contenant le domaine Jumonji C-terminal (JmjC) (Hou and Yu, 2010). L'existence de ces enzymes a rapidement permis d'établir que la méthylation de la lysine est une modification dynamique et réversible, comme toutes les autres modifications des histones.

La LSD1 (Lysine Specific Demethylase1) est la première histone lysine déméthylase à avoir été découverte (Shi et al., 2004). C'est une amine oxydase flavine-dépendante qui déméthyle les H3K4me2/me1 et H3K9me2/me1 ainsi que la protéine suppresseur de tumeurs p53 (Nicholson and Chen, 2009; Shi et al., 2004). Par la suite, il a été montré que l'enzyme LSD2 est impliquée dans la déméthylation de H3K4me2/me1 (Karytinis et al., 2009). Aucune de ces deux LSD ne peuvent déméthyle les lysines triméthylées.

Les protéines à domaine JmjC sont des enzymes hydroxylases qui fonctionnent en tant que déméthylases (Mosammaparast and Shi, 2010; Tsukada et al., 2006). Chez les mammifères, la déméthylase 1A à domaine JmjC (JHDM1A) a été identifiée comme spécifique des résidus H3K36 mono- et di-méthylés (Yamane et al., 2006). Ces enzymes sont très conservées au cours de l'évolution.

L'enzyme JARID1, capable de déméthyle H3K4me3, a été identifiée en 2007 (Lee et al., 2007; Seward et al., 2007) ainsi que deux autres déméthylases de H3K27me3, UTX et JMJD3 (De Santa et al., 2007; Hübner and Spector, 2010).

b) Acétylation / Désacétylation

Parmi les modifications post-traductionnelles connues des histones, l'acétylation est celle qui est le plus étudiée et la mieux caractérisée. Cette modification est presque invariablement associée à l'activation de la transcription. Au niveau des histones, il existe 14 sites possibles d'acétylation, principalement sur les histones H3, H4 et H2B (**Figure 4A**). Les histones sont acétylées et désacétylées sur les résidus lysine de leur queue N-terminale à la surface du cœur

du nucléosome. Ces réactions sont catalysées par deux types d'enzymes très conservées entre levure et l'homme, qui sont l'histone acétyltransférase (HAT) et l'histone désacétylase (HDAC). L'existence de ces deux enzymes aux activités antagonistes montre la réversibilité de cette marque.

Les enzymes HAT permettent le transfert d'un groupement acétyl du cofacteur acétyl-coenzyme A sur la chaîne latérale des lysines. Cette modification neutralise la charge positive du groupement amine et diminue l'interaction des queues d'histones avec les groupes phosphates de l'ADN chargés négativement (Choi and Howe, 2009). En conséquence, la conformation de la chromatine est plus ouverte et permet donc un accès plus facile à la machinerie transcriptionnelle (Imhof and Wolffe, 1998). Le changement de charge des queues d'histones dû à l'acétylation peut également altérer les interactions histone/histone entre nucléosomes voisins, ainsi que les interactions entre histones et protéines non-histoniennes (Tie et al., 2009). Tous ces changements peuvent affecter la structure du nucléosome ainsi que les structures d'organisation d'ordre supérieur. De plus, l'acétylation des nucléosomes autour des sites d'initiation de la transcription pourrait stabiliser la liaison de la chromatine avec d'autres facteurs de remodelage au niveau des régions promotrices (Hassan et al., 2001). Cela pourrait aussi déstabiliser la structure du nucléosome, conduisant à la diminution du niveau d'occupation du nucléosome en amont des sites d'initiation de la transcription et donc faciliter la fixation de l'ARN Pol II (Schones et al., 2008).

Du fait de sa fonction sur la régulation de l'expression génique, l'acétylation des histones participe à de nombreux processus biologiques, tels que la progression du cycle cellulaire (Gatta and Mantovani, 2010; Krebs et al., 2000), la dynamique structurelle des chromosomes (Ekwall et al., 1997), la recombinaison de l'ADN (Kuang et al., 2009; Schlissel, 2000) ainsi que la réparation de l'ADN et l'apoptose (Anamika et al., 2010).

Les enzymes HDAC, permettant la désacétylation des lysines d'histones, ont une action antagoniste aux HAT sur la chromatine, c'est-à-dire qu'elles ont un rôle globalement répresseur. La première HDAC a été identifiée chez les mammifères la même année que la première HAT (Taunton et al., 1996). Cette HDAC est l'homologue du co-répresseur Rpd3p chez la levure. Depuis quatre classes de HDAC ont été identifiées (Wolffe, 1996).

La désacétylation agit d'une part sur la transcription en rendant la structure de la chromatine plus compacte, via la restitution des charges positives des lysines. Mais elle permet également le recrutement de répresseurs contenant des domaines SANT, celui-ci étant un motif retrouvé

dans un grand nombre de co-répresseurs capables de reconnaître les queues d'histones non acétylées (Yu et al., 2003).

Malgré la corrélation générale entre l'état d'acétylation des histones et la transcription, il semble que ce ne soit pas une augmentation stable du niveau d'acétylation qui importe pour l'augmentation de la transcription, mais plutôt l'existence d'un équilibre déplacé vers un haut niveau d'acétylation couplé à une rapide désacétylation. En effet, le temps de renouvellement de l'acétylation des histones peut être très rapide. Les demi-vies d'acétylation les plus courtes, de 1 à 5 minutes, sont associées à des régions actives tandis que les demi-vies les plus longues, entre 30 et 60 minutes, ne corrélaient pas avec une activité transcriptionnelle (Waterborg, 2002). Le temps de renouvellement de l'acétylation des gènes actifs serait donc une variable critique pour leurs niveaux transcriptionnels qui sont déterminés par l'activité globale des HAT et HDAC.

c) Ubiquitinylation

L'ubiquitine (Ub) est une protéine de 76 acides aminés très conservée chez les organismes eucaryotes (Hochstrasser, 1996). Elle est conjuguée à une protéine substrat dans une réaction impliquant trois activités enzymatiques distinctes. L'Ub est d'abord activée par une réaction dépendante de l'ATP par l'enzyme activatrice E1 puis conjuguée à une enzyme E2. Enfin, l'Ub est transférée de l'enzyme E2 sur le résidu lysine cible de la protéine substrat par une enzyme ligase E3. Les substrats peuvent être mono- ou polyubiquitylés. La polyubiquitinylation conduit les protéines à la dégradation alors que la mono-ubiquitinylation oriente la protéine vers une fonction particulière.

Les queues d'histones peuvent être mono-ubiquitylées sur la lysine 119 de l'histone H2A et la lysine 120 de l'histone H2B (Osley, 2006)(**Figure 4A**).

Le fait que H2A^{Ub} se trouve généralement au niveau des promoteurs des gènes cibles réprimés et que la perte de cette marque induise une dérégulation suggère que l'ubiquitinylation de H2A est impliquée dans la répression génique (Higashi et al., 2010; Joo et al., 2007; Nakagawa et al., 2008). Trois enzymes ont été caractérisées pour leur activité E3 ubiquitine ligase-spécifique pour H2A dont la protéine Ring2/RING1B appartenant au groupe Polycomb. La perte de fonction de cette protéine induit une diminution du niveau

d'ubiquitinylation de H2A et résulte en des changements de morphologie cellulaire *in vivo* (Higashi et al., 2010; Wang et al., 2004c).

Plusieurs études ont montré que l'ubiquitinylation de H2B est nécessaire à la méthylation de H3K4 et H3K79 et font de H2B une marque d'activation transcriptionnelle. Cette ubiquitinylation de H2B est donc un exemple de « cross-talk » entre modifications chromatinienne puisqu'elle peut réguler d'autres modifications post-traductionnelles des histones au sein du même nucléosome (Chandrasekharan et al., 2010; Osley, 2006).

Une nouvelle forme de régulation des modifications des histones a été déterminée impliquant la partie N-terminale de H2A. La mutation ou la suppression de cette queue réduit l'ubiquitinylation de H2B ainsi que la méthylation de H3K4. De plus, la restauration de l'ubiquitinylation de H2B chez ces mutants supprime le défaut de méthylation de H3K4, suggérant que la partie N-terminale de H2A régule le « cross-talk » H2B/H3 (Zheng et al., 2010).

L'ubiquitinylation est une réaction réversible, l'Ub peut être éliminée de son substrat par une classe de protéases spécifiques ; UBP chez la levure et USP chez les mammifères (Nijman et al., 2005).

d) Phosphorylation

Les enzymes kinases (phosphorylation) et les phosphatases (déphosphorylation) sont impliquées dans le processus de phosphorylation des histones. Cette modification affecte les histones H1, H2A, H3 et H4 sur le groupement hydroxyle des résidus sérine (Ser) ou thréonine (Thr). La phosphorylation de H3 est la plus étudiée et quatre sites sont connus pour être phosphorylés sur cette histone : Thr3, Thr11, Ser10 et Ser28 (**Figure 4**). Ces modifications post-traductionnelles des histones sont réversibles et particulièrement dynamiques. La phosphorylation de H3 est associée à deux états chromatiniens opposés : les chromosomes mitotiques très condensés et la structure de la chromatine plus accessible observée au niveau des gènes actifs pendant l'interphase (Prigent and Dimitrov, 2003). La présence de marques H3 phosphorylées lors de la mitose suggère un rôle dans la condensation de la chromatine.

Une des modifications les plus importantes de H3 est sa phosphorylation sur la sérine 10 (H3Ser10) qui présente les deux fonctions opposées précédemment citées. Une coopération entre la phosphorylation de H3Ser10 et les acétylations et méthylations de H3 a été mise en évidence. H3Ser10 favorise l'acétylation de H3K14 (Cheung et al., 2000) et inhibe l'acétylation (Edmondson et al., 2002) et la méthylation de H3K9 (Rea et al., 2000), induisant ainsi l'activation de la transcription. Pour sa deuxième fonction, la phosphorylation de H3Ser10, par la kinase Aurora B lors de la mitose, inhibe les interactions entre HP1 et H3K9me dissociant ainsi HP1 des bras chromosomiques (Fischle et al., 2005).

Il faut également noter qu'en interphase, la phosphorylation de H3Ser28 présente une relation inverse avec la méthylation de H3K27 (Lau and Cheung, 2011b). En effet, il a été montré que la phosphorylation de H3Ser28 résultait en une diminution de H3K27me3 au niveau des cibles et donc jouait un rôle d'activateur. De plus, cette diminution de H3K27me3 est corrélée à une acétylation de H3K27 (Lau and Cheung, 2011a).

I-2-2- Le code histone

Vu les incroyables diversité et spécificité biologiques associées aux différentes marques des histones, l'idée a émergé qu'un code serait porté sur ces queues d'histones, pouvant être reconnu par d'autres protéines (Strahl and Allis, 2000). Ce modèle, nommé « code des histones », postule sur le fait que chaque combinaison de modifications post-traductionnelles sur les queues d'histones dicte une fonction biologique spécifique.

Une première vision simpliste de la fonction de ces modifications proposait que chacune de ces marques correspondent à des états transcriptionnels soit actifs soit réprimés. Depuis, une extension de cette idée est que la simple combinaison de ces marques corresponde à une fonction prévisible, mais ce code se heurte toutefois à la réalité expérimentale. En effet, dans de nombreux cas expérimentaux, il n'y a pas de stricte division entre modifications activatrices et répressives et plusieurs de ces marques épigénétiques peuvent se retrouver dans des contextes biologiques contradictoires. La fonction de ces marques post-traductionnelles est donc plus complexe que ce qu'il avait été imaginé initialement.

Au niveau d'une même queue d'histone, la modification d'un résidu peut conditionner des modifications sur d'autres résidus, c'est l'effet en *cis*. Par exemple, la triméthylation de H3K9 empêche l'acétylation de H3K14, de H3K18 et de H3K23. H3K9me3 inhibe également la

méthylation de H3K4 conduisant ainsi à la répression transcriptionnelle. A l'inverse, la méthylation de H3K4 empêche la méthylation de H3K9 (Lachner and Jenuwein, 2002; Nishioka et al., 2002).

Certaines marques fonctionnent donc de manière mutuellement exclusive et d'autres, au contraire, agissent en coopération. Ainsi, le remplacement d'une marque d'acétylation par une marque de méthylation sur H3K9 peut avoir un effet opposé sur la régulation de l'expression des gènes.

De plus, la modification d'un résidu peut conditionner la modification d'autres résidus sur les queues des autres histones, c'est l'effet en *trans*. C'est ainsi que l'ubiquitinylation de H2B est nécessaire pour permettre la méthylation des lysines K4 et K79 de l'histone H3 (Briggs et al., 2002).

De façon non-intuitive, il a été également montré que deux enzymes antagonistes, agissant sur une même modification, peuvent pourtant conduire à un même résultat. Ainsi, l'ubiquitinylation et la déubiquitinylation de l'histone H2A peuvent être associées à une fonction de répression transcriptionnelle Polycomb-dépendante (Scheuermann et al., 2010).

La complexité de ce système de régulation transcriptionnelle est en fait plus complexe du fait de l'existence de domaines chromatiniens, dans des cellules souches embryonnaires de souris (ESC), possédant à la fois la marque d'activation H3K4me3 et la marque de répression H3K27me3, ces domaines sont appelés domaines bivalents (Azucara et al., 2006; Bernstein et al., 2006). Ils correspondent à des gènes codant des facteurs de transcription développementaux. On pense que ces gènes sont transcriptionnellement réprimés ou peu transcrits mais conservent le potentiel d'être activés au cours de la différenciation. Le chapitre II-5-a développe de manière plus approfondie l'importance de ces domaines bivalents lors de la différenciation cellulaire.

Ces données confirment que ces marques ne sont pas irréversibles et permanentes.

Il est donc acquis aujourd'hui que les marques chromatiniennes ne constituent pas un code univoque aisément interprétable. Les modifications constitueraient plutôt un langage nuancé, dans lequel la combinaison des marques et leur environnement doivent être considérés afin de prévoir leur fonction. Le contexte de régulation et le contexte génomique doivent être pris en compte pour comprendre leur signification biologique. Les H3K4me3 et H3K9me3 sont des exemples instructifs : elles peuvent avoir différents rôles qui dépendent de l'autre modification d'histone présente. La combinaison de marques dites « inductibles » H3K4me3 et H3K9me3, détectées dans les régions codantes, indique que la transcription du gène est

donc inductible et dynamique. Au contraire, la combinaison des marques dites « constitutives » H3K9me3 et H4K20me3, au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique, indique une chromatine fermée et réprimée.

I-2-3- Remodelage de la chromatine et modification des histones

En plus des modifications des histones, il existe un autre mode de régulation dynamique de la chromatine qui nécessite l'hydrolyse de l'ATP et implique le mouvement des octamères d'histones pour rendre l'ADN accessible (Becker and Hörz, 2002). Les complexes de remodelage utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour modifier les contacts entre histones et ADN. Environ 30 gènes codant des sous-unités ATPase des complexes de remodelage ont été découverts chez les mammifères. Ces complexes sont des complexes multimériques qui peuvent être divisés en quatre différentes familles : SWI/SNF, ISWI, NURD/Mi-2/DHD et Ino80/SWR1. Ces familles protéiques sont composées d'un domaine ATPase commun ainsi que de domaines spécifiques à chacune d'entre elles (Hogan and Varga-Weisz, 2007).

Grâce à l'hydrolyse de l'ATP, ces complexes de remodelage peuvent affecter les nucléosomes de plusieurs façons (**Figure 5**) :

- par « glissement » (sliding), en déplaçant l'octamère d'histones sur une nouvelle position qui expose l'ADN (Hamiche et al., 1999; Whitehouse et al., 1999; Längst et al., 1999).
- par éjection, en dissociant complètement l'octamère pour exposer l'ADN (Boeger et al., 2003; Boeger et al., 2004; Lorch et al., 1999).
- en relevant les dimères de H2A/H2B, laissant seulement le tétramère central H3/H4 qui expose l'ADN et déstabilise le nucléosome (Bruno et al., 2003; Yang et al., 2007).
- par remplacement de dimères, en échangeant, par exemple, le dimère H2A/H2B par le dimère contenant H2B et un variant de H2A (Mizuguchi et al., 2004).

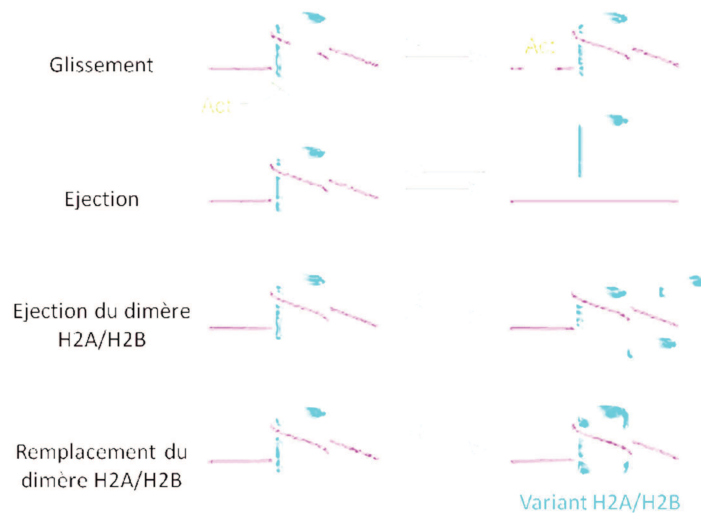


Figure 5 : Schématisation des différents modes de remodelage des nucléosomes. (Cairns, 2007) Les complexes de remodelage permettent l'accès à l'ADN nucléosomal selon ces différents mécanismes. Act = Activateur avec un site de fixation sur l'ADN.

Les facteurs de remodelage dépendant de l'ATP ne fonctionnent pas de manière cohérente. Les complexes BAF (Brahma Associated Factor), appartenant à la famille SWI/SNF des protéines du TrxG, peuvent fonctionner comme activateurs ou répresseurs de la transcription et peuvent même basculer entre ces deux modes d'action au sein du même gène (Kaeser et al., 2008). Une activité tissu-spécifique de ces complexes BAF a été mise en évidence par interaction différentielle avec des facteurs de transcription de différents types cellulaires (Trotter and Archer, 2008).

I-2-4- Méthylation de l'ADN

Comme mentionné précédemment, la transmission de l'expression génique est assurée soit par méthylation de l'ADN, soit par méthylation des histones (paragraphe I-2-1-a).

La méthylation est la seule modification connue de l'ADN et elle est généralement associée à un état chromatinien réprimé inhibant l'activité des promoteurs. Elle a lieu sur les résidus cytosines et adénines chez les procaryotes et uniquement sur les cytosines chez les eucaryotes. Elles semble avoir un rôle dans la répression transcriptionnelle à long terme et est également impliquée dans différents processus biologiques tels que la réparation de l'ADN (Reisenauer et al., 1999), le contrôle de l'initiation de la réplication de l'ADN chez *E. coli* ainsi que dans la formation de l'hétérochromatine.

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN a lieu dans un contexte de dinucléotides CpG, alors que chez les champignons ou les plantes, la méthylation a lieu dans un contexte de séquences symétriques et asymétriques (Bird, 2002). Cependant, la méthylation de l'ADN n'est pas présente chez tous les eucaryotes, elle est en effet absente chez *S. cerevisiae* et chez plusieurs protostomiens tel que le nématode *C. elegans*. De faibles niveaux de méthylation des cytosines ont été rapportés chez la drosophile alors qu'un niveau élevé de méthylation a été mis en évidence chez l'abeille *A. mellifera* (Wang et al., 2006). La méthylation de l'ADN a été également mise en évidence chez *Ciona* en utilisant le 5-aza-2'-deoxycytidine qui bloque la méthylation des CpG. Les embryons ainsi traités perdent les adhérences cellulaires et le développement embryonnaire s'arrête au stade de la neurulation (Sasaki and Satoh, 2007).

La méthylation de l'ADN est catalysée par quatre enzymes ADN méthyltransférases (DNMT) partageant un domaine DNMT conservé :

- DNMT1, qui a pour rôle de maintenir la méthylation de l'ADN au cours de la réplication en copiant la méthylation de l'ancien brin sur le nouveau (Leonhardt et al., 1992).
- DNMT2, qui a une très faible activité *in vitro* et est capable de méthyler un ARN de transfert (Goll et al., 2006).
- DNMT3a et DNMT3b, qui sont responsables de la méthylation *de novo* et sont capables de cibler des sites CpGs non méthylés (Okano et al., 1999).

Deux études, menées chez les mammifères (Kangaspeka et al., 2008; Métivier et al., 2008), démontrent l'existence de déméthylation active de l'ADN et suggèrent que la méthylation de l'ADN est une réaction réversible (Chen and Riggs, 2011). Ces études proposent que des cycles de méthylation et déméthylation ont lieu dans une courte échelle de temps au niveau de promoteurs de nombreux locus transcriptionnellement actifs. Ils suggèrent que la déméthylation de l'ADN est initiée par les mêmes enzymes qui interviennent lors du dépôt de la marque de méthylation, les DNMT3a et DNMT3b.

II- Le système de mémoire cellulaire des groupes Polycomb et Trithorax

Les protéines des groupes Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG) forment un système épigénétique fortement conservé au cours de l'évolution. Ces protéines ont été initialement découvertes il y a plus de soixante ans chez la drosophile. Les actions antagonistes de ces deux groupes sont impliquées dans le maintien de l'état transcriptionnel réprimé ou actif des gènes homéotiques au cours des différents stades du développement. De plus, nous savons aujourd'hui que les protéines du PcG et du TrxG contrôlent l'activation et la répression d'une importante fraction du génome et sont des régulateurs cruciaux de la différenciation et de la programmation génétique.

Ces deux groupes ainsi que les gènes *Hox* (voir chapitre II-4-a) étant plus précisément étudiés chez la drosophile, je me baserai sur ce modèle pour présenter leur identification ainsi que leur mode d'action.

II-1- Le groupe Polycomb

II-1-1- Les gènes du PcG

Le premier gène identifié chez la drosophile comme participant à la régulation de l'expression des gènes homéotiques est le gène *esc* (*extra sex comb*) en 1942 (Slifer). Quelques années plus tard, P. Lewis identifie le gène *Pc* (*Polycomb*). Les mutations de ces deux gènes entraînent des peignes sexuels supplémentaires sur les 2^{ème} et 3^{ème} pattes chez les mâles alors que ces peignes sont normalement présents uniquement sur la 1^{ère} patte. Lewis découvre ensuite que le phénotype de ces mutations est semblable à ceux obtenus avec des mutations gain de fonction des gènes homéotiques. En se basant sur ces observations, il propose que les phénotypes des mutations des gènes *esc* et *Pc* soient causés par la perte d'une répression correcte des gènes homéotiques qui conduit à la transformation d'un segment du corps en un autre. Par la suite, d'autres gènes présentant des phénotypes mutants identiques à *Pc* ont été identifiés par crible génétique. Le PcG a ainsi été défini comme étant un groupe de gènes pour lesquels la mutation individuelle résulte à des phénotypes similaires à ceux des mutants *Pc*. Aujourd'hui, une quinzaine de gènes du PcG ont été identifiés chez la drosophile. Tous les gènes présents chez la drosophile le sont également chez l'ascidie *Ciona intestinalis* à l'exception du gène *Polycomb*.

II-1-2- Les complexes du PcG

Les protéines du PcG sont des régulateurs épigénétiques que l'on peut apparenter à des répresseurs transcriptionnels. Ces protéines jouent un rôle fondamental au cours du développement.

L'hypothèse que les protéines du PcG pourraient exercer leurs fonctions en formant des complexes multimériques a été émise selon deux observations distinctes. Tout d'abord, les effets synergiques d'une double ou triple mutation des gènes du PcG sur les phénotypes homéotiques suggéraient l'existence d'une interaction dose-dépendante entre les protéines du PcG (Cheng et al., 1994). Deuxièmement, ces protéines présentaient une forte colocalisation sur les chromosomes polytènes de drosophile, ce qui suggérait leurs interactions sur les sites de fixation du PcG (Franke et al., 1992). Ceci a ensuite été confirmé par des expériences de co-immunoprécipitation et la purification biochimique des protéines du PcG a permis d'identifier trois principaux complexes : PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1), PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) et PhoRC (Pho Repressive Complex) (**Figure 6**).

| | <i>Drosophila melanogaster</i> | Human |
|------------------------|--------------------------------|---------|
| PcG complexes | | |
| PhoRC | dSfmbt | ? |
| | Pho | ? |
| PRC2 | E(z) | EZH2 |
| | Esc | EED |
| | Su(z)12 | SUZ12 |
| | N55 | RpAp48 |
| | | RpAp46 |
| PRC1 | dRing | RING1A |
| | Pc | HPC1-3 |
| | Pt1 | HPH1-3 |
| | Psc | BM11 |
| | Sm1 | SCMH1-2 |
| TBP-associated factors | | |

Figure 6 : Protéines du PcG chez la drosophile et l'homme. (Schuettengruber et al., 2007)

a) Le complexe PRC2

Le complexe PRC2 contient 4 protéines majeures : E(z) (Enhancer of zeste), Esc (Extra sex comb), Su(z)12 (Suppressor of zeste 12) et Nurf-55. Chacun de ces 4 composants contribue à la capacité du complexe PRC2 à se lier et méthyler les nucléosomes. Ce complexe est

responsable de la marque chromatinienne caractéristique H3K27me3. En effet, le composant clef du complexe PRC2 est la protéine E(z) à domaine SET qui triméthyle la lysine 27 de l'histone H3 (Cao and Zhang, 2004) mais elle accomplit cette action uniquement lorsqu'elle est associée dans le complexe (Czernin et al., 2002; Müller et al., 2002).

Chez la drosophile, la perte de fonction de E(z) entraîne l'absence de méthylation de H3K27me3 indiquant que c'est la seule activité méthyltransférase de ce résidu. La marque H3K27me3 est essentiellement restreinte aux sites cibles des PcG et représente seulement 5 à 10 % du total des histones H3 (Ebert et al., 2004).

Le complexe PRC2 contient également plusieurs autres protéines telles que AEBP2, Pcl (Polycomb like) et JARID2 (Landeira et al., 2010; Nekrasov et al., 2007; Pasini et al., 2010) qui interagissent avec les composants majeurs du PRC2 afin de stimuler leur activité enzymatique (Peng et al., 2009). Leur présence semble essentielle pour l'efficacité du marquage H3K27me3, et en conséquence pour la répression des gènes cibles du PRC2 (Li et al., 2010a; Margueron and Reinberg, 2011). AEBP2, Pcl et JARID2 peuvent également jouer un rôle de recruteur du complexe PRC2 (Li et al., 2010; Walker et al., 2010; Kim et al., 2009).

b) Le complexe PRC1

Chez la drosophile, le complexe PRC1 comprend 5 protéines centrales : Polycomb (Pc), Polyhomeotic (Ph), Posterior sex comb (Psc), Sex comb on midleg (Scm) et dRing (aussi appelé Sex combs extra (Sce)).

Chez les mammifères, chacun des gènes du PRC1 a au moins deux homologues, il faut donc considérer le PRC1 comme une famille de complexes (Vandamme et al., 2011). D'autres protéines interagissant avec les composants du PRC1 ont été identifiées telles que Zeste, Pipsqueak et les facteurs TAF (TATA binding protein Associated Factor) (Breiling et al., 2001; Saurin et al., 2001; Huang et al., 2002). L'interaction des facteurs TAF avec le complexe PRC1 suggère que PRC1 puisse réprimer la transcription en établissant des contacts directs avec la machinerie de transcription.

Le PRC1 est recruté sur la chromatine via le chromodomaine de la protéine Pc qui reconnaît la marque H3K27me3 déposée par la protéine E(z) du PRC2 (Cao and Zhang, 2004). Le PRC1, alors recruté, est capable de déposer une seconde marque, une mono-ubiquitinylation de la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub1), via l'activité E3 ubiquitine ligase de dRing. Cette marque d'histone est associée à la répression transcriptionnelle (Wang et al.,

2004a), H2Aub est présente dans la région promotrice des gènes réprimés, et la déubiquitinylation de H2Aub active l'initiation de la transcription par l'intermédiaire d'un phénomène de « *cross-talk* » avec la marque H3K4me3 (Nakagawa et al., 2008). Le rôle de cette modification n'est pas connue mais elle est déterminante pour la répression des gènes homéotiques par les PcG (Cao et al., 2005).

c) Le complexe PhoRC

Le complexe PhoRC est également impliqué dans la répression des gènes homéotiques (Klymenko et al., 2006). Ce complexe est constitué des protéines Pleiohomeotic (Pho) et dSfmbt (apparentée à Scm). La protéine Pho possède un domaine spécifique de liaison à l'ADN, contrairement aux protéines des complexes PRC1 et PRC2 qui ne contiennent pas de séquence spécifique similaire. Cette protéine peut interagir avec le complexe PRC1 via les protéines Pc et Ph (Mohd-Sarip et al., 2002), ainsi qu'avec le complexe PRC2 via l'interaction avec la protéine E(z) (Wang et al., 2004a). La présence de Pho permettrait au complexe cœur du PRC1 de se fixer de façon spécifique sur les PREs sans requérir la présence du PRC2 (Mohd-Sarip et al., 2005).

La protéine dSfmbt, contenant 4 domaines MBT (Malignant Brain Tumor), se lie spécifiquement sur les marques H3K9 et H4K20 mono- et diméthylées via les répétitions MBT.

Aucune activité enzymatique n'a été attribuée à ce complexe, par contre il constituerait une plateforme sur laquelle viendraient se positionner les complexes PRC2 et PRC1 lors du processus de répression des gènes.

d) Les autres complexes du PcG

En plus des trois complexes majeurs du PcG décrits ci-dessus, plusieurs autres ont été identifiés ces dernières années qui pourraient contribuer à la variété des processus biologiques régulés par les protéines du PcG. La diversité de ces complexes est obtenue soit par des interactions avec d'autres protéines que celles constituant le cœur du PcG, soit par la formation de nouveaux complexes PcG qui ne comprennent seulement que certaines protéines du PRC1.

Le dernier complexe identifié pour avoir un rôle dans la répression PcG-dépendante est le complexe PR-DUB (Polycomb Repressive Deubiquitinase) (Scheuermann et al., 2010). Il contient étonnamment une activité H2A déubiquitylase. Il colocalise avec le complexe PRC1 sur les gènes cibles. Ce complexe PR-DUB montre qu'un équilibre régulé entre l'ubiquitylation et déubiquitylation est essentiel à la répression via les PcG (Joo et al., 2007).

II-2- Le groupe Trithorax

II-2-1- Les gènes du TrxG

Les gènes du Trx ont été définis par leur capacité à contrebalancer l'activité répressive des gènes du PcG dans la régulation des gènes homéotiques chez la drosophile. Le membre central du groupe est le gène *Trithorax* (*Trx*) qui a été isolé en tant que mutation induisant la transformation des segments en ceux plus antérieurs (Ingham, 1985; Ingham, 1998), ceci étant dû à la perte de fonction des gènes homéotiques. Par la suite, deux gènes *Ash1* et *Ash2* ont été isolés par leur phénotype mutant qui impliquait également une perte de fonction des gènes homéotiques. Ces transformations homéotiques induites par leurs mutations ressemblent fortement à celles observées du mutant *Trx*. Par la suite, trois autres gènes ont été isolés et rapportés au TrxG : *brahma* (*brm*), *mora* (*mor*) et *osa*.

II-2-2- Les complexes du TrxG

Comme pour les membres du PcG, les analyses moléculaires et biochimiques des protéines du TrxG ont montré qu'elles s'organisaient en complexes multimériques (**Figure 7**), qui ont pour fonction de maintenir un état transcriptionnel actif des gènes cibles.

| | Drosophile remodeler/activator | Human |
|----------------|--------------------------------|------------------|
| TrxG complexes | | |
| SWI/SNF | Brm | BRM |
| | Osa | BAF250 |
| | Moira | BAF170 |
| | Snr1 | BAF47 |
| NURF | Iswi | SNF2L |
| | N38 | ? |
| | N301 | BPTF |
| | N55 | RpAp46 RpAp48 |
| TAD1 | Trx1 | |
| | dCBP | |
| | Snr1 | |
| Ash1 | Ash1 | |
| | dCBP | |
| MLL1-3 | | MLL1-3 |
| | | WDR5 |
| | | ASH2L |
| | | BLBP5 |
| | | CFP1 |

Figure 7 : Protéines du TrxG chez la drosophile et l'homme. (Schuettengruber et al., 2007)

4 principaux complexes ont été caractérisés ces dernières années chez la drosophile et sont classés en deux catégories : les remodeleurs de la chromatine et les modificateurs d'histones (Strahl and Allis, 2000; Whittaker, 1973; Vignali et al., 2000).

a) Les complexes remodeleurs de la chromatine

Trois des complexes du TrxG sont dans la catégorie des remodeleurs de la chromatine :

- le premier complexe, SWI/SNF (appelé BRM chez la drosophile), contient les protéines Brm, Moira, Osa et Snr1 (Papoulas et al., 1998). Brm possède l'activité ATPase de remodelage du complexe.

- les deux autres complexes, NURF et ACF, contribuent à la fonction des TrxG. Ils contiennent tous les deux l'ATPase ISWI. Le complexe NURF comprend également les trois protéines NURF-301, NURF-38 et NURF-55 (Badenhorst et al., 2002). Dans le complexe ACF, la protéine ACF est liée seulement avec ISWI (Fyodorov et al., 2004).

b) Les complexes modificateurs d'histones

L'un des deux complexes du TrxG ayant une action de modificateur d'histones est le complexe contenant une HMTase nommée Ash1 (Papoulas et al., 1998). Cette enzyme serait

responsable du dépôt de la marque de triméthylation de H3K4 via son domaine SET (Byrd and Shearn, 2003). Cependant, des analyses plus récentes suggèrent que Ash1 méthyle exclusivement H3K36 (Tanaka et al., 2007) et antagoniserait la méthylation de H3K27 médiée par le PRC2 en inhibant directement l'activité enzymatique de ce complexe (Yuan et al., 2011). Ash1 interagit avec la protéine CBP (CREB binding protein), une histone acétyltransférase qui est associée à l'activation de la chromatine (Bantignies et al., 2000).

Le deuxième complexe, appelé TAC1, contient la protéine Trx qui possède un domaine SET capable de trimétyler H3K4 (Smith et al., 2004), CBP ainsi que l'antiphosphatase Sbf1 (Petruk et al., 2001). L'interaction de CBP avec le complexe Ash1 et le complexe TAC1 pourrait suggérer que ces deux complexes agissent ensemble afin de maintenir les états transcriptionnels actifs par la combinaison de la fonction d'acétylation des histones de CBP avec l'activité de triméthylation de Trx et Ash1.

Bien que les mécanismes précis de connexion entre ces complexes ne soient pas précisément connus, certains éléments indiquent que leur association constitue une stratégie générale afin de contrebalancer la répression des gènes par les complexes du PcG.

II-3- Les modèles d'action des groupes Polycomb et Trithorax

Pour comprendre les mécanismes par lesquels les protéines des PcG et TrxG régulent les processus cellulaires, la connaissance des mécanismes qui contrôlent la liaison de ces protéines sur leurs gènes cibles est essentielle. Les protéines des PcG et TrxG régulent, respectivement en inhibant ou activant, la transcription de plusieurs milliers de gènes, y compris de nombreux facteurs de transcription requis pour les décisions cellulaires et qui montrent une expression tissu-cellulaire spécifique.

Ces protéines ne se lient donc pas à un même ensemble de gènes dans tous les types cellulaires. Par conséquent, les mécanismes et les éléments d'ADN qui gèrent la fixation et la dissociation de ces complexes sur leurs cibles doivent contenir des éléments d'une grande spécificité.

II-3-1- PRE / TRE

Les protéines des PcG et TrxG sont recrutées sur leurs gènes cibles via leur association à des séquences d'ADN régulatrices spécifiques appelées Polycomb et Trithorax Response Element

(PRE/TRE). Ces séquences peuvent être situées dans le promoteur proximal des gènes cibles ou à des dizaines de kilobases du site d'initiation de la transcription (TSS). Les séquences PRE et TRE sont des séquences chevauchantes et sont souvent fixées à la fois par les protéines du PcG et celles du TrxG (Chan et al., 1994; Orlando et al., 1998). La taille des PRE connus varie de quelques centaines à un millier de paires de bases et les séquences PRE/TRE se comportent par défaut en tant que PRE.

Les PRE ont été identifiés et caractérisés à différents locus homéotiques et non-homéotiques chez la drosophile (Bloyer et al., 2003; Chan et al., 1994). De plus, plusieurs gènes codant des protéines du PcG présentent un PRE, démontrant ainsi une fonction d'autorégulation de ces protéines (Schuettengruber et al., 2009). Plus de 160 séquences PREs ont été prédites par des approches bioinformatiques dans tout le génome de la drosophile (Ringrose et al., 2003). Par la suite, d'autres études ont permis d'identifier par la technique de «ChIP on Chip» un nombre plus important de PREs, environ 350 (Schuettengruber et al., 2009; Schwartz and Pirrotta, 2007).

Le premier PRE chez les vertébrés a été identifié assez récemment chez la souris (Sing et al., 2009) et les auteurs ont montré que ce PRE, nommé PRE-kr, est capable de recruter les complexes PRC1 et PRC2 en constatant étonnamment que l'affinité de PRC1 pour ce PRE est supérieure à celle du PRC2. Ces résultats suggèrent que les PRC1 et PRC2 pourraient avoir des affinités de liaison différentes et que le recrutement du PRC1 ne dépend pas uniquement du PRC2 chez les mammifères.

Il est important de noter que les PRE et TRE sont des éléments et pas simplement des séquences de nucléotides tels que celles qui sont normalement suffisantes pour le recrutement de facteurs de transcription. Bien que plusieurs facteurs de transcription soient essentiels pour le recrutement des protéines des PcG et TrxG aux niveaux des promoteurs spécifiques, un facteur de transcription unique n'est pas suffisant. Le rôle de ces facteurs dans la fonction des PRE et TRE est encore flou. Certains pourraient fonctionner comme des recruteurs de un ou plusieurs membres des complexes des PcG et TrxG, ils pourraient également participer au déplacement des nucléosomes pour permettre ou non la fixation d'autres protéines.

Dans tous les cas, c'est probablement une combinaison de facteurs qui est nécessaire au recrutement de ces protéines sur les gènes cibles puisque à ce jour aucun d'entre eux n'a été trouvé présent sur tout l'ensemble des sites PcG ou TrxG.

Alors que l'on pensait que chaque protéine de fixation à l'ADN était spécifique au recrutement des PcG et TrxG, ces protéines joueraient plutôt un double rôle. Par exemple

chez la drosophile, la protéine PHO, initialement identifiée comme recruteur des protéines du PcG, est également capable d'interagir avec le complexe Brahma du TrxG (Mohd-Sarip et al., 2002). Le facteur GAF, initialement isolé en tant que facteur du TrxG (Farkas et al., 1994), est également nécessaire à la répression d'un gène rapporteur par le PcG (Hagstrom et al., 1997).

Enfin, les PRE et TRE peuvent permettre de transmettre l'héritage mitotique et méiotique de la répression et de l'activation des protéines respectives des PcG et TrxG. Ainsi, les PRE et les TRE ont été aussi nommés « modules de la mémoire cellulaire » (CMM) (Cavalli and Paro, 1998; Maurange and Paro, 2002).

En résumé, les séquences d'ADN formant les PRE et TRE semblent contenir la plupart des informations nécessaires pour le recrutement des protéines des PcG et TrxG. Vu qu'aucune signature définitive d'un PRE/TRE n'a été identifiée, l'hypothèse la plus probable est que les protéines des PcG et TrxG puissent être recrutées de plusieurs façons par différentes combinaisons protéiques.

II-3-2- Recrutement des complexes protéiques des PcG et TrxG

a) Répression de la transcription

Chez la drosophile, le mécanisme de répression transcriptionnelle PcG-dépendante implique l'activité de 5 complexes multimériques : PRC1, PRC2, Pho-RC, dRAF et PR-DUB (**Figure 8**). Les protéines de liaison à l'ADN du complexe PhoRC ont un rôle central dans le recrutement des complexes du PcG au niveau du PRE de leurs cibles. Ces protéines vont d'abord recruter le complexe PRC2 au niveau des PRE par l'intermédiaire des facteurs de recrutement Pho. Grâce au domaine SET de la protéine E(z), le complexe PRC2 va ensuite trimétyler le résidu H3K27. L'association de la protéine Pcl avec la protéine E(z) du PRC2 permet un niveau élevé de marques H3K27me3 sur la chromatine. Cette marque sera ultérieurement reconnue par le chromodomaine de la protéine Pc du complexe PRC1 et va donc induire la fixation du PRC1 sur la marque H3K27me3. Ce complexe PRC1 va alors déposer une seconde marque sur la chromatine, la H2AK119ub, via l'activité ubiquitine-ligase de la protéine dRing. C'est ainsi que cette marque, en association avec la marque H3K27me3, va maintenir la répression transcriptionnelle des gènes cibles soit en empêchant

l'élongation de la transcription au niveau des TSS des gènes cibles, soit en agissant sur la structure de la chromatine, en s'opposant au remodelage ATP-dépendant par le complexe SWI/SNF du TrxG. Le recrutement du complexe dRAF renforce la répression transcriptionnelle via l'activité de la protéine dKdm2 qui déméthyle la marque active H3K36me2.

Le complexe PR-DUB permet alors la déubiquitinylation de H2AK119ub, l'équilibre régulé entre l'ubiquitinylation et déubiquitinylation semble essentiel à la répression via les PcG.

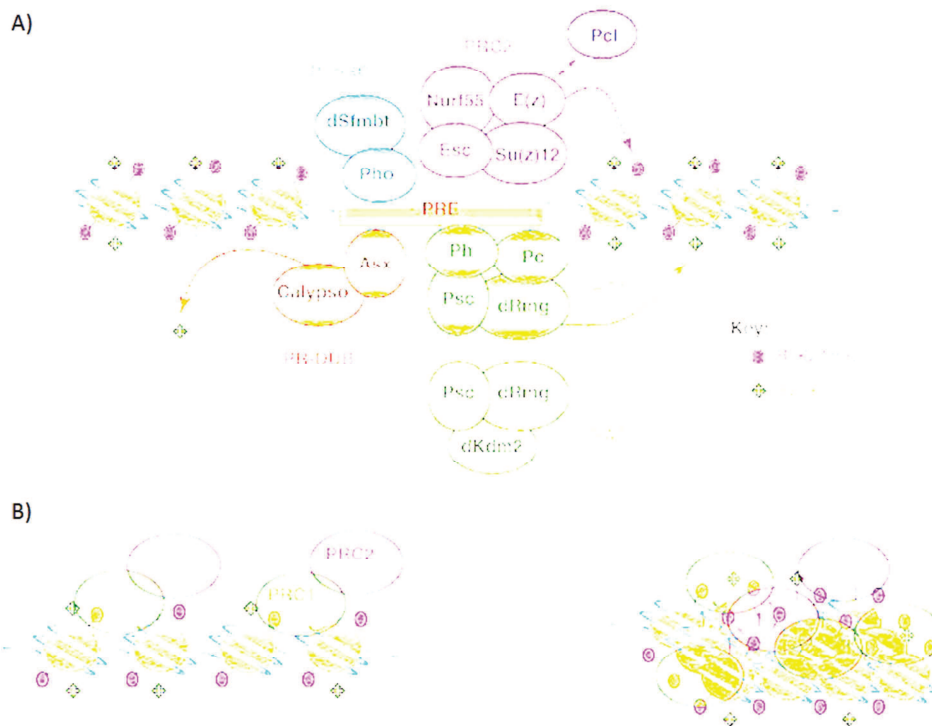


Figure 8 : Mécanisme d'action des complexes Polycomb chez la drosophile. (Bantignies and Cavalli, 2011) **A)** Représentation schématique : les complexes PRC1 (en vert foncé) et PRC2 (en violet) sont recrutés sur le PRE par une combinaison de protéines liant l'ADN, y compris le complexe Pho-RC (en bleu). La protéine E(z) du PRC2 triméthyle H3K27. L'association de Pcl avec le PRC2 permet un niveau élevé de H3K27me3. Cette marque de répression est ensuite reconnue par le chromodomaine de la protéine Pc du PRC1. La protéine dRing du PRC1 est responsable du dépôt d'une autre marque de répression, la mono-ubiquitinylation de H2AK119. Les protéines dRing et Psc peuvent être également présentes dans le complexe dRAF (en vert clair). Ce complexe dRAF contient dKdm2, une déméthylase de la marque active H3K36me2. Etonnamment, le complexe PR-DUB déubiquitine la marque H2AK119ub, et forme ainsi un équilibre essentiel à la répression via les PcG, régulé entre l'ubiquitinylation et déubiquitinylation. **B)** Représentation schématique de la compaction de la chromatine via les complexes PRC1 et PRC2.

b) Activation de la transcription

Le mécanisme d'activation transcriptionnelle TrxG-dépendante reste encore assez mystérieux.

Cet état d'activation, qui se traduit par une ouverture de la chromatine, s'accompagne notamment du dépôt de la marque active H3K4me3 par la protéine Trx (Smith et al., 2004). Une deuxième marque d'activation est déposée par la protéine Ash1, grâce à son activité HMTase, qui diméthyle le résidu H3K36. L'interaction de la protéine Ash1 avec la protéine CBP permet à celle-ci d'acétyler la marque de répression H3K27me3 et par conséquent de contrebalancer le système via cette nouvelle marque d'activation H3K27ac.

Ce nouveau code ainsi mis en place peut induire le recrutement du complexe SWI via le bromodomaine de la protéine Brm. La protéine Snr1 du complexe SWI interagit alors avec le complexe TAC1 qui joue un rôle global dans l'élongation de la transcription (Petruk et al., 2008). Le recrutement des complexes SWI et Nurf, grâce à leurs ATPases respectives Brm et Iswi, va permettre le remodelage de la chromatine et donc l'activation de la transcription des gènes cibles des TrxG. Le complexe de l'ARN polymérase II jouerait un rôle déterminant dans le recrutement des complexes du TrxG, ce qui est conforté par l'interaction de la protéine Brm avec l'ARN polymérase II (Armstrong et al., 2002).

De manière plus générale, il faut considérer les protéines du TrxG plutôt comme des anti-répresseurs nécessaires pour prévenir la répression par les protéines du PcG. L'état transcriptionnel des gènes cibles des PcG et TrxG est la résultante d'une balance entre les activités de ces deux groupes antagonistes.

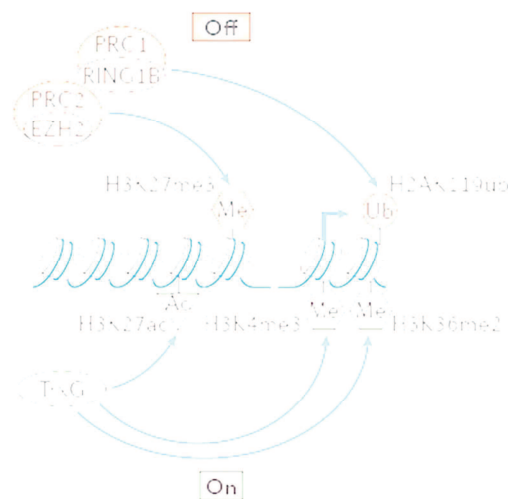


Figure 9 : Schéma récapitulatif des principaux acteurs et marques de la régulation transcriptionnelle des PcG et TrxG. (Schuettengruber et al., 2011) Les complexes protéiques du PcG ainsi que leurs marques répressives spécifiques sont en rouge. Le groupe Trx ainsi que ses marques activatrices sont en vert.

II-4- Les gènes cibles

a) Les gènes homéotiques

Les gènes homéotiques (*Hox*) ont été découverts chez *Drosophila melanogaster* en 1915 (Bridges and Morgan) grâce à des mutations qui transformaient une partie du corps en une autre. Ces gènes, au nombre de huit chez la drosophile, codent tous des facteurs de transcription ayant un même motif de liaison à l'ADN : l'homéodomaine. En effet, tous ces gènes partagent dans leur 2^{ème} exon une région conservée de 180 pb. Cette homéoboîte code un homéodomaine de 60 acides aminés, présentant un motif HLH (Helix-Loop-Helix) qui est responsable de la reconnaissance du site de fixation sur l'ADN par la protéine Hox. Une fois fixée sur l'ADN, la protéine Hox, associée à d'autres protéines, peut jouer son rôle de facteur de transcription pour ses gènes cibles.

Par la suite, il a été montré que les gènes *Hox* sont regroupés en deux complexes, nommés clusters, situés sur le chromosome 3 de la drosophile (Kaufman et al., 1980; Lewis, 1978) :

- le complexe Antennapedia (ANT-C), qui contient 5 gènes homéotiques nécessaires au développement de la tête ainsi que des deux premiers segments thoraciques.

- le complexe Bithorax (BX-C), regroupant 3 gènes homéotiques qui sont impliqués dans le développement du troisième segment thoracique ainsi que dans tous les segments abdominaux.

Remarquablement, ces gènes sont arrangés dans le même ordre génomique que leur domaine d'expression le long de l'axe antéro-postérieur (A-P) du corps, ce phénomène est appelé colinéarité spatiale (**Figure 10**) : plus un gène est situé vers l'extrémité 3' du complexe et plus sa limite d'expression est antérieure, alors qu'un gène situé vers l'extrémité 5' est transcrit plus postérieurement. Chaque gène *Hox* est donc exprimé dans une région spécifique du corps et est nécessaire à la différenciation morphologique de cette région.

Chez les vertébrés, une colinéarité temporelle s'ajoute à cette colinéarité spatiale, puisque tous les gènes antérieurs, situés à l'extrémité 3' du complexe, sont transcrits plus tôt que les gènes postérieurs, situés à l'extrémité 5' du complexe Hox (Ferrier and Minguillón, 2003; Monteiro and Ferrier, 2006).



Figure 10 : Représentation schématique du patron d'expression des gènes homéotiques chez l'embryon de drosophile. (Sparmann and Van Lohuizen, 2006) Haut : zone d'expression des gènes homéotiques chez l'adulte, chaque zone colorée correspond à la zone d'expression du gène homéotique de la même couleur. Milieu : les deux barres multicolores représentent les deux complexes ANT-c et BX-C, chaque couleur correspond à un gène homéotique. Bas : schématisation des parasegments qui composent l'embryon le long de l'axe A-P, la zone d'expression du gène homéotique correspondant est colorée.

Plus tard dans le développement, le patron des gènes homéotiques persiste, suggérant que des gènes peuvent être impliqués dans le maintien de leur expression. En effet, ce sont les deux groupes de gènes à effets antagonistes (Ingham, 1998; Simon et al., 1992), respectivement les protéines du PcG et du TrxG qui vont maintenir le patron d'expression des gènes homéotiques pendant tout le reste du développement ainsi qu'au stade adulte.

Des études utilisant des techniques de génétique moléculaire ont montré que la mutation de plusieurs gènes du PcG provoquait la dérégulation des gènes *Hox* mais que la perte des protéines du PcG n'empêchait pas la mise en place correcte du patron d'expression embryonnaire des gènes *Hox*. Par contre, ce patron dégénère plus tard durant le développement embryonnaire, avec une surexpression des gènes *Hox* dans tous les segments le long de l'axe A-P de l'embryon (Kennison, 1995; Schwartz and Pirrotta, 2007).

Ce maintien du profil d'expression dépend d'un système de mémoire cellulaire qui s'exerce au cours de plusieurs cycles de division cellulaire successifs. Ainsi les protéines du TrxG maintiennent l'état transcriptionnellement actif des gènes homéotiques dans les segments où ils étaient préalablement activés, alors que les protéines du PcG maintiennent l'état réprimé

des segments dans lesquels les gènes homéotiques étaient préalablement inhibés (Moehrle and Paro, 1994). Les protéines des PcG et TrxG forment donc un système de mémoire cellulaire dans le maintien du profil d'expression des gènes homéotiques.

Par la suite, les gènes *Hox* ont été identifiés chez tous les groupes de métazoaires excepté chez les éponges (Boncinelli et al., 1988; Ferrier and Minguillón, 2003; Garcia-Fernández, 2005). L'arrangement de ces gènes en cluster ainsi que le phénomène de colinéarité sont globalement conservés chez les bilatériens. Même si dans certains groupes, les complexes sont éclatés, l'organisation génomique de ces gènes semble être un caractère ancestral des bilatériens.

Les gènes *Hox* étant absents du génome des éponges, il semble alors que ces gènes sont apparus après la divergence des porifères et il est maintenant avéré que les cténophores actuels sont dépourvus de gènes *Hox*, alors que les cnidaires en possèdent.

La plupart des espèces de protostomiens possède des gènes *Hox* dispersés, on retrouve ainsi deux complexes chez la drosophile et trois complexes chez le nématode *C. elegans*. Ces gènes *Hox* appartiennent aux trois sous-groupes : antérieurs, centraux et postérieurs.

Chez les deutérostomiens, l'organisation des gènes *Hox* est bien décrite pour les échinodermes et certains chordés. Chez les échinodermes, 11 gènes *Hox* sont organisés en un complexe unique. Cependant, chez l'oursin aucune colinéarité n'est observée ce qui exclut la présence d'une séquence régulatrice commune au complexe (Monteiro and Ferrier, 2006). Chez le céphalochordé amphioxus, 15 gènes *Hox* organisés en un seul complexe sont présents mais sans colinéarité spatio-temporelle apparente (Holland et al., 2008).

Chez les urochordés, on observe une dispersion du complexe *Hox* qui est totale chez *Oikopleura dioica* et partielle mais importante chez *Ciona intestinalis*. Neuf gènes *Hox* (1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12 et 13) ont été identifiés chez cette dernière (Dehal et al., 2002) mais ils ne sont pas organisés en un réel cluster (**Figure 11**). Ces gènes sont répartis sur deux chromosomes avec des distances intergéniques très longues comprenant même l'insertion de gènes non homéotiques. Il ne semble pas y avoir de réelle colinéarité spatio-temporelle commune à l'ensemble de ces gènes, l'inversion de position du gène *Hox* 10 entre les gènes *Hox* 4 et 5 conforte cette idée (Ikuta et al., 2004). Des expériences de knockdown des gènes *Hox* chez *C. intestinalis* mettent en évidence un rôle limité de ces gènes dans le développement embryonnaire à l'exception des gènes *Hox* 10 et 12 qui ont une implication dans la mise en place du système nerveux et du bout de la queue respectivement (Ikuta et al., 2010).

Enfin chez les vertébrés, deux évènements de duplication du génome ont porté le nombre de complexes Hox à quatre : HoxA, HoxB, HoxC et HoxD. Il existe une colinéarité spatiale et temporelle au niveau de l'expression de ces gènes.

L'ensemble de ces données montre que les gènes *Hox* étaient déjà organisés en un complexe unique chez l'ancêtre des bilatériens et les études phylogéniques ont permis d'établir des relations d'orthologie entre les *Hox* des différentes espèces (**Figure 11**).

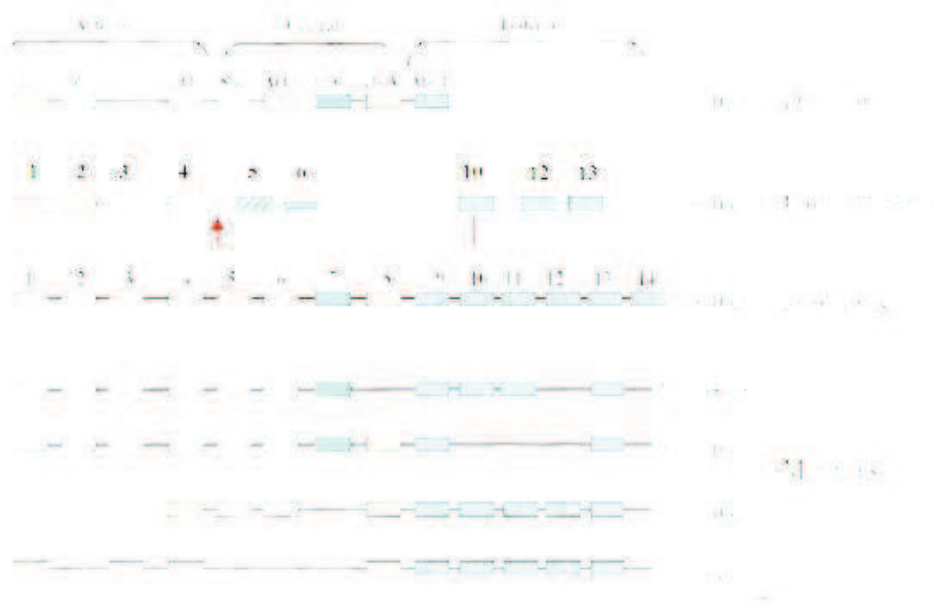


Figure 11 : Représentation de l'organisation des gènes homéotiques chez les mammifères, amphioxus, *Ciona intestinalis* et *Drosophila melanogaster*. (D'après Spagnuolo et al., 2003) La taille des complexes est indiquée sur la droite. Le code couleur indique les orthologues des différentes espèces. La flèche rouge indique un inversement de position du gène *Hox10* entre les gènes *Hox4* et *Hox5*.

On peut constater une variation au niveau de la taille de ces différents complexes (Duboule, 2007). Une forte compaction des quatre complexes mammaliens (environ 100 kb) s'oppose à la taille de l'unique complexe *Hox* d'amphioxus (environ 400 kb). Il n'existe aucune corrélation entre la taille du génome et celle des complexes *Hox* : par exemple, le « pseudo-cluster » *Hox* de l'ascidie *C. intestinalis* (650 kb) est beaucoup plus grand que celui de l'homme alors que son génome est 2 fois plus petit. Par contre, on pourrait expliquer cette observation par les duplications génomiques. En effet, à chaque évènement de duplication génomique, des contraintes de plus en plus importantes se mettent en place au niveau des complexes, telle que le partage de séquences régulatrices entre différents gènes *Hox*.

Bien que les contacts entre les gènes *Hox* ne soient pas essentiels à leur régulation, ils auraient permis de maintenir les gènes *Hox* partiellement ensemble. Il est possible que ces interactions soient le vestige de leur regroupement ancestral dans un seul et même complexe.

b) Les autres gènes cibles

En plus des gènes homéotiques, les complexes des PcG et TrxG contrôlent une importante partie du génome et sont ainsi des régulateurs essentiels de la programmation génomique et la différenciation. Les analyses à l'échelle génomique ont permis d'avoir plus d'informations sur le nombre et les types de gènes cibles des PcG et TrxG (Nègre et al., 2006; Schuettengruber et al., 2009). Ces analyses réalisées chez la souris, l'homme et la drosophile ont montré que les protéines des PcG et TrxG étaient concentrées au niveau des régions promotrices de ces gènes cibles. Ces analyses ont permis d'identifier des gènes cibles des PcG et TrxG extrêmement conservés entre la drosophile et l'homme (Schuettengruber et al., 2007). Ces cibles sont essentiellement impliquées dans les réseaux de régulation transcriptionnelle essentiels pour le développement et la différenciation.

Chez la drosophile, on estime la présence d'environ 200 gènes cibles. Ces gènes codent des facteurs de transcription mais également pour des récepteurs, des protéines majeures des voies de signalisation et de la morphogénèse et, plus généralement, impliquées dans le contrôle du développement. Les protéines des PcG et TrxG participent également à la régulation d'autres gènes que ceux impliqués dans le développement. Des gènes codant des protéines du cycle cellulaire telle que la cycline-A (Martinez et al., 2006) et la cycline-B (Oktaba et al., 2008) ont été identifiés comme cibles chez la drosophile.

Chez les mammifères, les gènes cibles sont estimés à environ 1000 dont la majorité est attribuée aux gènes du développement embryonnaire, et plus particulièrement impliqués dans les processus de différenciation cellulaire (Schuettengruber et al., 2007). Comme attendu, les gènes *Hox* et les gènes du PcG et TrxG eux-mêmes, sont retrouvés parmi ces gènes. De plus, des cibles impliquées dans les voies de signalisation majeures comme Wnt (Wingless-type MMTV integration site), TGF β (Transforming Growth Factor), BMP (Bone Morphogenetic Protein), FGF (Fibroblast Growth factor) et de l'acide rétinoïque ont été également identifiées. Certaines cibles sont également impliquées dans la prolifération cellulaire, ce qui est très étudié chez les mammifères puisqu'elle est associée aux problèmes de cancérisation. Ainsi les gènes humains *Bmi1*, *mel-18*, *Mll*, homologues respectifs des gènes de drosophile *Psc*, *Suz-12* et *Trx*, contrôlent l'expression de régulateurs de la prolifération cellulaire.

II-5- Fonctions biologiques

Les complexes des PcG et TrxG ont longtemps été assimilés à des interrupteurs épigénétiques contrôlant les états fonctionnellement actifs ou inactifs de leurs gènes cibles de façon irréversible. Cette vision est cependant difficile à concilier avec la régulation différentielle au cours du temps d'une grande diversité de gènes récemment identifiés comme cibles du PcG. Certains gènes restent fonctionnellement actifs alors qu'ils sont associés avec les complexes du PcG et d'autres gènes cibles changent leur état de répression au cours de la différenciation cellulaire. Dans certains cas chez les mammifères et la drosophile, les complexes du PcG et H3K27me3 coexistent avec une activité transcriptionnellement significative (Schwartz et al., 2006; Stock et al., 2007).

Les distributions des protéines des PcG et TrxG à l'échelle du génome, décrites chez la souris, les cellules humaines et chez la drosophile, montrent qu'un grand nombre de gènes sont des gènes cibles de ces deux groupes. Ainsi, les PcG et TrxG sont impliqués dans de nombreux processus biologiques (

Figure 12).

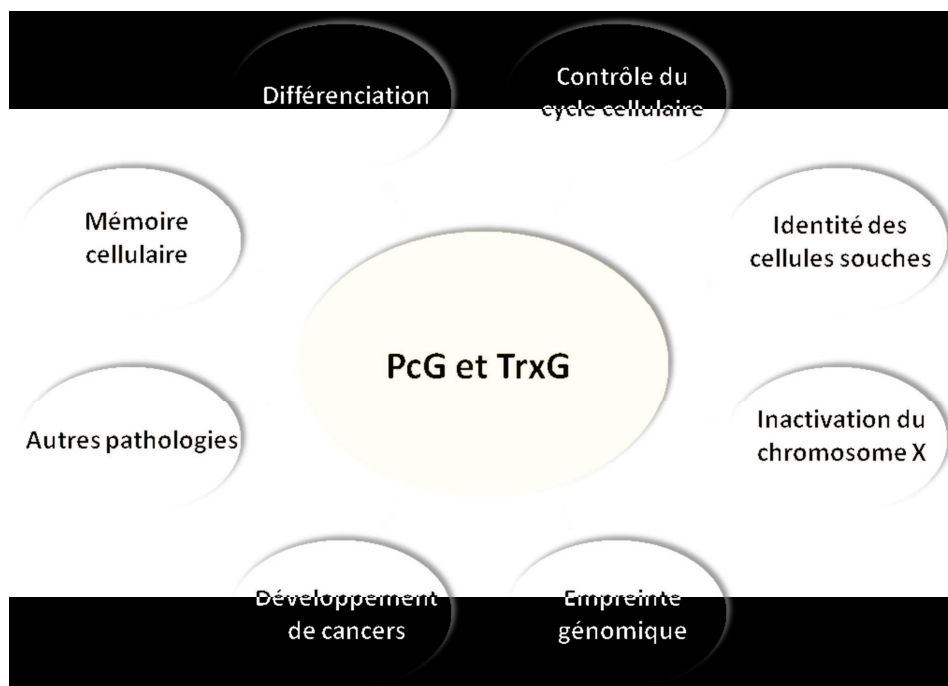


Figure 12 : Implication des PcG et TrxG dans de nombreux processus biologiques.

Des études précurseurs ont montré que les protéines des PcG et TrxG sont impliquées dans la prolifération cellulaire (Martinez and Cavalli, 2006), l'identité des cellules souches (Sparmann and Van Lohuizen, 2006), l'empreinte génomique chez les plantes et les mammifères (Bernstein et al., 2007; Delaval and Feil, 2004; Guitton and Berger, 2005) et l'inactivation du chromosome X femelle (Heard, 2005; Yang and Kuroda, 2007; Leeb and Wutz, 2012). Lorsque l'expression des protéines de ces deux groupes est aberrante, ces deux groupes peuvent également être impliqués dans de nombreuses pathologies telles que les cancers (Hassler and Egger, 2012), les maladies neurodégénératives (*e.g.* la maladie d'Alzheimer) (Bihaqi et al., 2012) et les syndrômes de myélodysplasie qui touchent les cellules souches hématopoïétiques (Xu and Li, 2012).

Toutes ces données suggèrent que les facteurs des PcG et TrxG ne servent pas seulement à maintenir la mémoire des états transcriptionnels des gènes à long terme mais qu'ils sont également impliqués dans la régulation de processus biologiques fondamentaux et cela de façon réversible et dynamique.

a) Implication des PcG et TrxG dans la différenciation cellulaire

La compréhension des rôles cellulaires des protéines du PcG pendant le développement a été possible grâce à des études sur les cellules ES (Surface et al., 2010). Au cours du lignage cellulaire, l'expression génique doit être adaptée pour spécifier la nouvelle identité de la cellule différenciée. Le rôle des protéines du PcG dans le destin des cellules souches a été en partie établi grâce à la cartographie des gènes cibles des protéines du PcG dans les cellules de mammifères et de drosophile. Ces études ont révélé que, dans les cellules ES, les complexes PcG se lient et répriment de nombreux gènes codant des régulateurs du développement et des protéines de signalisation. L'interaction des protéines du PcG avec la chromatine sur ces locus est associée à des niveaux élevés de marques répressives H3K27me3 et H2AK119ub1. Ces gènes cibles des protéines du PcG, réprimés, sont activés lors de la différenciation des cellules ES (Boyer et al., 2006; Stock et al., 2007). La mutation des protéines du PcG (Ring1, SUZ12, EED, ou EZH2) ou leur suppression (Ring1) conduit à une perte de H3K27me3 et H2AK119ub1 et induit ainsi une augmentation de l'expression des gènes du développement aboutissant à des défauts dans la différenciation des cellules ES (Chamberlain et al., 2008; Pasini et al., 2007; Leeb et al., 2010).

Dans les cellules ES, certains gènes cibles sont dans un état nommé bivalent car ils présentent à la fois les marques chromatiniennes de l'état activé et celles de l'état réprimé. Cet état bivalent serait responsable de la réactivation de ces gènes sous l'influence de signaux de différenciation (Bernstein et al., 2006; Mikkelsen et al., 2007).

Les gènes cibles du PcG à «domaines bivalents» sont marqués à la fois par la marque H3K4me3 d'activation et la marque H3K27me3 de répression (Azucara et al., 2006; Bernstein et al., 2006) : ces deux marques colocalisent avec l'ARN polymérase II en pause, en attendant d'entrer dans la phase d'élongation. L'ubiquitylation d'H2A est en grande partie responsable de cet état de pause de la polymérase (Stock et al., 2007).

Lorsque les cellules ES se différencient, les domaines bivalents tendent à préserver soit la marque répressive H3K27me3 soit la marque d'activation H3K4me3 (Margueron and Reinberg, 2011) (**Figure 13**). De plus, la plupart des gènes qui sont réprimés par les PcG dans les cellules ES, et qui ne sont pas activés au cours du lignage, sont *de novo* méthylés sur l'ADN au cours de la différenciation (Mohn et al., 2008). Ainsi, un état plus stable est créé pour les cibles du PcG, une fois leur ADN méthylé par rapport à un état réversible en absence de la méthylation de l'ADN.

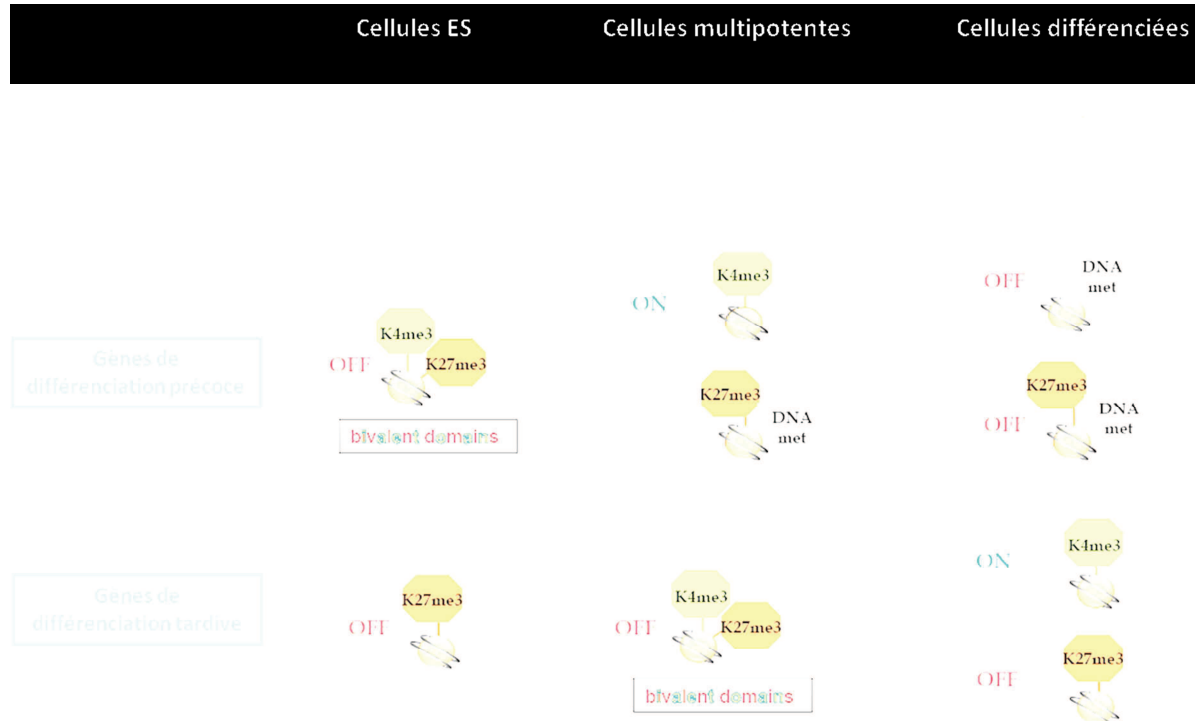


Figure 13 : Dynamique des domaines bivalents lors de la différenciation cellulaire.
(D'après Roure and Bantignies, 2009)

Enfin, il faut noter que les domaines bivalents ne sont pas exclusifs des cellules ES. Ils ont été également trouvés dans d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes ou les précurseurs neuraux (Cui et al., 2009; Mikkelsen et al., 2007). Ces domaines ont été aussi identifiés chez les embryons de poisson zèbre et de manière moins fréquente chez la drosophile, confirmant ainsi leur conservation au cours de l'évolution (Vastenhouw et al., 2010).

b) Implication des protéines du PcG dans le contrôle du cycle cellulaire

Les protéines du PcG sont étroitement connectées au processus de division cellulaire. Elles régulent directement le niveau d'expression de gènes essentiels au contrôle de la prolifération (**Figure 14**). De plus, leur propre niveau d'expression change au cours du cycle et certaines protéines du PcG présentent des associations dynamiques à la chromatine à travers les phases successives du cycle cellulaire.

Par exemple, le niveau d'expression des protéines EZH2 et SUZ12 est fortement réduit dans les fibroblastes humains en arrêt de division alors qu'il augmente rapidement durant l'entrée dans le cycle cellulaire à la transition G₀/G₁ (Bracken et al., 2003).

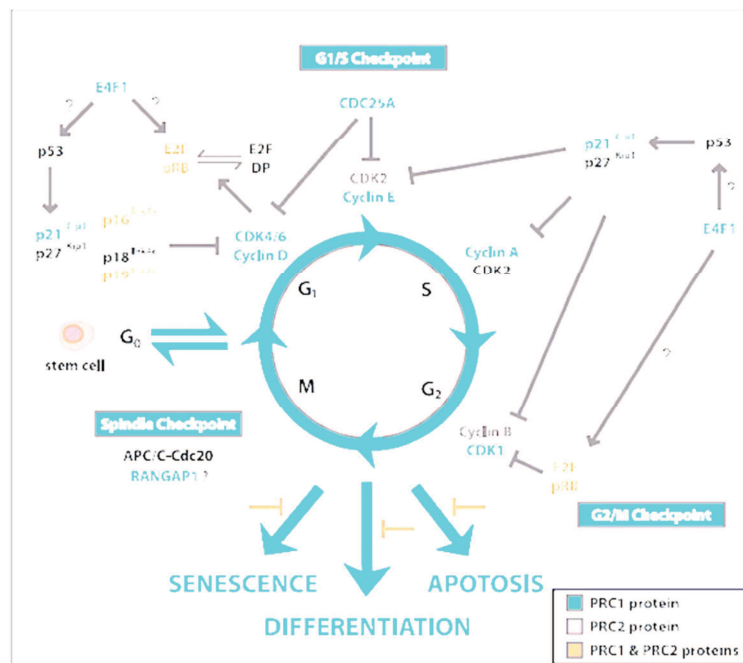


Figure 14 : Points de contrôle du cycle cellulaire régulés par les protéines du PcG. (Sauvageau and Sauvageau, 2010) Les régulateurs du cycle cellulaire réprimés, de manière directe, par les protéines du PRC1 sont indiqués en vert, ceux réprimés par les protéines du PRC2 en violet et en rouge pour les régulateurs réprimés par les protéines des deux PRC humains.

Chez les mammifères, les protéines du PcG ont des effets différentiels sur la prolifération. La première démonstration de l'implication des protéines du PcG dans la régulation du cycle cellulaire a été obtenue grâce à l'étude de la protéine BMI1 (PRC1) dans les cellules ES. En effet, la protéine BMI1 contrôle l'expression du locus CDKN2A (Inhibiteur de la protéine Kinase Cycline-Dépendante 2A), locus essentiel pour la progression de la phase G1 à S.

Par la suite, plusieurs protéines du PcG ont été identifiées pour leur capacité à se lier aux promoteurs de locus impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Maertens et al., 2009).

Par exemple, EZH2 se lie aux promoteurs d'inhibiteurs de CDK, INK4a et 4b, connus pour arrêter le cycle cellulaire en début de phase G1 (Kheradmand Kia et al., 2009). En réprimant ces inhibiteurs de CDK, les protéines du PcG permettent l'activation du complexe cycline D-CDK4/6 et par conséquent la progression du cycle cellulaire.

Les protéines du PcG présentent un autre rôle dans la régulation du cycle cellulaire en arrêtant les cellules en G2/M par la répression de la cycline B et de CDK1 *via* la fixation des protéines du PRC1 sur leurs promoteurs (Dahiya et al., 2001; Sharif et al., 2011).

Par ailleurs, le complexe PRC1 est impliqué dans la régulation de l'initiation de la phase S en provoquant la dégradation de la Geminin qui est un régulateur du cycle cellulaire contrôlant négativement la réplication (Ohtsubo et al., 2008).

Chez la souris, la surexpression d'EZH2 dans des fibroblastes primaires conduit à un blocage de la division (Kamminga et al., 2006). Cette fonction anti-proliférative du PRC2 est impliquée dans la restriction du nombre de cellules progénitrices lymphoïdes et myéloïdes. Dans ce contexte, la fonction du PRC2 est antagoniste à celle du PRC1, ce qui souligne une fois encore la grande complexité des régulations épigénétiques.

L'ensemble de ces données conforte l'idée que la régulation du cycle cellulaire par les protéines du PcG, comme celle de la différenciation, est beaucoup plus dynamique que cela aurait pu être envisagé. De plus, chaque membre du PcG semble être impliqué de façon distincte, à différents niveaux, dans le contrôle du cycle cellulaire.

c) Le PcG et les voies de signalisation

Afin de contrôler la différenciation et le cycle cellulaire, les protéines du PcG régulent plusieurs voies de signalisation chez divers organismes. La cartographie du génome à l'échelle des gènes cibles du PcG dans les cellules de mammifères, de drosophile ou de

poisson zèbre a permis de mettre en évidence que certaines voies de signalisation sont cibles uniquement de quelques sous-unités protéiques du PcG, indiquant une fonction spécifique de certains membres du PcG dans la régulation de leurs cibles.

Implication des complexes du PcG dans la régulation de la voie Notch

La voie Notch est bien conservée dans la transduction du signal dans le développement des métazoaires et sa dérégulation a été associée à des effets oncogéniques (Bolós et al., 2007).

Chez les mammifères, les études génomiques ont convergé vers un contrôle de la voie Notch par les protéines du PcG et chez la drosophile, il a été montré que ces protéines agissent directement sur plusieurs gènes contrôlant différents niveaux dans la cascade de la voie de signalisation Notch (Martinez et al., 2009). Ainsi, les protéines du PcG ciblent à la fois le ligand, le récepteur ainsi que des cibles essentielles de la voie Notch (Schuettengruber et al., 2009). De façon surprenante, Ph est un régulateur négatif de la voie Notch alors que certaines protéines du PRC2 et Pc la régulent activement (Saj et al., 2010). Ces données soulignent que les différentes protéines du PcG ciblent spécifiquement la voie Notch de manière indépendante.

Régulation de la voie Wnt par les protéines du PcG

La voie de signalisation Wnt est un régulateur des cellules souches, son activation a été observée dans de nombreux types de cellules souches et de cancers.

L'implication des protéines du PcG dans la régulation de la voie Wnt a été établie grâce à la cartographie du génome de la drosophile qui a permis d'identifier le gène *Wnt6* comme cible (Tolhuis et al., 2006). L'activation de la voie Wnt avait été précédemment corrélée à une augmentation du niveau d'expression des protéines du PcG suggérant l'existence d'une boucle de rétroaction entre les protéines du PcG et la voie de signalisation Wnt (Klebes et al., 2005; Cho et al., 2012).

Une étude plus récente a montré que la voie de signalisation Wnt est régulée spécifiquement par Psc-Su(z)2 (PRC1) *in vivo* (Li et al., 2010b). La mutation du locus Psc-Su(z)2 rend les cellules incapables de se différencier, ces cellules mutantes continuent à proliférer et provoquent le développement de tumeurs.

Ce résultat démontre que les protéines du PcG n'ont pas uniquement pour cibles des gènes qui sont déterminants pour la différenciation cellulaire, mais également des gènes connus pour leur implication dans le signal d'auto-renouvellement de nombreux types de cellules souches adultes et cancéreuses.

Régulation des protéines du PcG par la voie Ras

A l'inverse, plusieurs voies de signalisation régulent l'expression de certaines protéines du PcG, indiquant que les voies de signalisation peuvent changer les programmes de devenir cellulaire *via* leur action sur les complexes du PcG.

Par exemple, les processus de sénescence cellulaire induisent des signaux de stress qui diminuent le niveau de transcription d'EZH2 dans les fibroblastes humains (Bracken et al., 2007). De façon simultanée, la transcription de la déméthylase JMJD3 est augmentée en réponse à la voie de signalisation Ras (Barradas et al., 2009). Ces deux événements conduisent à la perte de la marque répressive H3K27me3 sur les cibles du PcG, déréprimant ainsi ces gènes.

d) Rôle des marques épigénétiques lors de l'activation du génome zygotique

Durant la première moitié du 20^{ème} siècle, les biologistes ont effectué des observations anatomiques détaillées du développement embryonnaire de plusieurs espèces. L'embryologie comparée a mis en lumière de nombreuses similarités dans les étapes du développement précoce des embryons. En effet, le développement embryonnaire des métazoaires comprend toujours une étape clef et indispensable qui est la reprogrammation transcriptionnelle de l'embryon, ou activation du génome zygotique (AGZ).

Juste après la fécondation, alors que le génome zygotique n'est pas transcrit, le contrôle du développement dépend des ARN messagers et des protéines maternels présents dans l'ovocyte. L'AGZ, concomitante à la dégradation des produits maternels, conduit à la synthèse de nouveaux transcrits qui seront nécessaires aux étapes ultérieures du développement (Tadros and Lipshitz, 2009).

La transition du contrôle maternel vers le contrôle embryonnaire du développement est appelée transition maternelle-zygotique (TMZ). L'activation d'une grande majorité des gènes exprimés lors de l'AGZ dépend de l'activité de la protéine Smaug qui est un des principaux acteurs de cette étape (Tadros et al., 2007). Cette protéine est responsable de la dégradation de répresseurs de l'activation zygotique, qui corrèle avec l'augmentation de la transcription pendant la TMZ (Benoit et al., 2009). La TMZ est très étudiée mais les mécanismes de sa régulation restent encore mal compris. Plus récemment, des études réalisées principalement

chez le poisson zèbre, la souris et le xénope mettent en évidence une implication de certaines marques épigénétiques déposées par les PcG et TrxG dans le contrôle de ce processus.

Lors de la TMZ, il y a une dégradation spécifique des transcrits maternels et la reprogrammation de l'expression génique permet la synthèse des transcrits zygotiques. Chez tous les métazoaires, la TMZ se déroule en deux phases (**Figure 15**) : une première phase dite « mineure » pendant laquelle les ARNm maternels sont dégradés et les ARNm zygotiques commencent à être synthétisés et une seconde phase dite « majeure » pendant laquelle les ARNm zygotiques sont synthétisés et transcrits.

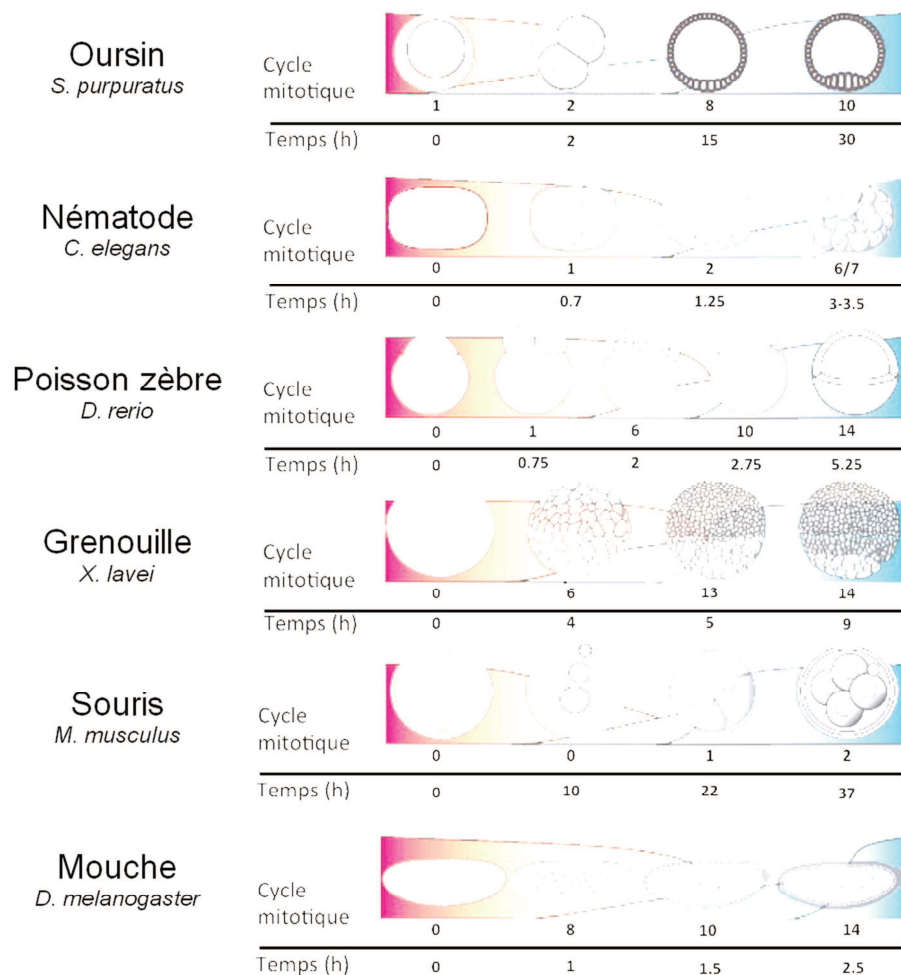


Figure 15 : Schéma comparatif de la transition maternelle-zygotique (TMZ) chez différentes espèces. D'après Tadros and Lipshitz, 2009. Représentation des premières étapes du développement embryonnaire précisant les cycles mitotiques et le temps post-fécondation correspondant. La quantité d'ARNm maternels est schématisée en rouge, celle des ARNm nouvellement synthétisés lors de la vague mineure d'activation du génome zygotique (AGZ) en bleu clair et celle de la vague majeure d'AGZ en bleu foncé.

Le déroulement de l'AGZ varie d'une espèce à l'autre. Chez le xénope, la transcription embryonnaire débute lors de la transition mid-blastula (TMB) (Bogdanović et al., 2012) (Figure 16 : Statuts des marques épigénétiques lors de la TMB du xénope. (Bogdanović et al., 2012) Le niveau de dépôt de la marque d'activation génique H3K4me3 est représenté en vert, celui pour la marque de répression génique H3K27me3 est en rouge et la méthylation de l'ADN est représentée en gris. **Figure 16**). Cependant, de très faibles niveaux de transcription ont pu être observés avant la TMB, par exemple pour le gène *Nodal* dont l'expression est corrélée à un enrichissement de la marque d'activation H3K4me3 sur son promoteur (Skirkanich et al., 2011; Blythe et al., 2010). Le dépôt de cette marque précède l'activation transcriptionnelle de l'embryon en favorisant une conformation plus ouverte et donc accessible de la chromatine (Akkers et al., 2009) ; ceci a également été mis en évidence chez le poisson zèbre (Vastenhouw et al., 2010).

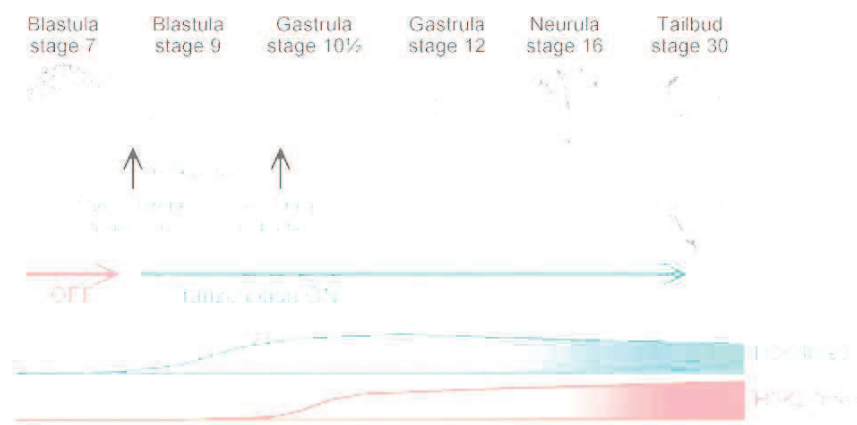


Figure 16 : Statuts des marques épigénétiques lors de la TMB du xénope. (Bogdanović et al., 2012) Le niveau de dépôt de la marque d'activation génique H3K4me3 est représenté en vert, celui pour la marque de répression génique H3K27me3 est en rouge et la méthylation de l'ADN est représentée en gris.

Après la TMB chez le xénope, une répression génique spécifique se met en place grâce, entre autres, au dépôt de la marque répressive H3K27me3 par le PRC2. En effet, des études par spectrométrie de masse quantitative ont mis en évidence un changement global au niveau des marques post-traductionnelles des queues d'histones qui se traduit par le passage d'un état transcriptionnellement actif à un état transcriptionnellement réprimé pendant le développement à partir du stade blastula jusqu'à la mise en place de la queue (Schneider et al., 2011). De plus, la répression transcriptionnelle dépendante de la méthylation de l'ADN est mise en place à la fin de la neurulation et est essentielle lors de l'organogénèse du xénope (Bogdanovic et al., 2011).

Chez la souris et le poisson zèbre, l'activité transcriptionnelle débute au stade 2 cellules et 512 cellules, respectivement (Albert and Peters, 2009; Kane and Kimmel, 1993). Il a été montré que le statut des méthylations des résidus lysines des queues d'histones varie considérablement au cours du développement embryonnaire précoce. Par exemple, chez la souris, les marques répressives H3K27me2/me3 sont déposées par EZH2 sur le génome paternel et sont ensuite maintenues sur le génome maternel avant le premier clivage (Puschendorf et al., 2008) (**Figure 17**).

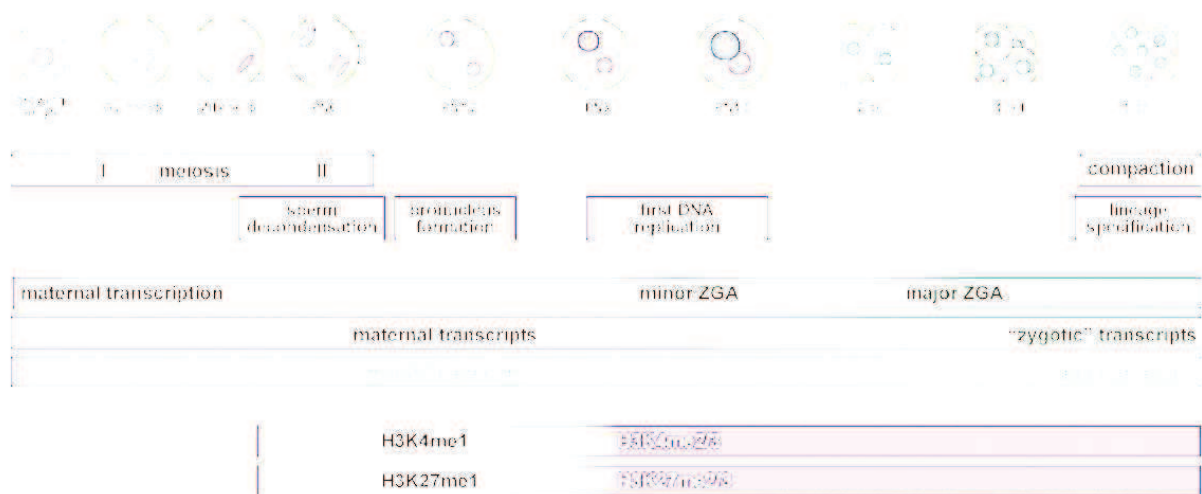


Figure 17 : Statuts des marques épigénétiques lors de l'AGZ chez la souris.
(Albert and Peters, 2009).

Une caractéristique du développement embryonnaire précoce du poisson zèbre est que les produits des gènes maternels assurent le développement jusqu'au stade 512 cellules, stade à partir duquel la transcription zygotique est activée. Pendant ces premiers cycles de division cellulaire, la majorité des blastomères sont identiques et dépourvus de méthylation d'ADN ainsi que de marques activatrices telles que H3K4me3 et H3K36me3 (MacKay et al., 2007; Vastenhouw et al., 2010; Lindeman et al., 2011). Après l'AGZ, une grande majorité des gènes présentent la marque H3K4me3 et certains gènes présentent également la marque répressive H3K27me3 sur les domaines bivalents (cf chapitre II-5-a) (Pour revue, Cayuso Mas et al., 2011). Les travaux d'Andersen et de ses collaborateurs (2012) suggèrent que l'enrichissement en marques H3K9me3 et H3K27me3, pendant l'AGZ, est associée à un remodelage localisé de la chromatine dû à la densité de la marque H3K4me3 ; ils instaurent donc le terme de co-

enrichissement en marques épigénétiques des queues d'histones sur certains domaines impliqués de façon répressive ou activatrice dans la régulation génique.

De cela, il ressort que l'AGZ présente des modalités différentes d'un organisme à un autre. A ce jour, cette phase critique du développement précoce n'a pas fait l'objet d'études approfondies chez les ascidies mais nos résultats obtenus en RT-qPCR chez *Ciona intestinalis* permettent d'envisager une activation très précoce du génome zygotique.

De plus en plus de données récentes impliquent les mécanismes épigénétiques, notamment les marques déposées par les complexes des PcG et TrxG, dans l'établissement du programme embryonnaire au moment de l'AGZ. Cette implication des marques épigénétiques des queues d'histones suggère un rôle essentiel dans l'initiation de la régulation transcriptionnelle zygotique.

e) PcG et cancer

Il est maintenant clairement établi que les protéines du PcG jouent un rôle important dans la prolifération tumorale et les cancers (Lin et al., 2011; Sauvageau and Sauvageau, 2010)(**Figure 18**). Le tableau de la Figure 18 recense les composants des PRC1 et PRC2 impliqués dans différents types de cancers. Ces protéines, lorsqu'elles sont dérégulées, peuvent agir comme des proto-oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs.

Dès les premiers stades du développement néoplasique, les modifications épigénétiques peuvent, comme les mutations génétiques, perturber de multiples voies biologiques en favorisant le risque de cancer. Le fait que les défauts épigénétiques, à la différence des mutations génétiques, soient potentiellement réversibles, permet d'envisager des thérapies visant à rétablir la répression ou l'activation épigénétiques normales. Pour cela, une bonne compréhension de la cause de ces dérégulations épigénétiques ainsi que de leurs impacts sur l'expression des gènes cibles est d'une importance capitale.

La première protéine du PcG identifiée pour sa fonction de proto-oncogène est BMI1 (PRC1) qui inhibe des inhibiteurs du cycle cellulaire (Van Lohuizen et al., 1991). De façon remarquable, alors que BMI1 est un proto-oncogène, son homologue Mel18 agit comme suppresseur de tumeurs. Son expression est diminuée dans les lignées du cancer du sein et

conduit à la répression de l'activité des complexes cycline/CDK (Matsuo et al., 2002). De plus, cette protéine régule négativement l'auto-renouveau des cellules souches hématopoïétiques et favorise leur différenciation (Kajiume et al., 2004). Seulement 30% des gènes cibles de BMI1 sont communs à Mel18. Ces actions opposées montrent que malgré leur homologie, ces deux protéines possèdent des fonctions spécifiques et antagonistes. Ces données montrent que les protéines du PcG semblent pouvoir cibler, directement ou indirectement, des gènes suppresseurs de tumeurs dans certaines conditions et des proto-oncogènes dans d'autres cas.

| Subunit | Aberrant Expression | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|--|
| | Expression | Cancer Type |
| PRC2 Components | | |
| Ezh2 | overexpression and/or amplification | B cell non-Hodgkin lymphomas, ¹ bladder cancers, ^{1,11,12} breast cancers, ^{1,11,12} colon cancers, ^{1,11} glioblastoma, ¹ Hodgkin lymphomas, ¹ oral cancers, ¹ liver cancers, ¹ lung cancers, ¹ lymphoma, ¹ mantle cell lymphomas, ¹ melanomas, ¹ prostate cancers, ^{1,11} testicular cancers ¹ |
| Suz12 | overexpression and/or amplification | breast cancers, ¹ colon cancers, ^{1,11} germinal cell-derived tumors, ¹ liver cancers, ¹ lung cancers, ¹ mantle cell lymphomas, ¹ melanomas, ¹ parathyroid and pituitary adenomas ¹ |
| Pc10 Phf19 | overexpression | colon cancers, ¹ skin cancers, ¹ lung cancers, ¹ rectal cancers, ¹ cervical cancers, ¹ uterus cancers, ¹ liver cancers ¹ |
| PRC1 components | | |
| Cbx7 | overexpression loss | follicular lymphoma ¹ pancreatic cancers ¹ |
| Phf1 | loss of heterozygosity | acute lymphoblastic leukemias ¹ |
| Phf8 | loss of heterozygosity | Osteosarcomas ^{1,11} |
| Bmi1 | overexpression and/or amplification | acute myeloid leukemias, ¹ breast cancers, ¹ gastrointestinal tumors, ¹ lymphomas, ^{1,12} medulloblastomas, ¹ neuroblastomas, ¹ lung cancers, ¹ parathyroid and pituitary adenomas ¹ |
| Pof2 Mel18 | loss | cutaneous squamous-cell carcinomas, ¹ gynecological tumors, ¹ prostate cancers, ^{1,11} |
| Ring1a | loss | clear-cell renal-cell carcinomas, ¹ testicular germ-cell tumors ¹ |
| Ring1b | overexpression | bladder cancers, ¹ breast cancers, ¹ colon tumors, ¹ gynecological tumors, ¹ kidney cancers, ¹ larynx cancers, ¹ liver cancers, ¹ lung cancers, ¹ lymphomas, ¹ melanomas, ¹ pancreatic cancers, ¹ parathyroid and thyroid cancers, ¹ prostate cancers, ¹ skin cancers, ¹ thymus cancers, ¹ urinary tract cancers ¹ |
| Mutations | | |
| Subunit | Type of Mutation | Cancer Type |
| PRC2 Components | | |
| Ezh2 | missense | diffuse large B cell lymphomas, ¹ myelodysplastic myeloproliferative syndromes ^{1,11} |
| Epc1 | truncation | acute lymphoblastic leukemias ^{1,11} |
| PRC1 Components | | |
| Phf8 | missense | osteosarcomas ^{1,11} |
| Asx11 | frameshift, truncation | acute myeloid leukemias, ¹ myelodysplastic myeloproliferative syndromes ^{1,11} |
| Chromosomal Translocations | | |
| Subunit | Fusion Gene Partner | Cancer Type |
| PRC2 Components | | |
| Suz12 | Juaf1 | endometrial stromal sarcomas ^{1,11} |
| Pc11 Phf1 | Juaf1, Epc1 | endometrial stromal sarcomas ¹ |
| Epc1 | Asx12 | acute lymphoblastic leukemias ¹ |
| PRC1 Components | | |
| Asx12 | Epc1 | acute lymphoblastic leukemias ¹ |

Figure 18 : Expressions, mutations et translocations chromosomales des gènes du PcG dans les cancers. (Sauvageau and Sauvageau, 2010)

Bien que BMI1 soit sans doute la protéine la plus fortement associée au développement néoplasique, plusieurs autres membres du PcG sont aussi liés à la tumorigénèse et sont surexprimés dans une importante variété de cancers humains (Piunti and Pasini, 2011).

Par exemple, la protéine EZH2 est régulée positivement dans certains lymphomes et cancers du sein et de la prostate (Valk-Lingbeek et al., 2004; Fujii et al., 2011). La surexpression d'EZH2 est rare dans les premiers stades du cancer de la prostate mais beaucoup plus commune dans les stades tardifs, soulignant sa fonction potentielle dans la progression tumorale (Saramäki et al., 2006). La protéine EZH2 a été classifiée comme un proto-oncogène mais son inactivation ne semble pas inhiber la prolifération cellulaire dans tous les modèles de lignées cellulaires pour le cancer de la prostate (Karanikolas et al., 2010). Ce résultat suggère que, bien qu'il y ait un grand potentiel pour qu'EZH2 soit utilisée comme biomarqueur, les cancers de la prostate semblent présenter un réseau moléculaire trop complexe ne permettant pas d'utiliser un seul facteur d'identification.

D'autres protéines du PcG ont été identifiées pour leur activité potentielle de supresseurs de tumeurs dont PhC3 (PRC1) dont la perte d'expression est corrélée avec la présence d'ostéosarcome. La restauration de l'expression de PhC3 dans l'ostéosarcome supprime la formation de colonies de cellules tumorales (Iwata et al., 2010).

Il est intéressant de noter qu'aucun membre du PRC2 n'a d'implication connue dans une fonction de supresseur de tumeurs à ce jour.

Les protéines du PcG sont donc impliquées dans la régulation de nombreux programmes moléculaires essentiels dans le développement tels que le cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation et le renouvellement des cellules souches. Il est possible d'envisager que les protéines du PcG ciblent différents groupes de gènes, dans différents tissus et différents types cellulaires, à différents stades du développement. Elles peuvent ainsi contrôler le destin des cellules souches en régulant leur auto-renouvellement ou leur différenciation.

L'expression anormale de ces protéines est observée dans les tumeurs humaines. Toutes ces études épigénétiques menées dans ces divers domaines permettent d'entrevoir que les complexes du PcG peuvent réguler leur gènes cibles de manière spécifique et dynamique.

II-6- Aspects évolutifs des interactions géniques des PcG et TrxG

Les protéines des PcG et TrxG ont d'abord été purifiées à partir de la drosophile mais leurs homologues ont été isolés plus tard chez d'autres organismes. Nous pouvons maintenant constater que ces protéines sont de manière générale bien conservées au cours de l'évolution (**Figure 19**). Au cours de l'évolution, le nombre de gènes appartenant aux PcG et TrxG a augmenté significativement, probablement par la double duplication de génome identifiée à la base des vertébrés. Ces duplications de gènes ont abouti à générer des homologues pouvant parfois diverger dans leurs domaines structuraux et donc dans leurs fonctions chez les mammifères (Kerppola, 2009; Whitcomb et al., 2007).

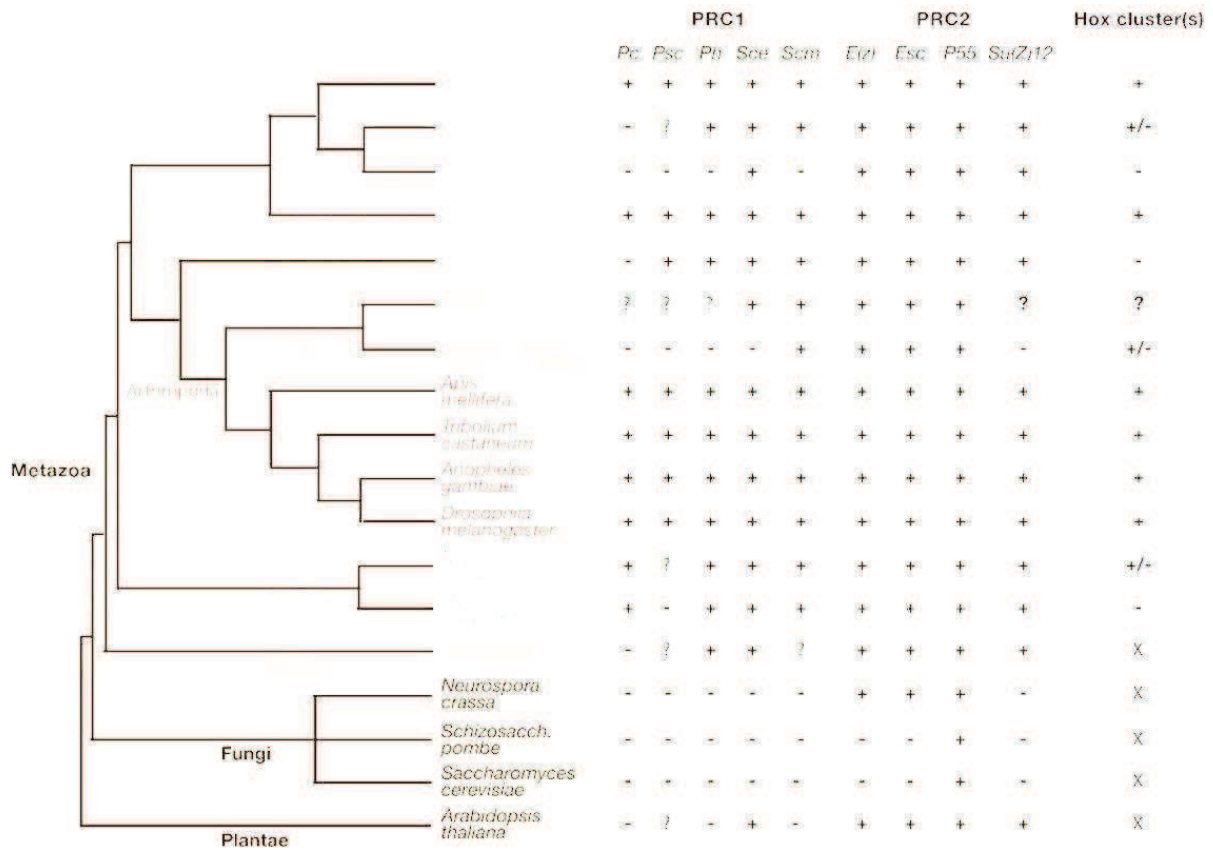


Figure 19 : Distribution phylogénétique de PRC1, PRC2 et des clusters des gènes *Hox* chez les eucaryotes. (Schuettengruber et al., 2007) Pour chaque espèce, + indique la présence et – l'absence des protéines qui constituent les complexes PRC1 et PRC2. La présence des clusters *Hox* est également indiquée pour chaque espèce : + indique la présence d'un ou plusieurs clusters, +/- indique l'existence de clusters partiels, - indique que les gènes *Hox* sont présents mais ne sont pas regroupés en cluster, x indique l'absence de gène *Hox*.

Le complexe PRC2 est le plus conservé, il a été identifié dans tous les règnes du vivant. Ainsi les protéines du PRC2 pourraient avoir une fonction ancestrale dans la répression

transcriptionnelle. Les gènes *E(z)*, *Esc* et *P55* apparaissent comme les mieux conservés au cours de l'évolution. L'homologue d'*Esc* chez *Arabidopsis thaliana* est impliqué dans la répression des gènes homéotiques (Kinoshita et al., 2001). Afin de mettre en évidence la conservation fonctionnelle des protéines homologues, des expériences de sauvetage ont montré qu'une protéine d'origine mammifère pouvait compenser une mutation de son gène correspondant chez la drosophile (gènes *Pc*, *Ph*) (Müller et al., 1995).

La conservation du PRC1 semble plus délicate bien que tous les mammifères ainsi que le poisson zèbre possèdent un complexe PRC1 similaire à celui de la drosophile (Levine et al., 2002; Vandamme et al., 2011). Par contre, aucune sous-unité homologue n'a été observée chez les champignons, très peu chez les plantes ainsi que chez *C.elegans* qui manque également d'un complexe PRC1. En étudiant la conservation évolutive des protéines du PcG, nous pouvons constater que certaines espèces comme *Ciona intestinalis* ne possèdent pas d'homologue de la protéine *Pc*. Sachant que c'est le chromodomaine de cette protéine qui reconnaît la marque H3K27me3 déposée par le PRC2, il faut alors admettre l'existence potentielle de nouveaux complexes.

Cependant, l'existence chez différentes espèces d'interactions protéine-protéine homologues à celles décrites chez la drosophile suggère que les complexes des PcG et TrxG peuvent eux-mêmes être conservés (Satijn et al., 2001). C'est le cas chez l'homme pour les homologues des protéines *Esc* et *E(z)* qui interagissent et appartiennent au même complexe (Sewalt et al., 1998). L'interaction des homologues *Pc* et *Psc* a été également mise en évidence chez le poisson zèbre (Kawamura et al., 2002). Parallèlement, les complexes du TrxG paraissent également conservés, la composition et la fonction du complexe *Brm* de drosophile sont homologues à celles du complexe SWI/Snf2 de levure (Dingwall et al., 1995).

Une étude a comparé le maintien des gènes homéotiques en cluster et la conservation des gènes des PRC1 et PRC2 au cours de l'évolution (Schuettengruber et al., 2007)(**Figure 19**). On peut voir de façon intéressante qu'il existe une corrélation entre le maintien du groupement des gènes *Hox* et la présence du complexe PRC1. On peut constater, par exemple chez l'urochordé *O.dioica*, pour qui le cluster des gènes *Hox* est totalement désintégré, que la plupart des gènes PRC1 sont absents. Bien que la corrélation ne soit pas stricte pour toutes les espèces, cela suggère soit que le complexe PRC1 puisse être déterminant pour maintenir les gènes *Hox* en cluster, soit que la perte d'organisation en cluster des gènes *Hox* engendre la

perte du PRC1. On peut donc imaginer que chez certaines espèces, l'absence de PRC1 a engendré la non-interaction des gènes *Hox* et ainsi provoqué leur dispersion dans le génome, où bien que cette dispersion dans le génome des gènes *Hox* ai engendré la perte du PRC1.

La démonstration que les complexes PRC1 et PRC2 des vertébrés agissent aussi de façon indépendante, permet de changer la vision des cibles du PcG (Tavares et al., 2012). Il existerait différentes classes de cibles faisant intervenir les différents complexes du PcG. Le défi étant d'identifier les gènes cibles pour chaque complexe et même pour chaque protéine du PcG. Ceci soulève un certain nombre de questions sur le mécanisme de recrutement des complexes ainsi que sur l'indépendance de fonctionnement des complexes au niveau de leurs cibles.

En conclusion, la conservation des protéines des PcG et TrxG au cours de l'évolution traduit leur importance biologique. Les mécanismes généraux de la fonction de ces complexes sont globalement conservés entre les animaux et les plantes mais le mode d'action spécifique de chaque protéine des complexes PcG et TrxG a parfois changé au cours de l'évolution. Ainsi, l'étude de ces complexes chez *Ciona intestinalis*, une ascidie qui se situe dans le groupe frère des vertébrés, devrait nous permettre d'identifier et de mieux comprendre les éventuelles innovations évolutives touchant les protéines des PcG et TrxG à une étape clef de l'histoire des métazoaires.

CHAPITRE 2 : L'ascidie *Ciona intestinalis*

Les ascidies sont des animaux marins filtreurs que l'on trouve dans toutes les mers du globe. Ces animaux sont utilisés comme modèle d'étude en embryologie depuis la moitié du 19^{ème} siècle. Depuis, de nombreux outils et ressources moléculaires ont été développés chez de nombreuses espèces d'ascidies.

Ciona intestinalis est l'une des ascidies les plus étudiées de nos jours. Son petit génome (15852 gènes) est entièrement séquencé et largement annoté. Son lignage cellulaire embryonnaire est très bien décrit ce qui en fait un organisme de choix dans les études développementales.

Toutefois, le changement du plan d'organisation observé au cours de la métamorphose fascine les biologistes depuis plus d'un siècle. Cette particularité biologique est au centre du débat sur l'origine des chordés et des vertébrés.

I- Position phylogénétique

Ciona intestinalis est un deutérostome appartenant à l'embranchement des chordés et au sous-embranchement des urochordés nommés également tuniciers (Lamarck, 1815). L'embranchement des chordés est caractérisé par un plan d'organisation commun et par l'apparition de la notochorde. Il est constitué de 3 grands groupes : les vertébrés, les céphalochordés et les urochordés.

Les urochordés se distinguent de l'ensemble des autres animaux par la présence d'une enveloppe protectrice constituée principalement de tunicine (polysaccharide proche de la cellulose des plantes). Cette molécule aurait été acquise via une symbiose ayant permis l'intégration dans le génome de la séquence codante de la cellulose synthase (Matthysse et al., 2004). Le sous-embranchement des urochordés comprend environ 1500 espèces et se divise en 3 classes : deux formes libres et nageantes qui sont des animaux planctoniques, les Thaliacés et les Appendiculaires, et une forme fixée, les Ascidiacés (ascidies).

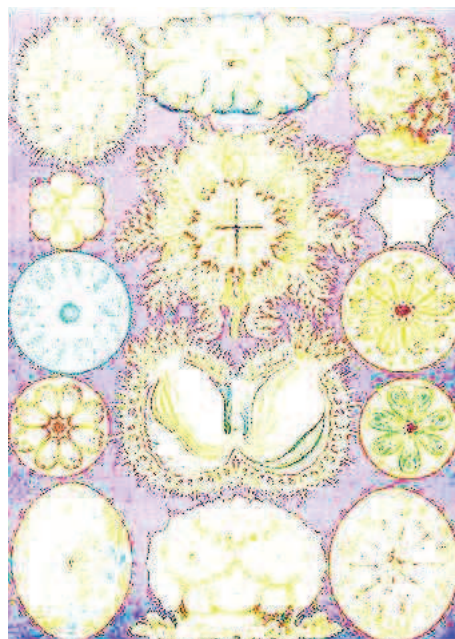


Figure 20 : Planche d'Ernst Haeckel illustrant les différentes espèces d'ascidies. (1904)

Les ascidies constituent la majorité des espèces du groupe des urochordés avec plus de 1300 espèces connues solitaires ou coloniales.

Cette classe comprend trois ordres : les aplousobranches, les phlebobranches et les stolidobranches.

Les aplousobranches sont des ascidies coloniales de petite taille (quelques millimètres). La fécondation est interne et se déroule au sein même de la colonie.

Les phlebobranches et les stolidobranches regroupent les ascidies solitaires. De taille plus importante (plusieurs centimètres), les adultes libèrent leurs œufs et leur sperme dans l'eau de mer. Les ascidies sont des organismes hermaphrodites dont la capacité d'autofécondation varie d'une espèce à l'autre (de 0 à 100 %).

Elles ont longtemps été classées parmi les mollusques. Ce sont les travaux de Lamarck en 1815 et ceux de Kowalevsky en 1866 sur les larves d'ascidies qui ont permis de rectifier leur position taxonomique. Dès 1872, Darwin émet l'hypothèse selon laquelle les tuniciers seraient le maillon intermédiaire entre les vertébrés et les non vertébrés (Darwin, 1872).

Depuis, les chordés ont fait l'objet de nombreuses études d'anatomie comparée, d'embryologie et de phylogénie moléculaire. Selon ces dernières études phylogénétiques (Delsuc et al., 2006), le groupe des urochordés, auquel appartient *Ciona intestinalis*, occupe une position de groupe frère des vertébrés (**Figure 21**).

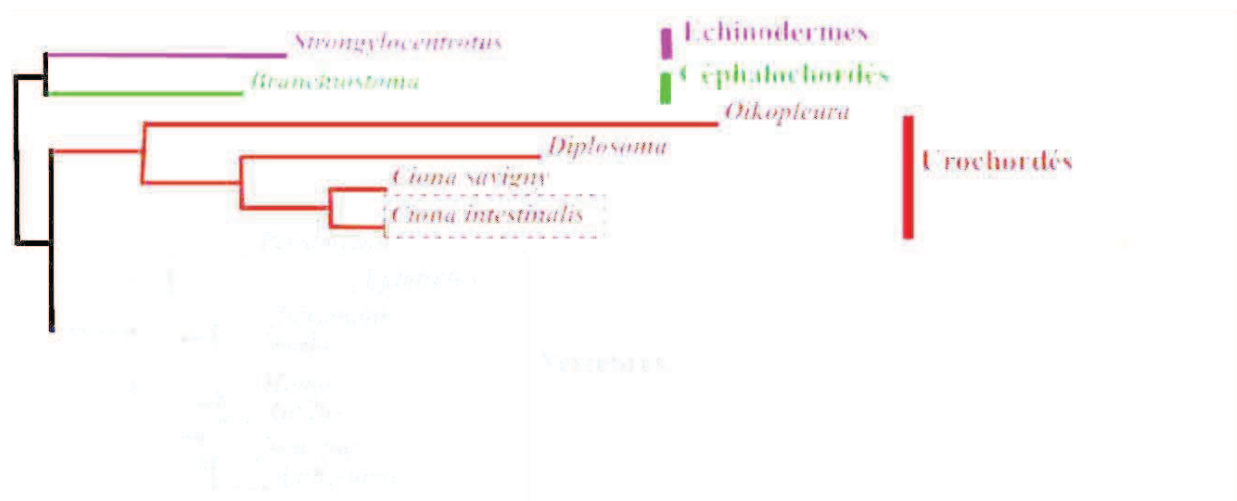


Figure 21 : Arbre phylogénétique des deutérostomes. (Delsuc et al., 2006)

Cette espèce appartient à la classe des Ascidiacées, à l'ordre des Enterogena, au sous-ordre Phlebobranchiata et à la famille des Cionadae.

Des études phylogénétiques de marqueurs ADN mitochondriaux et nucléaires ont permis de mettre en évidence l'existence de deux sous-espèces (type A et B) de *Ciona*. Ces deux types colonisent des espaces côtiers distincts à l'exception d'une zone de jonction des deux sous-espèces en Bretagne (**Figure 22**). Le croisement entre ces deux types est possible mais les hybrides sont infertiles (Caputi et al., 2007). Ces deux types présentent de légères différences phénotypiques notamment de la tunique et à la sortie du spermiducte au niveau du siphon exhalant.



Figure 22 : Distribution géographique des sous-espèces A (rose) et B (bleu) de *Ciona intestinalis*. (Caputi et al., 2007) Les ovales blancs transparents représentent des populations de *Ciona* non caractérisées. Les flèches noires mettent en évidence les différences phénotypiques entre les deux sous-espèces de la sortie du spermiducte.

Grâce à son important nombre d'œufs fertilisables, à l'invariance de son plan de clivage cellulaire, à son petit génome (15 852 gènes) séquencé et largement annoté (Dehal et al., 2002) dans lequel la majorité des gènes des vertébrés est représentée sans redondance, *Ciona intestinalis* est un modèle émergent en biologie du développement.

II- Cycle de vie

Le cycle de vie de *Ciona intestinalis* est rapide et très bien décrit. Il se déroule en deux phases : l'embryogénèse, suivie d'une phase larvaire mobile et, après métamorphose, une phase adulte fixée (**Figure 23**).

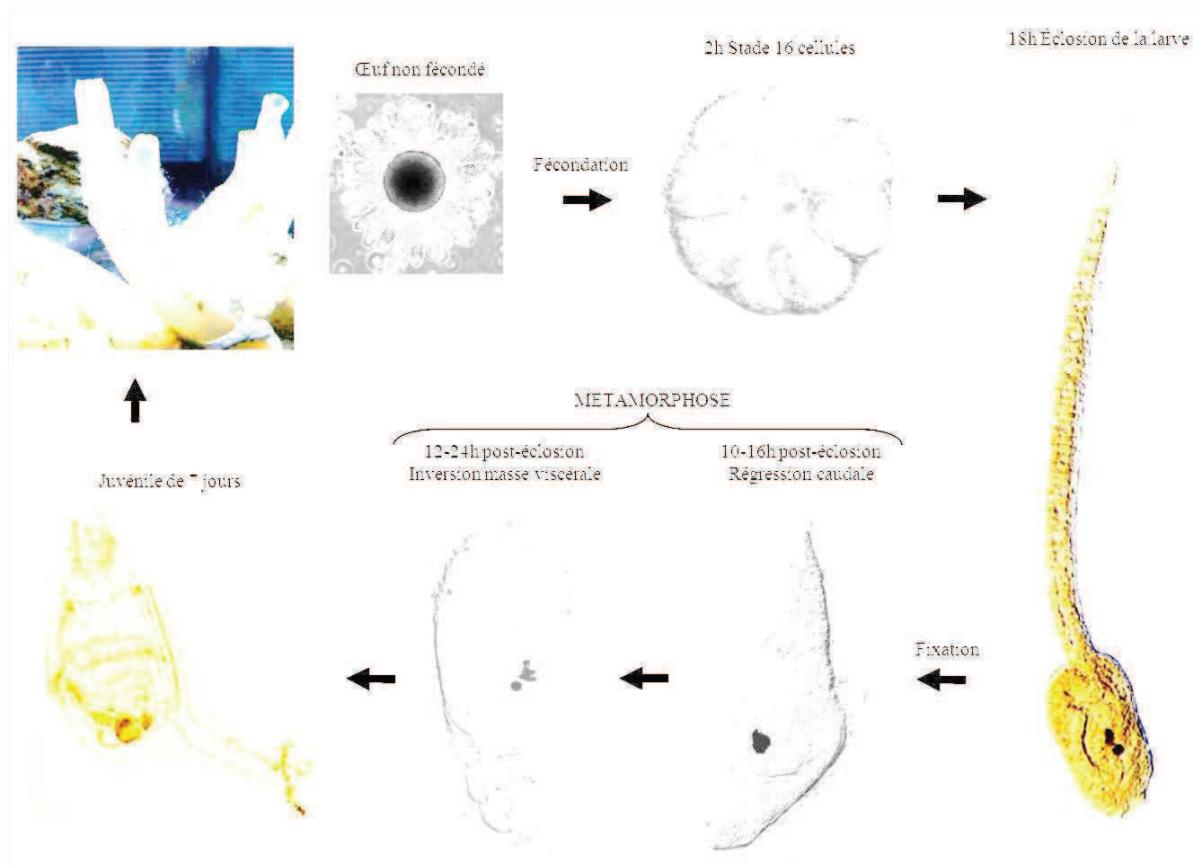


Figure 23 : Cycle de vie de *Ciona intestinalis*. Les temps indiqués correspondent à un développement à 18°C.

II-1- Libération des gamètes et fécondation

Ciona intestinalis libère ses gamètes femelles puis mâles dans l'eau de mer. Bien qu'hermaphrodite, la fécondation a lieu par contact des gamètes issus de deux individus. L'autofécondation peut se produire en très faible proportion selon les conditions extérieures, la saison et les individus (Rosati & de Santis 1978; de Santis & Pinto 1991).

Le gamète femelle de *Ciona* (**Figure 24**) est constitué de l'ovocyte qui est entouré par :

- un espace péri-vitellin contenant des cellules de la testa (Chabry, 1887) et une membrane vitelline, l'ensemble étant appelé chorion,
- une couche externe de cellules folliculaires qui servent de flotteurs.

Cet œuf a une taille comprise entre 200 et 300 μm .

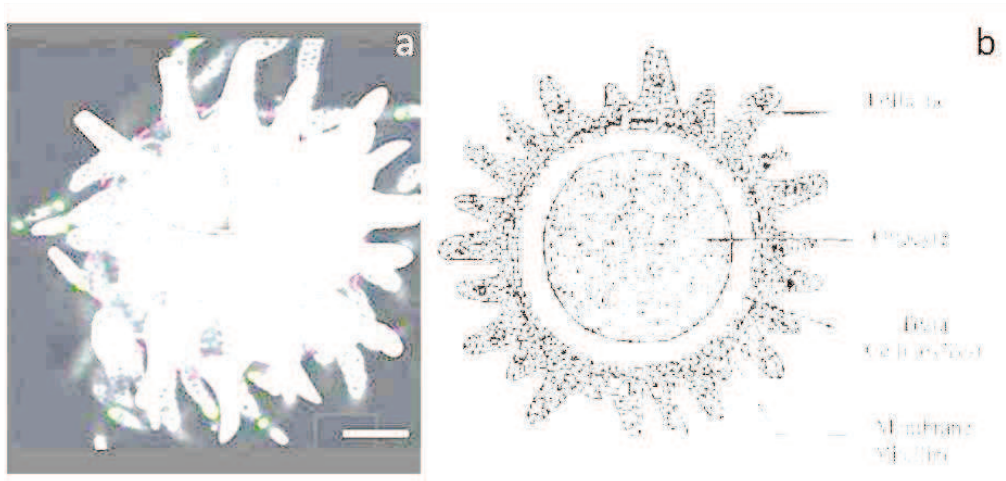


Figure 24 : Présentation d'un œuf mature de *Ciona intestinalis*. (Martinand-Mari et al., 2009) **a**, Image composite d'un œuf marqué avec de la phalloïdine fluorescente (blanc). Les pointillés roses représentent la base des cellules folliculaires. La coupe triangulaire permet de visualiser la couche sous-jacente de cellules de la testa. Barre d'échelle : 10 μm . **b**, Schéma d'une coupe d'œuf.

Lors de la fécondation, le spermatozoïde passe entre les cellules folliculaires et pénètre à travers le chorion. Il nage ensuite dans l'espace péri-vitellin dans lequel une activation apicale se produit et permet la fusion entre la tête du spermatozoïde et la membrane plasmique de l'ovocyte (Sato, 1994).

Chaque couche cellulaire semble jouer un rôle dans la rencontre du spermatozoïde et de l'ovocyte. En effet, les travaux de Miller suggéraient que les cellules folliculaires sécrètent un facteur d'attraction pour les spermatozoïdes (Miller, 1975; Miller, 1982). Il s'est ensuite avéré que c'était le pôle végétatif de l'œuf qui libère un stéroïde, le SAAF (Sperm Activating and Attracting Factor), qui induit l'activation du sperme ainsi que son attraction par chimiotactisme (Yoshida et al., 1993; Yoshida et al., 2002; Zhu and Inaba, 2011).

Les cellules folliculaires et la membrane vitelline sont responsables de la reconnaissance du soi et du non-soi, ce qui permet de limiter les auto-fécondations (Saito et al., 2012; Rosati and de Santis, 1978; Rosati et al., 1978). Les cellules folliculaires empêchent également la polyspermie en sécrétant une enzyme qui, dès l'entrée du premier spermatozoïde, dégrade la

N-acétylglucosamine, sucre nécessaire à la fixation des autres spermatozoïdes sur la membrane vitelline.

La fécondation induit le début du développement embryonnaire et conduit à la formation d'une larve 18 heures après la fécondation.

En milieu naturel, les embryons se développent à l'intérieur du chorion protecteur. La majorité des expériences de fécondation *in vitro* réalisées au laboratoire nécessitent la déchoriation de l'œuf par une solution activée de protéases (Sardet et al., 2011; Liu et al., 2006; Christiaen et al., 2009).

La fécondation provoque deux vagues de calcium dans l'œuf (Speksnijder et al., 1989). La première vague démarre au point d'entrée du spermatozoïde et se propage vers le pôle végétatif. La seconde vague se produit après l'expulsion du second globule polaire et se propage du pôle végétatif vers le reste de l'œuf (Roegiers et al., 1995; Yoshida et al., 1998; Dumollard & Sardet 2001; Wilding et al., 2000). La vague calcique issue du pôle végétatif semble être un mécanisme conservé au cours de l'évolution puisqu'elle a lieu chez les protostomes et les deutérostomes (Dumollard et al. 2002).

Ces vagues calciques jouent un rôle déterminant pour le développement futur de l'embryon, notamment lors de la ségrégation ooplasmique.

II-2- Composante maternelle et ségrégation ooplasmique

Les deux vagues calciques provoquent la perte de symétrie de l'œuf par rapport à l'axe pôle animal/végétatif. Cette perte de symétrie est caractérisée par des réarrangements du cytoplasme, on nomme ce phénomène la ségrégation ooplasmique. Ces réarrangements cytoplasmiques consistent en une réorganisation complète du cytosquelette d'actine et à une relocalisation du myoplasme (Conklin, 1905; Sawada & Schatten 1988; Sawada, 1988; Jeffery and Swalla, 1990; Yoshida et al., 1998; Prodon et al., 2006).

Les travaux de Conklin, utilisant des œufs de l'ascidie *Cynthia partita*, ont démontré l'existence d'un lien entre ces réarrangements cytoplasmiques et les axes de développement de l'embryon (Conklin, 1905).

Sardet et ses collaborateurs ont décrit en détail cette ségrégation ooplasmique dans l'œuf de l'ascidie *Phallusia mammillata* (Sardet et al., 1989). La première vague de contraction corticale de la membrane de l'œuf, qui se déplace du pôle animal vers le pôle végétatif, dépend d'un réarrangement du cytosquelette d'actine qui est contrôlé par la première vague calcique et la GTPase Rho (Sawada and Osanai, 1985; Yoshida et al., 2001). Dans un second temps, une relocalisation du myoplasme de l'hémisphère végétatif a lieu vers la région subéquatoriale de l'œuf. Cette deuxième phase de la ségrégation ooplasmique est plutôt dépendante des microtubules (Sawada and Schatten, 1988).

Ces réarrangements cytoplasmiques se traduisent par le déplacement de différents composés cellulaires et permettent notamment de concentrer certains ARN messagers dans des régions spécifiques de l'œuf. Cette étape permet la détermination des axes embryonnaires antéro-postérieur et dorso-ventral ainsi que le déterminisme précoce de certains tissus (**Figure 25**).



Figure 25 : Schéma représentatif des différents axes de polarité dans un œuf d'ascidie. (Sardet et al., 2004) **a**, Polarisation de l'axe animal-végétatif de l'ovocyte en fin de maturation méiotique ; **b**, Polarisation de l'axe dorso-ventral lors de la contraction corticale des microtubules lors de l'entrée du spermatozoïde fécondant ; **c**, Polarisation de l'axe antéro-postérieur lors de la translocation postérieure du réticulum cortical et du myoplasme.

Le développement de l'embryon dépend de l'établissement de polarités définissant plusieurs axes embryonnaires le long desquels s'organisent les futurs territoires de l'individu. L'œuf de *Ciona* présente déjà une polarité primaire animal-végétatif (A-V) établie pendant l'ovogenèse et la maturation méiotique qui participe à l'établissement de la polarité embryonnaire.

Chez *Ciona intestinalis*, un petit nombre d'ARN messagers et de protéines maternelles jouent le rôle de déterminants du développement et de la polarité.

Les ovocytes d'ascidies sont clairement polarisés pendant l'ovogenèse (Sardet et al., 1994), la polarisation de l'ovocyte est présente en fin de maturation méiotique (Sardet et al., 1992) (**Figure 25a**). Une couche de réticulum cortical comportant des ARN messagers déterminants pour la différenciation des tissus de la larve (*macho-1* et *pem-1*) et un tapis sous-cortical riche en mitochondries, le myoplasme, sont disposés selon un gradient animal-végétatif (Nishida, 2002; Sardet et al. 2003). Cette polarisation est amplifiée au moment de la fécondation par une contraction corticale massive de microfilaments due à la vague calcique d'activation déclenchée par le spermatozoïde fécondant (Roegiers et al., 1999; Roegiers et al., 1995) (**Figure 25b**).

Cette contraction définit un pôle de contraction dans le cortex végétatif et précise l'axe dorso-ventral, la position du pôle de contraction définit le futur site de gastrulation ainsi que le pôle dorsal de l'embryon (Roegiers et al., 1995). L'axe antéro-postérieur dépend également du site d'entrée du spermatozoïde car celui-ci introduit un centrosome qui est dupliqué dès la fin du cycle cellulaire méiotique. Le centrosome définit le côté postérieur via une translocation postérieure du domaine du réticulum cortical et du myoplasme riche en mitochondries (Roegiers et al., 1999; Chiba et al., 1999) (**Figure 25c**).

Des expériences d'ablation et de transfert de fragments d'œufs d'ascidie ont démontré que des déterminants maternels situés près de la surface de l'œuf spécifient respectivement la différenciation de l'ectoderme, de l'endoderme et des cellules musculaires des futures larves (Nishida, 1997).

Les ARN messagers de *Macho-1* et *Pem-1* sont ainsi déplacés en position postérieure et sont ensuite localisés vers l'équateur en fin de mitose. Ces ARN corticaux et le réticulum auquel ils sont liés s'accumulent au stade 8 cellules dans une petite zone corticale appelée CAB (Centrosome Attracting Body) (Sardet et al., 2003; Nishida and Sawada, 2001; Nishikata et al., 1999).

La recherche des déterminants maternels a abouti à l'identification de facteurs par une approche de molécule candidate et un crible d'expression in situ.

En 1996, l'équipe de Nori Satoh identifie un ARN messager maternel qui co-localise avec le myoplasme et qui est alors nommé *Pem* (Posterior end mark). Il code une petite protéine de

374 acides aminés ne contenant aucune homologie ou domaine connu. Sa localisation est corticale et se positionne selon un gradient animal-végétatif dans les œufs matures. Il est transloqué au pôle végétatif puis au pôle postérieur au cours des deux phases de ségrégation ooplasmique où il forme un croissant cortical (Yoshida et al., 1996; Prodon et al., 2007).

Lors du développement embryonnaire de *Ciona intestinalis*, la protéine Pem se localise au niveau des noyaux et permet la répression de la transcription de gènes de la lignée germinale (Shirae-Kurabayashi et al., 2011).

La surexpression de *Pem* induit une perturbation de la formation de la larve. Les cellules dérivant des lignages A, B et b se développent normalement tandis que celles dérivant du lignage a sont inhibées. Ces dernières sont alors localisées ectopiquement dans l'épiderme de la queue (lignage b) ainsi qu'au niveau du tube neural postérieur (lignages A et b), ceci semble mettre en évidence un changement de destin cellulaire. En effet, les cellules épidermiques des lignages a et b constituent des clones distincts qui restent positionnés respectivement antérieurement ou postérieurement, du stade 8 cellules au stade larvaire.

Yoshida et ses collaborateurs émettent donc l'hypothèse d'une transformation du destin des cellules de l'épiderme antérieur (lignage a) en épiderme postérieur (lignage b) et donc de l'implication de *Pem* dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur. Il est à noter que seuls les dérivés de l'ectoderme semblent être perturbés, ceux de l'endo-mésoderme restent inchangés.

En 2001, Nishida et Sawada identifient, chez *Halocynthia roretzi*, un ARNm dont la localisation apparaît concomitante à celle décrite pour le myoplasme et qu'il nomme *Macho-1* (Nishida and Sawada, 2001) et qui code un facteur de transcription à doigts de zinc.

La perte de fonction de *Macho-1* inhibe la formation du muscle primaire, ce qui se traduit par une réduction de l'élongation de la queue, tandis que la mise en place des autres tissus ne semble pas être perturbée.

L'injection d'ARNm de *Macho-1* induit fortement les marqueurs musculaires dans l'endoderme et l'épiderme. Cette expression ectopique indique que ces deux territoires sont compétents pour former du muscle en présence de *Macho-1*, soit que le programme musculaire remplace le programme existant dans ces zones, soit qu'il soit co-activé avec le programme épidermique et endodermique.

II-3- Développement embryonnaire

Le développement embryonnaire de *Ciona intestinalis* se déroule en 18 heures à 18°C depuis la fécondation jusqu'à l'éclosion de la larve (**Figure 26**).

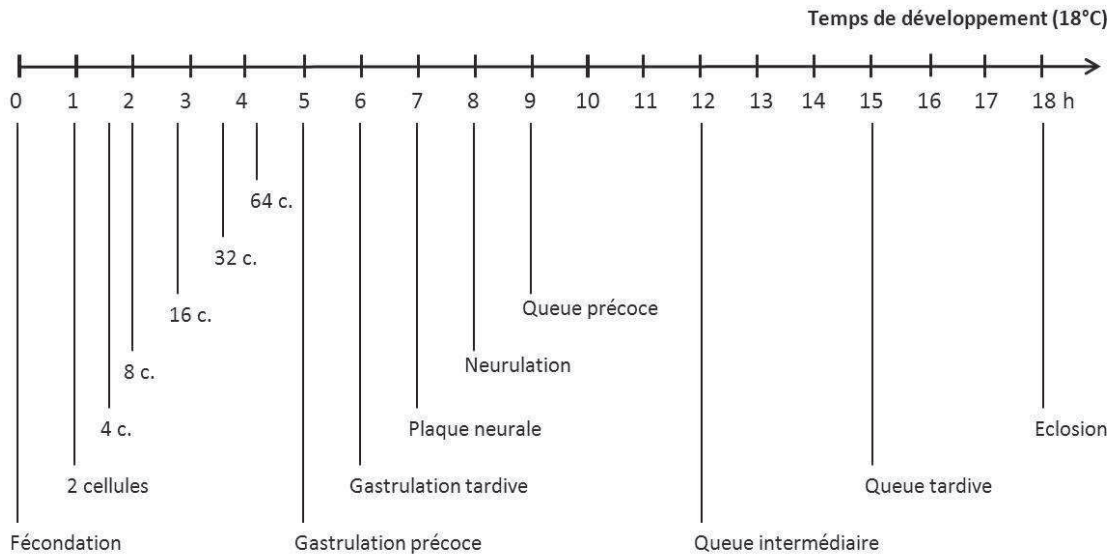


Figure 26 : Stades du développement embryonnaire de *Ciona intestinalis* à 18°C.

II-3-1- Le clivage et la morphogénèse

Les embryons de *Ciona* se développent selon des plans de clivage invariants et l'identification de chaque blastomère des stades précoces du développement est possible (Chabry, 1887; Conklin, 1905).

La première division se produit une heure après la fécondation à 18°C selon l'axe de symétrie bilatérale. La deuxième division sépare la moitié antérieure de la moitié postérieure de la future larve et aboutit à 4 blastomères symétriques. Le troisième clivage sépare les hémisphères végétatif et animal en un embryon asymétrique de 8 cellules (**Figure 27**) : 4 petits blastomères (a4.2 et b4.2) et 4 larges blastomères (A4.1 et B4.1).

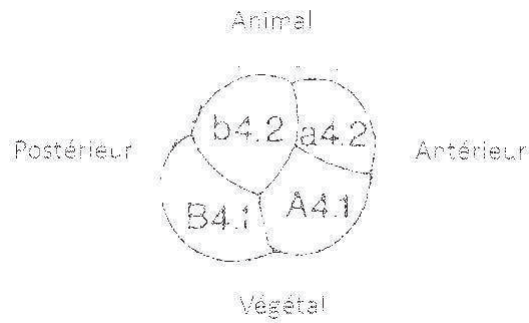


Figure 27 : Schéma du stade 8 cellules lors du clivage embryonnaire chez *Ciona intestinalis*. (Nicol and Meinertzhagen, 1988)

Le lignage antérieur animal est nommé a, le lignage antérieur végétatif est nommé A. le lignage postérieur animal est nommé b et le lignage postérieur végétatif est nommé B. Chaque blastomère est nommé par la lettre du lignage ainsi que par deux numéros : le premier numéro indique le nombre de clivages réalisés + 1 et le deuxième numéro indique l'identité du blastomère au sein de l'embryon.

Ainsi, la cellule mère postérieure animale b4.2 donne deux cellules filles annotées b5.3 et b5.4. Etant donné la symétrie bilatérale de l'embryon précoce, les deux blastomères jumeaux sont nommés de manière identique (**Figure 28**).

Au stade 8 cellules, les blastomères A et B de l'embryon forment l'hémisphère végétatif. Ils sont à l'origine des territoires endodermique et mésodermique de la future larve (endoderme, notochorde, muscle et mésenchyme). Les blastomères a et b forment l'hémisphère animal et sont à l'origine des territoires ectodermiques de la larve (épiderme et tissu neural). Le lignage b est également impliqué dans la formation du muscle et de l'endoderme. Les blastomères A et a forment les lignages antérieurs de l'embryon alors que les lignages B et b forment les lignages postérieurs de l'embryon.

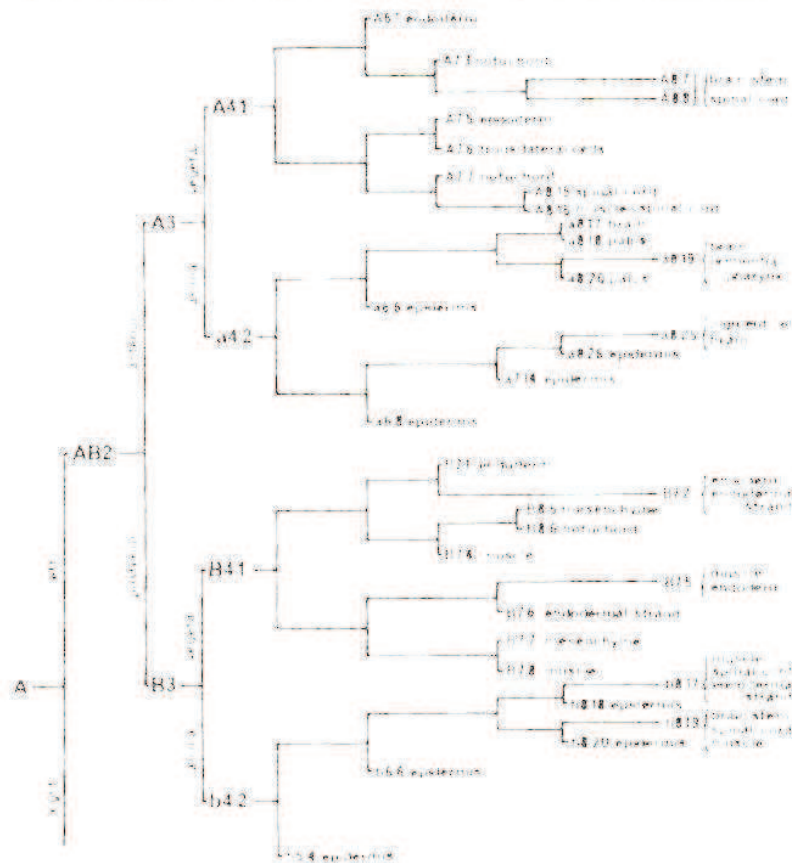


Figure 28 : Lignage cellulaire de l'embryon d'*Halocynthia roretzi*. (Satoh, 1994)

Cependant, il est à noter que les axes décrits précédemment sont cohérents pour les stades précoces du développement embryonnaire mais ils sont remaniés par les mouvements cellulaires lors de la gastrulation. Seules les cellules de l'ectoderme conservent une relative homogénéité le long de l'axe antéro-postérieur.

Les cellules du lignage a forment l'ensemble de l'ectoderme de la tête de la larve alors que les cellules du lignage b participent à la formation de l'ectoderme caudal. La frontière entre les lignages a et b correspondent globalement à la délimitation entre la tête et la queue de la larve. Le remaniement des cellules est plus important dans l'hémisphère végétatif. L'endoderme de la tête de la larve, la notochorde et le tube neural dérivent du blastomère A. Le blastomère B permet la formation du mésenchyme et de l'endoderme localisés dans la tête de la larve. Il donne également naissance à la rangée endodermique et aux cellules musculaires de la queue. Il est à noter que le muscle secondaire est issu du lignage A.

Du stade 8 cellules jusqu'au début de la gastrulation, tous les blastomères ont une surface exposée à l'espace périvitellin, ce n'est qu'à partir du stade 180 cellules que certains blastomères perdent ce contact.

La gastrulation commence au stade 110 cellules et se réalise par épibolie, les différentes catégories cellulaires migrent vers l'intérieur de l'embryon. La dynamique spatio-temporelle de l'invagination de l'endoderme est régulée par différents schémas d'activation de la myosine qui contrôle les tensions corticales (Sherrard et al., 2010).

Pendant une période allant du milieu à la fin de la gastrulation, la plaque neurale se forme sur la partie antérieure de l'hémisphère végétatif. Cette localisation définit l'hémisphère dorsal (zone de formation de la plaque neurale) de l'hémisphère ventral.

Lors de la neurulation, le tube neural est complètement internalisé. Ensuite, seulement une à deux divisions cellulaires supplémentaires seront nécessaires pour compléter le système nerveux central de la larve.

Au moment où le neuropore se forme, le corps de la larve se recourbe alors que la queue commence à s'allonger. Il est alors possible de distinguer la tête et la queue de la larve.

Le neuropore est complètement internalisé sous l'épiderme et forme une vésicule cérébrale antérieure. Celle-ci donnera deux organes sensoriels pigmentés : l'otolithe et l'ocèle respectivement au bout de 12 et 13 heures après la fécondation (Whittaker, 1973).

L'élongation de la queue correspond à la formation de la notochorde. Les cellules précurseurs de cette dernière migrent depuis la plaque neurale vers le pôle postérieur. Au stade intermédiaire de la formation de la queue de la larve (environ 12h après fécondation), la notochorde est constituée de deux rangées de cellules imbriquées les unes dans les autres. A la fin de l'élongation caudale, la notochorde forme une structure tubulaire constituée de matrice extracellulaire.

II-3-2- Le déterminisme tissulaire

La larve de *Ciona intestinalis* est composée d'un nombre restreint de tissus, elle est constituée d'un système nerveux central et périphérique, un épiderme, un endoderme, du mésenchyme, des cellules musculaires, une notochorde et une tunique.

Il existe chez *Ciona* deux types de déterminisme tissulaire :

- un déterminisme très précoce qui se met en place dès la ségrégation ooplasmique et qui se poursuit durant la distribution du myoplasme dans les différents blastomères au cours des clivages successifs (**Figure 29**). Les tissus qui présentent cette différenciation autonome sont l'épiderme, l'endoderme et les cellules musculaires issues de la lignée primaire.

- un déterminisme tissulaire plus tardif qui dépend des interactions entre les différents blastomères au cours du développement. La formation des tissus est induite et dépend de la position des cellules qui vont les composer à un stade précis de l'embryogenèse. Ce type de différenciation a lieu pour la formation de la notochorde, du système nerveux central et périphérique et des cellules musculaires issues de la lignée secondaire.

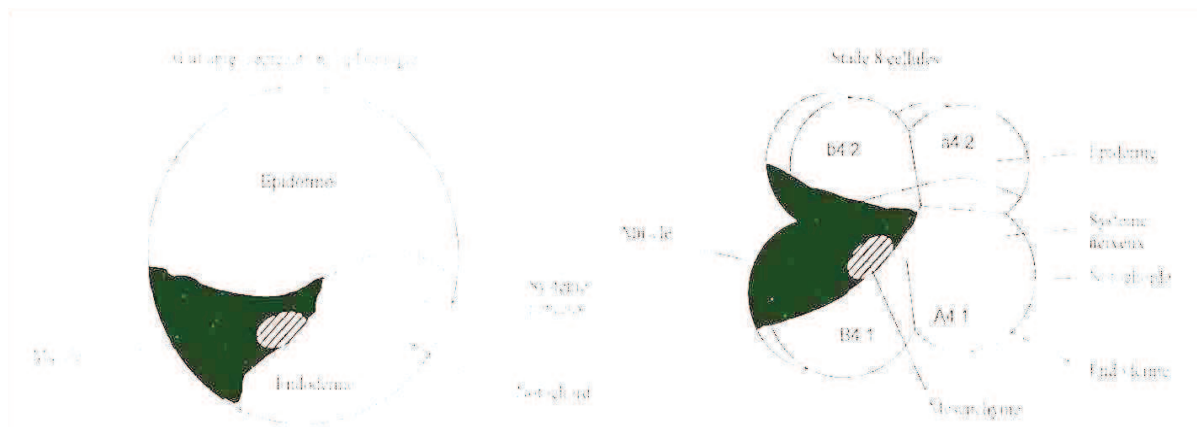


Figure 29 : Carte représentant les territoires du déterminisme tissulaire chez *Ciona intestinalis* après la ségrégation ooplasmique et au stade 8 cellules. (Sato, 1994) Le pôle animal est en haut et l'antérieur à droite.

Dans l'œuf, la limitation entre le pôle animal et le pôle végétatif est défini par un gradient de composants intra-cellulaires et d'ARNm. Les dérivés ectodermiques trouvent leur origine dans la partie animale de l'embryon, les dérivés endodermiques dans la partie végétative et les dérivés mésodermiques dans la partie équatoriale. Le mésoderme est formé dans la région équatoriale de l'œuf avec selon l'axe antéro-postérieur : le tissu neural, la notochorde, le mésenchyme et le muscle.

Au stade larvaire, *Ciona intestinalis* dispose d'un plan d'organisation commun à tous les chordés (**Figure 30**).

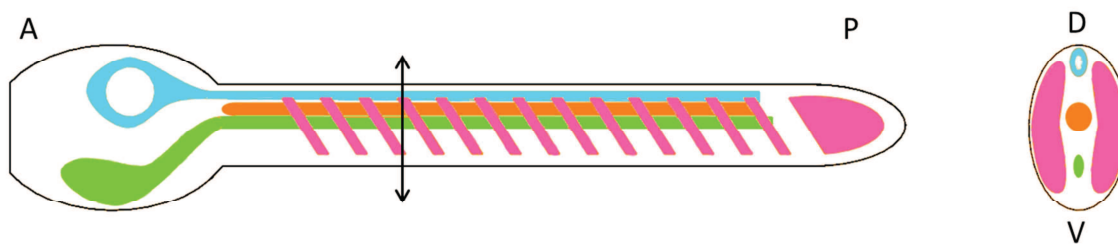


Figure 30 : Schéma d'une larve de *Ciona intestinalis*. A, Antérieur ; P, Postérieur ; D, Dorsal ; V, Ventral. Cellules musculaires en rose, Notochorde en orange, Tissu neural en bleu, Système digestif en vert, Epiderme en noir.

a) La notochorde

La larve de *Ciona* comporte une notochorde centrale dans la queue qui est une structure de soutien donnant son nom au phylum.

Elle est constituée de 40 cellules dont 32 proviennent du lignage A formant la notochorde primaire et le destin de ces cellules dépend d'une induction par le FGF des cellules endodermiques adjacentes entre les stades 32 et 64 cellules (Nakatani and Nishida, 1994; Nakatani et al., 1996; Nishida, 2005).

La notochorde secondaire est formée par 8 cellules qui proviennent du lignage B. Elle est induite par le FGF puis par la BMP au stade 44 cellules (Darras and Nishida, 2001) (**Figure 31**).

Peu après ces inductions, la différenciation de la notochorde est sous le contrôle du gène *Brachyury*, conservé chez les céphalochordés et les vertébrés (Corbo et al., 1997).

Ce gène *Brachyury* est exprimé dans les précurseurs de la notochorde et joue un rôle majeur dans la détermination de ce destin cellulaire. Il code un facteur de transcription qui régule de nombreuses protéines cibles impliquées dans la morphologie et les mouvements cellulaires (Takahashi et al., 1999; Hotta et al., 2000).

Depuis de nombreuses années, des études sont réalisées sur les séquences cis-régulatrices de ce gène et il a été montré que certains facteurs de transcription sont nécessaires à son activation (FoxA, FoxD, ZicL) ainsi que des voies de signalisation (FGF, Nodal, Notch) (Yasuo and Hudson, 2007; Imai et al., 2006; Kumano et al., 2006; José-Edwards et al., 2011). Les gènes de la famille Noto sont spécifiques de la notochorde et sont en aval de *Brachyury* et Fox A (Corbo et al., 1997; Hotta et al., 2000; Satoh et al., 2012).

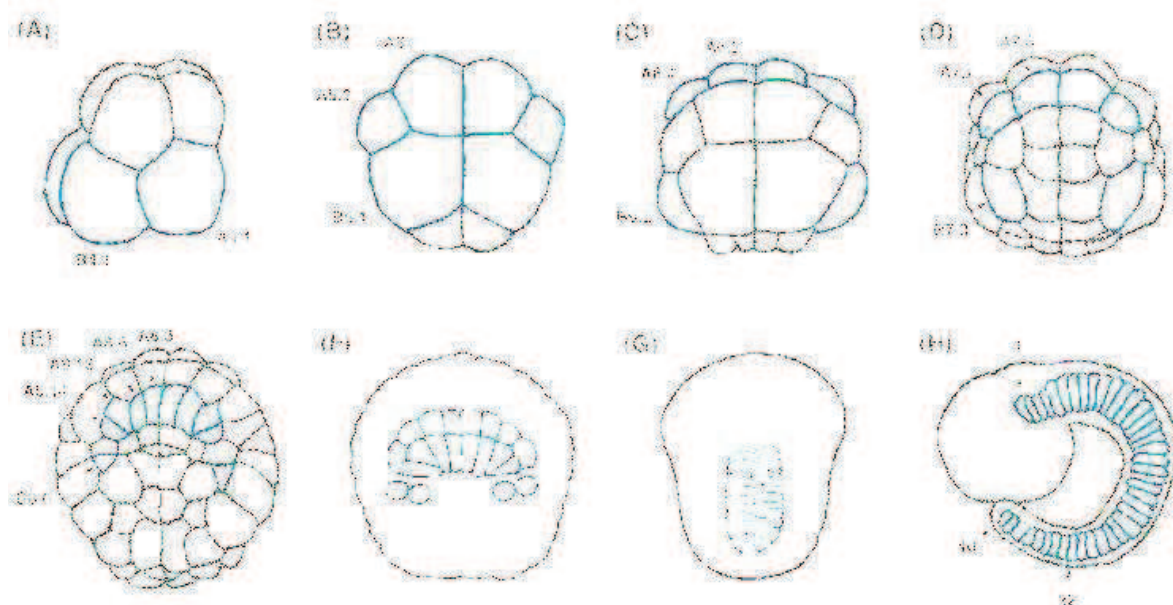


Figure 31 : Schéma représentatif des différents lignages de la notochorde lors du développement larvaire de *Ciona intestinalis*. (Corbo et al., 1997) Les cellules issues du lignage primaire sont en bleu foncé et celles provenant du lignage secondaire sont en bleu clair. **A**, Stade 8 cellules ; **B**, Stade 16 cellules ; **C**, Stade 32 cellules ; **D**, Stade 64 cellules ; **E**, Stade 110 cellules ; **F**, Gastrulation ; **G**, Neurulation ; **H**, Stade larvaire. Adapté de (Satoh, 1994).

Munro et Odell ont étudié le processus qui permet à la notochorde de passer d'un épithélium mono-stratifié à un alignement de cellules accolées les unes derrière les autres en maintenant le nombre de cellules constant (Munro and Odell, 2002a). Ces travaux détaillent les mouvements morphogénétiques qui permettent au tissu de migrer en position postérieure afin de former une entité allongée caudalement, puis une tige constituée de plusieurs cellules qui s'intercaleront pour former la notochorde. Ces mouvements s'effectuent sans aucune division cellulaire et dans un tissu dans lequel le destin cellulaire est déjà déterminé. Le gène *Noto-4* participe de manière déterminante à l'intercalation des cellules de la notochorde ; en effet, lors de son invalidation ces cellules restent sous la forme de deux rangées distinctes l'une de l'autre (Yamada et al., 2011).

L'ensemble de ces mouvements cellulaires qui conduisent à la formation de la notochorde est autonome à ce lignage. En effet, la suppression du muscle, de l'endoderme ou des deux n'affectent pas le processus de formation des précurseurs de la notochorde (Munro and Odell, 2002b).

En début d'élongation caudale, chaque cellule précurseur de la notochorde va s'allonger pour atteindre la longueur définitive de la queue. Cette élongation résulte de la sécrétion de matrice extra-cellulaire qui va former des vacuoles entre les cellules. Ces vacuoles vont s'agrandir et

placer les cellules en bordure du tissu ce qui donnera l'aspect caractéristique de la notochorde (**Figure 32**).

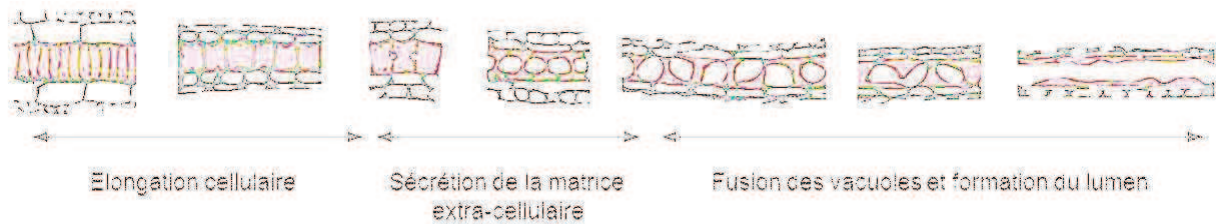


Figure 32 : Schéma représentatif de la formation de la notochorde lors du développement larvaire de *Ciona intestinalis*. (Denker and Di Jiang, 2012). Les cellules de la notochorde sont représentées en rouge. Adapté de (Dong et al., 2009; Munro and Odell, 2002a).

b) Les muscles

La larve de *Ciona* compte 40 cellules musculaires striées et uninucléées qui se répartissent de part et d'autre de la notochorde en trois couches longitudinales. Ce tissu musculaire se forme à partir de deux entités de cellules, nommées lignée primaire et secondaire (Meedel et al., 1987).

La lignée primaire est issue du blastomère B4.1 et donne des cellules musculaires dès le stade 8 cellules (**Figure 33**). Ce lignage constitue 32 cellules situées de chaque côté de la notochorde. Le muscle primaire se développe de façon autonome à partir de déterminants cellulaires spécifiques dont la localisation est déterminée dès la ségrégation ooplasmique.

Les travaux de (Nishida and Sawada, 2001) ont montré que le facteur déterminant des cellules musculaires, qui se trouve dans le cytoplasme de l'œuf sous la forme d'ARN messager maternel, est le produit du gène *macho-1* (cf chapitre II-2). 14 cibles exprimées de *Macho-1* ont été identifiées au stade 32 cellules (Yagi et al., 2004) dont 10 d'entre elles comportent une séquence cisrégulatrice, proche de celle de la famille Zic, correspondant à un domaine de fixation de *macho-1* dont *snail*, *Tbx-6b* et *-6c* (activant *Myo-D*) (Yagi et al., 2005; Kugler et al., 2010).

La lignée secondaire donne 8 cellules musculaires localisées à l'extrémité postérieure de la queue. Le déterminisme de ces cellules est conditionné par leur interaction avec d'autres cellules de la queue. Les blastomères A4.1 et b4.2 sont à l'origine de cette lignée (Nishida and Satoh, 1983)(**Figure 33**). La différenciation de ces cellules se produit juste après celle de la

lignée primaire (Nishida and Satoh, 1985) et est induite par la signalisation FGF à la fin du stade 32 cellules (Hudson and Yasuo, 2008). Ces cellules musculaires expriment les gènes *snail* et *MDF* (famille *MyoD*) comme le muscle primaire (Meedel et al., 2002). Il a été montré que l'expression du gène *Nodal* est nécessaire à la formation des cellules musculaires secondaires provenant du lignage A (Hudson and Yasuo, 2005).

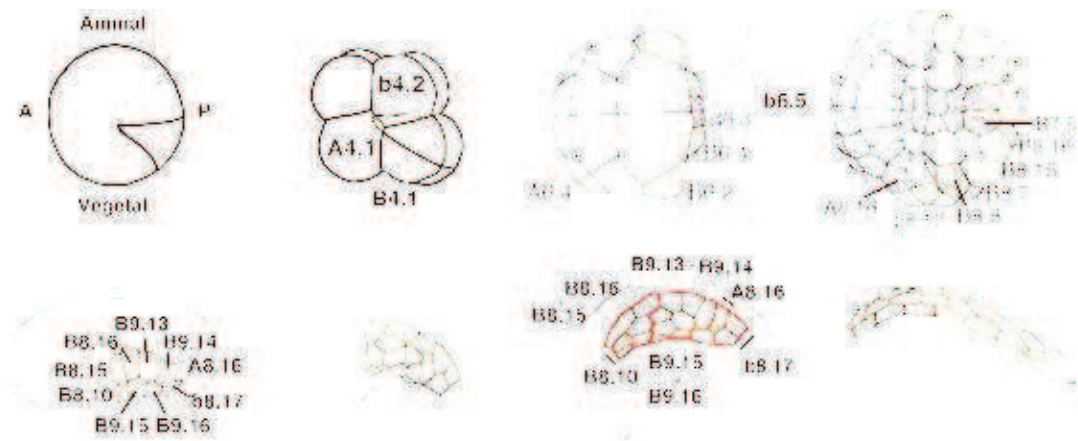


Figure 33 : Schéma représentatif du lignage du muscle lors du développement larvaire de *Ciona intestinalis*. (Passamaneck et al., 2007). Le muscle primaire est issu du blastomère B4.1 tandis que le muscle secondaire provient des blastomères A4.1 et b4.2. Les précurseurs des cellules musculaires sont en orange, ceux des tissus neuraux sont en bleu, ceux du mésenchyme sont en violet clair et les progéniteurs du cœur sont en violet foncé.

La différenciation musculaire au cours du développement embryonnaire a été suivie grâce à la détection de l'activité de l'acétylcholinestérase (Ach) (Durante, 1956; Whittaker, 1973; Meedel and Whittaker, 1979; Satoh, 1979). La présence de myofilaments est détectée au stade mi-têtard (Crowther and Whittaker, 1983).

c) L'épiderme

La larve de *Ciona* est recouverte entièrement d'un épiderme monocouche. Les cellules qui le composent sont toutes issues des blastomères du pôle animal (blastomères a4.2 et b4.2). Au stade mi-têtard, il y a 800 cellules épidermiques, ce nombre est définitif. Ces cellules sécrètent la tunique qui couvre l'ensemble du corps de la larve et qui forme une fine nageoire acellulaire au niveau dorsal et ventral de la queue. La synthèse de cette matrice a permis de suivre la différenciation épidermique (Dilly, 1969; Mancuso, 1973; Mancuso, 1974; Gianguzza and Dolcemascolo, 1980; Cloney and Cavey, 1982).

Peu de données existent sur la formation précoce du destin épidermique chez les chordés. Les précurseurs épidermiques dérivent tous de l'hémisphère animal (Satoh, 1994).

Il a été montré que l'épiderme du bourgeon caudal de l'ascidie *Halocynthia roretzi* possède une polarité antéro-postérieure définie par 8 zones correspondant à des combinaisons différentes d'expression de 4 gènes à homéoboîte (Wada et al., 1999). Au stade 32 cellules, les marqueurs épidermiques antérieurs (Hroth, Hdrll-1) sont dépendants d'une induction par les blastomères végétatifs A, tandis que les marqueurs épidermiques postérieurs (HrHox-1, Hrcad) sont activés par les blastomères végétatifs B.

Des études chez *Ciona* ont montré que l'épiderme de la larve est régionalisé selon l'axe dorso-ventral en constituant trois domaines cellulaires (médian, médian-latéral, latéral) qui expriment des marqueurs tels que Epi, Emx, FGF9/16/20 et ADMP (Pasini et al., 2006).

d) Le système nerveux

La larve de *Ciona intestinalis* possède un système nerveux central composé d'environ 330 cellules (250 cellules gliales et 80 neurones) qui forment une vésicule sensorielle antérieure, un ganglion viscéral médian et un tube nerveux dorsal au niveau de la queue.

Pour revue : Sasakura et al., 2012a.

Le système nerveux périphérique de la larve est composé d'une trentaine de neurones sensoriels épidermiques disposés le long de la queue ainsi qu'au niveau des papilles adhésives (**Figure 34**).

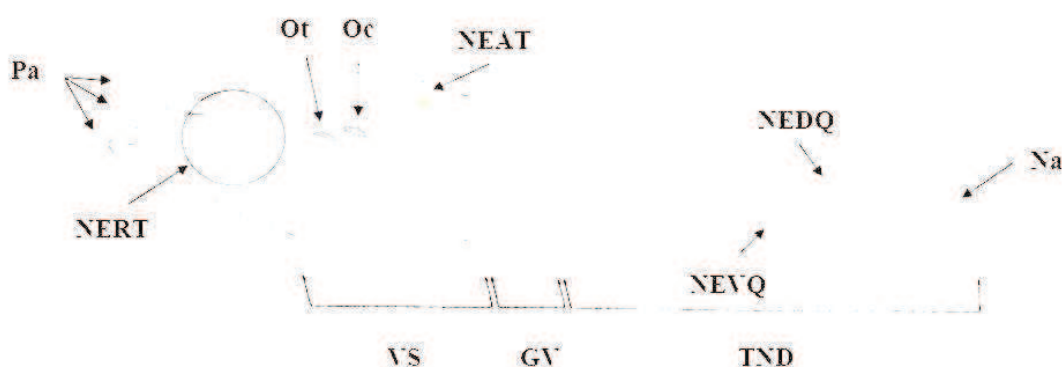


Figure 34 : Schéma du système nerveux de la larve de *Ciona intestinalis*. (Lemaire et al., 2002) Oc, oocèle ; Ot, otolithe ; Pa, papilles ; Na, nageoire ; NERT, neurone épidermique en position rostrale du tronc ; NEAT, neurone épidermique en position apicale du tronc ; NEDQ, neurone épidermique en position dorsale de la queue, NEVQ, neurone épidermique en position ventrale de la queue ; VS, vésicule sensorielle ; GV, ganglion viscéral ; TND, tube neural dorsal.

Le système nerveux central de la larve est issu des blastomères A4.1, a4.2 et b4.2.

Les cellules nerveuses issues du blastomère A4.1 sont prédéterminées par défaut et l'isolement de ce blastomère donne de la notochorde plutôt que du tissu nerveux (Picco et al., 2007). Les cellules nerveuses qui en sont issues vont composer la zone postérieure de la vésicule sensorielle, le ganglion viscéral et le tube neural de la queue. Les premiers signes de différenciation apparaissent dès le stade 44 cellules. Lors de la gastrulation, un marqueur spécifique du tissu neural, ETR, commence à être exprimé (Minokawa et al., 2001).

Des micromanipulations de blastomères ont montré que la formation du tissu neural issu du blastomères a4.2 n'est pas autonome et nécessite le contact ainsi que l'induction du blastomère A4.1 de l'hémisphère végétatif (Chabry, 1887; Conklin, 1905; Ortolani et al., 1979; Nishida and Satoh, 1989; Hudson and Lemaire, 2001). La différenciation des cellules nerveuses de cette lignée a été suivie par des mesures de potentiel membranaire et des immuno-marquages. L'acquisition du type neural nécessite deux inductions successives : une première dès le stade 32 cellules et une seconde avant le stade 110 cellules (Lemaire et al., 2002). Une troisième étape qui se déroule au cours de la gastrulation permet la différenciation terminale de ces cellules. Les trois phases, qui permettent à ces cellules d'acquérir un type neural, nécessitent une interaction avec les blastomères du pôle végétatif (Nishida and Satoh, 1989; Nishida, 1991; Wada and Saiga, 1999).

En ce qui concerne le tissu neural issu du blastomère b4.2, des expériences d'isolement de blastomère ont montré que l'interaction avec le blastomère B4.1 était également indispensable pour l'induction neurale (Hudson and Lemaire, 2001; Ohtsuka et al., 2001).

La vésicule sensorielle comprend deux cellules pigmentées : l'otolithe et l'oocèle.

L'otolithe est formé d'un agrégat de mélanine relié à des neurones sensoriels permettant à la larve de se situer vis-à-vis de la gravité (Sakurai et al., 2004).

L'oocèle contient de nombreux agrégats de mélanine et est accolé à des cellules photoréceptrices permettant à la larve de percevoir la lumière.

Le SNP comprend cinq paires de motoneurones dont la spécification est liée à l'expression de BMP2/4. De façon inverse à ce qui est observé chez les vertébrés, une surexpression de BMP2/4 induit des motoneurones ectopiques (Hudson et al., 2011).

Ohtsuka et ses collaborateurs ont mis en évidence que le système nerveux périphérique (SNP) dérivait des cellules animales après induction par les cellules végétatives (Ohtsuka et al.,

2001). Le SNP caudal est constitué de neurones ciliés positionnés le long des rangées médiane, ventrale et dorsale de l'épiderme de la queue (Takamura, 1998)(Figure 35).



Figure 35 : Photos des neurones sensoriels épidermiques de la larve de *Ciona intestinalis*. (Pasini et al., 2006) Microscopie confocale **a**, Immunomarquage réalisé avec un anticorps anti-tubuline (en vert) mettant en évidence les projections des neurones épidermiques sensoriels disposés caudalement ; **b**, Immunomarquage réalisé avec un anticorps anti-tubuline acétylée (en vert) mettant en évidence la partie proximale des projections d'une paire de neurones épidermiques sensoriels (DAPI en bleu et Phalloïdine en rouge).

Le SNP dérive de deux territoires distincts au sein de l'ectoderme postérieur issu du lignage b. La rangée médiane dorsale est spécifiée par l'induction neurale de *FGF9/16/20* au stade 32 cellules et est également dépendante de l'expression de *Nodal*.

La rangée médiane ventrale est spécifiée plus tardivement, au cours de la gastrulation, par un facteur de la famille des *BMP* (*ADMP*) sécrété par les cellules végétatives sous-adjacentes (Pasini et al., 2006). Ceux sont les mêmes blastomères qui donnent naissance aux cellules épidermiques et aux neurones sensoriels du SNP de la rangée médiane. La divergence de ces deux destins cellulaires s'effectue au cours de la neurulation sous le contrôle de la voie Notch. L'activation de cette voie supprime la formation des neurones sensoriels tandis que l'inhibition de cette voie induit la formation de neurones ciliés dans la lignée médiane (Pasini et al., 2006).

Il a été montré que le gène *ETR*, codant une protéine de liaison à l'ARN de classe ELAV, est largement exprimé à la fois dans le SNC et dans le SNP au cours de l'embryogénèse (Yagi and Makabe, 2001; Hudson et al., 2003).

e) L'endoderme

L'endoderme est présent essentiellement dans la tête de la larve et se poursuit dans la queue sous la forme d'une rangée cellulaire ventrale. Le nombre de cellules endodermiques est estimé à 500 lors de l'éclosion larvaire et ce lignage dérive des blastomères A4.1 et B4.1

(Nishida, 1987). Le premier évènement nécessaire à la formation de l'endoderme est l'accumulation nucléaire de β -caténine dans les blastomères de l'hémisphère végétatif (Imai et al., 2000). Cette accumulation apparaît nécessaire et suffisante pour induire de l'endoderme dans l'embryon.

Au stade 32 cellules, les cellules endodermiques expriment le gène FGF-9/16/20 sous l'influence directe ou non de l'accumulation de la β -caténine (Imai et al., 2002). En aval de la β -caténine, Fox-A est exprimé dans toutes les cellules précurseurs endodermiques dès le stade 16 cellules (Imai et al., 2006).

Plusieurs gènes exprimés dans ces cellules ont été identifiés : *Hrlim* (Wada et al., 1995), *forkhead/HNF-3b* (Di Gregorio et al., 2001), *phosphatase alcaline* (Kumano and Nishida, 1998; Whittaker, 1977).

La surexpression de la β -caténine induit la transformation de tous les destins cellulaires en endoderme à l'exception du muscle primaire qui est autonome. A l'inverse, la perte d'activité de la β -caténine provoque la perte des destins cellulaires végétatifs à l'exclusion du muscle et de l'épiderme dans les cellules végétatives (Imai et al., 2000).

II-3-3- L'éclosion larvaire

La larve de *Ciona intestinalis* est complètement formée et éclot 18h après la fécondation (à 18°C). Elle est constituée approximativement de 2600 cellules (**Figure 36**).

Durant l'heure qui précède l'éclosion, la larve contracte sa queue sporadiquement. Ces mouvements conduisent au déchirement du chorion et permettent sa libération. Les mécanismes qui contrôlent l'éclosion sont très peu étudiés. Cependant, certaines études suggèrent que la fragilisation du chorion serait causée par la sécrétion d'enzymes protéolytiques par les cellules folliculaires (Berrill, 1929; Grassé, 1948; Denucé, 1975). Il a été également montré au laboratoire qu'une inhibition du processus d'apoptose empêche l'éclosion larvaire (Maury et al., 2006).

La larve ainsi libérée mesure environ 0,7 mm, elle nage de 4 à 6h puis change de comportement. Le tronc s'oriente vers le bas et la larve fuit la lumière. La larve se fixe alors à un substrat solide, cette fixation est l'évènement précurseur de la métamorphose.



Figure 36 : Schéma d'une larve mature de *Ciona intestinalis*. (Satoh, 2003) **En**, endoderme ; **Ep**, épiderme ; **Es**, lignée endodermale ; **Mu**, muscle ; **Nc**, tube neural ; **No**, notochorde ; **Oc**, oocèle ; **Ot**, otolithe ; **Pa**, papilles ; **SV**, vésicule sensorielle ; **VG**, ganglion viscéral.

II-3-4- La métamorphose

Peu de temps après la fixation de la larve, les papilles sécrètent une substance adhésive et se rétractent en rapprochant l'organisme du substrat.

La métamorphose débute environ 26 heures après la fécondation et se déroule principalement en deux phases distinctes : une régression caudale puis une inversion de la masse viscérale.

Selon les études de (Cloney, 1977), la régression caudale serait la conséquence d'une désolidarisation et d'une contraction des cellules épidermiques de la queue. Ces contractions provoqueraient la rétraction dans le tronc de la notochorde et des autres tissus. Ces différents tissus seraient par la suite phagocytés par les immunocytes circulants. A la fin de cette contraction, la fine couche externe de la queue formée par la tunique est libérée dans le milieu. Selon cette hypothèse, l'épiderme représenterait la force motrice de la régression caudale.

Des études effectuées au sein du laboratoire ont mis en évidence une vague de mort cellulaire massive lors de la régression caudale qui débute à l'extrémité de la queue et se propage vers la tête de la larve. Ce phénomène d'apoptose est régulé par la voie des MAP kinases et l'activation des caspases et touche l'ensemble des tissus de la queue à l'exception du tube neural (Chambon et al., 2002).

Une fois la régression caudale terminée, une inversion de la masse viscérale se produit et les siphons inhalant et exhalant se mettent en place. La mise en place du pied se réalise ensuite et permet la fixation du juvénile.

La métamorphose se poursuit par l'élimination des organes larvaires ; la vésicule sensorielle et le ganglion viscéral sont phagocytés. Ensuite, la mise en place des organes de Ciona adulte a lieu (**Figure 37**) :

- une double couche de tunique constituée de tunicine et de cellulose
- un système nerveux composé d'un ganglion cérébral et d'une hypophyse
- un système digestif formé d'un estomac, d'une glande sécrétrice et d'un intestin
- un cœur
- un endostyle
- des sacs branchiaux
- des cellules musculaires
- des systèmes reproductifs

Le juvénile réalise une croissance rapide et acquière la maturité sexuelle au bout de deux mois environ.

Peu de choses sont connues sur les signaux naturels induisant la métamorphose. Le rôle potentiel du système nerveux de la larve qui s'étend des papilles adhésives à la queue en passant par le ganglion viscéral a été abordé (Cloney, 1977; Cloney and Cavey, 1982). En effet, le système nerveux pourrait émettre des facteurs humoraux contrôlant la métamorphose. Il a également été montré que le bon déroulement de la métamorphose nécessitait la présence de cellules de la testa (Sato and Morisawa, 1999).

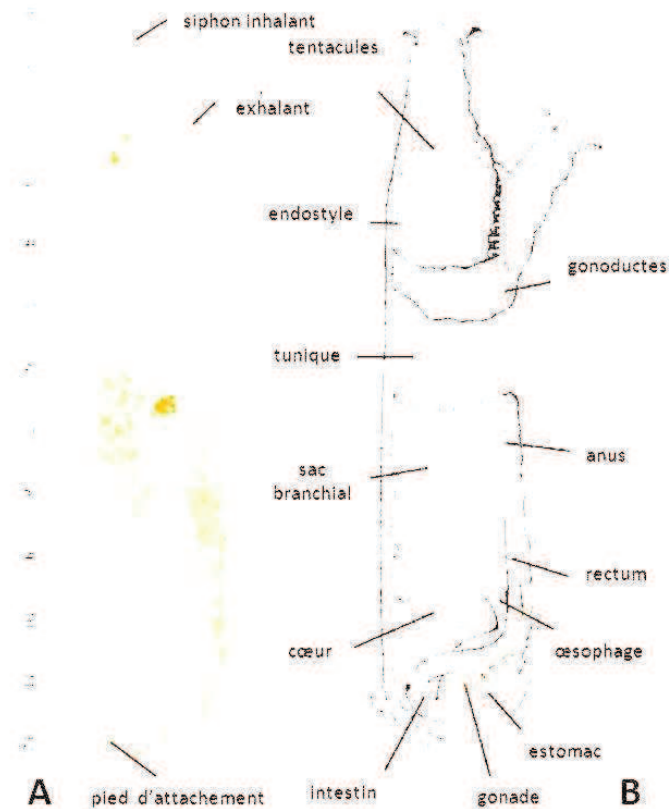


Figure 37 : Individu adulte de *Ciona intestinalis*. (Cirino et al., 2002) **A**, photographie ; **B**, schéma descriptif de l'anatomie interne.

La métamorphose des ascidies est parfois comparée à celle des batraciens. Cependant, chez ces organismes, la métamorphose n'a pas les mêmes conséquences : en effet, les amphibiens conservent leur plan d'organisation alors que *Ciona intestinalis* change complètement de structure. Elle passe d'une organisation de type chordé à celle d'un urochordé. Ce passage d'un plan d'organisation à un autre a valu aux ascidies de nombreux débats sur leur position phylogénétique.

Résultats

I- Positionnement du sujet

J'ai été recrutée en tant qu'ingénieur d'études ITRF UM2 dans l'équipe du professeur Stephen Baghdigian en décembre 2006. La thématique de l'équipe était essentiellement orientée sur les phénomènes d'apoptose au cours du développement de *Ciona intestinalis*. A mon arrivée dans le laboratoire, j'ai commencé à travailler sur les projets de recherche en cours puis on m'a confié en parallèle un nouveau projet d'étude récemment établi en collaboration avec Giacomo Cavalli qui dirige une équipe à l'Institut de Génétique Humaine de Montpellier, travaillant sur les mécanismes de la régulation épigénétique *via* les PcG et TrxG chez la drosophile. Les premiers résultats que j'ai obtenus sur ce projet « Ciona/épigénétique » ont été mis à profit pour débiter une thèse, en co-tutelle entre les deux laboratoires, en décembre 2008.

Le but de ce projet est de savoir si le système de mémoire cellulaire, formé par les complexes multimériques des PcG et TrxG, est conservé dans le développement embryonnaire de *Ciona* afin de contrôler l'expression des gènes *Hox* au cours du temps, sachant que :

- la protéine Pc du PRC1 est absente (Schuettengruber et al., 2007). Il a été mis en évidence, chez la drosophile, que la protéine Pc permet le recrutement du PRC1 *via* la reconnaissance de la marque de répression H3K27me3 déposée par la protéine E(z) du PRC2.

- le cluster des gènes *Hox* est fragmenté et ne comporte pas de réelle colinéarité (Ikuta et al., 2004). De plus, en cours de thèse, Ikuta et ses collaborateurs ont montré que l'implication des gènes *Hox* dans le développement embryonnaire de *Ciona* semble être limitée, à l'exception des gènes *Hox-10* et *-12* impliqués dans le développement du système nerveux et du bout de la queue respectivement (Ikuta et al., 2010).

Cette étude nous a menés à un certain nombre d'observations détaillées dans les deux parties de ce chapitre.

Nous avons décidé d'aborder cette problématique par des expériences de knockdown par micro-injection d'oligonucléotides anti-sens de type morpholino dans les œufs de *Ciona*. Je me suis formée et ai mis en place cette technique qui n'était pas utilisée au laboratoire avant mon arrivée.

Dans un premier temps, j'ai montré que l'inhibition de l'expression protéique d'E(z) a des conséquences dramatiques sur la mise en place des différents tissus au cours du développement larvaire, notamment sur la mise en place de la notochorde puisque celle-ci est totalement absente chez les morphants.

Ces observations ont été obtenues par deux approches expérimentales, (i) une étude morphologique en microscopie électronique à transmission, (ii) des marquages en immunofluorescence indirecte.

J'ai ensuite suivi la présence ainsi que l'activité de la protéine E(z) au cours du développement des embryons contrôles et morphants à l'aide d'un anticorps anti-Ci-E(z), que j'ai produit au cours de ma thèse, et d'un anticorps anti-H3K27me3 commercial. Ceci nous a permis d'affirmer que la protéine E(z) est fonctionnelle et conserve son activité méthyltransférase sur le résidu H3K27 chez *C. intestinalis*.

Par la suite, nous avons étudié l'expression génique d'E(z) (PRC2), de *Ph* (PRC1), de *Trx* (TAC1), des gènes *Hox* et de gènes fonctionnels impliqués dans la mise en place de l'épiderme, le système nerveux, la notochorde et les cellules musculaires. Cette étude a été réalisée par la technique de qPCR sur des échantillons sauvages et morphants-E(z) du début du développement embryonnaire jusqu'au stade larvaire.

Nous avons mis en évidence le profil d'expression de ces gènes au cours du développement embryonnaire et avons montré que la dérégulation d'expression génique attendue en l'absence d'E(z) n'est pas systématique, ce qui conforte l'idée de complexité organisationnelle des complexes des PcG et TrxG. En effet, les gènes *Hox* testés ne présentent pas de variation significative lors de l'inhibition d'E(z) à l'exception du gène *Hox-12* pour lequel une dérégulation est observée au cours du développement embryonnaire des morphants E(z). Ces résultats suggèrent une implication limitée du PcG dans la régulation de l'expression génique des gènes *Hox* chez *Ciona*.

Dans un deuxième temps, je me suis intéressée à l'implication des protéines Ph et Trx dans le développement larvaire de *Ciona*. J'ai abordé cette étude par des invalidations protéiques par micro-injection de morpholino. Une approche par MET et immunofluorescence indirecte, m'ont permis de décrire les phénotypes tardifs obtenus en mettant en évidence une implication remarquable de ces deux protéines dans le développement embryonnaire. La protéine Trx semble jouer un rôle déterminant dans la régulation de l'activation génique.

De plus, ces observations confortent l'idée d'un PRC1 actif. La fonction de reconnaissance de la marque H3K27me3, portée par la protéine Pc chez la drosophile, serait assurée par une autre protéine chez *Ciona*.

L'ensemble de ces observations conforte l'idée selon laquelle les protéines des PcG et TrxG jouent un rôle déterminant dans la régulation de l'expression génique lors du développement embryonnaire de *Ciona intestinalis* tout en ayant une implication mineure dans la régulation de l'expression des gènes *Hox*. Ces données laissent entrevoir un nouveau mode organisationnel du PRC1. Le principe global d'action de ces complexes a été maintenu au cours de l'évolution mais le rôle de chaque protéine peut avoir potentiellement évolué.

II- Implication d'E(z) au cours du développement embryonnaire de *Ciona intestinalis*

II-1- Défauts du développement associés à l'inactivation d'E(z) chez *Ciona intestinalis*

Les résultats sont présentés sous la forme d'un article en préparation.

Enhancer of zeste inactivation triggers major developmental defects during early embryogenesis of *Ciona intestinalis* (prochordate)

Enhancer of zeste invalidation triggers major developmental defects during early embryogenesis of *Ciona intestinalis* (prochordate)

Emilie Liabeuf-Le Goff, Camille Martinand-Mari, Marianne Martin, Yvan Boublik, Nelly Godefroy, Paul Mangeat, Giacomo Cavalli and Stephen Baghdiguian

Abstract

Classically, E(z) is known to be a major regulator of *Hox* genes activity via H3K27me3 mark deposit. By using morpholino invalidation of E(z) in *Ciona intestinalis*, we showed evidence that E(z) acts as a major determinant in embryonic development. Morphant E(z) embryos are affected with a severe phenotype which can be summarized by successive defects beginning with the early miss-positioning of dividing daughter cells at 4-cell stage. E(z) deficient embryos fail to form a notochord, lack caudal nerve. Overall, miss-localization and terminal differentiation defects of nerve, epidermal and muscle cells lead to an improper larva. These major phenotypic defects are correlated with lack of H3K27me3 mark deposit as evidenced by indirect immunofluorescence and western blotting studies. RT-qPCR experiments of tissue-specific genes demonstrate a de-repression of genes directly implied in early development while late-expressed genes are down-regulated. In addition among *Hox* genes, only *Hox12* expression is significantly modified and found to be de-repressed in morphant context.

Altogether, our results present the first evidence of histone epigenetic marks as major determinants in *Ciona intestinalis* embryonic development.

Introduction

Epigenetic regulation of gene expression is necessary for the correct deployment of developmental programs and for the maintenance of cell fates. Polycomb group (PcG) and Trithorax group (TrxG) genes were first identified genetically in *Drosophila melanogaster* as repressors and activators required for maintaining the correct expression pattern of homeotic genes (*Hox* genes) throughout development. *Hox* genes, a set of transcription factors, specify cell identity along the anteroposterior axis of segmented animals. In addition, PcG and TrxG proteins play critical roles in stem cell biology, development, and cancer (Sauvageau and Sauvageau, 2010; Simon and Kingston, 2009; Sparmann and van Lohuizen, 2006).

In *Drosophila*, three principal PcG protein complexes have been characterized: the Polycomb repressive complex 1 and 2 (PRC1 and PRC2, respectively) and the Pho repressive complex

(PhoRC) (Schwartz and Pirrotta, 2007). Enhancer of zeste E(z) is one of the four major components of the PRC2 which also includes Extra sex comb (Esc), Suppressor of zeste 12 (Su(z)12) and Nurf-55. PRC2 is known to associate with and methylate nucleosomes. Specifically PRC2 is responsible of a multiple methylation which occurs on and trimethylates Lysine 27 of histone H3 (H3K27me3 mark). E(z) contains a SET domain that bears the catalytic methylation activity (Cao and Zhang, 2004), but in order to be active E(z) has to be associated with the three other PRC2 components (Czermin et al., 2002; Müller et al., 2002). E(z) loss of function induces the lack of H3K27 methylation supporting that the methyltransferase activity is only supported by E(z) (Ebert et al., 2004). H3K27me3 is considered as a major epigenetic mark associated with the repression of gene transcription. This general gene repression is complemented by the PRC1 which consists of five components namely Polycomb (Pc), Polyhomeotic (Ph), Posterior sex comb (Psc), Sex comb of midleg (Scm), and dRing (Aissani and Bernardi, 1991; Muller and Verrijzer, 2009; Schuettengruber et al., 2007; Schwartz and Pirrotta, 2007; Simon and Kingston, 2009). PRC1 is recruited onto the chromatin via the chromodomain of Pc which recognizes the H3K27me3 allowing PRC1 to add a second mark consisting in mono-ubiquitinylation of Lys119 on histone H2A, via the ubiquitin-ligase of dRing (Wang et al., 2004).

In contrast, TrxG (which includes three major complexes: SWI/SNF, NURF and TAC1 ; Schuettengruber et al., 2007) counterbalances the repressive activity of PcG. PcG and TrxG are widely expressed in metazoans where they are also generally considered as major epigenetic regulators. At the transition between invertebrates and vertebrates, an increase in the number of PcG and TrxG is observed. Successive duplications have led to the generation of homolog gene products exhibiting evolved structural domains and functions (Whitcomb et al., 2007; Kerppola, 2009). It has been established that PRC1 and 2 can act independently (Mohd-Sarip et al., 2005; Tavares et al., 2012), therefore different targets of PRC1 and 2 exist in different tissues. The identification of these tissue-specific targets is a major challenge. Similarly challenging is the characterization of the mechanism of recruitment of PcG proteins to these various targets. During the course of evolution, although the general principles of action of PcG and TrxG have been maintained, each individual protein might have evolved functionally.

Ciona intestinalis, a solitary ascidian (Tunicata, Chordata) is positioned at the basal level of the chordate lineage (Delsuc et al., 2006). Their eggs develop into tadpole larvae, which share

a prototypical morphogenesis and chordate body plan, characterized by the presence of a hollow dorsal neural tube, a notochord, paraxial mesoderm and a post-anal tail (Satoh, 1994; Satoh, 2008). Beside a tadpole-like chordate body plan, the lineage of *C. intestinalis* embryonic cells is invariant and has been well described (Conklin, 1905; Lemaire, 2009). Its genome is fully sequenced and largely annotated (Dehal et al., 2002).

In *Ciona intestinalis*, the *Hox* gene cluster is disorganized and dispersed across two chromosomes; the temporal collinearity of *Hox* gene expression is lost and the spatial collinearity is only partially retained (Ikuta et al., 2004). A recent study suggests that the *Hox* genes functional roles are also limited as far as larval development is concerned (Ikuta et al., 2010). Moreover, *C. intestinalis* PRC1 lacks Pc gene, whereas, in contrast, PRC2 is fully expressed (Schuettengruber et al., 2007). The question arises as to whether PRC1 is active in *Ciona* which lacks the H3K27me3 recruitment function of Pc. Most importantly is the H3K27 mark functional in the absence of Pc ? In this study, we aimed to analyze the function of *Ciona* E(z) during embryonic development. In order to address this question we used an invalidation approach by morpholino injected in eggs before fertilization and followed E(z) activity during embryo development.

Results

Eggs were injected with either E(z) morpholino or standard morpholino as a control. E(z) morpholino is designed in order to target the AUG codon and generate non translated mRNAs. We therefore verified mRNA expression not only of E(z) but also of genes involved in the PcG (*Polyhomeotic*, *Ph*, from PRC1) and TrxG (*Trithorax*, *Trx*, from TAC1 complex) (Figure 1). qPCR results showed that all analyzed genes are maternal genes and are expressed as soon as 1-cell stage. During embryo development, *E(z)*, *Ph* et *Trx* mRNA expression decrease gradually over time and we observed no significant difference between control and morphant embryos. Injection of E(z) morpholino should induce a defective expression of the protein, therefore, in order to detect *ciona* E(z) protein, we raised a specific antibody from a large recombinant N-terminal fragment of Ci-E(z) produced in bacteria which was used for indirect immunofluorescence studies.

The expression and cellular localization of E(z) during embryonic development of *Ciona* was next characterized in control embryos and E(z)-morphants (Figure 2). In control embryos, E(z) fluorescence was detected at the 32-cell stage. All blastomeres were labeled (with the

exclusion of cells undergoing a mitotic event) at this stage as well as at the following 64-cell stage. Surprisingly, in gastrula, a loss of detection of E(z) protein consistently occurred at this major developmental stage. In neurula, the detection of E(z) resumed in a cell-specific manner. On the following stage of development (initial tailbud), cell-selective detection of E(z) was only muscle cells. Then, at mid tailbud stage, a drastic and major increase in E(z) fluorescence enlightened all embryonic cells. In late tailbud, when the notochord development is achieved, all tail cells were found to be E(z) positive. Then at the hatching stage, another differential expression of E(z) was observed. Cells of the newly formed adhesive papillae were labeled for E(z), as well as some epidermal and endodermic head cells. In the tail, positive cells were specifically located in the rear extremity including epidermal, muscular and notochord cells.

We next analyzed the effect of E(z) invalidation. None detection of E(z) was recorded during embryonic development (Figure 2, right panels). Moreover, embryos presented major developmental defects that could be observed as early on as the 4-cell stage, a time at which no E(z) fluorescence was detected in wild type. At 4-cell stage and beyond blastomeres were impaired to divide and cleave properly leading to the development of a disorganized embryo later on. Indeed as soon as the 4-cell stage, a significant defect in cell positioning took place. This embryo asymmetry was amplified with subsequent divisions which led to the formation of miss-organized, asymmetric gastrula and neurula. The resulting embryo failed to reach a functional hatching larva leading to an impaired tadpole in which a head structure could still be distinguished from an incomplete tail part totally lacking notochord. Some cell differentiation occurred since muscle-like cells were observed. Although these cells were contractile, the resulting tadpole was unable to swim (data not shown). Multinucleated cells were also observed showing a cell division defect. At the latest stage, a few nuclei were E(z) positive, potentially indicative of the occurrence of a dilution effect of the morpholino. TUNEL labeling on morphant embryos did not reveal apoptosis at any stage of embryonic development (data not shown).

The characterization of the E(z)-invalidated phenotype was further complemented at the hatching larva stage (Figure 3). An extensive comparison between control and E(z)-morphant embryos was performed, notably by using specific-antibody of differentiated nervous cells. In control embryos, acetylated-tubulin antibodies decorated both the central (head-located part) and peripheral (regularly positioned all along the tail) nervous systems (Figure 3a). In

contrast, in the morphant, all nervous cells were very scarce and miss-localized at the head-tail junction (Figure 3b). Moreover, the total absence of the caudal nerve was noticed (data not shown). Cells in the morphant were further identified and characterized through ultrastructural analysis. In contrast to control embryos (Figure 3c), the relative positioning of cells in the morphant was drastically affected (Figure 3e), confirming the observations made at the light microscopic level (Figures 2 and 3d). In those ultrathin sections of morphant embryo (Figure 3e), the lack of notochord structure was particularly striking, pointing to the disorganization of embryonic tissues. In addition, mitochondrial-enriched muscle cells were clearly identified externally delocalized, as compared with control tissue, and resided close to a set of ill-differentiated cells containing numerous lipid droplets, presumably originating from endodermal precursor cells (Figure 3e). In addition to the lack of notochord formation, a major characteristic of *E(z)* invalidation appeared to be a general defect in cell differentiation which led to the generation of a majority of cells rich in lipid droplets as indicated by the toluidin blue labeling of cells in semi-thin sections of morphant embryos (Figure 3d). Muscle cells appeared rich in lipid droplets as well (Figure 3f). Accumulation of lipids, never seen in control muscle, might reflect a defect in either cell differentiation or metabolism or both.

E(z) functions as the catalytic subunit in the PCR2 complex. Invalidation of *E(z)* should result in the lack of H3K27 trimethylation. We therefore verified the status of the H3K27me3 mark with a specific antibody in control and morphant embryos (Figure 4). It is interesting to note that H3K27me3 antibody labeled the egg pronucleus at meiosis 1 stage. In contrast, in following stages, from 2-cell up to 64-cell stage, the mark was absent in control embryos. In gastrula, the mark reappeared and labeling was maintained in the neurula. In the initial tailbud only epidermal cells of the nascent tail were H3K27me3 positive. A strong labeling was then detected at middle tailbud stage, correlating with the strongest recorded expression of *E(z)*, in all epidermal cells, in all cells of tail extremity and some endodermal cells of the head. A same pattern of labeling was maintained in later stages. In the hatching larva the cells of papillae were H3K27me3 positive, as was previously observed for *E(z)*. It is important to note that the mark is maintained during mitosis (Figure 4, gastrula control and Figure S1). Overall, the results for H3K27me3 were well consistent with the pattern and kinetics of expression of *E(z)*. By comparison, no detection of the H3K27me3 mark was observed in morphant embryo confirming that *E(z)* activity was clearly defective, and that the observed strong phenotype resulted indeed from *E(z)* deficiency.

These observations were confirmed by Western blotting by using the same H3K27me3 antibody on control and E(z) morphant embryos at different developmental stages (Figure 5). In control embryos, we detected a very light signal at 1-cell stage, nothing at 16-cell stage and a strong staining at middle tailbud stage. As expected, no detection was observed in all tested stages of E(z) morphants. These results are in perfect harmony with the previous immunofluorescence experiments.

To complement the description of the E(z) phenotype, we further analyzed by qPCR the expression of various genes known to be implicated along the embryonic development (Figure 6). We chose genes implicated in muscle (Macho1, Tbx6c and TPM2), nervous system (ETR), notochord (Noto4), epiderm (Epi1) development and *Hox* genes (1-5, 10 and 12). A first category of genes encompasses three genes (Macho1, Tbx6c and ETR) whose expression was increased in the morphant context very early on at the 4-cell stage. The maternal Macho1 gene was overexpressed from the 4-cell stage; its overall level of expression declined over development but with the significant maintenance of a relative difference between control and morphant. Tbx6c, a Macho1-induced gene (Yagi et al., 2005), was also overexpressed all along embryonic development up to hatching larva stage. In contrast, ETR overexpression was biphasic with a first peak up to 64-cell stage followed by down regulation at gastrula and a second phase of overexpression starting at late tailbud stage. It should be noticed, in controls, that the ETR expression peak is delayed and appears at gastrula and neurula stages. A second class of genes, *Hox12* and *Epi1*, was characterized by a peak of overexpression at neurula and early tailbud stages respectively. Finally, a last class of genes involved in terminal differentiation was found to be down regulated at late stages of development : TPM2 and Noto4. TPM2 involved in muscle differentiation, which expression started at gastrula appeared downregulated from neurula and beyond in morphant embryos. The same phenomenon was observed for Noto4, a gene involved in notochord formation with a down regulation significantly detected from middle tailbud stage and beyond. The *Hox* 1-5 and 10 did not present significant differences between control and morphant (data not shown). Overall it could be conclude that the invalidation of E(z) through morpholino, while not affecting the expression of regulatory genes of the same family such as Trx and Ph (Figure 1), induced a strong phenotype (Figures 2 and 3) which might be explained in part by the deficiency in H3K27me3 mark (Figures 4 and 5) and deregulation of various sets of genes acting along the various stages of embryonic development, ie from very early on (4-cell stage) up to terminal differentiation stages (Figure 6).

Discussion

Taken together, our data militates in favor of a major role of protein E(z) in the embryonic development of *C. intestinalis* despite the absence of protein Pc which recognizes the H3K27me3 mark in *Drosophila melanogaster*. Inhibition of E(z) protein has implications for the viability of mutant larva which results in major defects in differentiation, signaling and cellular positioning. Indeed, we detected absence of notochord and dorsal neural tube, positioning defects of muscle cells (presence of muscle cells close to the otolith/ocellus) and epidermal sensory neurons (head-tail abortive junction), presence of large multinucleated cells resulting from cytokinesis defects, loss of cell-cell contacts and modified metabolism with the presence of lipid vesicles in muscle cells. So far, no results have been published on the epigenetic regulation by Polycomb complex in *Ciona*. This work reveals the role of epigenetic regulation under control of E(z) during early development of *Ciona* and raises many questions about the mode of action of PcG in this species.

The absence of notochord and the positions of ectopic muscle and nerve cell in morphants could be caused by defects in cell fate during early development. At 32-cell stage, the blastomeres A6.4 pair has a common cell fate notochord/muscle/nervous system, B6.2 blastomeres have a common cell fate notochord/muscle, A6.2 a common cell fate notochord/system nervous and B6.5 a common cell fate nervous system/muscle (Sato, 1994). At 64-cell stage and the beginning of gastrulation, only blastomeres A7.8 and A8.16 have a common cell fate muscle/notochord. After the onset of gastrulation, no more blastomere gives common cell fate notochord/muscle/nervous system. It is noteworthy that the phenotype of morphant is not related to apoptosis since no TUNEL-positive nuclei were observed all along embryogenesis. In E(z) morphants, the fate of blastomeres normally involved in the formation of the notochord could be diverted in view of the absence of notochord in these morphants. We can therefore ask about the fate of these blastomeres: can they be directed to another cell fate or remain in a standby state ? It has been shown in mice that methylation of H3K27 by EZH2 plays an essential role in the repression of muscle-specific genes and the demethylase activity of UTX on H3K27me3 is required to initiate muscle fate (Caretta et al., 2004; Seenundun et al., 2010). The qPCR results for *Macho-1* and *Tbx-6c* genes show a derepression of their level of expression in morphants MO-E(z), this would thus consider referral to persistence of muscle cells in morphants.

Surprisingly, the H3K27me3 mark is present in the unfertilized egg of *Ciona* (blocked in metaphase I of meiosis) while protein E(z) is not detected. One hypothesis would be that the

E(z) protein is present transiently during the maturation of the egg in the ovarian tissue. Similar observations were made in *Drosophila* eggs where immunofluorescence experiments showed that E(z) is no longer visible from oogenesis stage 6 (*Drosophila melanogaster* oogenesis includes 14 stages) while the mark of gene repression H3K27me3 is deposited early during oogenesis and is maintained throughout oogenesis (Iovino, Ciabrelli and Cavalli, unpublished data).

Surprisingly, as soon as 4-cell stage a morphant phenotype defect is observed while the protein E(z) and H3K27me3 marks are not yet detected in the controls. The E(z) mRNA are maternal (Figure 1), this suggests that the protein E(z) is required very early during embryonic development, zygotic translation seems essential in the early cell divisions. Our results can be compared with recent studies conducted in mice, showing that PRC1 components play a role in DNA replication, cell cycle progression and embryonic development from the 2-cell stage (Posfai et al., 2012).

The presence of multinucleated cells in E(z) morphants reflects a defect in cell cycle and cytokinesis in particular. H3K27me3 mark is maintained during mitosis in control (Figure S1); the absence of this mark in morphants may be responsible for this lack of cytokinesis. Polyploidy is also observed in the morphants E(z) in *Drosophila* and studies are underway (Iovino, Ciabrelli and Cavalli, unpublished data).

We have shown by RT-qPCR experiments on E(z) morphants, the expression of *Hox* genes is not significantly altered during embryonic development when the protein E(z) is inhibited, except *Hox-12* gene which is derepressed. This highlights a minor involvement in *Hox* genes regulated by PcG during *Ciona* embryogenesis. These results are consistent with the data obtained by Ikuta et al. (2010) who observed no phenotypic difference in the inhibition of *Hox* except for *Hox10* and 12. In our study, derepression of *Hox12* gene in E(z) invalidation context shows that the PcG-dependent gene regulation is partially conserved in *Ciona*. A recent study in *Ciona* also suggests the involvement of *Hox1* during metamorphosis (Sasakura et al., 2012). In this context and despite disruption cluster of *Hox* genes, a more classic PcG and TrxG of *Hox* gene regulation could be found during metamorphosis and the late development of *Ciona*.

The genomic analysis by ChIP is currently underway in our labs, and will enable us global identification of PcG and TrxG target genes in *Ciona*.

Bibliography

- Aïssani, B. and Bernardi, G. (1991). CpG islands, genes and isochores in the genomes of vertebrates. *Gene* **106**, 185–195.
- Bredfeldt, T. G., Greathouse, K. L., Safe, S. H., Hung, M.-C., Bedford, M. T. and Walker, C. L. (2010). Xenoestrogen-induced regulation of EZH2 and histone methylation via estrogen receptor signaling to PI3K/AKT. *Mol. Endocrinol.* **24**, 993–1006.
- Cao, R. and Zhang, Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Current Opinion in Genetics & Development* **14**, 155–164.
- Chambon, J. P., Soule, J., Pomies, P., Fort, P., Sahuquet, A., Alexandre, D., Mangeat, P. H. and Baghdiguian, S. (2002). Tail regression in *Ciona intestinalis* (Prochordate) involves a Caspase-dependent apoptosis event associated with ERK activation. *Development* **129**, 3105–3114.
- Conklin, E. G. (1905). The organization and cell lineage of the ascidian egg. *J. Acad. Nat. Sci. (Philadelphia)* **13**, 1–119.
- Czernin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. and Pirrotta, V. (2002). Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**, 185–196.
- Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., Davidson, B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D. M., et al. (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **298**, 2157–2167.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D. and Philippe, H. (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* **439**, 965–968.
- Ebert, A., Schotta, G., Lein, S., Kubicek, S., Krauss, V., Jenuwein, T. and Reuter, G. (2004). Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in Drosophila. *Genes Dev.* **18**, 2973–2983.
- Ikuta, T., Yoshida, N., Satoh, N. and Saiga, H. (2004). *Ciona intestinalis* Hox gene cluster: Its dispersed structure and residual colinear expression in development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15118–15123.
- Ikuta, T., Satoh, N. and Saiga, H. (2010). Limited functions of Hox genes in the larval development of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development* **137**, 1505–1513.
- Kerppola, T. K. (2009). Polycomb group complexes-many combinations, many functions. *Trends in cell biology* **19**, 692–704.
- Lemaire, P. (2009). Unfolding a chordate developmental program, one cell at a time: invariant cell lineages, short-range inductions and evolutionary plasticity in ascidians. *Dev. Biol.* **332**, 48–60.
- Méjean, C., Lebart, M. C., Boyer, M., Roustan, C. and Benyamin, Y. (1992). Localization and identification of actin structures involved in the filamin-actin interaction. *Eur. J. Biochem.* **209**, 555–562.
- Mita-Miyazawa, I., Ikegami, S. and Satoh, N. (1985). Histospecific acetylcholinesterase development in the presumptive muscle cells isolated from 16-cell-stage ascidian embryos with respect to the number of DNA replications. *J Embryol Exp Morphol* **87**, 1–12.
- Mohd-Sarip, A., Cléard, F., Mishra, R. K., Karch, F. and Verrijzer, C. P. (2005). Synergistic recognition of an epigenetic DNA element by Pleiohomeotic and a Polycomb core complex. *Genes Dev.* **19**, 1755–1760.

- Müller, J. and Verrijzer, P.** (2009). Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 150–158.
- Müller, J., Hart, C. M., Francis, N. J., Vargas, M. L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E. L., O'Connor, M. B., Kingston, R. E. and Simon, J. A.** (2002). Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**, 197–208.
- Posfai, E., Kunzmann, R., Brochard, V., Salvaing, J., Cabuy, E., Roloff, T. C., Liu, Z., Tardat, M., van Lohuizen, M., Vidal, M., et al.** (2012). Polycomb function during oogenesis is required for mouse embryonic development. *Genes Dev.* **26**, 920–932.
- Reynolds, E. S.** (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208–212.
- Sasakura, Y., Kanda, M., Ikeda, T., Horie, T., Kawai, N., Ogura, Y., Yoshida, R., Hozumi, A., Satoh, N. and Fujiwara, S.** (2012). Retinoic acid-driven Hox1 is required in the epidermis for forming the otic/atrial placodes during ascidian metamorphosis. *Development* **139**, 2156–2160.
- Satoh, N.** (1994). *Developmental biology of ascidians*. Cambridge.
- Sauvageau, M. and Sauvageau, G.** (2010). Polycomb Group Proteins: Multi-Faceted Regulators of Somatic Stem Cells and Cancer. *Cell Stem Cell* **7**, 299–313.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. and Cavalli, G.** (2007). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell* **128**, 735–745.
- Schwartz, Y. B. and Pirrotta, V.** (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 9–22.
- Simon, J. A. and Kingston, R. E.** (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 697–708.
- Sparmann, A. and van Lohuizen, M.** (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 846–856.
- Tavares, L., Dimitrova, E., Oxley, D., Webster, J., Poot, R., Demmers, J., Bezstarosti, K., Taylor, S., Ura, H., Koide, H., et al.** (2012). RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell* **148**, 664–678.
- Wang, L., Brown, J. L., Cao, R., Zhang, Y., Kassis, J. A. and Jones, R. S.** (2004). Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Molecular cell* **14**, 637–646.
- Whitcomb, S. J., Basu, A., Allis, C. D. and Bernstein, E.** (2007). Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. *Trends in Genetics* **23**, 494–502.
- Yagi, K., Takatori, N., Satou, Y. and Satoh, N.** (2005). Ci-Tbx6b and Ci-Tbx6c are key mediators of the maternal effect gene Ci-macho1 in muscle cell differentiation in *Ciona intestinalis* embryos. *Developmental Biology* **282**, 535–549.

Materials and methods

Animal husbandry

Adult *Ciona intestinalis* were collected in the bay of Roscoff (Finistère, France). Oocytes and sperm were obtained by dissection of gonoducts, dechoriation was performed with 1.0% sodium thioglycolate (T0632, Sigma) and 0.05% actinase E (D4527, Sigma) (Mita-Miyazawa et al., 1985) and cross fertilization was performed in glass tubes. Embryos were reared in glass petri dishes at 18°C in 0.2 mm filtered sea water containing 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin.

Microinjection

25-mer MO for Ci-E(z) (5'-TTTGACTGCGTCATTGCGTGATAT-3') was ordered (Gene Tools, LLC), with target sequence containing the first methionine codon (underlined). MO was injected with Texas-Red Dextran (Invitrogen). 1 mM MO was used for microinjection. Control embryos injected with a universal control MO (5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3') did not alter gene expression. Every experiment was carried out with 20 or more embryos, and basically the same result was obtained.

Immunization procedure and antibody production

Antibody anti-E(z) was generated to a GST fusion protein corresponding to the N-terminal domain of the E(z) protein (residues 1 to 605 - ENSCINT00000016333) (Montpellier Prorec platform, France). Purified fusion protein was used to immunize rabbits and sera were affinity-purified on immobilized E(z) fusion protein (Méjean et al., 1992).

TUNEL staining and indirect immunofluorescence analysis

Embryos were fixed for 20 min with 3,7% formaldehyde in filtered seawater and then permeabilized for 20 min at room temperature with 0,2 % Triton X-100 in TS solution (150 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 7.5).

TUNEL staining (Roche, In situ cell death fluorescein or rhodamin detection kit) was performed as described previously (Chambon et al., 2002).

Fixed and permeabilized embryos subjected to indirect immunofluorescence with rabbit antibodies anti-E(z) polyclonal antibody (produce in our lab) or rabbit anti-H3K27me3 (Millipore) or rabbit anti-acetylated tubulin (Sigma) and Phalloidin-TRITC (Sigma) staining

as described previously (Chambon et al., 2002). Appropriate secondary antibody was FITC-conjugated donkey-anti-rabbit immunoglobulins (Jackson Laboratories). Specimens were analyzed with a Leica TCS-SPE laser confocal microscope (Montpellier RIO Imaging platform, France).

Acid precipitation of histone proteins and immunoblotting

Histone extraction was prepared essentially as described in Bredfeldt et al. (2010). Briefly, 15-30 mg of staged larvae were resuspended in 150 μ l RSB buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.4; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; Complete Protease Inhibitor Cocktail) with 0.5% Nonidet P-40, homogenized using a Dounce homogenizer and incubated on ice for 10 min. Lysates were then centrifuged for 5 min at 10,000 rpm at 4°C. The pellet was resuspended in equal volumes (75 μ l) of 5 mM MgCl₂ and 0.8 M HCl, passed 4 times through a 25G5/8 gauge needle, and incubated on ice for 1h. The solution of histone proteins was centrifuged at 14,000 rpm for 10 min at 4°C. Supernatant was transferred to a new tube, and histones were precipitated with a 25% of trichloroacetic acid (TCA) solution dissolved in deionized water. Precipitated histones were collected by centrifugation for 20 min at 14,000 rpm at 4°C. The resultant pellet was washed with ice-cold acetone, dried, and subsequently resuspended with deionized water (30 μ l) and 2M Tris-HCl, pH 8.0 (0.3 μ l). Histone proteins (4 μ l) were resolved on 20% SDS-PAGE gel and Coomassie stain was used to correct for variations in histone H3 loading.

Then, histones were separated by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane (Immobilon; Millipore), and changes in histone methylation relative to total histone H3 were investigated by Western blot analysis. Membranes were probed with rabbit anti-histone H3 (1:5000 ; ab1791, Abcam) and anti-H3K27me3 (1:5000 ; 07-449, Millipore) in 5% BSA, Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, for 2 hours at room temperature, followed by incubation with Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (1:10 000 ; Jackson ImmunoResearch). The blots were visualized by an enhanced chemiluminescence detection system (Pierce).

Light and transmission electron microscopy (TEM)

Embryos were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.2) and post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.45 M cacodylate buffer (pH 7.2). The fixed material was dehydrated in a graded alcohol series and embedded in Epon 812. For light microscopy, semi-thin sections were stained with Toluidine Blue and observed on a Reichert microscope equipped with Nomarski optics. For TEM, ultra-thin sections were classically contrasted with

uranyl acetate and lead citrate (Reynolds, 1963), and observed with a Jeol 1200X transmission electron microscope (UM2 TEM platform, France).

mRNA isolation and RT-qPCR

Fertilized and microinjected eggs were collected at different stages of development from t0h to t18h after fertilization. Total RNA was isolated with RNeasy kit according to the supplier's instructions (QIAGEN). Reverse transcription was performed on equal input mRNA by Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) with an oligodT primer. qPCR was realized on a Light Cycler 480 with the SYBR Green I Master kit (Roche) (qPHD UM2/GenomiX Platform, Montpellier - France) and monitored using S26 control primers. Sets of forward (F) and reverse (R) primers designed to amplify each selected gene are listed hereafter in Table 1.

| Name | Forward primer | Reverse primer |
|----------|-----------------------|-----------------------|
| Ci-TPM2 | GAATTGGAATCTGCCCAAGA | CTGCCTCTTCCAACCTTTTGC |
| Ci-Epi1 | AGCACTACTTGCCAGAGGA | GTCTCGAGAATCGGTCTGAAG |
| Ci-ETR | TCGAGTTGTCGCAAGCATAAC | ACCATCAGGCCCTTCTTTTT |
| Ci-Noto4 | AGATCTTTGCGGAAAAGTGG | CAAAGCAGATCCTGGTCTCT |
| Ci-Macho | GACAAGCCGTATCTGTGCAA | GAATTTTGTGCTCCGGTGAT |
| Ci-Tbx6c | CACCACCATATGCATTCCAA | AGGTGAATTTTGTGGCGAAG |
| Ci-Trx | TGTAGCCAGGATGAATGGTG | ATCGTTTTGAAAAGCGCAGT |
| Ci-Ph | TGTGTGATGGTTGCTCCAAT | CATTGAACACACGAGGTGCT |
| Ci-E(z) | CCGAGGGAAGGTATACGACA | TACTTCATGGCATCGGATTG |
| Ci-Hox1 | CTACTGCGAGCCCTCAATGT | ATTTCAACCCTCCTGGCTCT |
| Ci-Hox2 | TACCTTTGCCGACCAAGAAG | CTCGACGTCCTACCGGTTT |
| Ci-Hox3 | CCTGGCATCTTTGACTGGAT | TCGCGTTTGCTAGCTGAATA |
| Ci-Hox4 | GAGTCCGGAGGATGACAAGA | TACCTGGTGTGCGGTGTAAG |
| Ci-Hox5 | GAGTGACGAAAGCAGTGACG | TCTGACGTTCCGGTGAGACAC |
| Ci-Hox10 | GACGGGGAGGGAAAATAGAT | TGTACGGCACTCGTTTCTTG |
| Ci-Hox12 | TGCAACTCCACAATTCCAA | AGCTGGGTAATGGGGGTAGT |
| Ci-S26 | AAGGACGCGGTCATGTAAAA | TCTTTGGCAAGGCGTAAGAT |

Database analysis

Protein sequences from *D. melanogaster* and *H. sapiens* were found on NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). For each species, when several proteins were available for the same gene the longest was retained. Each selected sequence was then used to conduct TBLASTN searches in *C. intestinalis* genomic (<http://genome.jgi.doe.gov/Cioin2.home.html>)

and cDNA (http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/blast_kh.html) databases. Among hit sequences, we selectively kept those that were indifferently found with both reference species. As expected, the closer the reference species is to *Ciona intestinalis*, the more the e-value is significant (data not shown). This step gave clusters of sequences that we validated with Aniseed web site (<http://www.aniseed.cnrs.fr/>), (ii) search for functional domains required for activity with a CD-search on NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd.cgi>) against CDD-43212 PSSMs database.

Legends of figures

Figure 1 : mRNA expression of E(z), Ph (PRC1) and Trx (TAC1) in E(z) morphants and wild-type embryos.

Time course of E(z) (top panel), Ph (middle panel) and Trx (lower panel) mRNA expression between 1-cell stage to hatching stage in E(z) morphants (light grey) and wild-type embryos (dark grey). The histograms are the mean of four independent micro-injection experiments ; data were normalized to respective S26 mRNA expression values. One relative mRNA quantity corresponds to the amount of target at 1-cell stage.

Figure 2 : E(z) detection by indirect immunofluorescence and confocal analyses in E(z) morphants and control embryos.

E(z) (red), actin (phalloïdine, green) and DAPI (blue) triple labeling of *Ciona intestinalis* embryos at different stages of development. On the right of each merge, the corresponding image of E(z) alone is shown in black and white. For 32-, 64-cell and neurula wild-type stages, the black and white images correspond to a Z-projection. Ct: control embryo; MO: E(z) morphant. Scale bar: 25 μm .

Figure 3 : Characterization of E(z) morphant at the hatching larva stage (18 hpf).

Acetylated-tubulin detection by indirect immunofluorescence in E(z) morphant (b) and wild-type hatching larva (a). Acetylated-tubulin (red), actin (phalloïdine, green) and DAPI (blue) triple labeling of *Ciona intestinalis* hatching larva. Arrow indicates nervous cells in tail-head junction. Scale bar : 70 μm .

Ultrastructural characterization of wild type hatching larva and E(z) morphant. Semi-thin section of E(z) morphant (d), stained with Toluidine Blue. Black rectangle corresponds to the ultra-thin section of muscle cells with lipidic vesicles (arrows) observed by TEM (f). Ultra-thin tail cross-sections of wild-type hatching larva (c) and E(z) morphant (e) showing externally delocalized muscle cell in E(z) morphant. e : epiderm cell; sm : striated muscle ; ntc : notochord cell ; nt : notochord lumina ; n : nucleus. Scale bars : 10 μm (c and e), 35 μm (d), 6 μm (f).

Figure 4 : H3K27me3 detection by indirect immunofluorescence and confocal analyses in E(z) morphants and control embryos.

H3K27me3 (red), actin (phalloïdine, green) and DAPI (blue) triple labeling of *Ciona* embryos at different stages of development. On the right of each merge, the corresponding image of H3K27me3 alone is shown in black and white. For neurula and gastrula wild-type stages, the black and white images correspond to a Z-projection. Ct: control embryo ; MO: E(z) morphant. Scale bar: 25 μ m.

Figure 5 : H3K27me3 detection by Western blotting in E(z) morphants and control embryos.

Comparative western blot analysis between E(z) morphants (MO-E(z)) and control embryos (MO-control) at different stages of *Ciona intestinalis* development with antibody against H3K27me3. Coomassie blue stain (CB) showing the acid extracted histone proteins from *Ciona intestinalis* (top). Western Blotting (WB) was performed with antibody against H3 to show relative quantity in each lane. Note that 3 times more histone preparation was loaded per lane when histone methylation was evaluated. Exposure : 4 min. for H3K27me3 and 5 sec. for H3. Mid.tail : Middle tailbud stage.

Figure 6 : mRNA expression of tissue-specific genes and *Hox12* gene in E(z) morphants and wild-type embryos.

Time course of muscle (*Macho1*, *Tbx6c*, *TPM2*), nervous system (*ETR*), notochord (*Noto4*), epiderm (*Epi1*) specific and *Hox12* mRNA expression between 1-cell to hatching stage in E(z) morphants (light grey) and wild-type embryos (dark grey). The histograms are the mean of four independent micro-injection experiments; data were normalized to respective S26 mRNA expression values. One relative mRNA quantity corresponds to the highest amount of wild-type target mRNA except for *Hox12* and *Epi1* mRNA expression for which it corresponds to the highest amount of E(z) morphants target mRNA.

Figure 1

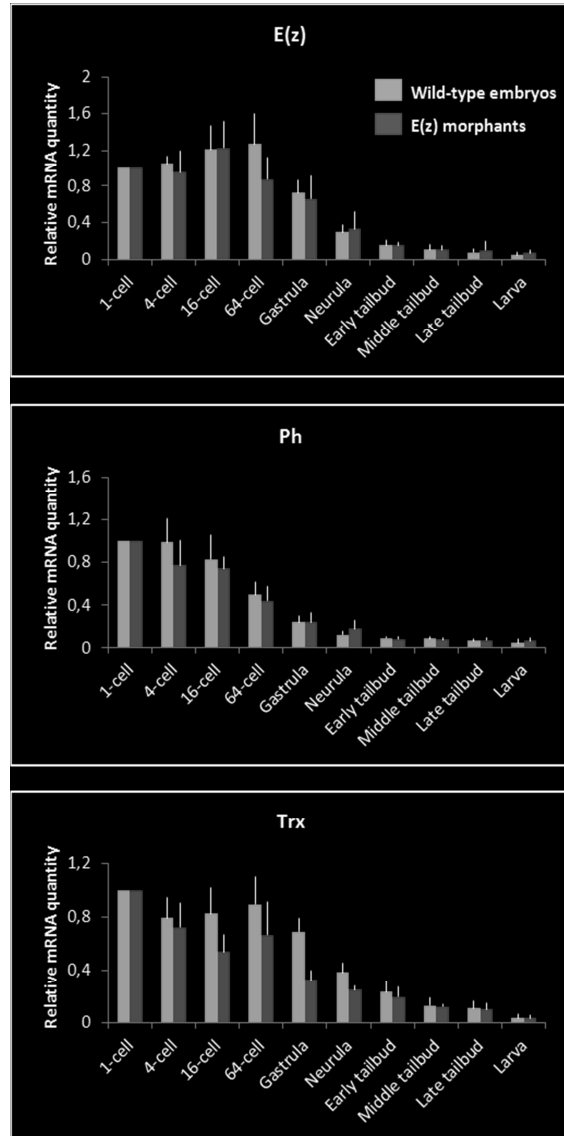
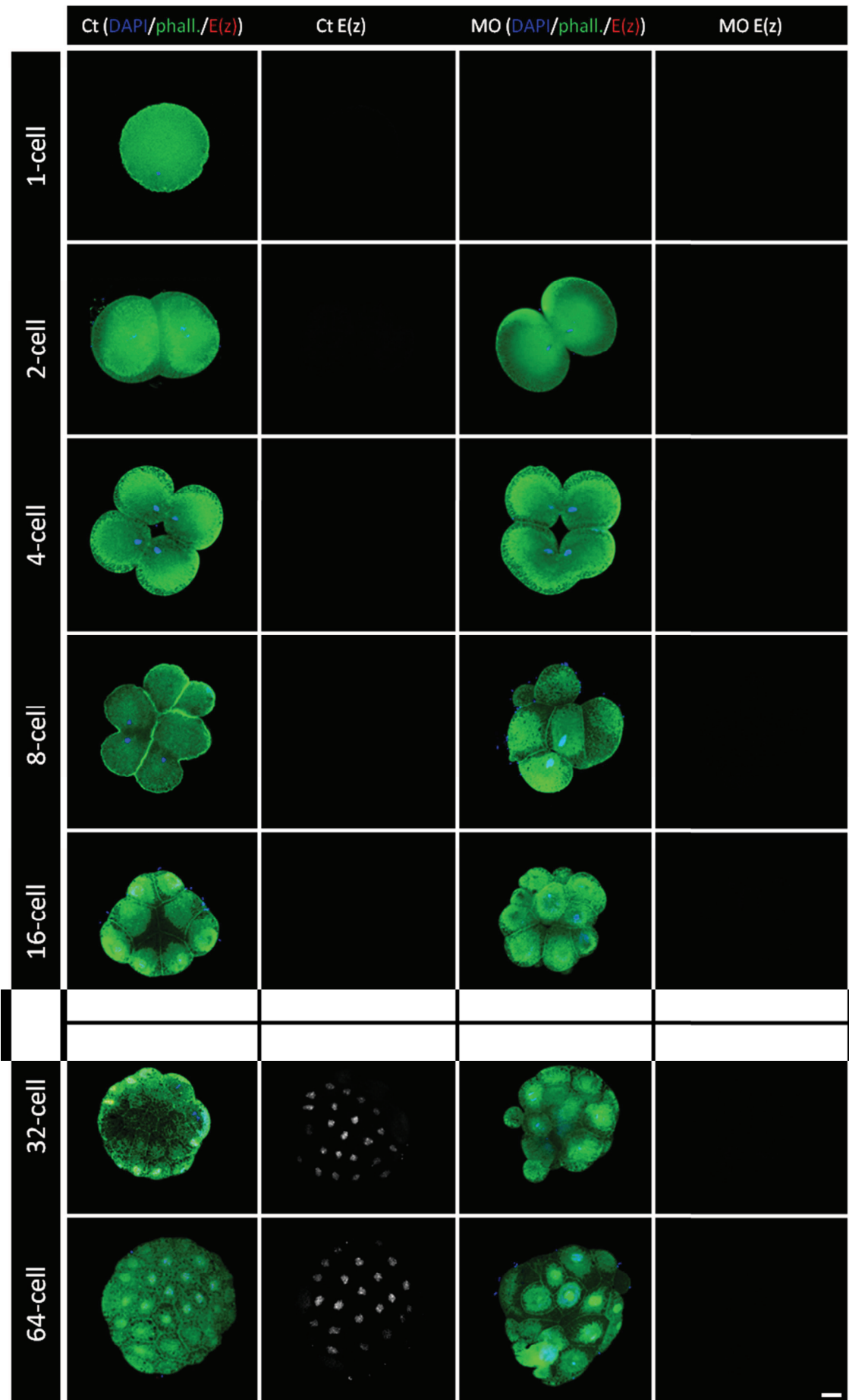


Figure 2



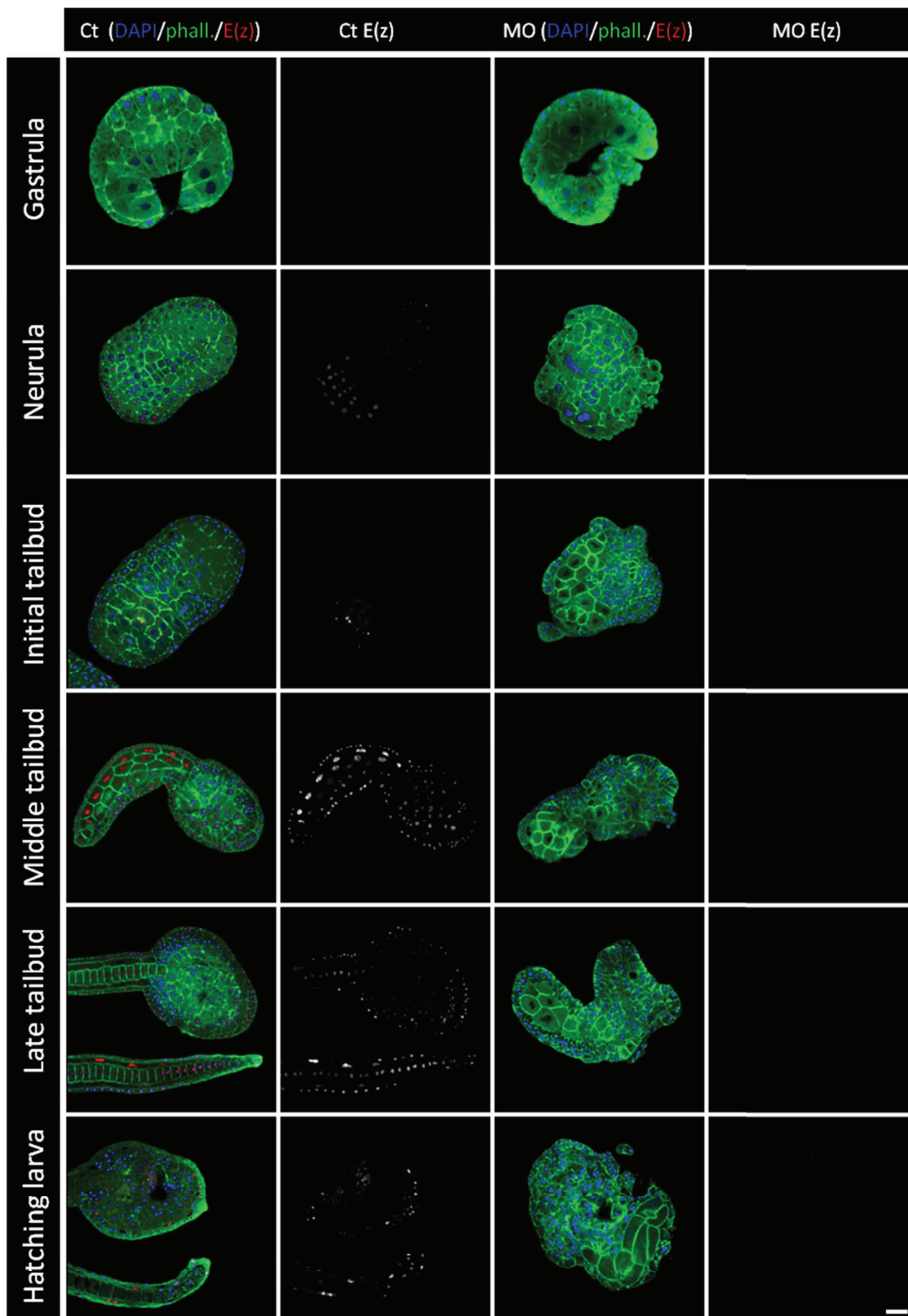


Figure 3

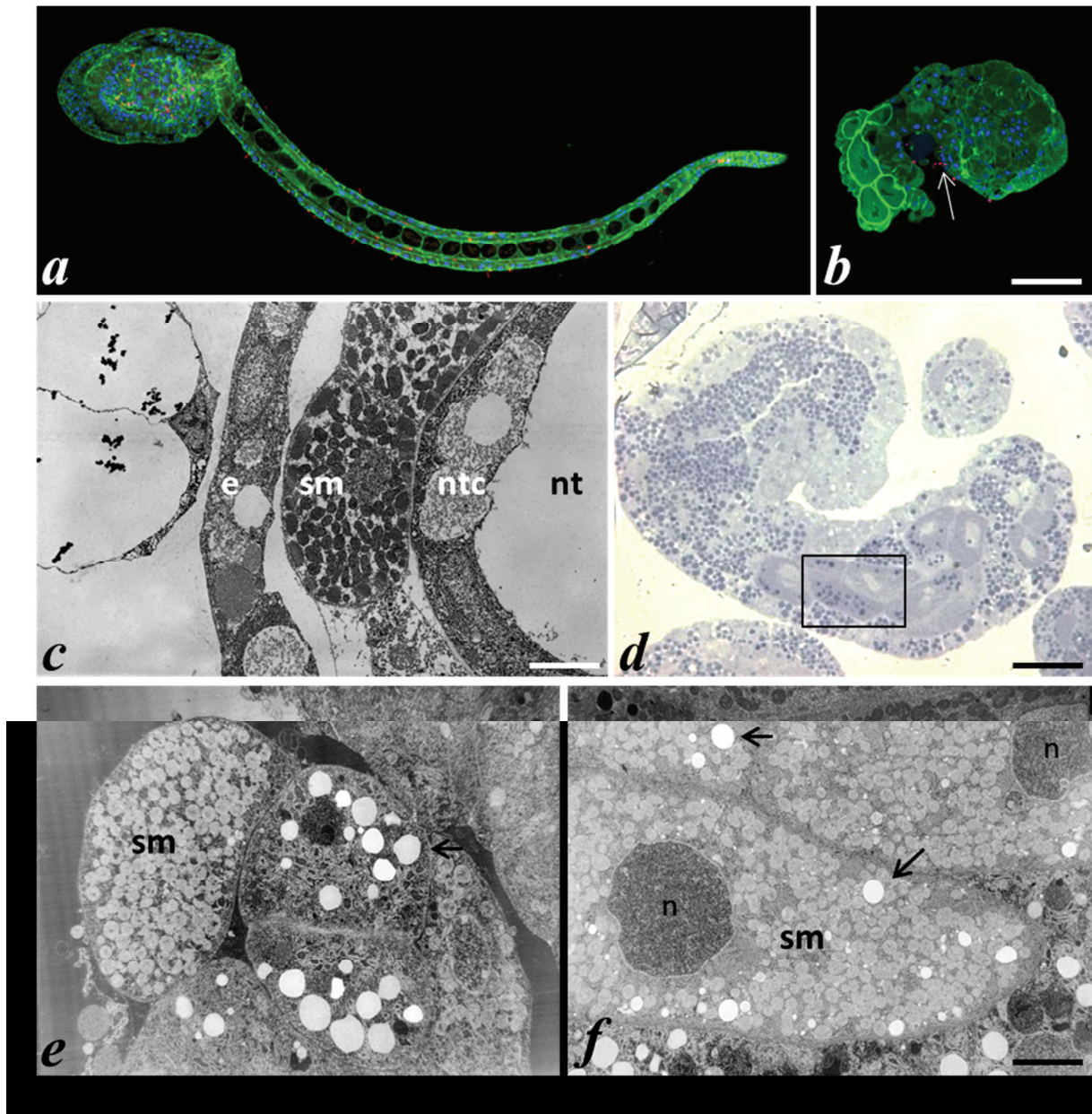
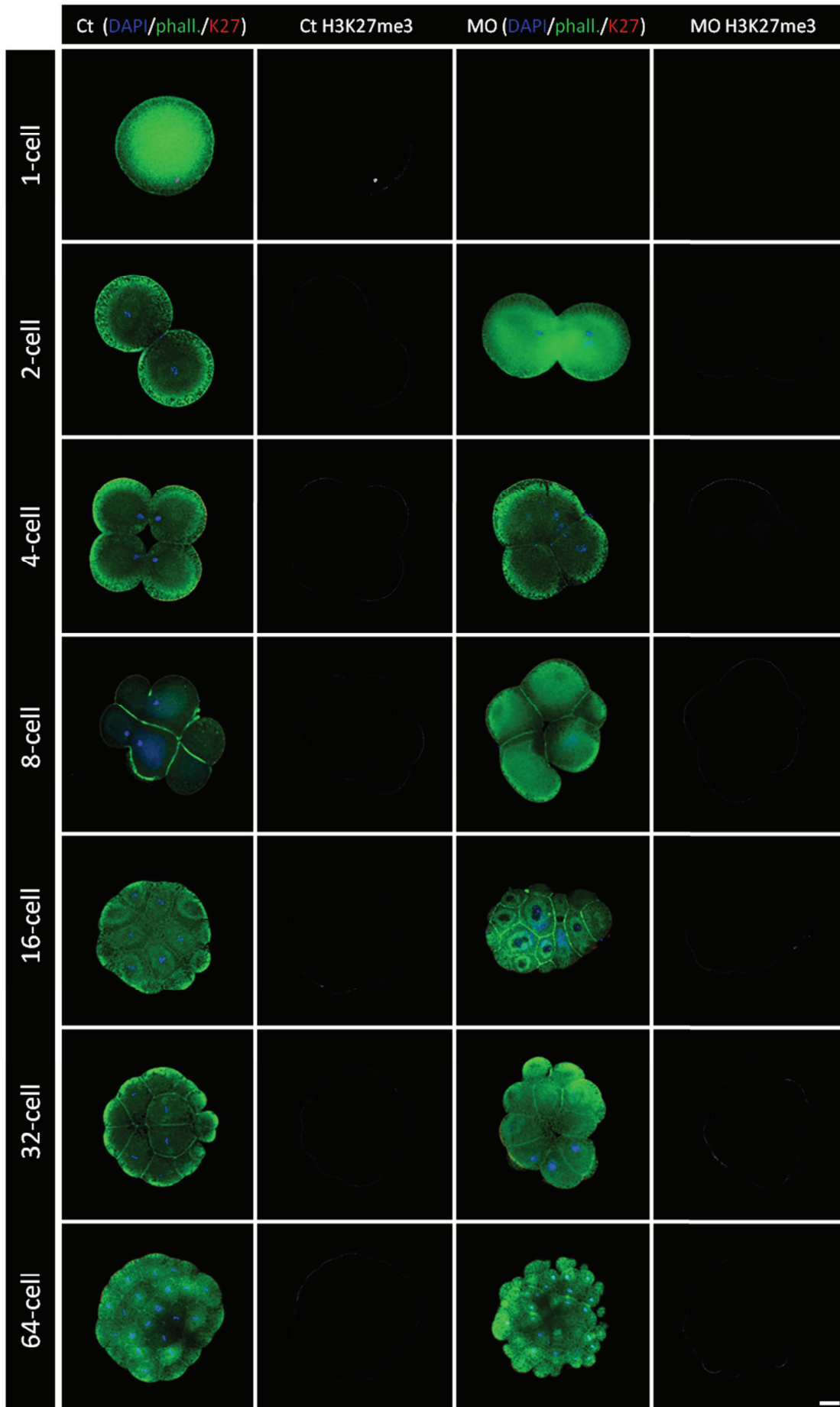


Figure 4



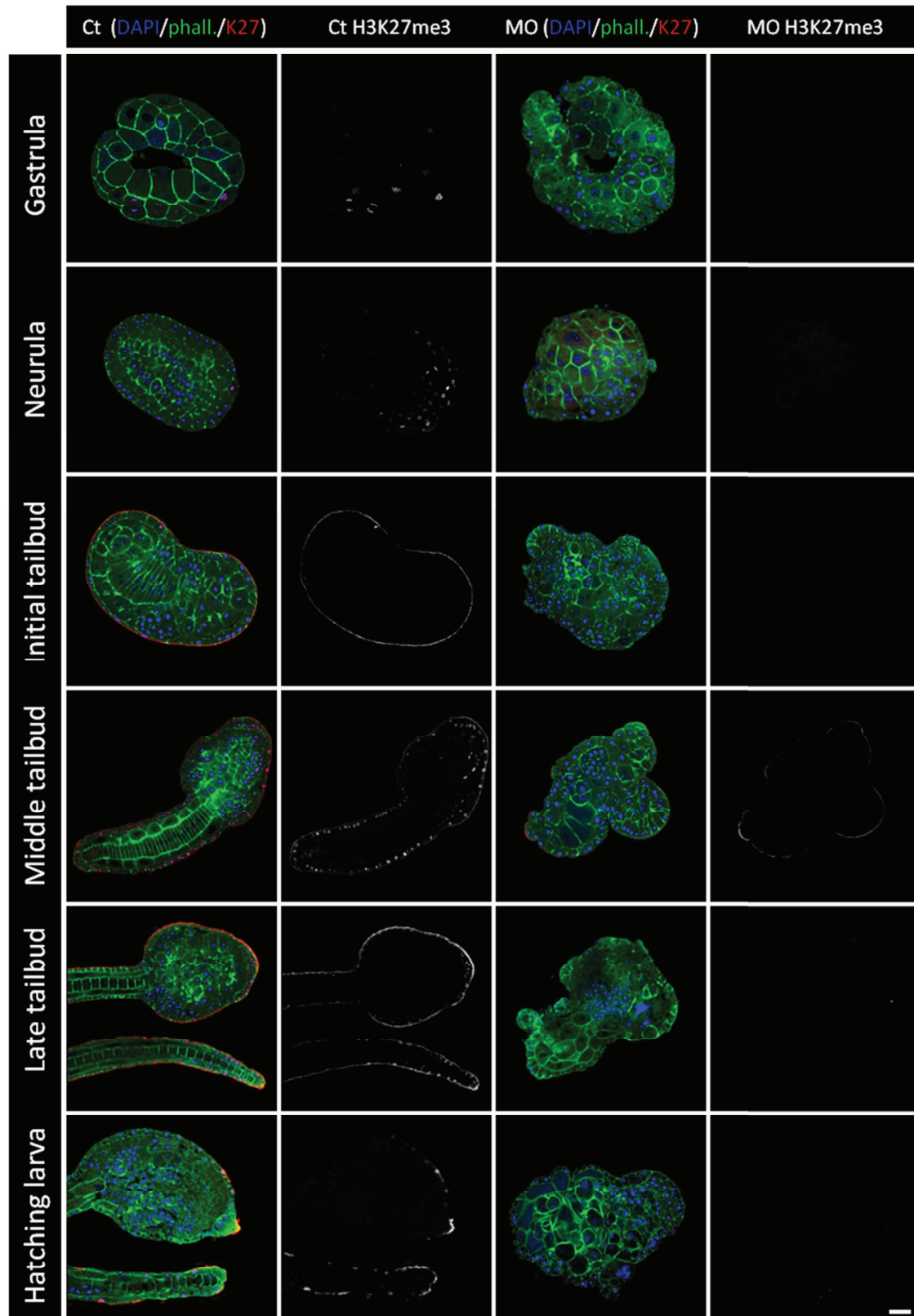


Figure 5

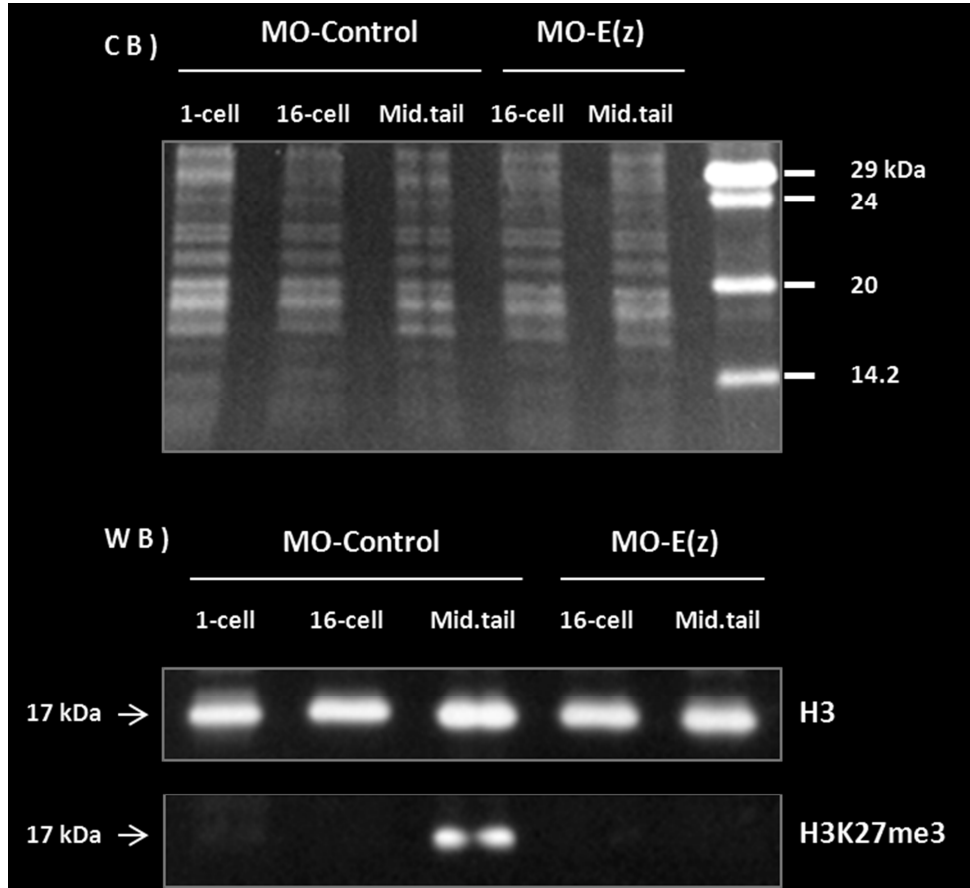
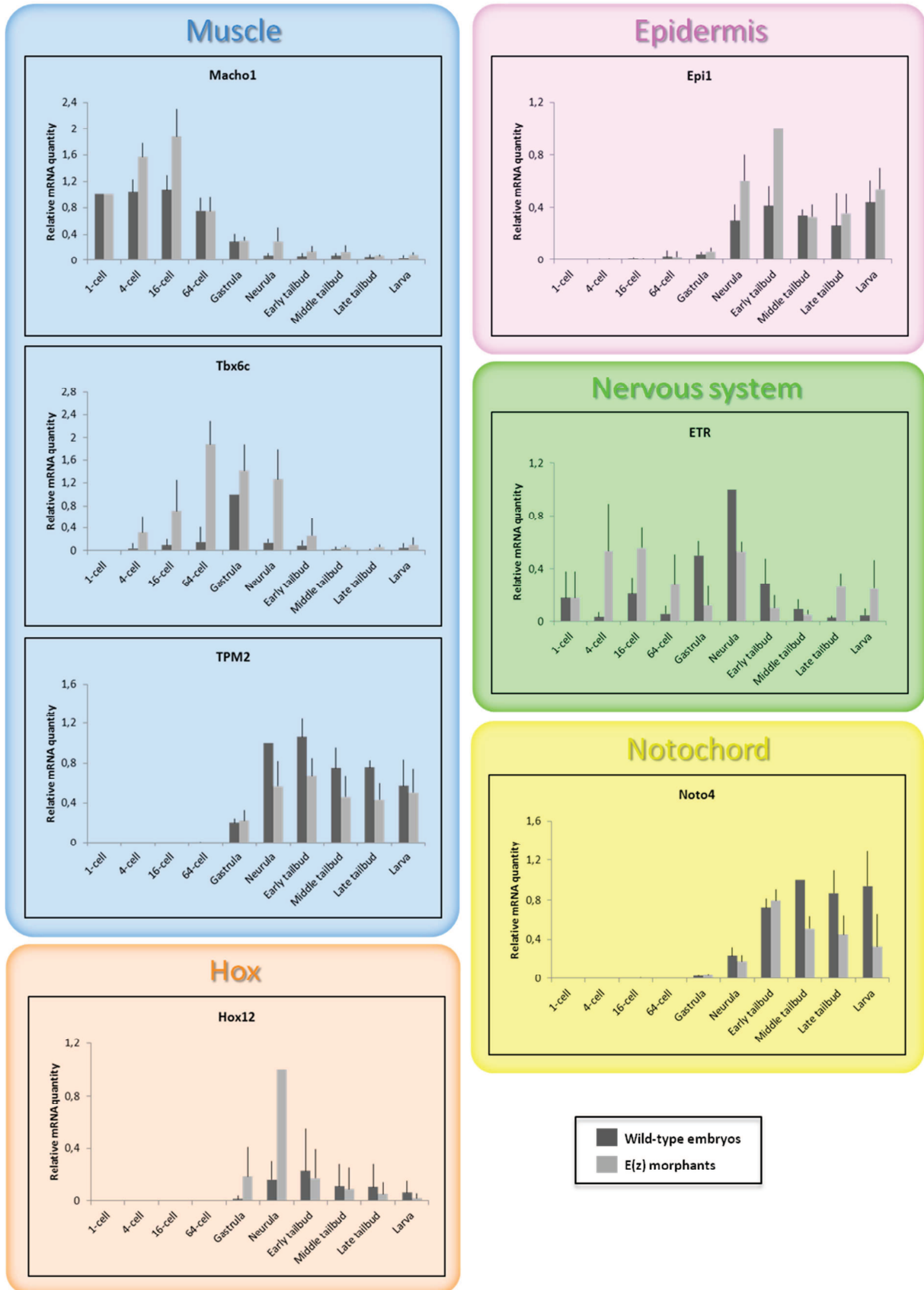


Figure 6



Supplementary data

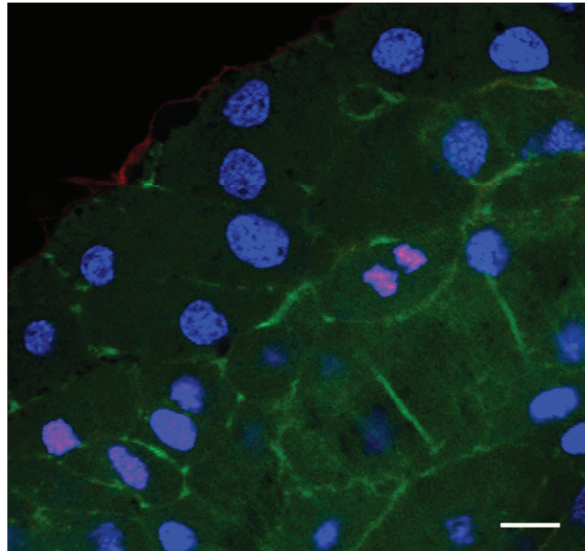


Figure S1 : H3K27me3 detection during mitosis by indirect immunofluorescence and confocal analyses in control embryos.

H3K27me3 (red), actin (phalloïdine, green) and DAPI (blue) triple labeling of *Ciona* embryos at middle tailbud stage. Scale bar: 8 μ m.

II-2- Statut de l'acétylation de H3K27 chez les morphants MO-E(z)

Il a été mis en évidence chez la drosophile que la diminution de H3K27me3 est corrélée avec l'augmentation de H3K27ac (Lau and Cheung, 2011a). La marque de dérèglement génique H3K27ac est déposée par l'acétyltransférase CBP (CREB binding protein) qui appartient au complexe TAC1 du TrxG (Tie et al., 2009)(**Figure 38**)(voir chapitre II-2-2 de l'introduction).

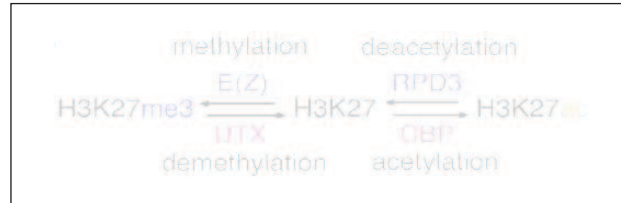


Figure 38 : Vue d'ensemble des réactions enzymatiques des PcG (en bleu) et TrxG (en rouge) sur le résidu H3K27. (Tie et al., 2009)

J'ai analysé le statut de cette marque d'activation génique H3K27ac chez des morphants E(z) en comparaison avec des individus microinjectés avec le MO-contrôle afin de voir si l'on pouvait observer une augmentation du niveau d'acétylation de H3K27 en absence d'E(z) chez *C. intestinalis*. Pour cela des expériences d'immunofluorescence indirecte sur des échantillons contrôles et morphants au stade late tailbud ont été réalisées en utilisant un anticorps commercial dirigé contre H3K27ac (Millipore) (**Figure 39**).

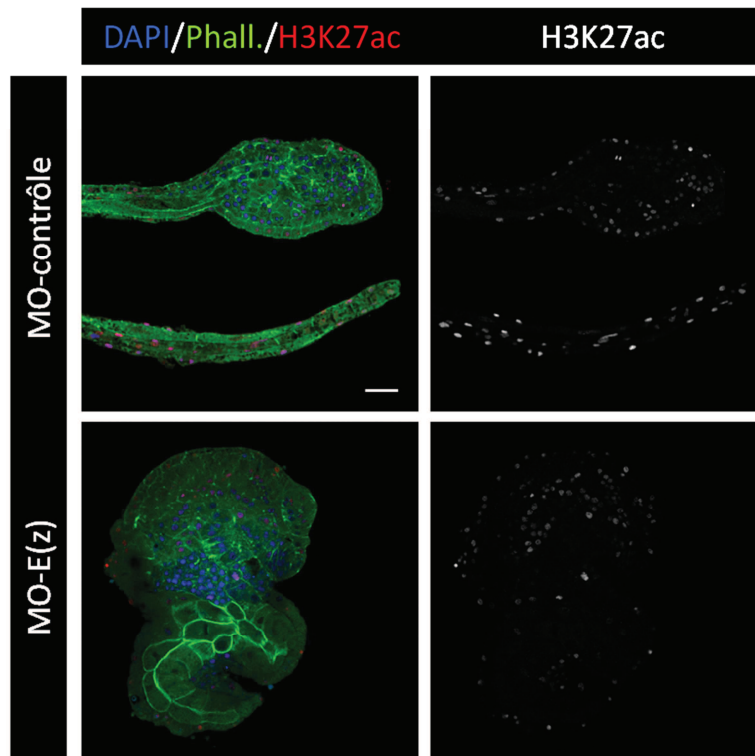


Figure 39 : Immunofluorescence sur des échantillons au stade late tailbud contrôle et morphant-E(z). Marquage DAPI en bleu, Phalloïdine en vert et H3K27ac en rouge. Barre d'échelle = 25 μ m.

Contrairement aux observations faites chez la drosophile, nous ne constatons pas d'augmentation significative du niveau d'acétylation d'H3K27 lorsque la marque H3K27me3 est éteinte.

La déméthylation de H3K27 par la déméthylase spécifique UTX (Smith et al., 2008) est une condition préalable à l'acétylation par CBP (Tie et al., 2009). Le statut d'UTX doit donc être vérifié chez les morphants E(z) afin d'établir le mode d'action enzymatique de cette régulation génique.

II-3- Caractérisation de l'anticorps dirigé contre Ci-E(z)

Dans le but de confirmer la spécificité de l'anticorps anti-E(z) que j'ai produit au cours de ma thèse, nous avons réalisé des expériences de Western blot sur un extrait protéique d'échantillons sauvages au stade mi-têtard (**Figure 40**).

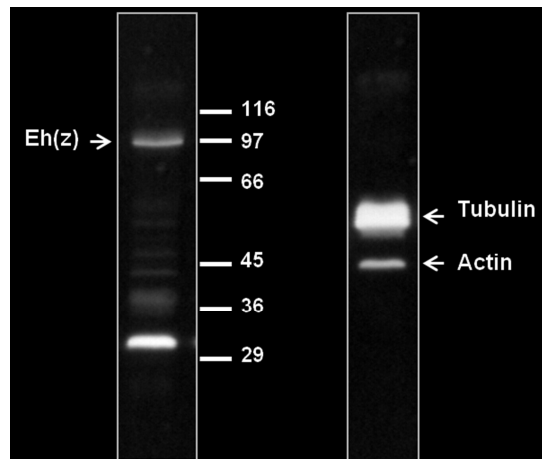


Figure 40 : Western blot réalisé avec l'Ac anti-Ci-E(z) au stade mi-têtard sauvage. Western blot réalisé sur 100 µg d'extrait protéique révélé avec l'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la partie N-terminale (résidu 1 à 605 - ENSCINT00000016333) de la protéine E(z) de Ciona.

Cette expérience de Western blot met en évidence la présence d'une bande à 97 kDa révélée par l'anticorps anti-E(z). Cependant, la protéine E(z) de Ciona a un poids moléculaire attendu de 84,9 kDa, or nous ne détectons pas de bande à cette taille.

J'ai réalisé une étude comparative de cette protéine chez la drosophile, l'homme et Ciona. Il faut noter que la protéine E(z) de Ciona présente plus d'homologie de séquence avec l'isoforme H2 humaine.

Les comparaisons de séquences protéiques m'ont permis de mettre en évidence une conservation relative entre les homologues (**Figure 41**). Les tailles de ces protéines homologues sont très proches : 747 acides aminés pour Ci-E(z) (ENSCINT00000016333), 746 acides aminés pour Hu-E(z)H2 (CAA64955) et 760 acides aminés pour Dr-E(z)A (NP_524021).

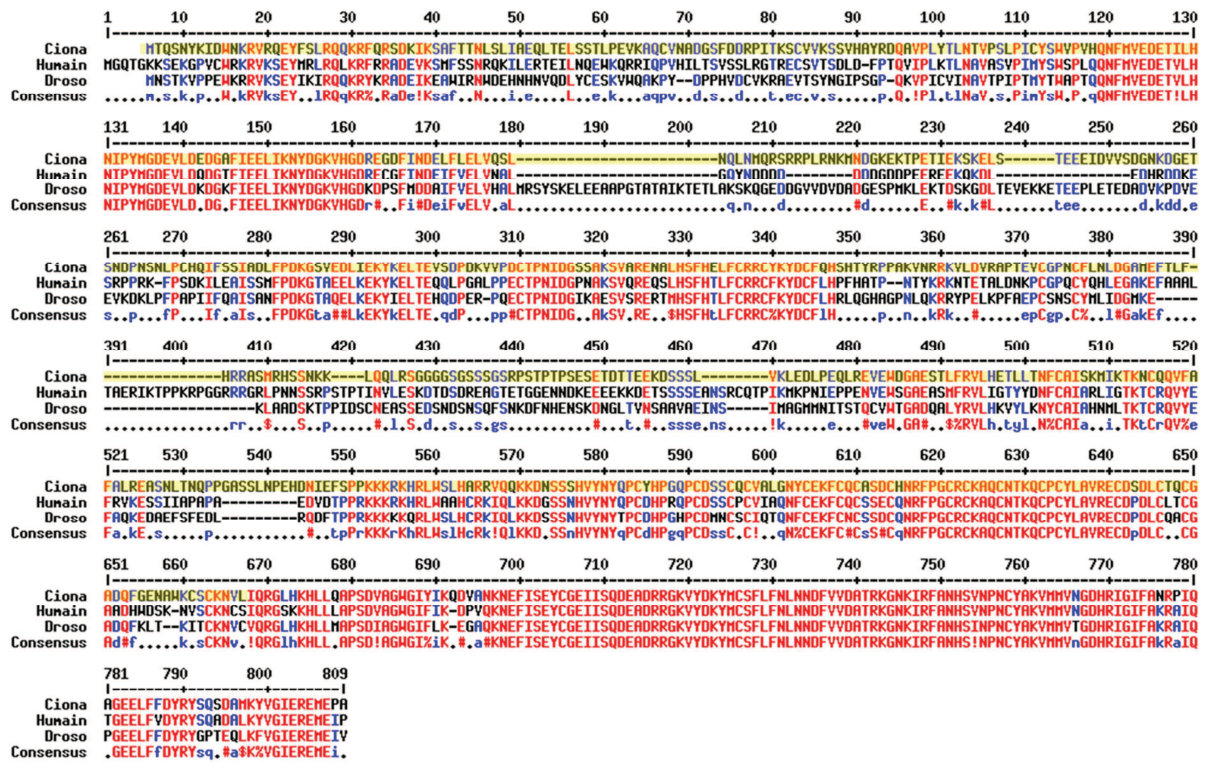


Figure 41 : Comparaison de séquences des protéines E(z) de drosophile, de Ciona et humaine. Les séquences protéiques ont été alignées avec MultAlin. Les acides aminés qui partagent 90 et 50 % d'identité sont indiqués en rouge et bleu respectivement. La séquence surlignée en jaune clair correspond à la protéine recombinante utilisée pour la production d'anticorps anti-Ci-E(z).

Les anticorps commerciaux dirigés contre la protéine E(z) de drosophile ou humaine ne détectent pas la protéine E(z) de Ciona mais certains de ces anticorps permettent la détection en western blot d'un signal pouvant aller jusqu'à 100 kDa selon les anticorps alors que les poids moléculaires attendus de cette protéine chez la drosophile et humaine sont de 86,9 kDa et 85,2 kDa respectivement (ex : Ac anti-EZH2-BD43, Millipore).

Ces données nous permettraient donc d'envisager que la bande détectée à 97 kDa par l'anticorps anti-Ci-E(z) correspond effectivement à cette protéine. Des expériences de Western blot sur des échantillons au stade mi-têtard contrôle et morphant E(z) nous permettront de confirmer ces résultats.

III- Implication de Ph et Trx au cours du développement embryonnaire de *Ciona intestinalis*

Je me suis également intéressée aux statuts de deux autres protéines des PcG et TrxG :

- la protéine Ph (Polyhomeotic) qui appartient au PRC1 du PcG et qui est nécessaire au maintien de la répression génique mais dont le rôle n'est pas précisément connu.

- la protéine Trx (Trithorax) du complexe TAC1 du TrxG qui est responsable du dépôt de la marque d'activation génique H3K4me3.

III-1- Caractérisation des phénotypes morphants MO-Ph et MO-Trx par microscopie confocale

J'ai initié cette étude par des invalidations protéiques par micro-injection de morpholino dans les œufs de *Ciona*. J'ai observé que les inhibitions de l'expression protéique de Ph et de Trx ont des conséquences dramatiques sur la mise en place des différents tissus au cours du développement larvaire (**Figure 42**).

Ces observations ont été obtenues par des marquages d'immunofluorescence sur des échantillons au stade larvaire, micro-injectés soit par le morpholino contrôle, soit par le morpholino Trx (positionné au niveau de la jonction intron1/exon2 de l'ARNm - ENSCINT00000013297), soit par le morpholino Ph (positionné au niveau de la jonction intron4/exon5 de l'ARNm - ENSCINT00000000976).

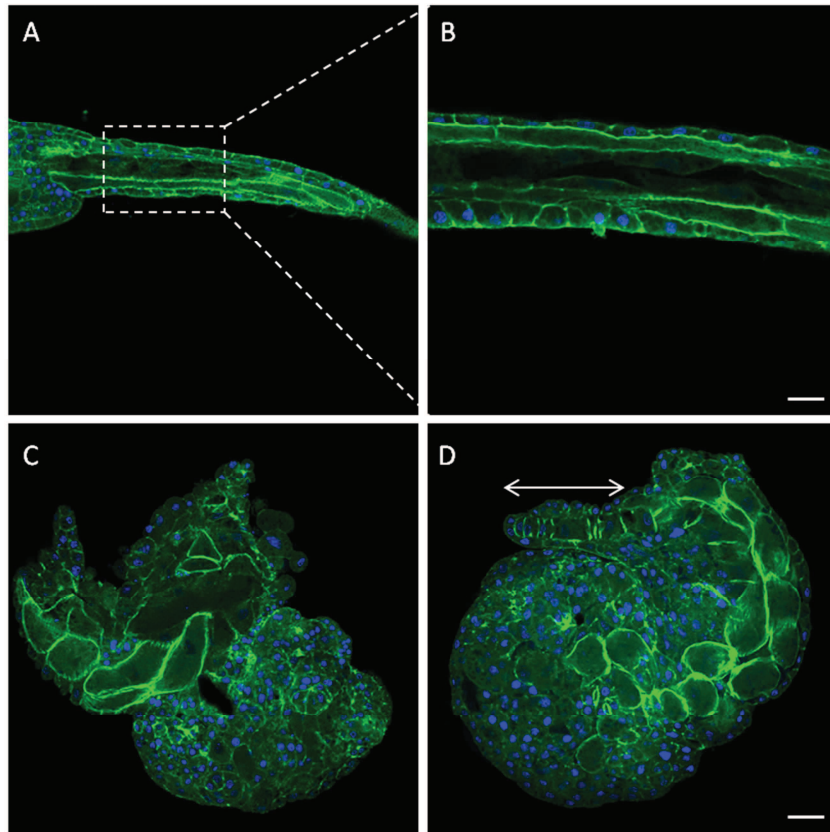


Figure 42 : Immunofluorescence sur des échantillons aux stades larvaires contrôle et morphant pour les protéines Ph et Trx. Marquage DAPI en bleu, Phalloïdine en vert. **A et B)** Larve micro-injectée avec le MO-contrôle, mise en évidence de l'organisation cellulaire d'une coupe longitudinale de la queue avec la notochorde au centre, flanquée de part et d'autre par les cellules musculaires organisées en chevron puis les cellules épidermiques positionnées le plus extérieurement. **C)** Morphant micro-injecté avec le MO-Ph. **D)** Morphant micro-injecté avec le MO-Trx. La double-flèche blanche indique le bout de la queue dans lequel on peut voir quelques cellules de la notochorde abortive. Barre d'échelle (A, C et D) = 20 μ m, barre d'échelle (B) = 45 μ m.

Le marquage phalloïdine (en vert) permet de marquer les contours cellulaires et de visualiser les réseaux contractiles des cellules musculaires et la présence d'une notochorde abortive.

L'inhibition de la protéine Ph (**Figure 42-C**) produit un morphant semblable à celui produit par l'inhibition de la protéine E(z). Les cellules musculaires sont présentes et possèdent un système contractile fonctionnel mais présentent un défaut de positionnement majeur. En effet, on peut observer sur cette coupe confocale que la vésicule sensorielle est directement en contact avec une cellule musculaire. La notochorde est absente et les cellules épidermiques perdent partiellement leur organisation structurale notamment par une perte de contact cellule-cellule. Un défaut de cytokinèse est également caractérisé par la présence de grosses cellules polynucléées.

Cette similitude de phénotype entre les morphants-E(z) et Ph indiquerait que les voies de signalisation en aval de ces deux protéines sont très proches.

L'inhibition de la protéine Trx (**Figure 42-D**) provoque également un phénotype très perturbé de la mise en place de la queue. Les cellules musculaires sont différenciées, possèdent un système contractile mais ont très peu de contacts cellule-cellule. Elles présentent un défaut de positionnement lié à un phénomène d'antériorisation. L'organisation des cellules épidermiques semble intacte. Une notochorde abortive est présente en bout de queue (mise en évidence par la double-flèche).

Le statut du système nerveux des morphants MO-Ph et MO-Trx a été observé par immunofluorescence avec un anticorps anti-tubuline acétylée. Les SNC (système nerveux central) et SNP (système nerveux périphérique) sont remarquablement réduits dans les deux types de morphants (**Figure 43**). Les cellules du SNC sont peu nombreuses et leur positionnement est éparé. Le tube nerveux dorsal est absent, les neurones épidermiques sensoriels sont anormalement peu nombreux et présentent un défaut de positionnement. Ils sont situés à la jonction tête-queue, de manière similaire à ce qui est observé chez le morphant MO-E(z). La vésicule sensorielle présente un défaut de positionnement, elle se localise également à la jonction tête-queue.

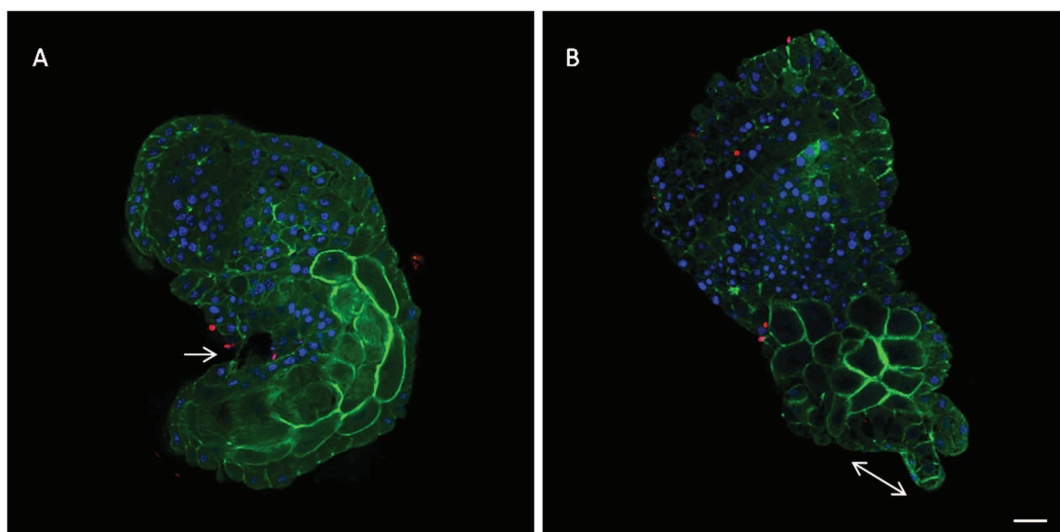


Figure 43 : Immunofluorescence sur des échantillons au stade larvaire des morphants MO-Ph et MO-Trx. Marquage DAPI en bleu, Phalloïdine en vert et tubuline acétylée en rouge. **A)** Morphant micro-injecté avec le MO-Ph. La flèche pointe la jonction tête-queue où sont présents, de manière anormale les neurones épidermiques sensoriels et la vésicule sensorielle. **B)** Morphant micro-injecté avec le MO-Trx. La double-flèche blanche indique le bout de la queue dans lequel on peut voir la notochorde abortive. Barre d'échelle = 20 μ m.

Les défauts phénotypiques du morphant MO-Trx sont très similaires à ceux décrits pour les morphants du PcG mais dans ce cas, la présence d'une notochorde abortive à l'extrémité de l'ébauche caudale singularise le morphant MO-Trx des deux autres.

III-2- Caractérisation ultrastructurale des phénotypes des morphants MO-Ph et MO-Trx

Afin d'approfondir cette étude phénotypique des morphants Ph et Trx, j'ai réalisé des coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine (**Figure 44**). Au cours de leur développement, les larves de *Ciona* sont très riches en lipide (vésicules en bleu foncé) puisqu'elles ont un développement lécithotrophe. Cependant, les cellules musculaires des deux morphants comportent également des vésicules lipidiques ce qui traduit un problème de métabolisme des lipides, observation déjà réalisée dans les morphants E(z).

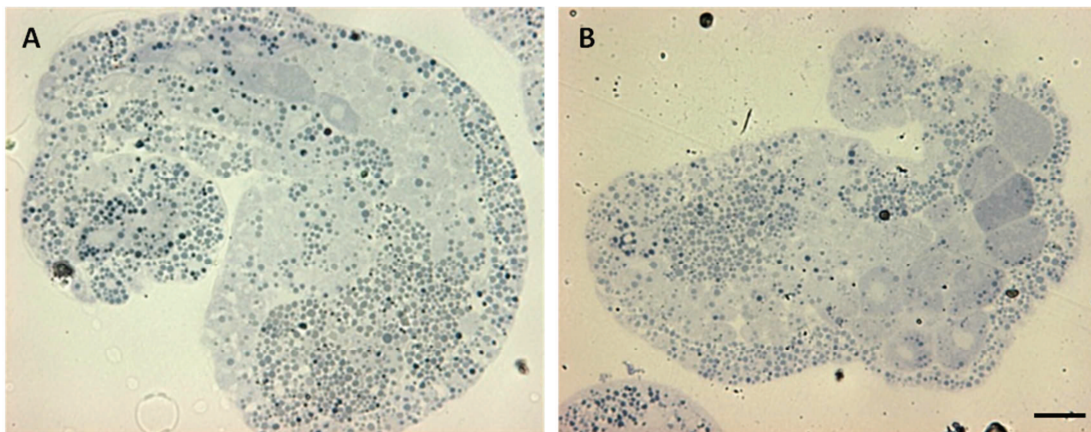


Figure 44 : Observation microscopique de coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine des morphants MO-Ph et MO-Trx au stade larvaire. A) MO-Ph. B) MO-Trx. Barre d'échelle = 15 µm.

Des observations au MET de coupes ultra-fines permettent de mettre en évidence des problèmes de métabolisme dans les morphants MO-Trx et MO-Ph au stade larvaire. Des cellules saturées de vésicules lipidiques perdent la totalité des jonctions adhérentes et sont complètement extériorisées (**Figure 45-B**).

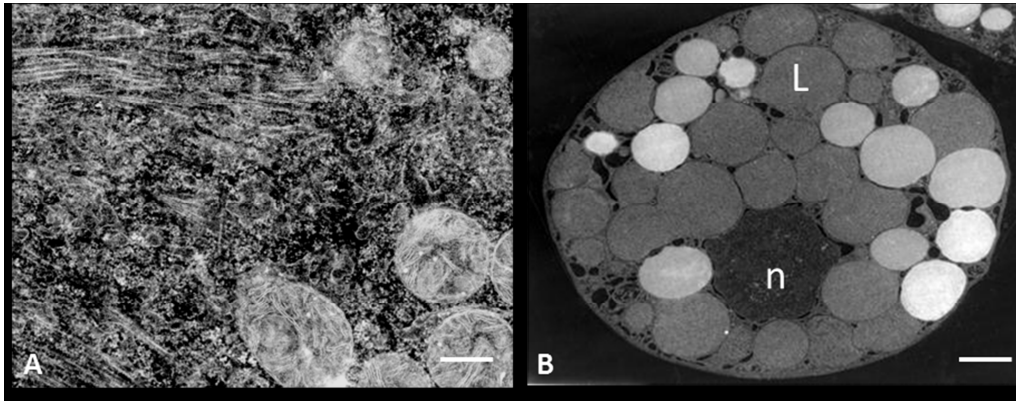


Figure 45 : Observation au MET de coupes ultra-fines d'échantillons larvaires sauvages et morphants MO-Ph. A) Réseau contractile et mitochondries d'une cellule musculaire d'une larve sauvage. **B)** Cellule d'un morphant MO-Ph totalement extériorisée et saturée de vésicules lipidiques. **n** = noyau, **L** = vésicule lipidique. Barre d'échelle (A) = 0,5 μm. Barre d'échelle (B)= 4 μm.

Comme pour E(z), l'absence d'anticorps spécifiques des protéines d'urochordés ne permet pas de détecter sélectivement Ci-Ph et Ci-Trx. Il est donc difficile de déterminer un rôle précis à chacune de ces protéines dans les régulations géniques assurées par les PcG et TrxG. Cette production d'anticorps polyclonaux est en cours au laboratoire, j'ai obtenu des séras de lapins immunisés avec les protéines Ci-Ph (ENSCINT00000000976) et Ci-Trx (ENSCINT000000013297) qu'il faut maintenant purifier sur colonne d'affinité (**Figure 46**).

A

```

1 MKMEDNDGDYILSDTYASDDETOIGIKLSLEVLAKHKILTHIIDGFIIEESIQQFPEPEV
61 PSFLSSRQLNMI RERQOEIVAREKEREIAYEENLFTQTAAEVIETATCDQCGFMGPRSRF
121 AQP SARFCSLGCARKYKTGCPKRLVNRLQVATLGGKRGRFRLHLSQINQNRKAGLGRGRK
181 SSVNKIPSPPHSISSSSFSMCDGCSNTSESSFTSSPEQSPHPDLPEMSGASSCPVRWS
241 VEDVFTFIKSLPDSQHAEDFRMQEIDGSALLLLHEEHLVCSMNLPLGPALKLCAHIDRL
301 REREVY

```

B

```

1 DLRQCIFCSKYGDDHFMYAGRLLYCSQDEWCHVNCALWSAEVYEQHDGSLQNVQSAASRG
61 KMMKCELCCLPGATVGCSTRQC PKNYHFMCARKTDCAFQNDKKVFCLRHHSNANIEVEFE
121 VLRMVCVDNDEMFPNRRWQRGVLSNITVTIGSLTVHQLGRLGVASDMRDCLIPASFRMT
181 RVFWSAFSPTRKTVYITVSEKKPSFDGNQSKPAADNTNLTIAHASEDLVSQLLSAVOEC
241 RATTKGPSPTVALHAVMTPFSPFLGVSHDAVRFLAEQLPGARYCHRYRAKYHKHKKTTEEVE
301 THINPHGCARAEQYKGRSKPDMFSFLRASKHRATSCDLPAMRFRQLRHLTRDSVGVYRS
361 TIHGRGLYCKRDFDSGEMIMEYTGQII RQELTDKREKYYESKSIGCYMFRMDDFYVVDAT
421 VLGSGARFINHSCDPNCYSRIVQFEGKKHIVIFALREIYKGEELTYDYKFPPIEDENHKIA
481 CTCGARLCRKFMN

```

Figure 46 : Séquences protéiques de Ci-Ph (A) et Ci-Trx (B). Les séquences soulignées en jaune correspondent aux séquences protéiques choisies pour la production d'anticorps. Ph (résidus 135 à 246 - ENSCINT00000000976), Trx (résidus 1 à 149 - ENSCINT000000013297).

L'approche en immunofluorescence et en MET nous a permis de faire un bilan descriptif précis des phénotypes observés lors de l'inhibition protéique de Ph et Trx. Ces morphants présentent une queue abortive, une absence totale de la notochorde chez le morphant MO-Ph et partielle chez le morphant MO-Trx. Nous avons pu mettre en évidence des défauts importants du système musculaire et nerveux ainsi que des défauts de métabolisme énergétique.

Discussion et perspectives

L'ensemble de ces résultats milite en faveur d'un rôle majeur des protéines E(z), Ph et Trx dans le développement embryonnaire de *C. intestinalis*. L'inhibition de chacune de ces protéines a des répercussions sur la viabilité des larves mutées qui se traduit par des défauts majeurs de différenciation, de signalisation et de positionnement cellulaire.

Jusqu'à présent, aucun résultat n'a été publié sur la régulation épigénétique par les PcG et TrxG chez *Ciona*.

Les travaux de cette thèse, essentiellement descriptifs, révèlent le rôle déterminant des régulations épigénétiques au cours du développement précoce chez *Ciona* et soulèvent un grand nombre de questions sur le mode d'action des PcG et TrxG chez cette espèce.

Chez *Ciona*, malgré l'absence de la protéine Pc (ayant un rôle primordial chez la drosophile dans le maintien de la répression génique), nous constatons que les complexes des PcG et TrxG sont également impliqués dans le développement embryonnaire.

Les défauts phénotypiques des morphants MO-E(z) et MO-Ph présentent des caractéristiques semblables :

- la notochorde est absente,
- les cellules musculaires présentent des défauts de positionnement, certaines sont antériorisées (présence de cellules musculaires proches de la vésicule sensorielle) et d'autres extériorisées (perte de contact cellule-cellule). Le système contractile est fonctionnel mais la présence de vésicules lipidiques dans cellules musculaires traduit des défauts de métabolisme énergétique,
- les SNP et SNC présentent un nombre réduit de cellules nerveuses. Le tube neural dorsal est absent et les neurones épidermiques sensoriels présentent un défaut de positionnement (jonction tête-queue abortive),
- l'épiderme présente partiellement des défauts d'adhésion, certaines cellules épidermiques perdent leurs contacts cellule-cellule et sont totalement extériorisées,
- la présence de grosses cellules polynucléées traduit des défauts de cytokinèse.

A l'exception de la présence d'une notochorde abortive dans le morphant MO-Trx, les mêmes défauts phénotypiques sont observés dans les trois morphants.

Cette différence de phénotypes observable entre l'inhibition des protéines du PcG (E(z) et Ph) et du TrxG (Trx), à savoir la présence d'une notochorde abortive dans les morphants MO-Trx, met en évidence une moindre implication du TrxG dans la mise en place de la notochorde.

Il est important de noter que les phénotypes des morphants obtenus ne sont pas liés à un phénomène de mort cellulaire puisqu'aucun noyau apoptotique n'a été observé au cours du développement des morphants. Lors de l'inhibition des protéines du PcG (E(z) et Ph), le devenir des blastomères normalement impliqués dans la formation de la notochorde pourrait donc être détourné au vu de l'absence de notochorde chez ces morphants. Nous pouvons donc nous questionner sur le devenir de ces blastomères : peuvent-ils être orientés vers un autre destin cellulaire ou rester dans un état d'engagement abortif ?

Il a été mis en évidence chez la souris que la méthylation d'H3K27 par EZH2 joue un rôle essentiel dans la répression de gènes muscle-spécifiques et que l'activité déméthylase d'UTX sur H3K27me3 est nécessaire pour engager le destin musculaire (Caretti et al., 2004; Seenundun et al., 2010). Nos résultats obtenus en qPCR sur les gènes muscle-spécifiques *Macho-1* et *Tbx-6c* mettent en évidence une dérégulation de leur niveau d'expression chez les morphants MO-E(z), ceci permettrait donc d'envisager l'orientation vers un destin cellulaire musculaire favorisé chez les morphants.

Des expériences de micro-injection du MO-E(z) dans les blastomères cités précédemment ainsi que des comptages de cellules musculaires et nerveuses dans les morphants du PcG nous permettraient d'en savoir plus sur les éventuels destins cellulaires mis en place lors de l'inhibition d'E(z).

De plus, des expériences d'hybridation in situ ciblant les ARNm d'E(z), Ph et Trx au cours du développement embryonnaire des morphants et des témoins permettraient de définir une localisation tissulaire de ces gènes.

J'ai pu constater, à partir des nombreuses observations confocales, que les phénotypes des morphants apparaissent définitivement établis à partir du stade mi-têtard. Des marquages BrdU en immunofluorescence permettraient de confirmer le statut de la prolifération cellulaire à partir de ce stade. De plus, des comptages de noyaux ont permis de constater que le nombre de ces derniers au stade mi-têtard chez les morphants MO-E(z), MO-Ph et MO-Trx est considérablement inférieur à celui des témoins. Il semblerait donc que le nombre de mitoses soit nettement réduit chez les morphants.

De manière surprenante la marque H3K27me3 est présente dans l'œuf non fécondé de *Ciona* alors que la protéine E(z) n'est pas détectée. Il est intéressant de noter que l'œuf mature de *Ciona* est bloqué en métaphase I de méiose. Deux hypothèses sont envisageables ; soit le seuil

de détection de l'anticorps dirigé contre Ci-E(z) n'est pas atteint, soit la protéine E(z) est présente de manière transitoire lors de la maturation de l'œuf dans le tissu ovarien. Il serait intéressant de tester cette dernière hypothèse par un marquage en immunofluorescence du tissu ovarien avec l'anticorps anti-Ci-E(z).

Des observations identiques ont été réalisées dans des œufs de drosophile. Des expériences d'immunofluorescence ont mis en évidence qu'E(z) n'est plus visible à partir du stade 6 de l'ovogénèse (l'ovogénèse de drosophile comprend 14 stades). De plus, des expériences de déplétion d'E(z) par RNAi dans l'ovogénèse tardive n'ont aucune répercussion sur H3K27me3 et les œufs ne présentent pas de défaut de fécondité. En revanche, des expériences de déplétion d'E(z) plus précoce mettent en évidence une perte d'H3K27me3 et une stérilité des œufs. En conclusion, chez la drosophile, la marque de répression génique H3K27me3 est déposée précocement au cours de l'ovogénèse et est maintenue en l'absence de doses détectables d'E(z) (Iovino, Ciabrelli et Cavalli, données non publiées).

De manière surprenante, un défaut de phénotype du morphant MO-E(z) est observé dès le stade 4 cellules alors que la protéine E(z) et la marque H3K27me3 ne sont pas encore détectées dans les témoins. Les ARNm d'E(z) sont maternels (cinétique d'expression mise en évidence par RT-qPCR). Il semblerait donc que la protéine E(z) soit requise très précocement au cours du développement embryonnaire, la traduction zygotique semble essentielle dès les premières divisions cellulaires. Nos résultats peuvent être mis en parallèle avec des études récentes, réalisées chez la souris, montrant que des composants du PRC1 jouent un rôle primordial dans la réplication, la progression du cycle cellulaire ainsi que dans le développement embryonnaire dès le stade 2 cellules (Posfai et al., 2012).

La présence de cellules polynucléées chez les morphants MO-E(z) traduit un défaut au cours du cycle cellulaire et plus particulièrement de cytokinèse. La marque H3K27me3 est conservée pendant la mitose, ceci a été mis en évidence lors de la phase G1 (Hansen et al., 2008) et nous l'observons en immunofluorescence chez Ciona lors de l'anaphase (Figure S1). L'absence de cette marque chez les morphants MO-E(z) pourrait être responsable de ce défaut de cytokinèse. Des expériences d'immunofluorescence sur les morphants MO-E(z) précoces avec un anticorps dirigé contre la β -tubuline, marqueur des fuseaux mitotiques, permettraient de confirmer les défauts de cytokinèse observés.

La polypléidie est également constatée chez des morphants E(z) chez la drosophile et des études sont en cours concernant l'implication des cyclines car il se pourrait qu'il y ait des

dérépressions de ces gènes provoquant un stress réplicatif (Iovino, Ciabrelli et Cavalli, données non publiées). Un lien entre les kinases cycline-dépendantes 1 et 2 (CDK1 et 2) et des composants du PcG dont EZH2 a été mis en évidence dans des cellules souches embryonnaires humaines (Chen et al., 2010; Sharif et al., 2011; Van Hoof et al., 2009).

Nous avons montré, par des expériences de RT-qPCR sur des morphants MO-E(z), que l'expression des gènes *Hox*, n'est pas significativement modifiée au cours du développement embryonnaire lorsque la protéine E(z) est inhibée, à l'exception du gène *Hox-12* qui est déréprimé. Ceci met en évidence une implication mineure des PcG dans la régulation génique des *Hox* chez *Ciona* au cours de l'embryogénèse. Ces résultats sont en adéquation avec les données obtenues par Ikuta et ses collaborateurs (2010) qui ne constataient pas de différence phénotypique lors de l'inhibition des *Hox*, par la technique de micro-injection de morpholinos, à l'exception des *Hox-10* et *Hox-12* impliqués respectivement dans la mise en place du système nerveux et du bout de la queue.

Il a été proposé que les gènes *Hox* soient organisés en cluster chez l'ancêtre des deutérostomes et que ce cluster se soit désorganisé chez les échinodermes et les urochordés (Cameron et al., 2006; Ikuta and Saiga, 2005; Lemons and McGinnis, 2006; Seo et al., 2004). Cette perte d'organisation en cluster des gènes *Hox* chez les ascidies est incontestable et la colinéarité résiduelle (Ikuta et al., 2004).

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que les gènes *Hox* ne jouent pas un rôle crucial au cours de la morphogénèse et que leurs rôles fonctionnels soient globalement limités. La dérépression du gène *Hox-12* lors de l'inhibition d'E(z) montre que la régulation génique PcG-dépendante est partiellement conservée chez *Ciona*.

Les fonctions des gènes *Hox* dans la régionalisation des structures le long de l'axe antéro-postérieur ont été principalement décrites dans des organismes à développement relativement lent. Ainsi une corrélation pourrait être faite entre le rôle limité de ces gènes ainsi que leur modalité de régulation d'expression apparemment innovante avec l'embryogénèse rapide de la larve de *Ciona* qui possède un plan d'organisation simple.

Il est possible que le rôle des gènes *Hox* intervienne pendant ou après la métamorphose. Une récente étude réalisée chez *Ciona* suggère d'ailleurs une implication de *Hox-1* lors de la métamorphose (Sasakura et al., 2012b). Dans ce contexte et malgré une désorganisation du cluster des gènes *Hox*, un rôle plus classique des PcG et TrxG sur la régulation génique des *Hox* pourrait être retrouvé au cours de la métamorphose et du développement tardif chez *Ciona*.

Enfin pour répondre au grand nombre de questions soulevées par ce travail, nous réalisons actuellement, en collaboration avec Bernd Schuettengruber et Patrick Lemaire, les premières étapes d'une analyse génomique par la technique de ChIP (Immunoprécipitation de chromatine) chez *Ciona* avec des anticorps dirigés contre H3K27me3, H3K27ac, H3K4me3 afin d'identifier les séquences marquées. Quelques études sur les régions cis-régulatrices ont été réalisées chez la cione (Khoueiry et al., 2010; Kubo et al., 2010) mais à ce jour aucun lien n'a été montré entre les marques épigénétiques présentes sur les queues d'histones et la régulation transcriptionnelle chez ce modèle.

J'ai réalisé des mises au point d'expérimentation à partir d'un protocole utilisé chez la drosophile (Schuettengruber et al., 2009) et un projet de séquençage à haut-débit a été déposé auprès de la plateforme MGMX (Montpellier).

Le principal problème rencontré pour mener à terme cette expérience de ChIP est un problème d'approvisionnement en *Ciona intestinalis* de sous-espèce A qui est la seule séquencée à ce jour.

Cette analyse génomique permettra une identification globale des gènes cibles des PcG et TrxG chez *Ciona*.

« Tout comme les cellules héritent des gènes, ils héritent également d'un ensemble d'instructions qui indiquent quand les gènes doivent devenir actifs, dans quel tissu et dans quelle mesure. Sans ce mode d'emploi épigénétique, les organismes multicellulaires n'existeraient pas. » (Vines, 1998)

Matériels et Méthodes

1- Matériel biologique

Les individus adultes de *Ciona intestinalis* proviennent de la station marine de Roscoff en Bretagne et certains de l'étang de Thau à Sète. La taille moyenne des individus utilisés est comprise entre 4 et 10 cm. Les œufs et le sperme sont récupérés successivement par dissection de l'oviducte et du tube séminifère, en évitant un contact entre les gamètes d'un même individu. Toutes les expériences sont réalisées à 18°C.

Les cellules folliculaires sont enlevées du chorion par des mouvements de va-et-vient avec une pipette de 10 mL.

La fécondation se réalise par la mise en contact des spermatozoïdes et des œufs issus d'individus différents, dans 15 mL d'eau de mer filtrée et complétée avec 100 U.mL⁻¹ de pénicilline et 100 µg.mL⁻¹ de streptomycine. Après 10 minutes, les œufs fécondés sont rincés par 3 lavages successifs et sont ensuite transférés en boîte de pétri 100 mm puis incubés à 18°C jusqu'au stade de développement souhaité.

2- Déchoriation des œufs

Avant la fécondation, les œufs sont déchorionés par traitement enzymatique dans des tubes en verre, contenant de l'eau de mer ajustée à pH 10 avec NaOH 10N et additionnée avec 1 % de thioglycolate de sodium et 0,05 % de pronase E (Mita-Miyazawa et al., 1985). La manipulation s'effectue uniquement avec des pipettes Pasteur en verre car les œufs déchorionés restent collés sur le plastique.

Les œufs sont ensuite rincés 4 fois avec de l'eau de mer filtrée afin d'éliminer la solution de déchoriation. Après fécondation, les œufs sont incubés à 18°C dans des boîtes de Pétri en verre.

3- Micro-injection de morpholinos

Les œufs déchorionés sont placés dans des rails, constitués d'agarose et d'eau de mer filtrée, afin qu'ils ne puissent pas bouger. Chaque œuf est micro-injecté, grâce à un micro-injecteur (FemtoJet, Eppendorf) couplé à un micro-manipulateur (Narishige), avec une solution d'injection contenant 1 mM de morpholino (Gene Tools) mélangé à 25 mg.mL⁻¹ de Dextran Texas Red (Invitrogen) qui permet de valider par fluorescence la micro-injection.

Les morpholinos utilisés sont présentés dans le tableau suivant :

| Nom | Morpholino |
|-------------|--|
| MO-E(z) | 5'-TTTGACTGCGTC <u>ATTT</u> GCGTGATAT-3' |
| MO-Trx | 5'-TCTTGCCGAATTATCTAAATAGGGA-3' |
| MO-Ph | 5'-GGAATCTGCATCGATTCAATAAATT-3' |
| MO-Contrôle | 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3' |

4- Fixation et perméabilisation

Les embryons sont fixés dans de l'eau de mer contenant 3,7 % Paraformaldéhyde (PAF) pendant 20 minutes à température ambiante. Le tampon de fixation est ensuite éliminé et les échantillons peuvent être stockés dans du tampon phosphate (PBS) contenant des traces de fixateur, à 4°C pendant au maximum une semaine avant le traitement.

Après un lavage des échantillons avec une solution Tris Saline (TS : 25 mM Tris / 150 mM NaCl, pH 7,5), la perméabilisation est réalisée dans du TS contenant 0,2 % Triton X-100 pendant 20 minutes à température ambiante.

5- Immunofluorescence indirecte

Après fixation et perméabilisation, les échantillons sont rincés 2 fois dans du TS puis incubés pendant 1h en chambre humide à 37°C dans l'obscurité avec de la phalloïdine, couplée rhodamine (TRITC) ou fluorescéine (FITC) à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans un volume total de 200 μL de TS. 3 rinçages sont ensuite réalisés avec du TS puis les échantillons sont incubés pendant 1h30 en chambre humide à 37°C dans l'obscurité avec l'anticorps primaire à la dilution voulue dans un volume total de 200 μL de TS. Les échantillons sont à nouveau lavés 3 fois avec du TS puis sont incubés pendant 1h30 à 37°C avec l'anticorps secondaire couplé TRITC ou FITC, en présence de DAPI à 50 ng.mL^{-1} . Les échantillons sont ensuite lavés 2 fois dans du TS, une fois dans de l'eau MilliQ et sont montés entre lame et lamelle dans du Mowiol. L'observation se fait avec un microscope confocal Leica TCS-SPE (plateforme Montpellier RIO Imaging).

Les anticorps et molécules fluorescentes utilisés sont :

- Phalloïdine couplée TRITC (Sigma)
- Phalloïdine couplée FITC (Sigma)
- DAPI (Sigma)
- Anticorps anti-H3K27me3 (Millipore)
- Anticorps anti-E(z) (produit par le laboratoire)
- Anticorps anti-H3K27ac (Millipore)
- Anticorps anti-tubuline acétylée (Sigma)

Pour chaque marquage, un contrôle négatif est réalisé en supprimant l'incubation avec l'anticorps primaire.

6- Marquage TUNEL

Les marquages TUNEL sont réalisés avec un kit Roche (In situ cell death fluorescein or rhodamin detection kit), qui permet de visualiser les noyaux apoptotiques, ceci selon le protocole du fournisseur.

Un contrôle positif est réalisé par un traitement préalable des échantillons avec de la DNase à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ pendant 10 minutes à 37°C .

7- Microscopie électronique en transmission et optique

Les échantillons sont fixés dans un tampon cacodylate de sodium $0,2 \text{ M}$ (pH 7,2) contenant 2,5 % de glutaraldéhyde pendant 1h sur glace. Ils sont ensuite rincés 4 fois pendant 15 minutes à température ambiante dans un tampon cacodylate de sodium $0,225 \text{ M}$ (pH 7,2), puis fixés pendant 1h à 4°C dans un tampon cacodylate de sodium $0,45 \text{ M}$ (pH 7,2) contenant 1 % d'acide osmique. Les échantillons sont enfin lavés 4 fois pendant 15 minutes dans un tampon cacodylate de sodium $0,225 \text{ M}$ (pH 7,2).

Le matériel fixé est ensuite déshydraté dans des bains d'alcool de titre croissant : éthanol 30° pendant 10 minutes, éthanol 50° pendant 10 minutes, éthanol 70° pendant 10 minutes, éthanol 75° pendant 10 minutes puis 3 bains de 5 minutes dans de l'éthanol absolu. Les échantillons sont alors inclus dans de la résine Epon 812, qui polymérise à 60°C pendant 72h.

Pour la microscopie optique, des coupes semi-fines sont réalisées et colorées au bleu de toluidine.

Pour la MET, des coupes ultra-fines sont réalisées avec un ultramicrotome LEICA. Elles sont contrastées par un traitement à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb (Reynolds, 1963) puis observées sur un microscope électronique à transmission Jeol 1200X à 80 kV (plateforme UM2-Microscopie électronique et analytique).

8- Production et purification d'anticorps polyclonaux

Les anticorps ont été générés contre une protéine de fusion GST correspondant au domaine N-terminal de la protéine E(z) de Ciona (résidus 1 à 605). Le clonage a été fait dans un vecteur pGEX-6p1 et la surexpression protéique a été réalisée par voie bactérienne (*Escherichia coli*). La purification de la protéine de fusion se fait par affinité sur résine glutathion sépharose 4B (colonne GSTrap, GE Healthcare) (Plateforme ProRec de Montpellier).

La protéine de fusion purifiée est utilisée pour immuniser les lapins ; le sérum, récupéré 8 semaines après la 1^{ère} injection, est purifié par affinité sur une colonne de sépharose 4B activée au bromure de cyanogène (BrCN) sur laquelle a été immobilisée la protéine de fusion (Méjean et al., 1992).

9- Préparation d'extraits protéiques d'histones

L'extraction d'histones est réalisée essentiellement comme décrit dans Bredfeldt et al. (2010). 15-30 mg de larves micro-injectées sont resuspendues dans 150 µl de tampon RSB (10 mM Tris-HCl, pH7.4; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases) avec 0.5% Nonidet P-40. L'échantillon est homogénéisé puis incubé dans la glace pendant 10 minutes. Le lysat est centrifugé pendant 5 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Le culot est resuspendu dans un volume équivalent (75 µl) dans 5 mM MgCl₂ / 0.8 M HCl, il est passé 4 fois dans une seringue 25G5/8, et incubé dans la glace pendant 1h. La solution contenant les histones est centrifugée à 14 000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube, et les histones sont précipitées avec une solution à 25 % d'acide trichloroacétique dissout dans de l'eau déionisée. Les histones précipitées sont collectées après centrifugation pendant 20 min à 14 000 rpm à 4°C. Le culot est rincé avec de l'acétone,

séché, et ensuite resuspendu dans de l'eau déionisée (30µl) avec 2M Tris-HCl, pH 8.0 (0.3µl). L'extrait d'histones est ensuite utilisé pour réaliser des gels SDS-PAGE et des Western blots.

10- SDS-PAGE et Western Blot

Les embryons sont centrifugés, l'eau de mer est éliminée, et les échantillons sont incubés sur glace pendant 10 minutes dans du tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.6, 5 mM EDTA, 0.5 % NP-40, 1 mM PMSF, 1 mM orthovanadate, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS), complété par un mélange d'inhibiteurs de protéases (Roche Molecular Biochemicals).

Les échantillons sont ensuite broyés avec un potter pour tube de 1,5 mL, puis le lysat est clarifié par centrifugation pendant 15 minutes à 20 000 g à 4°C.

Les échantillons issus de cette lyse sont ensuite dilués dans du tampon Laemmli (Laemmli, 1970) et bouillis pendant 5 minutes.

Les protéines totales des lysats sont séparées par électrophorèse (1h à 20 mA) sur un gel SDS-Polyacrylamide (10 à 20 %), puis transférées sur membrane de PVDF (1h à 0,8 mA/cm²).

Les membranes sont ensuite pré-hybridées dans du PBS/0,05 % Tween/5 % BSA pendant 1 heure à température ambiante.

Après un rinçage de 5 minutes dans du PBS/0,05 % Tween, les membranes sont incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire à la dilution voulue dans du PBS/0,05 % Tween/1 % BSA.

Après 3 rinçages de 10 minutes dans du PBS/0,05 % Tween, les membranes sont incubées pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxidase dans du PBS/0,05 % Tween/1 % BSA.

Les membranes sont ensuite lavées 3 fois pendant 10 minutes dans du PBS/0,05 % Tween, puis incubées 2 minutes avec le substrat enzymatique (GE Healthcare).

La lumière dégagée par la réaction enzymatique est détectée sur film photographique (GE Healthcare).

11- Préparation d'extraits d'ARN totaux et RT-qPCR

L'ARN total des échantillons est purifié grâce au kit RNeasy suivant le protocole fourni par le manufacturier (QIAGEN).

Après isolation de l'ARN à différents stades du développement embryonnaire, l'ARN messager est synthétisé en ADN complémentaire par transcription inverse (SuperScript II Rnase H, Invitrogen).

Pour chaque messager étudié, des amorces oligonucléotidiques sens (F) et antisens (R) spécifiques ont été utilisées :

| Nom | Amorce F | Amorce R |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Ci-TPM3 | GATTCCGAGTTGGAGGTGAA | CGTATTTTCTGTCTGGCGTCT |
| Ci-TPM2 | GAATTGGAATCTGCCCAAGA | CTGCCTCTTCCAACCTTTTGC |
| Ci-Epi1 | AGCACTACTTGCCCAGAGGA | GTCTCGAGAATCGGTCAAG |
| Ci-ETR | TCGAGTTGTCGCAAGCATAC | ACCATCAGGCCCTTCTTTTT |
| Ci-Noto1 | TCGCTAATTTTGCTGATTGG | AGAAATGCGAGCAGGATGTT |
| Ci-Noto4 | AGATCTTTGCGGAAAAGTGG | CAAAAGCAGATCCTGGTCCT |
| Ci-Machol | GACAAGCCGTATCTGTGCAA | GAATTTTGTGCTCCGGTGAT |
| Ci-Tbx6b | GGTATTTTTCGGCAGACTCCA | GAATCCAGTGGAGACCGAAA |
| Ci-Tbx6c | CACCACCATATGCATTCCAA | AGGTGAATTTTGTGGCGAAG |
| Ci-Trithorax | TGTAGCCAGGATGAATGGTG | ATCGTTTTGAAAAGCGCAGT |
| Ci-Polyhomeotic | TGTGTGATGGTTGCTCCAAT | CATTGAACACACGAGGTGCT |
| Ci-Enhancer of zeste | CCGAGGGAAGGTATACGACA | TACTTCATGGCATCGGATTG |
| Ci-Hox1 | CTACTGCGAGCCCTCAATGT | ATTTCAACCCTCCTGGCTCT |
| Ci-Hox2 | TACCTTTGCCGACCAAGAAG | CTCGACGTCACTACCGGTTT |
| Ci-Hox3 | CCTGGCATCTTTGACTGGAT | TCGCGTTTGCTAGCTGAATA |
| Ci-Hox4 | GAGTCCGGAGGATGACAAGA | TACCTGGTGTCTCGGTGTAAG |
| Ci-Hox5 | GAGTGACGAAAGCAGTGACG | TCTGACGTTCCGGTGAGACAC |
| Ci-Hox10 | GACGGGGAGGGAAAATAGAT | TGTACGGCACTCGTTTCTTG |
| Ci-Hox12 | TGCAACTTCCACAATTCCAA | AGCTGGGTAATGGGGGTAGT |
| Ci-S26 | AAGGACGCGGTCATGTAAAA | TCTTTGGCAAGGCGTAAGAT |

La qPCR est réalisée avec un appareil Light Cycler 480 en utilisant le kit SYBR Green I (Roche) (plateforme qPCR UM2/GenomiX).

12- Analyses bioinformatiques

Les recherches de séquences dans le génome de *Ciona intestinalis* ont été effectuées sur les sites :

<http://www.aniseed.cnrs.fr/>

<http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/indexr1.html>

<http://genome.jgi-psf.org/Cioin2/Cioin2.home.html>

Les recherches de séquences dans le génome de *Drosophila melanogaster* et d'*Homo sapiens* ont été effectuées sur le site :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Les alignements de séquences ont été réalisés grâce au site :

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

Les estimations d'hydrophobicité et de taille moléculaire ont été effectuées sur le site :

<http://web.expasy.org/protparam/>

Bibliographie

- Akkers, R. C., Van Heeringen, S. J., Jacobi, U. G., Janssen-Megens, E. M., François, K.-J., Stunnenberg, H. G. and Veenstra, G. J. C. (2009). A hierarchy of H3K4me3 and H3K27me3 acquisition in spatial gene regulation in *Xenopus* embryos. *Dev. Cell* 17, 425–434.
- Albert, M. and Peters, A. H. F. M. (2009). Genetic and epigenetic control of early mouse development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 113–121.
- Anamika, K., Krebs, A. R., Thompson, J., Poch, O., Devys, D. and Tora, L. (2010). Lessons from genome-wide studies: an integrated definition of the coactivator function of histone acetyl transferases. *Epigenetics Chromatin* 3, 18.
- Andersen, I. S., Ostrup, O., Lindeman, L. C., Aanes, H., Reiner, A. H., Mathavan, S., Aleström, P. and Collas, P. (2012a). Epigenetic complexity during the zebrafish mid-blastula transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 1139–1144.
- Andersen, I. S., Reiner, A. H., Aanes, H., Aleström, P. and Collas, P. (2012b). Developmental features of DNA methylation during activation of the embryonic zebrafish genome. *Genome Biol.* 13, R65.
- Ardehali, M. B., Mei, A., Zobeck, K. L., Caron, M., Lis, J. T. and Kusch, T. (2011). *Drosophila* Set1 is the major histone H3 lysine 4 trimethyltransferase with role in transcription. *EMBO J.* 30, 2817–2828.
- Armstrong, J. A., Papoulas, O., Daubresse, G., Sperling, A. S., Lis, J. T., Scott, M. P. and Tamkun, J. W. (2002). The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *EMBO J.* 21, 5245–5254.
- Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jørgensen, H. F., John, R. M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merkenschlager, M., et al. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* 8, 532–538.
- Badenhorst, P., Voas, M., Rebay, I. and Wu, C. (2002). Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes Dev.* 16, 3186–3198.
- Bannister, A. J., Schneider, R. and Kouzarides, T. (2002). Histone methylation: dynamic or static? *Cell* 109, 801–806.
- Bantignies, F. and Cavalli, G. (2011). Polycomb group proteins: repression in 3D. *Trends Genet.* 27, 454–464.
- Bantignies, F., Goodman, R. H. and Smolik, S. M. (2000). Functional interaction between the coactivator *Drosophila* CREB-binding protein and ASH1, a member of the trithorax group of chromatin modifiers. *Mol. Cell. Biol.* 20, 9317–9330.
- Barradas, M., Anderton, E., Acosta, J. C., Li, S., Banito, A., Rodriguez-Niedenführ, M., Maertens, G., Banck, M., Zhou, M.-M., Walsh, M. J., et al. (2009). Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. *Genes Dev.* 23, 1177–1182.
- Becker, P. B. and Hörz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 247–273.
- Bell, O., Wirbelauer, C., Hild, M., Scharf, A. N. D., Schwaiger, M., MacAlpine, D. M., Zilbermann, F., Van Leeuwen, F., Bell, S. P., Imhof, A., et al. (2007). Localized H3K36 methylation states

- define histone H4K16 acetylation during transcriptional elongation in *Drosophila*. *EMBO J.* 26, 4974–4984.
- Belmont, A. S. (2002). Mitotic chromosome scaffold structure: new approaches to an old controversy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 15855–15857.
- Benoit, B., He, C. H., Zhang, F., Votruba, S. M., Tadros, W., Westwood, J. T., Smibert, C. A., Lipshitz, H. D. and Theurkauf, W. E. (2009). An essential role for the RNA-binding protein Smaug during the *Drosophila* maternal-to-zygotic transition. *Development* 136, 923–932.
- Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 142–148.
- Bernstein, B. E., Humphrey, E. L., Erlich, R. L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J. S., Kouzarides, T. and Schreiber, S. L. (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8695–8700.
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315–326.
- Bernstein, B. E., Meissner, A. and Lander, E. S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* 128, 669–681.
- Berrill, N. (1929). Studies in tunicate development. I. general physiology of development of simple ascidians. *Philos. Trans. R. Soc. Lon. Biol.* 37–78.
- Bihaqi, S. W., Schumacher, A., Maloney, B., Lahiri, D. K. and Zawia, N. H. (2012). Do epigenetic pathways initiate late onset Alzheimer disease (LOAD): towards a new paradigm. *Curr Alzheimer Res* 9, 574–588.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21.
- Bloyer, S., Cavalli, G., Brock, H. W. and Dura, J.-M. (2003). Identification and characterization of polyhomeotic PREs and TREs. *Dev. Biol.* 261, 426–442.
- Blythe, S. A., Cha, S.-W., Tadjuidje, E., Heasman, J. and Klein, P. S. (2010). beta-Catenin primes organizer gene expression by recruiting a histone H3 arginine 8 methyltransferase, Prmt2. *Dev. Cell* 19, 220–231.
- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J. S. and Kornberg, R. D. (2003). Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Mol. Cell* 11, 1587–1598.
- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J. S. and Kornberg, R. D. (2004). Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo. *Mol. Cell* 14, 667–673.
- Bogdanovic, O., Long, S. W., Van Heeringen, S. J., Brinkman, A. B., Gómez-Skarmeta, J. L., Stunnenberg, H. G., Jones, P. L. and Veenstra, G. J. C. (2011). Temporal uncoupling of the DNA methylome and transcriptional repression during embryogenesis. *Genome Res.* 21, 1313–1327.
- Bogdanović, O., Van Heeringen, S. J. and Veenstra, G. J. C. (2012). The epigenome in early vertebrate development. *Genesis* 50, 192–206.

- Bolós, V., Grego-Bessa, J. and De la Pompa, J. L. (2007). Notch signaling in development and cancer. *Endocr. Rev.* 28, 339–363.
- Boncinelli, E., Somma, R., Acampora, D., Pannese, M., D’Esposito, M., Faiella, A. and Simeone, A. (1988). Organization of human homeobox genes. *Hum. Reprod.* 3, 880–886.
- Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M. K., et al. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349–353.
- Bracken, A. P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E. and Helin, K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* 22, 5323–5335.
- Bracken, A. P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., Theilgaard-Mönch, K., Minucci, S., Porse, B. T., Marine, J.-C., et al. (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev.* 21, 525–530.
- Bredfeldt, T. G., Greathouse, K. L., Safe, S. H., Hung, M.-C., Bedford, M. T. and Walker, C. L. (2010). Xenoestrogen-induced regulation of EZH2 and histone methylation via estrogen receptor signaling to PI3K/AKT. *Mol. Endocrinol.* 24, 993–1006.
- Breiling, A., Turner, B. M., Bianchi, M. E. and Orlando, V. (2001). General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins. *Nature* 412, 651–655.
- Bridges and Morgan (1923). *Publs Carnegie Inst Wash.*
- Briggs, S. D., Xiao, T., Sun, Z.-W., Caldwell, J. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Allis, C. D. and Strahl, B. D. (2002). Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* 418, 498.
- Bruno, M., Flaus, A., Stockdale, C., Rencurel, C., Ferreira, H. and Owen-Hughes, T. (2003). Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Mol. Cell* 12, 1599–1606.
- Byrd, K. N. and Shearn, A. (2003). ASH1, a Drosophila trithorax group protein, is required for methylation of lysine 4 residues on histone H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11535–11540.
- Cairns, B. R. (2007). Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 989–996.
- Cameron, R. A., Rowen, L., Nesbitt, R., Bloom, S., Rast, J. P., Berney, K., Arenas-Mena, C., Martinez, P., Lucas, S., Richardson, P. M., et al. (2006). Unusual gene order and organization of the sea urchin hox cluster. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 306, 45–58.
- Cao, R. and Zhang, Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Current Opinion in Genetics & Development* 14, 155–164.
- Cao, R., Tsukada, Y.-I. and Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol. Cell* 20, 845–854.

- Caputi, L., Andreakis, N., Mastrototaro, F., Cirino, P., Vassillo, M. and Sordino, P. (2007). Cryptic speciation in a model invertebrate chordate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9364–9369.
- Caretti, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G. E. and Sartorelli, V. (2004). The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* 18, 2627–2638.
- Cavalli, G. and Paro, R. (1998). The Drosophila Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell* 93, 505–518.
- Cayuso Mas, J., Noël, E. S. and Ober, E. A. (2011). Chromatin modification in zebrafish development. *Methods Cell Biol.* 104, 401–428.
- Chabry, L. (1887). Contribution à l'embryologie normale et tératologique des ascidies simples. *J Anat Physiol (Paris)* 167–319.
- Chamberlain, S. J., Yee, D. and Magnuson, T. (2008). Polycomb repressive complex 2 is dispensable for maintenance of embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cells* 26, 1496–1505.
- Chambon, J. P., Soule, J., Pomies, P., Fort, P., Sahuquet, A., Alexandre, D., Mangeat, P. H. and Baghdiguian, S. (2002). Tail regression in *Ciona intestinalis* (Prochordate) involves a Caspase-dependent apoptosis event associated with ERK activation. *Development* 129, 3105–3114.
- Chan, C. S., Rastelli, L. and Pirrotta, V. (1994). A Polycomb response element in the Ubx gene that determines an epigenetically inherited state of repression. *EMBO J.* 13, 2553–2564.
- Chandrasekharan, M. B., Huang, F., Chen, Y.-C. and Sun, Z.-W. (2010). Histone H2B C-terminal helix mediates trans-histone H3K4 methylation independent of H2B ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3216–3232.
- Chen, Z. and Riggs, A. D. (2011). DNA methylation and demethylation in mammals. *J. Biol. Chem.* 286, 18347–18353.
- Chen, S., Bohrer, L. R., Rai, A. N., Pan, Y., Gan, L., Zhou, X., Bagchi, A., Simon, J. A. and Huang, H. (2010). Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2. *Nat. Cell Biol.* 12, 1108–1114.
- Cheng, N. N., Sinclair, D. A., Campbell, R. B. and Brock, H. W. (1994). Interactions of polyhomeotic with Polycomb group genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 138, 1151–1162.
- Cheung, P., Tanner, K. G., Cheung, W. L., Sassone-Corsi, P., Denu, J. M. and Allis, C. D. (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol. Cell* 5, 905–915.
- Chiba, S., Miki, Y., Ashida, K., Wada, M. R., Tanaka, K. J., Shibata, Y., Nakamori, R. and Nishikata, T. (1999). Interactions between cytoskeletal components during myoplasm rearrangement in ascidian eggs. *Dev. Growth Differ.* 41, 265–272.
- Cho, J.-H., Dimri, M. and Dimri, G. P. (2012). A Positive Feedback Loop Regulates the Expression of Polycomb Group Protein BMI1 via WNT Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.*
- Choi, J. K. and Howe, L. J. (2009). Histone acetylation: truth of consequences? *Biochem. Cell Biol.* 87, 139–150.

- Christiaen, L., Wagner, E., Shi, W. and Levine, M. (2009). Isolation of sea squirt (*Ciona*) gametes, fertilization, dechorionation, and development. *Cold Spring Harb Protoc* 2009, pdb.prot5344.
- Cirino, P., Toscano, A., Caramiello, D., Macina, A., Miraglia, V. and Monte, A. (2002). Laboratory culture of the ascidian *Ciona intestinalis*: a model system for molecular developmental biology research. *Mar. Mod. Elec. Rec.*
- Cloney, R. A. (1977). Larval adhesive organs and metamorphosis in ascidians. I. Fine structure of the evertting papillae of *Distaplia occidentalis*. *Cell Tissue Res.* 183, 423–444.
- Cloney, R. A. and Cavey, M. J. (1982). Ascidian larval tunic: Extraembryonic structures influence morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 222, 547–562.
- Conklin, E. G. (1905). The organization and cell lineage of the ascidian egg. *J. Acad. Nat. Sci. (Philadelphia)* 13, 1–119.
- Corbo, J. C., Levine, M. and Zeller, R. W. (1997). Characterization of a notochord-specific enhancer from the Brachyury promoter region of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Development* 124, 589–602.
- Cosgrove, M. S. and Patel, A. (2010). Mixed lineage leukemia: a structure-function perspective of the MLL1 protein. *FEBS J.* 277, 1832–1842.
- Crowther, R. J. and Whittaker, J. R. (1983). Developmental autonomy of muscle fine structure in muscle lineage cells of ascidian embryos. *Dev. Biol.* 96, 1–10.
- Cui, K., Zang, C., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Childs, R. W., Peng, W. and Zhao, K. (2009). Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* 4, 80–93.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. and Pirrotta, V. (2002). Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111, 185–196.
- Dahiya, A., Wong, S., Gonzalo, S., Gavin, M. and Dean, D. C. (2001). Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol. Cell* 8, 557–569.
- Darras, S. and Nishida, H. (2001). The BMP signaling pathway is required together with the FGF pathway for notochord induction in the ascidian embryo. *Development* 128, 2629–2638.
- Darwin, C. (1872). *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*.
- De Santa, F., Totaro, M. G., Prosperini, E., Notarbartolo, S., Testa, G. and Natoli, G. (2007). The Histone H3 Lysine-27 Demethylase Jmjd3 Links Inflammation to Inhibition of Polycomb-Mediated Gene Silencing. *Cell* 130, 1083–1094.
- De Santis, R. and Pinto, M. R. (1991). Gamete self-discrimination in ascidians: a role for the follicle cells. *Mol. Reprod. Dev.* 29, 47–50.
- Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., Davidson, B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D. M., et al. (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 298, 2157–2167.

- Delaval, K. and Feil, R. (2004). Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 188–195.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D. and Philippe, H. (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439, 965–968.
- Denucé, J. M. (1975). Proteolytic activity in *Ciona intestinalis*, associated with hatching. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 83, 958–959.
- Di Gregorio, A., Corbo, J. C. and Levine, M. (2001). The regulation of forkhead/HNF-3beta expression in the *Ciona* embryo. *Dev. Biol.* 229, 31–43.
- Dilly, P. N. (1969). The ultrastructure of the test of the tadpole larva of *Ciona intestinalis*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 95, 331–346.
- Dingwall, A. K., Beek, S. J., McCallum, C. M., Tamkun, J. W., Kalpana, G. V., Goff, S. P. and Scott, M. P. (1995). The *Drosophila* snr1 and brm proteins are related to yeast SWI/SNF proteins and are components of a large protein complex. *Mol. Biol. Cell* 6, 777–791.
- Duboule, D. (2007). The rise and fall of Hox gene clusters. *Development* 134, 2549–2560.
- Dumollard, R. and Sardet, C. (2001). Three different calcium wave pacemakers in ascidian eggs. *J. Cell. Sci.* 114, 2471–2481.
- Dumollard, R., Carroll, J., Dupont, G. and Sardet, C. (2002). Calcium wave pacemakers in eggs. *J. Cell. Sci.* 115, 3557–3564.
- Durante, M. (1956). Cholinesterase in the development of *Ciona intestinalis* (Ascidia). *Experientia* 12, 307–308.
- Ebert, A., Schotta, G., Lein, S., Kubicek, S., Krauss, V., Jenuwein, T. and Reuter, G. (2004). Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev.* 18, 2973–2983.
- Edmondson, D. G., Davie, J. K., Zhou, J., Mirnikjoo, B., Tatchell, K. and Dent, S. Y. R. (2002). Site-specific loss of acetylation upon phosphorylation of histone H3. *J. Biol. Chem.* 277, 29496–29502.
- Eissenberg, J. C. and Elgin, S. C. (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 204–210.
- Ekwall, K., Olsson, T., Turner, B. M., Cranston, G. and Allshire, R. C. (1997). Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell* 91, 1021–1032.
- Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., Gyurkovics, H. and Karch, F. (1994). The Trithorax-like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature* 371, 806–808.
- Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453.
- Feng, Q. and Zhang, Y. (2003). The NuRD complex: linking histone modification to nucleosome remodeling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 274, 269–290.

- Ferrier, D. E. K. and Minguillón, C. (2003). Evolution of the Hox/ParaHox gene clusters. *Int. J. Dev. Biol.* 47, 605–611.
- Finch, J. T. and Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1897–1901.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S. A., Kim, Y., Allis, C. D. and Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.* 17, 1870–1881.
- Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Funabiki, H. and Allis, C. D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116–1122.
- Franke, A., DeCamillis, M., Zink, D., Cheng, N., Brock, H. W. and Paro, R. (1992). Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* 11, 2941–2950.
- Fujii, S., Tokita, K., Wada, N., Ito, K., Yamauchi, C., Ito, Y. and Ochiai, A. (2011). MEK-ERK pathway regulates EZH2 overexpression in association with aggressive breast cancer subtypes. *Oncogene* 30, 4118–4128.
- Fyodorov, D. V., Blower, M. D., Karpen, G. H. and Kadonaga, J. T. (2004). Acf1 confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin in vivo. *Genes Dev.* 18, 170–183.
- García-Fernández, J. (2005). The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat. Rev. Genet.* 6, 881–892.
- Gatta, R. and Mantovani, R. (2010). Single nucleosome ChIPs identify an extensive switch of acetyl marks on cell cycle promoters. *Cell Cycle* 9, 2149–2159.
- Gianguzza, M. and Dolcemascolo, G. (1980). Morphological and cytochemical investigations on the formation of the test during the embryonic development of *Ciona intestinalis*. *Acta Embryol Morphol Exp* 1, 225–239.
- Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C.-L., Zhang, X., Golic, K. G., Jacobsen, S. E. and Bestor, T. H. (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311, 395–398.
- Gräff, J. and Mansuy, I. M. (2008). Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav. Brain Res.* 192, 70–87.
- Grassé, P. (1948). *Traité de zoologie, Anatomie, Systématique, Biologie Tome XI.*
- Guitton, A.-E. and Berger, F. (2005). Control of reproduction by Polycomb Group complexes in animals and plants. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 707–716.
- Hagstrom, K., Muller, M. and Schedl, P. (1997). A Polycomb and GAGA dependent silencer adjoins the Fab-7 boundary in the *Drosophila bithorax* complex. *Genetics* 146, 1365–1380.
- Hamiche, A., Sandaltzopoulos, R., Gdula, D. A. and Wu, C. (1999). ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF. *Cell* 97, 833–842.

- Hamon, M. A. and Cossart, P. (2008). Histone Modifications and Chromatin Remodeling during Bacterial Infections. *Cell Host & Microbe* 4, 100–109.
- Hansen, K. H., Bracken, A. P., Pasini, D., Dietrich, N., Gehani, S. S., Monrad, A., Rappsilber, J., Lerdrup, M. and Helin, K. (2008). A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nat. Cell Biol.* 10, 1291–1300.
- Hassan, A. H., Neely, K. E. and Workman, J. L. (2001). Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* 104, 817–827.
- Hassler, M. R. and Egger, G. (2012). Epigenomics of cancer - emerging new concepts. *Biochimie* 94, 2219–2230.
- Heard, E. (2005). Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 482–489.
- Higashi, M., Inoue, S. and Ito, T. (2010). Core histone H2A ubiquitylation and transcriptional regulation. *Exp. Cell Res.* 316, 2707–2712.
- Hochstrasser, M. (1996). Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* 84, 813–815.
- Hogan, C. and Varga-Weisz, P. (2007). The regulation of ATP-dependent nucleosome remodelling factors. *Mutat. Res.* 618, 41–51.
- Holland, L. Z., Albalat, R., Azumi, K., Benito-Gutiérrez, E., Blow, M. J., Bronner-Fraser, M., Brunet, F., Butts, T., Candiani, S., Dishaw, L. J., et al. (2008). The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res.* 18, 1100–1111.
- Hotta, K., Takahashi, H., Asakura, T., Saitoh, B., Takatori, N., Satou, Y. and Satoh, N. (2000). Characterization of Brachyury-downstream notochord genes in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Biol.* 224, 69–80.
- Hotta, K., Takahashi, H., Satoh, N. and Gojobori, T. (2008). Brachyury-downstream gene sets in a chordate, *Ciona intestinalis*: integrating notochord specification, morphogenesis and chordate evolution. *Evolution & Development* 10, 37–51.
- Hou, H. and Yu, H. (2010). Structural insights into histone lysine demethylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 739–748.
- Huang, D.-H., Chang, Y.-L., Yang, C.-C., Pan, I.-C. and King, B. (2002). pipsqueak encodes a factor essential for sequence-specific targeting of a polycomb group protein complex. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6261–6271.
- Hübner, M. R. and Spector, D. L. (2010). Role of H3K27 demethylases Jmjd3 and UTX in transcriptional regulation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75, 43–49.
- Hudson, C. and Lemaire, P. (2001). Induction of anterior neural fates in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mech. Dev.* 100, 189–203.
- Hudson, C. and Yasuo, H. (2005). Patterning across the ascidian neural plate by lateral Nodal signalling sources. *Development* 132, 1199–1210.

- Hudson, C. and Yasuo, H. (2008). Similarity and diversity in mechanisms of muscle fate induction between ascidian species. *Biol. Cell* 100, 265–277.
- Hudson, C., Darras, S., Caillol, D., Yasuo, H. and Lemaire, P. (2003). A conserved role for the MEK signalling pathway in neural tissue specification and posteriorisation in the invertebrate chordate, the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development* 130, 147–159.
- Hudson, C., Ba, M., Rouvière, C. and Yasuo, H. (2011). Divergent mechanisms specify chordate motoneurons: evidence from ascidians. *Development* 138, 1643–1652.
- Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R. A., Jr, Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Petty, T. J., Sheston, E. A., Mellert, H. S., Stavridi, E. S. and Halazonetis, T. D. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* 432, 406–411.
- Ikuta, T. and Saiga, H. (2005). Organization of Hox genes in ascidians: Present, past, and future. *Developmental Dynamics* 233, 382–389.
- Ikuta, T., Yoshida, N., Satoh, N. and Saiga, H. (2004). *Ciona intestinalis* Hox gene cluster: Its dispersed structure and residual colinear expression in development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15118–15123.
- Ikuta, T., Satoh, N. and Saiga, H. (2010). Limited functions of Hox genes in the larval development of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development* 137, 1505–1513.
- Imai, K., Takada, N., Satoh, N. and Satou, Y. (2000). (beta)-catenin mediates the specification of endoderm cells in ascidian embryos. *Development* 127, 3009–3020.
- Imai, K. S., Satoh, N. and Satou, Y. (2002). Early embryonic expression of FGF4/6/9 gene and its role in the induction of mesenchyme and notochord in *Ciona savignyi* embryos. *Development* 129, 1729–1738.
- Imai, K. S., Levine, M., Satoh, N. and Satou, Y. (2006). Regulatory blueprint for a chordate embryo. *Science's STKE* 312, 1183.
- Imhof, A. and Wolffe, A. P. (1998). Transcription: gene control by targeted histone acetylation. *Curr. Biol.* 8, R422–424.
- Ingham, P. W. (1985). A clonal analysis of the requirement for the trithorax gene in the diversification of segments in *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol* 89, 349–365.
- Ingham, P. W. (1998). trithorax and the regulation of homeotic gene expression in *Drosophila*: a historical perspective. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 423–429.
- Iwata, S., Takenobu, H., Kageyama, H., Koseki, H., Ishii, T., Nakazawa, A., Tatzaki, S., Nakagawara, A. and Kamijo, T. (2010). Polycomb group molecule PHC3 regulates polycomb complex composition and prognosis of osteosarcoma. *Cancer Sci.* 101, 1646–1652.
- Jeffery, W. R. and Swalla, B. J. (1990). The myoplasm of ascidian eggs: a localized cytoskeletal domain with multiple roles in embryonic development. *Semin. Cell Biol.* 1, 373–381.
- Joo, H.-Y., Zhai, L., Yang, C., Nie, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Chang, C. and Wang, H. (2007). Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination. *Nature* 449, 1068–1072.

- José-Edwards, D. S., Kerner, P., Kugler, J. E., Deng, W., Jiang, D. and Di Gregorio, A. (2011). The identification of transcription factors expressed in the notochord of *Ciona intestinalis* adds new potential players to the brachyury gene regulatory network. *Dev. Dyn.* 240, 1793–1805.
- Kaesler, M. D., Aslanian, A., Dong, M.-Q., Yates, J. R., 3rd and Emerson, B. M. (2008). BRD7, a novel PBAF-specific SWI/SNF subunit, is required for target gene activation and repression in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 283, 32254–32263.
- Kajiume, T., Ninomiya, Y., Ishihara, H., Kanno, R. and Kanno, M. (2004). Polycomb group gene mel-18 modulates the self-renewal activity and cell cycle status of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 32, 571–578.
- Kamminga, L. M., Bystrykh, L. V., De Boer, A., Houwer, S., Douma, J., Weersing, E., Dontje, B. and De Haan, G. (2006). The Polycomb group gene *Ezh2* prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood* 107, 2170–2179.
- Kane, D. A. and Kimmel, C. B. (1993). The zebrafish midblastula transition. *Development* 119, 447–456.
- Kangaspeska, S., Stride, B., Métivier, R., Polycarpou-Schwarz, M., Ibberson, D., Carmouche, R. P., Benes, V., Gannon, F. and Reid, G. (2008). Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 452, 112–115.
- Karanikolas, B. D. W., Figueiredo, M. L. and Wu, L. (2010). Comprehensive evaluation of the role of EZH2 in the growth, invasion, and aggression of a panel of prostate cancer cell lines. *Prostate* 70, 675–688.
- Karytinis, A., Forneris, F., Profumo, A., Ciossani, G., Battaglioli, E., Binda, C. and Mattevi, A. (2009). A novel mammalian flavin-dependent histone demethylase. *J. Biol. Chem.* 284, 17775–17782.
- Kaufman, T. C., Lewis, R. and Wakimoto, B. (1980). Cytogenetic Analysis of Chromosome 3 in *DROSOPHILA MELANOGASTER*: The Homeotic Gene Complex in Polytene Chromosome Interval 84a-B. *Genetics* 94, 115–133.
- Kawamura, A., Yokota, S., Yamada, K., Inoue, H., Inohaya, K., Yamazaki, K., Yasumasu, I. and Higashinakagawa, T. (2002). *pc1* and *psc1*, zebrafish homologs of *Drosophila* Polycomb and Posterior sex combs, encode nuclear proteins capable of complex interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 456–463.
- Kennison, J. A. (1995). The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu. Rev. Genet.* 29, 289–303.
- Kerppola, T. K. (2009). Polycomb group complexes--many combinations, many functions. *Trends Cell Biol.* 19, 692–704.
- Kheradmand Kia, S., Solaimani Kartalaei, P., Farahbakhshian, E., Pourfarzad, F., Von Lindern, M. and Verrijzer, C. P. (2009). EZH2-dependent chromatin looping controls INK4a and INK4b, but not ARF, during human progenitor cell differentiation and cellular senescence. *Epigenetics Chromatin* 2, 16.
- Khoeiry, P., Rothbacher, U., Ohtsuka, Y., Daian, F., Frangulian, E., Roure, A., Dubchak, I. and Lemaire, P. (2010). A cis-regulatory signature in ascidians and flies, independent of transcription factor binding sites. *Curr. Biol.* 20, 792–802.

- Kim, H., Kang, K. and Kim, J. (2009). AEBP2 as a potential targeting protein for Polycomb Repression Complex PRC2. *Nucleic Acids Res.* 37, 2940–2950.
- Kinoshita, T., Harada, J. J., Goldberg, R. B. and Fischer, R. L. (2001). Polycomb repression of flowering during early plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14156–14161.
- Klebes, A., Sustar, A., Kechris, K., Li, H., Schubiger, G. and Kornberg, T. B. (2005). Regulation of cellular plasticity in *Drosophila* imaginal disc cells by the Polycomb group, trithorax group and lama genes. *Development* 132, 3753–3765.
- Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Köcher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M. and Müller, J. (2006). A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes Dev.* 20, 1110–1122.
- Kornberg, R. D. and Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285–294.
- Krebs, J. E., Fry, C. J., Samuels, M. L. and Peterson, C. L. (2000). Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell* 102, 587–598.
- Krogan, N. J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D. P., Beattie, B. K., Emili, A., Boone, C., et al. (2003). Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4207–4218.
- Kuang, F. L., Luo, Z. and Scharff, M. D. (2009). H3 trimethyl K9 and H3 acetyl K9 chromatin modifications are associated with class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 5288–5293.
- Kubo, A., Suzuki, N., Yuan, X., Nakai, K., Satoh, N., Imai, K. S. and Satou, Y. (2010). Genomic cis-regulatory networks in the early *Ciona intestinalis* embryo. *Development* 137, 1613–1623.
- Kugler, J. E., Gazdoui, S., Oda-Ishii, I., Passamaneck, Y. J., Erives, A. J. and Di Gregorio, A. (2010). Temporal regulation of the muscle gene cascade by *Macho1* and *Tbx6* transcription factors in *Ciona intestinalis*. *J Cell Sci* 123, 2453–2463.
- Kumano, G. and Nishida, H. (1998). Maternal and zygotic expression of the endoderm-specific alkaline phosphatase gene in embryos of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev. Biol.* 198, 245–252.
- Kumano, G., Yamaguchi, S. and Nishida, H. (2006). Overlapping expression of *FoxA* and *Zic* confers responsiveness to FGF signaling to specify notochord in ascidian embryos. *Dev. Biol.* 300, 770–784.
- Lachner, M. and Jenuwein, T. (2002). The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 286–298.
- Lachner, M., O’Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116–120.
- Lachner, M., O’Sullivan, R. J. and Jenuwein, T. (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell. Sci.* 116, 2117–2124.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lamarck, J. B. . M. (1815). *Histoire naturelle des animaux sans vertèbre*. Paris Verdière.
- Landeira, D., Sauer, S., Poot, R., Dvorkina, M., Mazzarella, L., Jørgensen, H. F., Pereira, C. F., Leleu, M., Piccolo, F. M., Spivakov, M., et al. (2010). Jarid2 is a PRC2 component in embryonic stem cells required for multi-lineage differentiation and recruitment of PRC1 and RNA Polymerase II to developmental regulators. *Nat. Cell Biol.* 12, 618–624.
- Längst, G., Bonte, E. J., Corona, D. F. and Becker, P. B. (1999). Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell* 97, 843–852.
- Lau, P. N. I. and Cheung, P. (2011a). Histone code pathway involving H3 S28 phosphorylation and K27 acetylation activates transcription and antagonizes polycomb silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 2801–2806.
- Lau, P. N. I. and Cheung, P. (2011b). Unlocking polycomb silencing through histone H3 phosphorylation. *Cell Cycle* 10, 1514–1515.
- Lee, N., Zhang, J., Klose, R. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R. S. and Zhang, Y. (2007). The trithorax-group protein Lid is a histone H3 trimethyl-Lys4 demethylase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 341–343.
- Leeb, M. and Wutz, A. (2012). Establishment of epigenetic patterns in development. *Chromosoma* 121, 251–262.
- Leeb, M., Pasini, D., Novatchkova, M., Jaritz, M., Helin, K. and Wutz, A. (2010). Polycomb complexes act redundantly to repress genomic repeats and genes. *Genes Dev.* 24, 265–276.
- Lemaire, P., Bertrand, V. and Hudson, C. (2002). Early steps in the formation of neural tissue in ascidian embryos. *Dev. Biol.* 252, 151–169.
- Lemons, D. and McGinnis, W. (2006). Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* 313, 1918–1922.
- Leonhardt, H., Page, A. W., Weier, H. U. and Bestor, T. H. (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71, 865–873.
- Levine, S. S., Weiss, A., Erdjument-Bromage, H., Shao, Z., Tempst, P. and Kingston, R. E. (2002). The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6070–6078.
- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565–570.
- Li, G., Margueron, R., Ku, M., Chambon, P., Bernstein, B. E. and Reinberg, D. (2010a). Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes & Development* 24, 368–380.
- Li, X., Han, Y. and Xi, R. (2010b). Polycomb group genes Psc and Su(z)2 restrict follicle stem cell self-renewal and extrusion by controlling canonical and noncanonical Wnt signaling. *Genes Dev.* 24, 933–946.

- Lin, Y.-W., Chen, H.-M. and Fang, J.-Y. (2011). Gene silencing by the Polycomb group proteins and associations with cancer. *Cancer Invest.* 29, 187–195.
- Lindeman, L. C., Winata, C. L., Aanes, H., Mathavan, S., Alestrom, P. and Collas, P. (2010). Chromatin states of developmentally-regulated genes revealed by DNA and histone methylation patterns in zebrafish embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 803–813.
- Lindeman, L. C., Andersen, I. S., Reiner, A. H., Li, N., Aanes, H., Østrup, O., Winata, C., Mathavan, S., Müller, F., Aleström, P., et al. (2011). Prepatterning of developmental gene expression by modified histones before zygotic genome activation. *Dev. Cell* 21, 993–1004.
- Liu, L., Xiang, J., Dong, B., Natarajan, P., Yu, K. and Cai, N. (2006). *Ciona intestinalis* as an emerging model organism: its regeneration under controlled conditions and methodology for egg dechoriation. *J Zhejiang Univ Sci B* 7, 467–474.
- Lorch, Y., Zhang, M. and Kornberg, R. D. (1999). Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* 96, 389–392.
- Louis Allano and Clamens, A. (2010). *Faits et mécanismes de l'évolution biologique*.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.
- MacKay, A. B., Mhanni, A. A., McGowan, R. A. and Krone, P. H. (2007). Immunological detection of changes in genomic DNA methylation during early zebrafish development. *Genome* 50, 778–785.
- Maertens, G. N., El Messaoudi-Aubert, S., Racek, T., Stock, J. K., Nicholls, J., Rodriguez-Niedenführ, M., Gil, J. and Peters, G. (2009). Several distinct polycomb complexes regulate and co-localize on the INK4a tumor suppressor locus. *PLoS ONE* 4, e6380.
- Maeshima, K. and Eltsov, M. (2008). Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes. *J. Biochem.* 143, 145–153.
- Mancuso, V. (1973). Changes in fine structure associated with the test formation in the ectoderm cells of *Ciona intestinalis* embryo. *Acta Embryol Exp (Palermo)* 3, 247–257.
- Mancuso, V. (1974). Formation of the ultrastructural components of *Ciona intestinalis* tadpole test by the animal embryo. *Experientia* 30, 1078.
- Margueron, R. and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343–349.
- Martin, C. and Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 838–849.
- Martinand-Mari, C., Maury, B., Rousset, F., Sahuquet, A., Mennessier, G., Rochal, S., Lorman, V., Mangeat, P. and Baghdiguan, S. (2009). Topological Control of Life and Death in Non-Proliferative Epithelia. *PLoS ONE* 4, .
- Martinez, A.-M. and Cavalli, G. (2006). The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle* 5, 1189–1197.

- Martinez, A.-M., Colomb, S., Déjardin, J., Bantignies, F. and Cavalli, G. (2006). Polycomb group-dependent Cyclin A repression in *Drosophila*. *Genes Dev.* 20, 501–513.
- Martinez, A.-M., Schuettengruber, B., Sakr, S., Janic, A., Gonzalez, C. and Cavalli, G. (2009). Polyhomeotic has a tumor suppressor activity mediated by repression of Notch signaling. *Nat. Genet.* 41, 1076–1082.
- Matsuo, F., Yano, K., Saito, H., Morotomi, K., Kato, M., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Akiyama, F., Sakamoto, G. and Miki, Y. (2002). Mutation analysis of the mel-18 gene that shows decreased expression in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer* 9, 33–38.
- Matthysse, A. G., Deschet, K., Williams, M., Marry, M., White, A. R. and Smith, W. C. (2004). A functional cellulose synthase from ascidian epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 986–991.
- Maurange, C. and Paro, R. (2002). A cellular memory module conveys epigenetic inheritance of hedgehog expression during *Drosophila* wing imaginal disc development. *Genes Dev.* 16, 2672–2683.
- Maury, B., Martinand-Mari, C., Chambon, J.-P., Soulé, J., Degols, G., Sahuquet, A., Weill, M., Berthomieu, A., Fort, P., Mangeat, P., et al. (2006). Fertilization regulates apoptosis of *Ciona intestinalis* extra-embryonic cells through thyroxine (T4)-dependent NF-kappaB pathway activation during early embryonic development. *Dev. Biol.* 289, 152–165.
- Meedel, T. H. and Whittaker, J. R. (1979). Development of acetylcholinesterase during embryogenesis of the ascidian *Ciona intestinalis*. *J. Exp. Zool.* 210, 1–10.
- Meedel, T. H., Crowther, R. J. and Whittaker, J. R. (1987). Determinative properties of muscle lineages in ascidian embryos. *Development* 100, 245–260.
- Meedel, T. H., Lee, J. J. and Whittaker, J. R. (2002). Muscle Development and Lineage-Specific Expression of CiMDF, the MyoD-Family Gene of *Ciona intestinalis*. *Developmental Biology* 241, 238–246.
- Méjean, C., Lebart, M. C., Boyer, M., Roustan, C. and Benyamin, Y. (1992). Localization and identification of actin structures involved in the filamin-actin interaction. *Eur. J. Biochem.* 209, 555–562.
- Métivier, R., Gallais, R., Tiffoche, C., Le Péron, C., Jurkowska, R. Z., Carmouche, R. P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G., et al. (2008). Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452, 45–50.
- Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.-K., Koche, R. P., et al. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553–560.
- Miller, R. L. (1975). Chemotaxis of the spermatozoa of *Ciona intestinalis*. *Nature* 254, 244–245.
- Miller, R. L. (1982). Sperm chemotaxis in ascidians. *Am. Zool.* 827–40.
- 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.

- Minokawa, T., Yagi, K., Makabe, K. W. and Nishida, H. (2001). Binary specification of nerve cord and notochord cell fates in ascidian embryos. *Development* 128, 2007–2017.
- Mita-Miyazawa, I., Ikegami, S. and Satoh, N. (1985). Histospecific acetylcholinesterase development in the presumptive muscle cells isolated from 16-cell-stage ascidian embryos with respect to the number of DNA replications. *J Embryol Exp Morphol* 87, 1–12.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.-H., Sen, S. and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343–348.
- Moehrle, A. and Paro, R. (1994). Spreading the silence: epigenetic transcriptional regulation during *Drosophila* development. *Dev. Genet.* 15, 478–484.
- Mohd-Sarip, A., Venturini, F., Chalkley, G. E. and Verrijzer, C. P. (2002). Pleiohomeotic can link polycomb to DNA and mediate transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7473–7483.
- Mohd-Sarip, A., Cléard, F., Mishra, R. K., Karch, F. and Verrijzer, C. P. (2005). Synergistic recognition of an epigenetic DNA element by Pleiohomeotic and a Polycomb core complex. *Genes Dev.* 19, 1755–1760.
- Mohn, F., Weber, M., Rebhan, M., Roloff, T. C., Richter, J., Stadler, M. B., Bibel, M. and Schübeler, D. (2008). Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol. Cell* 30, 755–766.
- Monteiro, A. S. and Ferrier, D. E. K. (2006). Hox genes are not always Colinear. *Int. J. Biol. Sci.* 2, 95–103.
- Mosammamaparast, N. and Shi, Y. (2010). Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 155–179.
- Müller, J., Gaunt, S. and Lawrence, P. A. (1995). Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development* 121, 2847–2852.
- Müller, J., Hart, C. M., Francis, N. J., Vargas, M. L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E. L., O'Connor, M. B., Kingston, R. E. and Simon, J. A. (2002). Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell* 111, 197–208.
- Munro, E. M. and Odell, G. M. (2002a). Polarized basolateral cell motility underlies invagination and convergent extension of the ascidian notochord. *Development* 129, 13–24.
- Munro, E. M. and Odell, G. (2002b). Morphogenetic pattern formation during ascidian notochord formation is regulative and highly robust. *Development* 129, 1–12.
- Nagy, P. L., Griesenbeck, J., Kornberg, R. D. and Cleary, M. L. (2002). A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 90–94.
- Nakagawa, T., Kajitani, T., Togo, S., Masuko, N., Ohdan, H., Hishikawa, Y., Koji, T., Matsuyama, T., Ikura, T., Muramatsu, M., et al. (2008). Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes Dev.* 22, 37–49.

- Nakatani, Y. and Nishida, H. (1994). Induction of notochord during ascidian embryogenesis. *Dev. Biol.* 166, 289–299.
- Nakatani, Y., Yasuo, H., Satoh, N. and Nishida, H. (1996). Basic fibroblast growth factor induces notochord formation and the expression of As-T, a Brachyury homolog, during ascidian embryogenesis. *Development* 122, 2023–2031.
- Nègre, N., Hennetin, J., Sun, L. V., Lavrov, S., Bellis, M., White, K. P. and Cavalli, G. (2006). Chromosomal distribution of PcG proteins during *Drosophila* development. *PLoS Biol.* 4, e170.
- Nekrasov, M., Klymenko, T., Fraterman, S., Papp, B., Oktaba, K., Köcher, T., Cohen, A., Stunnenberg, H. G., Wilm, M. and Müller, J. (2007). Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *EMBO J.* 26, 4078–4088.
- Nicholson, T. B. and Chen, T. (2009). LSD1 demethylates histone and non-histone proteins. *Epigenetics* 4, 129–132.
- Nicol, D. and Meinertzhagen, I. A. (1988). Development of the central nervous system of the larva of the ascidian, *Ciona intestinalis* L. I. The early lineages of the neural plate. *Dev. Biol.* 130, 721–736.
- Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O’Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E., et al. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412, 561–565.
- Nijman, S. M. B., Luna-Vargas, M. P. A., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M. G., Sixma, T. K. and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773–786.
- Nishida, H. (1987). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage. *Dev. Biol.* 121, 526–541.
- Nishida, H. (1991). Induction of Brain and Sensory Pigment Cells in the Analyzed by Experiments with Isolated Blastomeres. *Development* 112, 389–395.
- Nishida, H. (1997). Cell fate specification by localized cytoplasmic determinants and cell interactions in ascidian embryos. *Int. Rev. Cytol.* 176, 245–306.
- Nishida, H. (2002). Specification of developmental fates in ascidian embryos: molecular approach to maternal determinants and signaling molecules. *Int. Rev. Cytol.* 217, 227–276.
- Nishida, H. (2005). Specification of embryonic axis and mosaic development in ascidians. *Dev. Dyn.* 233, 1177–1193.
- Nishida, H. and Satoh, N. (1983). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. I. Up to the eight-cell stage. *Dev. Biol.* 99, 382–394.
- Nishida, H. and Satoh, N. (1985). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. II. The 16- and 32-cell stages. *Dev. Biol.* 110, 440–454.
- Nishida, H. and Satoh, N. (1989). Determination and regulation in the pigment cell lineage of the ascidian embryo. *Dev. Biol.* 132, 355–367.

- Nishida, H. and Sawada, K. (2001). *macho-1* encodes a localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis. *Nature* 409, 724–729.
- Nishikata, T., Hibino, T. and Nishida, H. (1999). The centrosome-attracting body, microtubule system, and posterior egg cytoplasm are involved in positioning of cleavage planes in the ascidian embryo. *Dev. Biol.* 209, 72–85.
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C. D., Tempst, P. and Reinberg, D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev.* 16, 479–489.
- Ohtsubo, M., Yasunaga, S., Ohno, Y., Tsumura, M., Okada, S., Ishikawa, N., Shirao, K., Kikuchi, A., Nishitani, H., Kobayashi, M., et al. (2008). Polycomb-group complex 1 acts as an E3 ubiquitin ligase for Geminin to sustain hematopoietic stem cell activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10396–10401.
- Ohtsuka, Y., Obinata, T. and Okamura, Y. (2001). Induction of ascidian peripheral neuron by vegetal blastomeres. *Dev. Biol.* 239, 107–117.
- Okano, M., Takebayashi, S., Okumura, K. and Li, E. (1999). Assignment of cytosine-5 DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b to mouse chromosome bands 12A2-A3 and 2H1 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 86, 333–334.
- Oktaba, K., Gutiérrez, L., Gagneur, J., Girardot, C., Sengupta, A. K., Furlong, E. E. M. and Müller, J. (2008). Dynamic regulation by polycomb group protein complexes controls pattern formation and the cell cycle in *Drosophila*. *Dev. Cell* 15, 877–889.
- Orlando, V., Jane, E. P., Chinwalla, V., Harte, P. J. and Paro, R. (1998). Binding of trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J.* 17, 5141–5150.
- Ortolani, G., Patricolo, E. and Mansueto, C. (1979). Trypsin-induced cell surface changes in ascidian embryonic cells: regulation of differentiation of a tissue-specific protein. *Exp. Cell Res.* 122, 137–147.
- Osley, M. A. (2006). Regulation of histone H2A and H2B ubiquitylation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5, 179–189.
- Oudet, P., Gross-Bellard, M. and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4, 281–300.
- Papoulas, O., Beek, S. J., Moseley, S. L., McCallum, C. M., Sarte, M., Shearn, A. and Tamkun, J. W. (1998). The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* 125, 3955–3966.
- Parseghian, M. H. and Hamkalo, B. A. (2001). A compendium of the histone H1 family of somatic subtypes: an elusive cast of characters and their characteristics. *Biochem. Cell Biol.* 79, 289–304.
- Pasini, A., Amiel, A., Rothbacher, U., Roure, A., Lemaire, P. and Darras, S. (2006). Formation of the Ascidian Epidermal Sensory Neurons: Insights into the Origin of the Chordate Peripheral Nervous System. *PLoS Biology* 4, e225.

- Pasini, D., Bracken, A. P., Hansen, J. B., Capillo, M. and Helin, K. (2007). The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3769–3779.
- Pasini, D., Cloos, P. A. C., Walfridsson, J., Olsson, L., Bukowski, J.-P., Johansen, J. V., Bak, M., Tommerup, N., Rappsilber, J. and Helin, K. (2010). JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature* 464, 306–310.
- Passamaneck, Y. J., Hadjantonakis, A.-K. and Di Gregorio, A. (2007). Dynamic and Polarized Muscle Cell Behaviors Accompany Tail Morphogenesis in the Ascidian *Ciona intestinalis*. *PLoS ONE* 2, e714.
- Passarge, E. (1979). Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. *Am. J. Hum. Genet.* 31, 106–115.
- Peng, J. C., Valouev, A., Swigut, T., Zhang, J., Zhao, Y., Sidow, A. and Wysocka, J. (2009). Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell* 139, 1290–1302.
- Peters, A. H. F. M., Kubicek, S., Mechtler, K., O’Sullivan, R. J., Derijck, A. A. H. A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., et al. (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell* 12, 1577–1589.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Smith, S., Tillib, S., Kraevski, V., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C. M. and Mazo, A. (2001). Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* 294, 1331–1334.
- Petruk, S., Smith, S. T., Sedkov, Y. and Mazo, A. (2008). Association of trxB and PcG proteins with the bxd maintenance element depends on transcriptional activity. *Development* 135, 2383–2390.
- Picco, V., Hudson, C. and Yasuo, H. (2007). Ephrin-Eph signalling drives the asymmetric division of notochord/neural precursors in *Ciona* embryos. *Development* 134, 1491–1497.
- Piunti, A. and Pasini, D. (2011). Epigenetic factors in cancer development: polycomb group proteins. *Future Oncol* 7, 57–75.
- Pokholok, D. K., Harbison, C. T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N. M., Lee, T. I., Bell, G. W., Walker, K., Rolfe, P. A., Herbolsheimer, E., et al. (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122, 517–527.
- Posfai, E., Kunzmann, R., Brochard, V., Salvaing, J., Cabuy, E., Roloff, T. C., Liu, Z., Tardat, M., Van Lohuizen, M., Vidal, M., et al. (2012). Polycomb function during oogenesis is required for mouse embryonic development. *Genes Dev.* 26, 920–932.
- Pray-Grant, M. G., Daniel, J. A., Schieltz, D., Yates, J. R., 3rd and Grant, P. A. (2005). Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 433, 434–438.
- Prigent, C. and Dimitrov, S. (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J. Cell. Sci.* 116, 3677–3685.
- Prodon, F., Chenevert, J. and Sardet, C. (2006). Establishment of animal-vegetal polarity during maturation in ascidian oocytes. *Dev. Biol.* 290, 297–311.

- Prodon, F., Yamada, L., Shirae-Kurabayashi, M., Nakamura, Y. and Sasakura, Y. (2007). Postplasmic/PEM RNAs: a class of localized maternal mRNAs with multiple roles in cell polarity and development in ascidian embryos. *Dev. Dyn.* 236, 1698–1715.
- Puschendorf, M., Terranova, R., Boutsma, E., Mao, X., Isono, K., Brykczynska, U., Kolb, C., Otte, A. P., Koseki, H., Orkin, S. H., et al. (2008). PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. *Nature Genetics* 40, 411–420.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O’Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593–599.
- Reisenauer, A., Kahng, L. S., McCollum, S. and Shapiro, L. (1999). Bacterial DNA methylation: a cell cycle regulator? *J. Bacteriol.* 181, 5135–5139.
- REYNOLDS, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208–212.
- Rice, J. C., Briggs, S. D., Ueberheide, B., Barber, C. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Shinkai, Y. and Allis, C. D. (2003). Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol. Cell* 12, 1591–1598.
- Ringrose, L. and Paro, R. (2004). EPIGENETIC REGULATION OF CELLULAR MEMORY BY THE POLYCOMB AND TRITHORAX GROUP PROTEINS. *Annual Review of Genetics* 38, 413–443.
- Ringrose, L., Rehmsmeier, M., Dura, J.-M. and Paro, R. (2003). Genome-wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Cell* 5, 759–771.
- Roegiers, F., McDougall, A. and Sardet, C. (1995). The sperm entry point defines the orientation of the calcium-induced contraction wave that directs the first phase of cytoplasmic reorganization in the ascidian egg. *Development* 121, 3457–3466.
- Roegiers, F., Djediat, C., Dumollard, R., Rouvière, C. and Sardet, C. (1999). Phases of cytoplasmic and cortical reorganizations of the ascidian zygote between fertilization and first division. *Development* 126, 3101–3117.
- Rosati, F. and De Santis, R. (1978). Studies on fertilization in the ascidians: I. Self-sterility and specific recognition between gametes of *Ciona intestinalis*. *Experimental Cell Research* 112, 111–119.
- Rosati, F., De Santis, R. and Monroy, A. (1978). Studies on fertilization in the ascidians. II. Lectin binding to the gametes of *Ciona intestinalis*. *Exp. Cell Res.* 116, 419–427.
- Roure, V. and Bantignies, F. (2009). Polycomb group-mediated gene silencing mechanisms: stability versus flexibility. *Epigenomics* 1, 301–318.
- Saito, T., Shiba, K., Inaba, K., Yamada, L. and Sawada, H. (2012). Self-incompatibility response induced by calcium increase in sperm of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 4158–4162.
- Saj, A., Arziman, Z., Stempfle, D., Van Belle, W., Sauder, U., Horn, T., Dürrenberger, M., Paro, R., Boutros, M. and Merdes, G. (2010). A combined ex vivo and in vivo RNAi screen for notch regulators in *Drosophila* reveals an extensive notch interaction network. *Dev. Cell* 18, 862–876.

- Sakurai, D., Goda, M., Kohmura, Y., Horie, T., Iwamoto, H., Ohtsuki, H. and Tsuda, M. (2004). The role of pigment cells in the brain of ascidian larva. *J. Comp. Neurol.* 475, 70–82.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C. T., Schreiber, S. L., Mellor, J. and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407–411.
- Saramäki, O. R., Tammela, T. L. J., Martikainen, P. M., Vessella, R. L. and Visakorpi, T. (2006). The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 639–645.
- Sardet, C., Speksnijder, J., Inoue, S. and Jaffe, L. (1989). Fertilization and ooplasmic movements in the ascidian egg. *Development* 105, 237–249.
- Sardet, C., Speksnijder, J., Terasaki, M. and Chang, P. (1992). Polarity of the ascidian egg cortex before fertilization. *Development* 115, 221–237.
- Sardet, C., McDougall, A. and Houlston, E. (1994). Cytoplasmic domains in eggs. *Trends Cell Biol.* 4, 166–172.
- Sardet, C., Nishida, H., Prodon, F. and Sawada, K. (2003). Maternal mRNAs of PEM and macho 1, the ascidian muscle determinant, associate and move with a rough endoplasmic reticulum network in the egg cortex. *Development* 130, 5839–5849.
- Sardet, C., Prodon, F., Prulière, G. and Chenevert, J. (2004). Polarisation des oeufs et des embryons principes communs. *Medecine Sciences* 20, 414–23.
- Sardet, C., McDougall, A., Yasuo, H., Chenevert, J., Pruliere, G., Dumollard, R., Hudson, C., Hebras, C., Le Nguyen, N. and Paix, A. (2011). Embryological methods in ascidians: the Villefranche-sur-Mer protocols. *Methods Mol. Biol.* 770, 365–400.
- Sasaki, A. and Satoh, N. (2007). Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on the Gene Expression Profile During Embryogenesis of the Ascidian *Ciona intestinalis*: A Microarray Analysis. *Zoological Science* 24, 648–655.
- Sasakura, Y., Mita, K., Ogura, Y. and Horie, T. (2012a). Ascidians as excellent chordate models for studying the development of the nervous system during embryogenesis and metamorphosis. *Dev. Growth Differ.* 54, 420–437.
- Sasakura, Y., Kanda, M., Ikeda, T., Horie, T., Kawai, N., Ogura, Y., Yoshida, R., Hozumi, A., Satoh, N. and Fujiwara, S. (2012b). Retinoic acid-driven Hox1 is required in the epidermis for forming the otic/atrial placodes during ascidian metamorphosis. *Development* 139, 2156–2160.
- Satijn, D. P., Hamer, K. M., Den Blaauwen, J. and Otte, A. P. (2001). The polycomb group protein EED interacts with YY1, and both proteins induce neural tissue in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1360–1369.
- Sato, Y. and Morisawa, M. (1999). Loss of test cells leads to the formation of new tunic surface cells and abnormal metamorphosis in larvae of *Ciona intestinalis* (Chordata, ascidiacea). *Dev. Genes Evol.* 209, 592–600.

- Satoh, N. (1979). On the “clock” mechanism determining the time of tissue-specific enzyme development during ascidian embryogenesis. I. Acetylcholinesterase development in cleavage-arrested embryos. *J Embryol Exp Morphol* 54, 131–139.
- Satoh, N. (1994). *Developmental biology of ascidians*. Cambridge.
- Satoh, N. (2003). The ascidian tadpole larva: comparative molecular development and genomics. *Nat. Rev. Genet.* 4, 285–295.
- Satoh, N., Tagawa, K. and Takahashi, H. (2012). How was the notochord born? *Evol. Dev.* 14, 56–75.
- Saurin, A. J., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Kingston, R. E. (2001). A Drosophila Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature* 412, 655–660.
- Sauvageau, M. and Sauvageau, G. (2010). Polycomb Group Proteins: Multi-Faceted Regulators of Somatic Stem Cells and Cancer. *Cell Stem Cell* 7, 299–313.
- Sawada, T. (1988). The mechanism of ooplasmic segregation in the ascidian egg. *Zool. Sci.* 5, 667–75.
- Sawada, T. and Osanai, K. (1985). Distribution of actin filaments in fertilized egg of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 111, 260–265.
- Sawada, T. and Schatten, G. (1988). Microtubules in ascidian eggs during meiosis, fertilization, and mitosis. *Cell Motil. Cytoskeleton* 9, 219–230.
- Scheuermann, J. C., De Ayala Alonso, A. G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R. K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T. W. and Müller, J. (2010). Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* 465, 243–247.
- Schlissel, M. S. (2000). Perspectives: transcription. A tail of histone acetylation and DNA recombination. *Science* 287, 438–440.
- Schlissel, M. S. (2003). Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nature Reviews Immunology* 3, 890–899.
- Schneider, T. D., Arteaga-Salas, J. M., Mentele, E., David, R., Nicetto, D., Imhof, A. and Rupp, R. A. W. (2011). Stage-specific histone modification profiles reveal global transitions in the *Xenopus* embryonic epigenome. *PLoS ONE* 6, e22548.
- Schones, D. E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T.-Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G. and Zhao, K. (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* 132, 887–898.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D. and Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 18, 1251–1262.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. and Cavalli, G. (2007). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell* 128, 735–745.
- Schuettengruber, B., Ganapathi, M., Leblanc, B., Portoso, M., Jaschek, R., Tolhuis, B., Van Lohuizen, M., Tanay, A. and Cavalli, G. (2009). Functional anatomy of polycomb and trithorax chromatin landscapes in *Drosophila* embryos. *PLoS Biol.* 7, e13.

- Schuettengruber, B., Martinez, A.-M., Iovino, N. and Cavalli, G. (2011). Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 799–814.
- Schwartz, Y. B. and Pirrotta, V. (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat. Rev. Genet.* 8, 9–22.
- Schwartz, Y. B., Kahn, T. G., Nix, D. A., Li, X.-Y., Bourgon, R., Biggin, M. and Pirrotta, V. (2006). Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 38, 700–705.
- Seenundun, S., Rampalli, S., Liu, Q.-C., Aziz, A., Palii, C., Hong, S., Blais, A., Brand, M., Ge, K. and Dilworth, F. J. (2010). UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis. *EMBO J.* 29, 1401–1411.
- Seo, H. C., Edvardsen, R. B., Maeland, A. D., Bjordal, M., Jensen, M. F., Hansen, A., Flaas, M., Weissenbach, J., Lehrach, H., Wincker, P., et al. (2004). Hox cluster disintegration with persistent anteroposterior order of expression in *Oikopleura dioica*. *Nature* 431, 67–71.
- Sewalt, R. G., Van der Vlag, J., Gunster, M. J., Hamer, K. M., Den Blaauwen, J. L., Satijn, D. P., Hendrix, T., Van Driel, R. and Otte, A. P. (1998). Characterization of interactions between the mammalian polycomb-group proteins Enx1/EZH2 and EED suggests the existence of different mammalian polycomb-group protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3586–3595.
- Seward, D. J., Cubberley, G., Kim, S., Schonewald, M., Zhang, L., Tripet, B. and Bentley, D. L. (2007). Demethylation of trimethylated histone H3 Lys4 in vivo by JARID1/JmJc proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 240–242.
- Sharif, J., Endoh, M. and Koseki, H. (2011). Epigenetic memory meets G2/M: to remember or to forget? *Dev. Cell* 20, 5–6.
- Shen, X., Yu, L., Weir, J. W. and Gorovsky, M. A. (1995). Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vivo. *Cell* 82, 47–56.
- Sherrard, K., Robin, F., Lemaire, P. and Munro, E. (2010). Sequential activation of apical and basolateral contractility drives ascidian endoderm invagination. *Curr. Biol.* 20, 1499–1510.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A. and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941–953.
- Shirai-Kurabayashi, M., Matsuda, K. and Nakamura, A. (2011). Ci-Pem-1 localizes to the nucleus and represses somatic gene transcription in the germline of *Ciona intestinalis* embryos. *Development* 138, 2871–2881.
- Simon, J., Chiang, A. and Bender, W. (1992). Ten different Polycomb group genes are required for spatial control of the *abdA* and *AbdB* homeotic products. *Development* 114, 493–505.
- Sing, A., Pannell, D., Karaiskakis, A., Sturgeon, K., Djabali, M., Ellis, J., Lipshitz, H. D. and Cordes, S. P. (2009). A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. *Cell* 138, 885–897.
- Skirkanich, J., Luxardi, G., Yang, J., Kodjabachian, L. and Klein, P. S. (2011). An essential role for transcription before the MBT in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 357, 478–491.

- Slifer, E. H. (1942). A mutant stock of *Drosophila* with extra sex combs. *J. Exp. Zool* 31–40.
- Smith, S. T., Petruk, S., Sedkov, Y., Cho, E., Tillib, S., Canaani, E. and Mazo, A. (2004). Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. *Nat. Cell Biol.* 6, 162–167.
- Smith, E. R., Lee, M. G., Winter, B., Droz, N. M., Eissenberg, J. C., Shiekhattar, R. and Shilatifard, A. (2008). *Drosophila* UTX is a histone H3 Lys27 demethylase that colocalizes with the elongating form of RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1041–1046.
- Spagnuolo, A., Ristoratore, F., Di Gregorio, A., Aniello, F., Branno, M. and Di Lauro, R. (2003). Unusual number and genomic organization of Hox genes in the tunicate *Ciona intestinalis*. *Gene* 309, 71–79.
- Sparmann, A. and Van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 846–856.
- Speksnijder, J. E., Corson, D. W., Sardet, C. and Jaffe, L. F. (1989). Free calcium pulses following fertilization in the ascidian egg. *Dev. Biol.* 135, 182–190.
- Stock, J. K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H., Brockdorff, N., Fisher, A. G. and Pombo, A. (2007). Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 1428–1435.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45.
- Surface, L. E., Thornton, S. R. and Boyer, L. A. (2010). Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment. *Cell Stem Cell* 7, 288–298.
- Tachibana, M., Ueda, J., Fukuda, M., Takeda, N., Ohta, T., Iwanari, H., Sakihama, T., Kodama, T., Hamakubo, T. and Shinkai, Y. (2005). Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev.* 19, 815–826.
- Tadros, W. and Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 136, 3033–3042.
- Tadros, W., Westwood, J. T. and Lipshitz, H. D. (2007). The mother-to-child transition. *Dev. Cell* 12, 847–849.
- Takahashi, H., Hotta, K., Erives, A., Di Gregorio, A., Zeller, R. W., Levine, M. and Satoh, N. (1999). Brachyury downstream notochord differentiation in the ascidian embryo. *Genes Dev.* 13, 1519–1523.
- Takamura, K. (1998). Nervous network in larvae of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Genes Evol.* 208, 1–8.
- Tanaka, Y., Katagiri, Z.-I., Kawahashi, K., Kioussis, D. and Kitajima, S. (2007). Trithorax-group protein ASH1 methylates histone H3 lysine 36. *Gene* 397, 161–168.
- Taunton, J., Hassig, C. A. and Schreiber, S. L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272, 408–411.

- Tavares, L., Dimitrova, E., Oxley, D., Webster, J., Poot, R., Demmers, J., Bezstarosti, K., Taylor, S., Ura, H., Koide, H., et al. (2012). RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell* 148, 664–678.
- Thoma, F., Koller, T. and Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* 83, 403–427.
- Tie, F., Banerjee, R., Stratton, C. A., Prasad-Sinha, J., Stepanik, V., Zlobin, A., Diaz, M. O., Scacheri, P. C. and Harte, P. J. (2009). CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing. *Development* 136, 3131–3141.
- Tolhuis, B., De Wit, E., Muijrrers, I., Teunissen, H., Talhout, W., Van Steensel, B. and Van Lohuizen, M. (2006). Genome-wide profiling of PRC1 and PRC2 Polycomb chromatin binding in Drosophila melanogaster. *Nat. Genet.* 38, 694–699.
- Trotter, K. W. and Archer, T. K. (2008). The BRG1 transcriptional coregulator. *Nucl Recept Signal* 6, e004.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P. and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811–816.
- Upadhyay, A. K. and Cheng, X. (2011). Dynamics of histone lysine methylation: structures of methyl writers and erasers. *Prog Drug Res* 67, 107–124.
- Valk-Lingbeek, M. E., Bruggeman, S. W. M. and Van Lohuizen, M. (2004). Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 118, 409–418.
- Van Hoof, D., Muñoz, J., Braam, S. R., Pinkse, M. W. H., Linding, R., Heck, A. J. R., Mummery, C. L. and Krijgsveld, J. (2009). Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 214–226.
- Van Lohuizen, M., Frasch, M., Wientjens, E. and Berns, A. (1991). Sequence similarity between the mammalian bmi-1 proto-oncogene and the Drosophila regulatory genes Psc and Su(z)2. *Nature* 353, 353–355.
- Vandamme, J., Völkel, P., Rosnoblet, C., Le Faou, P. and Angrand, P.-O. (2011). Interaction proteomics analysis of polycomb proteins defines distinct PRC1 complexes in mammalian cells. *Mol. Cell Proteomics* 10, M110.002642.
- Vastenhouw, N. L., Zhang, Y., Woods, I. G., Imam, F., Regev, A., Liu, X. S., Rinn, J. and Schier, A. F. (2010). Chromatin signature of embryonic pluripotency is established during genome activation. *Nature* 464, 922–926.
- Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E. and Workman, J. L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell Biol.* 20, 1899–1910.
- Vines, G. (1998). Hidden inheritance. *new Scientist* 26–31.
- Wada, S. and Saiga, H. (1999). Vegetal cell fate specification and anterior neuroectoderm formation by Hroth, the ascidian homologue of orthodenticle/otx. *Mech. Dev.* 82, 67–77.

- Wada, S., Katsuyama, Y., Yasugi, S. and Saiga, H. (1995). Spatially and temporally regulated expression of the LIM class homeobox gene *HrLim* suggests multiple distinct functions in development of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Mech. Dev.* 51, 115–126.
- Wada, S., Katsuyama, Y. and Saiga, H. (1999). Anteroposterior patterning of the epidermis by inductive influences from the vegetal hemisphere cells in the ascidian embryo. *Development* 126, 4955–4963.
- Walker, E., Chang, W. Y., Hunkapiller, J., Cagney, G., Garcha, K., Torchia, J., Krogan, N. J., Reiter, J. F. and Stanford, W. L. (2010). Polycomb-like 2 associates with PRC2 and regulates transcriptional networks during mouse embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 6, 153–166.
- Wang, L., Brown, J. L., Cao, R., Zhang, Y., Kassis, J. A. and Jones, R. S. (2004a). Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol. Cell* 14, 637–646.
- Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y.-H., Perlin, J. R., Leonelli, L., Sonbuchner, L. S., McDonald, C. H., Cook, R. G., Dou, Y., et al. (2004b). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination. *Science* 306, 279–283.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S. and Zhang, Y. (2004c). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873–878.
- Wang, Y., Jorda, M., Jones, P. L., Maleszka, R., Ling, X., Robertson, H. M., Mizzen, C. A., Peinado, M. A. and Robinson, G. E. (2006). Functional CpG methylation system in a social insect. *Science* 314, 645–647.
- Waterborg, J. H. (2002). Dynamics of histone acetylation in vivo. A function for acetylation turnover? *Biochem. Cell Biol.* 80, 363–378.
- Whitcomb, S. J., Basu, A., Allis, C. D. and Bernstein, E. (2007). Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. *Trends Genet.* 23, 494–502.
- Whitehouse, I., Flaus, A., Cairns, B. R., White, M. F., Workman, J. L. and Owen-Hughes, T. (1999). Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* 400, 784–787.
- Whittaker, J. R. (1973). Tyrosinase in the presumptive pigment cells of ascidian embryos: tyrosine accessibility may initiate melanin synthesis. *Dev. Biol.* 30, 441–454.
- Whittaker, J. R. (1977). Segregation during cleavage of a factor determining endodermal alkaline phosphatase development in ascidian embryos. *J. Exp. Zool.* 202, 139–153.
- Wilding, M., Marino, M., Monfrecola, V. and Dale, B. (2000). Meiosis-associated calcium waves in ascidian oocytes are correlated with the position of the male centrosome. *Zygote* 8, 285–293.
- Wolffe, A. P. (1996). Histone deacetylase: a regulator of transcription. *Science* 272, 371–372.
- Wolffe, A. P. and Hayes, J. J. (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.* 27, 711–720.

- Wood, C. M., Nicholson, J. M., Lambert, S. J., Chantalat, L., Reynolds, C. D. and Baldwin, J. P. (2005). High-resolution structure of the native histone octamer. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61, 541–545.
- Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T. A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A. L., Roeder, R. G., Brivanlou, A. H. and Allis, C. D. (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121, 859–872.
- Xu, F. and Li, X. (2012). The role of histone methyltransferase EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Expert Rev Hematol* 5, 177–185.
- Yagi, K. and Makabe, K. W. (2001). Isolation of an early neural marker gene abundantly expressed in the nervous system of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev. Genes Evol.* 211, 49–53.
- Yagi, K., Satoh, N. and Satou, Y. (2004). Identification of downstream genes of the ascidian muscle determinant gene *Ci-macho1*. *Dev. Biol.* 274, 478–489.
- Yagi, K., Takatori, N., Satou, Y. and Satoh, N. (2005). *Ci-Tbx6b* and *Ci-Tbx6c* are key mediators of the maternal effect gene *Ci-macho1* in muscle cell differentiation in *Ciona intestinalis* embryos. *Dev. Biol.* 282, 535–549.
- Yamada, S., Ueno, N., Satoh, N. and Takahashi, H. (2011). *Ciona intestinalis* *Noto4* contains a phosphotyrosine interaction domain and is involved in the midline intercalation of notochord cells. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 11–18.
- Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. and Zhang, Y. (2006). JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* 125, 483–495.
- Yang, P. K. and Kuroda, M. I. (2007). Noncoding RNAs and intranuclear positioning in monoallelic gene expression. *Cell* 128, 777–786.
- Yang, X., Zaurin, R., Beato, M. and Peterson, C. L. (2007). Swi3p controls SWI/SNF assembly and ATP-dependent H2A-H2B displacement. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 540–547.
- Yasuo, H. and Hudson, C. (2007). FGF8/17/18 functions together with FGF9/16/20 during formation of the notochord in *Ciona* embryos. *Dev. Biol.* 302, 92–103.
- Yoshida, M., Inaba, K. and Morisawa, M. (1993). Sperm chemotaxis during the process of fertilization in the ascidians *Ciona savignyi* and *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* 157, 497–506.
- Yoshida, S., Marikawa, Y. and Satoh, N. (1996). Posterior end mark, a novel maternal gene encoding a localized factor in the ascidian embryo. *Development* 122, 2005–2012.
- Yoshida, M., Sensui, N., Inoue, T., Morisawa, M. and Mikoshiba, K. (1998). Role of two series of Ca²⁺ oscillations in activation of ascidian eggs. *Dev. Biol.* 203, 122–133.
- Yoshida, M., Horiuchi, Y. and Morisawa, M. (2001). Calcium transient Signal Ooplasmic Segregation through the small GTPase rho in Ascidian eggs. In *The Biology of Ascidians*, pp. 80–85. Sawada H, Yokosawa H, Lambert CC.
- Yoshida, M., Murata, M., Inaba, K. and Morisawa, M. (2002). A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 14831–14836.

- Yu, J., Li, Y., Ishizuka, T., Guenther, M. G. and Lazar, M. A. (2003). A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *EMBO J.* 22, 3403–3410.
- Yuan, W., Xu, M., Huang, C., Liu, N., Chen, S. and Zhu, B. (2011). H3K36 methylation antagonizes PRC2-mediated H3K27 methylation. *J. Biol. Chem.* 286, 7983–7989.
- Zheng, S., Wyrick, J. J. and Reese, J. C. (2010). Novel trans-tail regulation of H2B ubiquitylation and H3K4 methylation by the N terminus of histone H2A. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3635–3645.
- Zhu, L. and Inaba, K. (2011). Lipid rafts function in Ca²⁺ signaling responsible for activation of sperm motility and chemotaxis in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 920–929.