

UNIVERSITÉ DE LILLE 1 NORD DE FRANCE

LABORATOIRE INSERM U908

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

**Etude du rôle des protéines Polycomb
Pcgf1 et Ezh2 chez le poisson zèbre
*Danio rerio.***

Présentée et soutenue publiquement par

Barbara Dupret

Le 22 Novembre 2017

Jury

Président : Pr. Xuefen Le Bourhis
Rapporteurs : Dr. Jean-Stéphane Joly
Dr. Raphaël Margueron
Examineurs : Pr. Johanna Chluba
Dr. Karima Kissa
Dr. Dominique Leprince
Directeur : Pr. Pierre-Olivier Angrand

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier la région Haut de France et l'université de Lille 1 pour m'avoir financée durant ces 3 ans de thèse.

Je remercie les membres de mon jury qui me font l'honneur d'évaluer mes travaux de thèses : Madame le Professeur **Johanna Chluba**, Monsieur le Docteur **Jean-Stéphane Joly**, Madame le Docteur **Karima Kissa**, Monsieur le Docteur **Dominique Leprince** et Monsieur le Docteur **Raphäel Margueron**. Je vous remercie pour avoir pris le temps de relire mon manuscrit et avoir accepté de parcourir ces kilomètres pour venir assister à ma soutenance. Un grand merci à **Dominique Leprince** et **Karima Kissa** d'être venus chaque année dans notre laboratoire afin de discuter de l'évolution de mes projets.

Par la suite, je souhaite remercier la directrice de laboratoire, **Xuefen Le Bourhis**, pour m'avoir fait confiance des années plus tôt pour mes premiers stages puis la thèse. Je vous remercie pour tous vos conseils au cours de ces années, nos discussions (scientifiques ou non) très enrichissantes. J'ai beaucoup appris dans votre laboratoire et cette expérience restera une des plus profitables.

Je souhaite remercier mon directeur de thèse, **Pierre-Olivier Angrand**, pour m'avoir encadrée pendant le Master 2 et la thèse. Merci de vous être tant investi pour la réussite de ce master qui m'a permis d'obtenir ma bourse de thèse. Merci pour votre encadrement en thèse qui m'a permis de m'épanouir dans mon projet. J'ai beaucoup appris durant ces 4 années à vos côtés, tant au niveau scientifique que personnel. Merci de m'avoir fait confiance sur nos projets et pour l'entretien des poissons.

Merci à **Pamela Völkel** pour m'avoir appris les bases des expériences du laboratoire et pour ses conseils précieux afin d'assurer la réussite des manipulations.

Merci du temps que tu as investi pour m'apprendre l'organisation des manipulations et la mise en forme des résultats.

Je remercie tous les statutaires de l'équipe. Merci **Eric Adriaenssens** pour avoir toujours su me faire rire et me raconter des petites anecdotes, **Valérie Chopin** pour tes conseils d'organisation pour l'avenir, **Chann Lagadec** pour ta joie de vivre et ta positive-attitude, **Samuel Meignan** pour ton enthousiasme et **Robert-Alain Toillon** pour avoir toujours été présent pour les problèmes techniques de microscopie mais aussi la maintenance du laboratoire. Merci pour votre bonne humeur, tous les agréables moments passés au laboratoire, vos suggestions expérimentales lors des réunions hebdomadaires et vos conseils.

Merci à **Valérie Cendre** pour m'avoir aidée dans la gestion des problèmes administratifs et d'avoir ri plus fort que moi, à **Véronique Hourdot** pour ton rire et ton naturel, à **Isabelle Lefebvre** pour m'avoir aidée dans la gestion des stocks plastiques et m'avoir raconté l'histoire du laboratoire et à **Nathalie Ziental** pour m'avoir appris les bases des expériences d'histologie et pour ta bonne humeur. Merci pour nos discussions de couloir qui m'ont bien fait rire et vont me manquer.

Un grand merci à l'équipe des jeunes (**Justine Bailleul, Nadège Bidan, Jordan Colette, Jérémy Duval, Pauline Follet, Clément Lecerf, Romain Lévêque** et **Bernadette Rogez**) pour tous les bon moments passés ensemble au laboratoire et à l'extérieur du laboratoire. Merci pour votre soutien et nos fous rires. Nadège nos discussions dans le métro vont me manquer. Je pourrai, encore un moment, j'espère traverser le couloir qui sépare nos habitations et rire dans ton appartement ! Justine je te souhaite bon courage pour les 6 derniers mois ! J'ai adoré passer ces 4 années en ta compagnie ! Romain merci pour tous ces bidons d'eau portés, pour nous avoir fait sortir du labo (même si tu te moquais de mes supers jus et chocolats). Jordan et Clément votre petite équipe m'a bien fait rire. Jérémy merci pour ton calme à toutes épreuves. Pauline merci pour ton soutien, toutes nos discussions sur la vie vont me

manquer. Bernadette merci pour ta folle-attitude, je te souhaite bon courage pour cette dernière année. Et pour finir mes recommandations d'ancienne : n'oubliez pas d'entretenir de bonnes relations avec les jeunes arrivant afin de garder cette cohésion de groupe. Un grand merci à vous tous et je vous souhaite une bonne continuation.

Merci également à tous ceux qui sont passés et ont marqué ma thèse **Thomas Bourhis, Anais Chapart, Jocelyn Coquet, Enora Heyman** et **Kamar Ghaibour**, également un grand merci à **Constance Vennin**. Merci pour tes conseils pour gérer la rédaction. Je te souhaite de vivre d'agréables moments en Allemagne. Merci aux anciens thésards **Matthieu Guilbert** et **Léo Aubert**. Je vous remercie tout les deux pour m'avoir formée au métier de doctorant et m'avoir enseigné les règles fondamentales de la vie au laboratoire. Merci pour votre soutien à mes débuts et pour les moments passés ensemble.

Finalement je voudrais remercier toutes les personnes de mon entourage qui ont fortement participé à la réussite de ma thèse. Merci à ma **famille** pour son soutien, maman merci pour la relecture de toutes mes fautes d'orthographe, pour tes conseils et ton soutien durant toutes ces années d'études ! Un immense merci à **Jérémy** pour m'avoir soutenue dans tous les moments difficiles, d'avoir pris soin de moi et merci d'avoir été compréhensif quand un temps de ma vie s'est résumé à l'écriture ! Merci à la Zumba-Team (**Alexandra, Bertrand, Alexis, Bob, JP, David, Aurélie A., Aurélie, Bodo, Céline, Mélanie, Sarah** et **Souria**) pour tous ces excellents moments tout en transpiration, toutes les discussions qui m'ont fait sortir de l'univers de la recherche et m'ont changé les idées !

RESUME

Les complexes PRC1 et PRC2 contrôlent l'expression génique via l'organisation de la structure de la chromatine. Ce contrôle se fait par l'ajout de la marque H2AK119ub1 par le PRC1 et l'ajout de la marque H3K27me3 par le PRC2. Cette étude s'attache à étudier le rôle de la protéine Pcgf1 (membre du complexe PRC1) et de la protéine Ezh2 (membre du complexe PRC2) lors du développement du poisson zèbre.

Le complexe PRC1 est formé par différentes protéines dont les Pcgf. Il existe de nombreux homologues Pcgf qui ont des fonctions distinctes. L'analyse révèle que certaines protéines Pcgf ont une expression différente lors de la régénération de la nageoire caudale et lors du développement. Cette étude s'intéresse au rôle de la protéine Pcgf1 lors du développement du poisson zèbre. Le gène *pcgf1* a été inactivé à l'aide des TALEN. Les individus *pcgf1*^{-/-} sont viables et fertiles. Cependant, leur développement précoce est retardé et les adultes montrent des signes de vieillissement accéléré. Ce mutant est le premier modèle de vertébré qui met en évidence le rôle de Pcgf1 dans la prolifération cellulaire lors du développement et son association au vieillissement.

La protéine Ezh2 est impliquée dans le devenir cellulaire et la différenciation. L'inactivation du gène *ezh2* grâce aux TALEN a révélé la fonction indispensable d'Ezh2 lors du développement. En effet, les embryons se développent normalement puis les larves meurent à 12 jours post-fécondation. De façon intéressante, les embryons de poisson zèbre peuvent gastruler en l'absence d'Ezh2, contrairement au modèle murin. La présence des ARN maternels chez le poisson zèbre pourrait expliquer cette différence. Les organes sont correctement mis en place à 5 jours post-fécondation. Les larves présentent un défaut de maintien de la paroi du bulbe intestinal. La protéine Ezh2 est importante pour le maintien du pancréas exocrine. L'absence d'Ezh2 cause une augmentation importante du nombre de cellules apoptotiques. Ezh2 est essentiel lors de la régénération de la nageoire caudale.

Mots clefs : Pcgf1, Ezh2, Développement, Répression Polycomb, TALEN, Poisson-zèbre

ABSTRACT

PCR1 and PRC2 are complexes that control gene expression via chromatin structure reorganization. This expression regulation is maintained by adding epigenetics marks H2AK119ub1 by the PRC1 and adding of H3K27me3 by the PRC2. The study devotes to study the role of the protein Pcgf1 (part of the PRC1 complex) and of the Ezh2 protein (part of the PRC2 complex) during zebrafish development. The PRC1 complex is formed by different proteins including Pcgf proteins. There are several Pcgf homologs that have different functions. The study reveals that some Pcgf proteins have a different expression during caudal fin regeneration and development. We are interested in Pcgf1 protein during zebrafish development. The *pcgf1* gene was inactivated by using TALEN. The fish *pcgf1*^{-/-} are viable and fertile. However, the early development is delayed and adults show signs of accelerated aging. This mutant is the first vertebrate model showing the role of Pcgf1 in cells proliferation during development and aging.

Ezh2 protein is involved in cell-fate decisions and differentiation. Inactivation of *ezh2* gene by TALEN reveals the essential role of Ezh2 during development. Indeed, at the beginning embryos develop normally then larvae die at 12 days post-fertilization. Interestingly, zebrafish embryo can gastrulate without Ezh2. This contradicts with observations in mouse model. The organs are properly formed at 5 days post-fertilization. Larvae show defects in the intestinal bulb wall. Ezh2 is important for exocrine pancreas maintenance. The absence of Ezh2 causes an increase in apoptic cells. Ezh2 is essential during caudal fin regeneration.

Keywords : Pcgf1, Ezh2, Development, Polycomb repression, TALEN, Zebrafish

ABBREVIATIONS

A

A : Alanine

aa : acide aminé

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ARNt : ARN de transfert

ARNg : ARN guide

ATHL : AT Hook Like

B

BCIP : 5-Bromo 4-Chloro 3-Indolyl Phosphate

BET : Bromure d'Ethidium

bp : paire de base

C

CBX : Chromobox

CDK1 : Cyclin Dependant Kinase 1

Crispr-Cas9 : Clustred regulary interspaced short palindromic repeat- CRISPR associated protein)

crRNA : crispr RNA

CSC : Cellules Souches Cancéreuses

D

DIG : Digoxygénine

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DZNep : 3-déazaneplanocine A

E

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique
EED : Embryonic Ectoderm Development
ER : Estrogenes Receptor
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases
ES : Embryonnaires Souches
Esc : Extra Sex Comb
E(z) : Enhancer of Zeste
EZH1 : Enhancer of Zeste Homolog 1
EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2

G

Gal4/UAS : Gal4-Upstream Activation Sequence

H

H2A : Histone 2A
H2AK118ub1 : Histone2A, lysine 118 mono-ubiquitinylée
H2AK119ub1 : Histone 2A, lysine 119 mono-ubiquitinylée
H2B : Histone 2B
H3 : Histone 3
H3S10P : Histone 3, Sérine 10 phosphorylée
H3.3 : Histone 3 variant 3
H3K27me3 : Histone 3, lysine 27 triméthylée
H4 : Histone 4
HDAC : Histone Deacétylase
Hp1 β : Heterochromatine protein 1
hpf : heures post-fécondation
HR : Réparation par Homologie

I

ifabp : intestinal fatty acid-binding protein

iPS : Souches Pluripotentes induites

J

JNK : c-Jun N-terminal Kinases

jpa : jour post-amputation

jpf : jour post-fécondation

K

K : Lysine

KO : Knock Out

L

l-fabp : liver fatty acid-binding protein

lncRNA : long ARN non codant

M

miR : micro-ARN

N

NaB : butyrate de sodium

NBT : Nitro Blue Tetrazolium

NHEJ : Non Homologous End Joining

NLS : Nuclear Localization Sequence

NMD : Non Mediated Decay

O

OGT : **O** GlcNac **T**ransferase

P

p21^{waf1/cip1} : p21 (**W**ild type p53 **A**ctivated **F**ragment**1**/ **C**dk-**I**nteracting **P**rotein
1)

PAF : **P**CNA-**A**ssociated **F**actor

PAM : **P**rotospacer **A**djacent **M**otif

PBS : **P**hosphate **B**uffer **S**aline

PBST : **P**hosphate **B**uffer **S**aline-**T**ween

Pc : **P**olycomb

PCAF : **P**300/**C**BP-**A**ssociated **F**actor

PCGF : **P**olycomb **G**roup ring **F**ingers

Pcl : **P**olycomb**L**ike

PCR : **P**olymerase **C**hain **R**eaction

PFA : **P**araformaldéhyde

Pho : **P**leiohomeotic

PI3K : **P**hospho**I**nositide **3** **K**inase

PRC1 : **P**olycomb **R**epressive **C**omplex **1**

PRC2 : **P**olycomb **R**epressive **C**omplex **2**

PRE : **P**olycomb **R**esponsive **E**lement

PSC : **P**osterior **S**ex **C**omb

R

RFLP : **R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism

RING : **R**eally **I**nteresting **N**ew **G**ene

RVD : **R**épétition **V**ariable de **D**irésidus

S

SA- β galactosidase : Senescence Associated β galactosidase

SAM : S-AdenosylMéthionine

S : Sérine

Sce : Sex Comb Extra

Scm : Sex comb on middle leg

SSC : Saline de Citrate de Sodium

SSPE : Sodium Chloride-Sodium Phosphate-EDTA

SVF : Serum de Veau Foetal

T

T : Tyrosine

TALE : Transcription Activator Like-Effector

TALEN : Transcription Activator Like-Effector Nuclease

TAE : Tris, Acétate, EDTA

TBE : Tris, Borate, EDTA

TBS : Tris-Buffered Saline

TBST : Tris-Buffered Saline-Tween

TH : Tampon d'Hybridation

Thr : Thréonine

Tg : Transgénique

TGF : Transforming Growth Factor

TNF : Tumor Necrosis Factor

Trp : Tryptophane

TSA : Trichostatin A

TU : Tuebingen

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

Y

Y : Tyrosine

Z

ZGA : Zygotic Gene Activation

Table des matières

I	Introduction	25
1	Le complexe PRC2	29
1.1	Composition du complexe PRC2	29
1.2	EZH2 contrôle l'expression génique	32
1.3	Mécanismes de recrutement d'EZH2 à la chromatine	36
1.3.1	Par les longs ARN non codants	37
1.3.2	Par les protéines	40
1.4	EZH2 et cancer	41
1.4.1	EZH2 dans les cancers hématologiques	41
1.4.2	EZH2 dans les tumeurs solides	41
1.4.3	Cibler EZH2 dans les cancers	42
1.5	Les modifications post-traductionnelles d'EZH2	46
1.5.1	Phosphorylation	46
1.5.2	Acétylation	47
1.5.3	Ubiquitination	47
1.5.4	O-GlcNacylation	48
2	Le complexe PRC1	51
2.1	Composition du complexe PRC1	51
2.1.1	Activité et formation des complexes PRC1	53
2.1.2	Régulation de l'expression	55
2.1.3	Le complexe PRC1 canonique	56
2.1.4	Complexes PRC1 non canoniques	57

2.2	Autres recrutement à la chromatine du complexe PRC1	59
2.2.1	Recrutement via les ARN non codants	59
2.2.2	Par les protéines.	61
2.3	PRC1, devenir cellulaire et développement	61
3	TALEN	69
3.1	Réparation des cassures d'ADN double brin	69
3.2	Les ZFN	71
3.3	Le TALEN	73
3.3.1	Description du TALEN.	73
3.3.2	Assemblage des TALEN.	76
3.3.3	Edition des génomes.	77
3.4	Application des TALEN	78
3.5	Les CRISPR	79
4	Le poisson zèbre	83
4.1	Origine du poisson zèbre, environnement	83
4.2	Elevage	85
4.3	Reproduction	86
4.4	Le développement du poisson zèbre	86
4.4.1	L'oeil	87
4.4.2	Le pancréas	90
4.4.3	L'intestin	91
4.4.4	Le Foie	96
4.5	Régénération de la nageoire caudale	98
4.6	La répression Polycomb chez le poisson zèbre	102
4.7	Poisson zèbre et cancer	104
II	Matériels et Méthodes	109
1	Contexte scientifique	111

2	Objectifs de la thèse	113
3	Matériels et méthodes	115
3.1	TALEN	115
3.2	Génotypage	116
3.3	Quantification de la courbure de la colonne vertébrale	118
3.4	Amputation de la nageoire caudale.	118
3.5	Hybridation <i>in situ</i>	119
3.6	Extraction des ARN	123
3.7	Western Blot	124
3.8	Coloration par l'Oil-red-O	126
3.9	Bleu alcian-Rouge alizarine	126
3.10	Acridine orange	127
3.11	Coloration, SA- β Galactosidase	127
3.12	Immunomarquage sur embryons entiers	128
3.13	Inclusion des larves en paraffine	130
3.14	Coloration sur lames	130
3.15	Drogues	134
3.16	Imagerie	134
3.17	Publication : Identifier le phénotype d'une lignée homozygote mutante	134
3.18	Valorisation des résultats	141
III	Résultats	143
1	Pcgf1	145
2	Ezh2	159
IV	Discussion	183
1	Pcgf1	187
1.1	Pcgf1, contrôle de la prolifération cellulaire	187

1.2	Pcgf1, cellules souches et vieillissement	189
2	Ezh2	193
2.1	Expression au cours du développement.	193
2.2	Expression dans les zones de prolifération.	195
2.3	Ezh2, rôle dans l'adipogénèse	196
2.4	Ezh2, rôle dans le développement intestinal	197
2.4.1	Maintien des tissus.	203
2.5	La régénération	205
2.6	Rôle des ARN maternels.	206
2.7	Compensation par Ezh1	208
2.8	Perspectives à long terme.	208
2.9	Conclusion générale	211
V	Annexes	271

Table des figures

1	Répression génique par les protéines Polycomb du PRC2 chez la drosophile.	29
2	L'isoforme Ezh1 β dans les cellules musculaires squelettiques suite à un stress atrophique.	30
3	Organisation des domaines protéiques d'EZH2, EED et SUZ12 composant le complexe PRC2 chez le champignon filamenteux <i>Chaetomium thermophilum</i>	33
4	Modulation de l'activité du complexe PRC2 en fonction de la présence de PHF1.	34
5	Boucle de rétro-contrôle positif d'Ezh2.	36
6	Recrutement du complexe PRC2 à la chromatine via les longs ARN non codants.	39
7	L'inhibition d'EZH2.	45
8	Modifications post-traductionnelles d'EZH2.	49
9	Le complexe PRC1 chez la drosophile.	51
10	Composition des complexes PRC1 canoniques et non canoniques.	52
11	Représentation schématique des régions conservées des homologues de Pc.	54
12	Mono-ubiquitination de la lysine 118 de l'histone H2A (H2AK118ub1) par le complexe PRC1 chez la drosophile.	54
13	Les protéines PCGF forment différents complexes.	56
14	Recrutement via Kdm2b.	58
15	Rôle du complexe PRC1 dans la sénescence.	60

16	Rôle de REST dans la liaison du complexe PRC1 en fonction de la distance aux éléments RE1.	62
17	Les différents modes de recrutement des complexes PRC1.	63
18	Cbx7 contrôle l'expression de Cbx2, Cbx4 et Cbx8 dans les cellules ES.	64
19	Contrôle de l'expression du locus Ink4a/Arf par Kdm2b, Ezh2 et Bmi1.	68
20	Rôles du complexe PRC1 dans le devenir cellulaire.	68
21	Réparation des cassures d'ADN doubles brins par NHEJ.	70
22	Réparation des cassures d'ADN doubles brins par HR.	71
23	La liaison des ZFN à l'ADN.	73
24	Structure des TALEN.	74
25	Liaison du RVD à l'ADN.	75
26	Méthodes d'assemblage des TALEN.	77
27	Liaison des CRISPR à l'ADN.	81
28	Distribution naturelle du poisson zèbre.	83
29	Le poisson zèbre.	84
30	Structure de l'oeil chez les vertébrés.	88
31	Structure de la cornée.	89
32	Comparaison de l'oeil de la larve et de l'adulte chez le poisson zèbre.	89
33	Représentation schématique des différents stades de développement du pancréas chez l'embryon de poisson zèbre.	92
34	Structure de l'intestin des larves de poisson zèbre.	93
35	Marquage de l'endoderme chez l'embryon.	93
36	Architecture de la paroi intestinale chez l'adulte.	96
37	Développement des organes digestifs.	97
38	Les différents stades de développement du tube digestif et du foie. . .	98
39	Anatomie du système digestif de la larve à 5 jpf.	99
40	Structure de la nageoire caudale.	100
41	Echelle de temps de la régénération de la nageoire caudale chez l'adulte.	101

42	Schéma des différentes étapes de la régénération des vaisseaux sanguins chez les sauvages et chez les mutants <i>reg6</i>	103
43	Schéma des différentes étapes de la régénération de la nageoire caudale.	104
44	Etude de la courbure de la colonne vertébrale chez les mutants <i>pcgf1^{-/-}</i> .	118
45	Amputation de la nageoire caudale des embryons à 3 jpf.	119
46	Inactivation du gène <i>pcgf1</i> chez le poisson zèbre.	146
47	Expression des transcrits <i>pcgf</i> au cours du développement chez le poisson zèbre.	148
48	Expression des protéines Pcgf chez les embryons dans le cerveau et la régénération de la nageoire caudale chez l'adulte.	150
49	Coloration des os et cartilages chez les embryons et les larves.	152
50	Absence de phénotype cranio-facial des embryons <i>pcgf1^{-/-}</i>	153
51	Retard de développement précoce des embryons et larves <i>pcgf1^{-/-}</i>	155
52	Vieillesse accélérée chez les individus <i>pcgf1^{-/-}</i>	157
53	Inactivation du gène <i>ezh2</i> chez le poisson zèbre à l'aide des TALEN.	160
54	Absence de phénotype macroscopique chez les larves <i>ezh2^{-/-}</i>	162
55	Expression d' <i>ezh2</i> chez les embryons et les larves au cours du développement.	163
56	Expression d' <i>ezh2</i> au cours du développement.	165
57	Abondance de la marque H3K27me3 chez les <i>ezh2^{-/-}</i> en comparaison aux <i>ezh2^{+/+}</i>	166
58	Phénotype intestinal des larves <i>ezh2^{-/-}</i> à 9 jpf.	168
59	Structure du tube digestif chez les larves à 5 jpf et 9 jpf en coupes transversales.	169
60	Apoptose des cellules intestinales chez les larves <i>ezh2^{-/-}</i>	170
61	Structure intestinale et contrôle de l'expression de <i>Phox2bb</i> dans l'oeil par <i>Ezh2</i>	172
62	Analyse de la mise en place des organes digestifs.	174

63	Ezh2 est indispensable au maintien du développement du pancréas exocrine mais pas de l'oeil.	175
64	Inhibition d'Ezh2 par le GSK126 avant 3 hpf.	177
65	Inhibition d'Ezh2 par le GSK126 à 2 cellules.	178
66	Expression d'Ezh2 lors de la régénération de la nageoire caudale. . . .	180
67	Inhibition d'Ezh1 et Ezh2 par l'UNC1999.	181
68	Contrôle du cycle cellulaire par Pcgf1.	189
69	Organisation cellulaire du tectum optique.	196
70	La voie WNT.	198
71	Architecture de la crypte intestinale chez les mammifères.	200
72	Activation du génome zygotique chez le poisson zèbre et la souris. . .	206

Liste des tableaux

1	Nomenclature gènes et protéines selon les espèces.	27
2	Longs ARN non codants impliqués dans le recrutement d'EZH2 au niveau de promoteurs cibles.	40
3	Les différents noms des protéines du complexe PRC1 trouvés dans la littérature.	53
4	Variation du complexe PRC1 non canonique chez l'Homme.	59
5	Reconnaissance des nucléotides par les di-résidus variables du TALE .	75
6	Protéines du complexe PRC2 mutées chez le poisson zèbre	104
7	Phénotype mortel jusqu'au stade juvénile de poisson zèbre	141

Première partie

Introduction

Les noms des gènes et des protéines des différentes espèces seront écrits selon la nomenclature de la table 1. Chez les eucaryotes, le matériel génétique est com-

Organismes	Gènes	Protéines
Drosophile <i>Drosophila melanogaster</i>	Mutant récessif : <i>gène</i>	Protéine
	Mutant dominant : <i>Gène</i>	Protéine
Poisson-zèbre <i>Danio rerio</i>	<i>gène</i>	Protéine
Souris <i>Mus musculus</i>	<i>Gène</i>	Protéine
Homme <i>Homo sapiens</i>	<i>GENE</i>	PROTEINE

TABLE 1: **Nomenclature gènes et protéines selon les espèces.**

pressé sous forme de chromatine. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Chaque nucléosome est composé d'un octamère de deux fois chaque histone : H2A, H2B ; H3, H4 ; et de 146 bp de l'ADN qui s'enroule autour de cet octamère d'histone (Bentley et al. 1984, Zhang et al. 2001). Il existe plusieurs variants d'histones qui peuvent composer l'octamère. Les histones et leur variants peuvent subir des modifications post-traductionnelles. Ces modifications changent la structure de la chromatine et influencent les interactions ADN-histones, histones-histones et peuvent recruter d'autres protéines. En conséquences, elles vont moduler l'expression génétique. Ces changements de l'expression génique (sans modifier la séquence génique) sont appelés mécanismes épigénétiques. Les modifications épigénétiques sont transmises lors des divisions cellulaires. Une dérégulation de ces marques cause des anomalies du développement et est à l'origine de pathologies comme par exemple les maladies auto-immunes, les cancers. Parmi les différentes modifications post-traductionnelles qui peuvent être portées par les histones on trouve l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination et la sumoylation. Différentes protéines sont capables d'effectuer ces modifications "writer", de les enlever "eraser" et de s'y lier "reader". La méthylation des histones a lieu sur deux acides aminés, les lysines et les arginines (Musselman et al. 2012). La méthylation de la lysine est associée à la répression génique. La triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 est catalysée par le complexe PRC2 et la mono-ubiquitinylation de la lysine 119 de l'histone H2A est catalysée par le complexe PRC1.

Chapitre 1

Le complexe PRC2

1.1 Composition du complexe PRC2

La répression génique par les protéines Polycomb a été découverte chez la drosophile, le complexe PRC2 est composé de 4 éléments : Esc, E(z), Nurf55 et Su(z)12 (figure 1).

La répression polycomb est conservée au travers des espèces et est apparue très tôt chez les eucaryotes, elle est retrouvée chez une espèce d'algue verte unicellulaire, *Chlamydomonas reinhardtii* (Shaver et al. 2010, Ketel et al. 2005). Chez les mammifères, le PRC2 est composé des protéines EZH2/EZH1, SUZ12, EED et de protéines accessoires (Kuzmichev et al. 2002). Ce complexe triméthyle la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) qui réprime l'expression génique (Müller et al. 2002, Wang et al. 2006, Margueron et al. 2008).

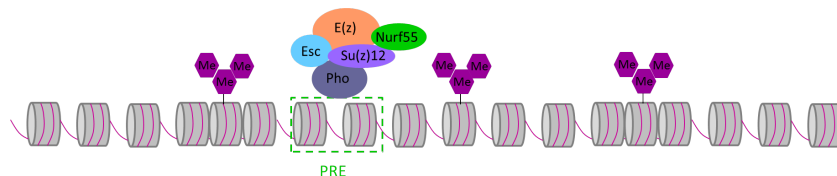


FIGURE 1: **Répression génique par les protéines Polycomb du PRC2 chez la drosophile.** Les protéines E(z), Esc et Su(z)12 forment le complexe PRC2. Le complexe PRC2 catalyse la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). Cette marque épigénétique est répressive. La liaison du complexe PRC2 à la chromatine est permise grâce à la liaison de Pho au niveau des séquences PRE.

La sous unité catalytique du complexe PRC2 Chez la drosophile, E(z) possède l'activité d'histone méthyltransférase portée par son domaine SET (domaine catalytique). Des mutations dans ce domaine empêchent la triméthylation de H3K27 *in vitro*.

Chez les mammifères, les protéines orthologues de E(z) sont EZH1 et EZH2. La protéine EZH1 possède une activité catalytique plus faible qu'EZH2 (Shen et al. 2008). La protéine EZH2 catalyse la marque H3K27me2/3 dans les tissus prolifératifs alors qu'EZH1 est retrouvée préférentiellement dans les tissus peu prolifératifs. La perte d'EZH2 cause une diminution de H3K27me3 contrairement à la perte d'EZH1 (Margueron et al. 2008).

EZH1. Une isoforme d'Ezh1, Ezh1 β , sans domaine catalytique SET est exprimée dans le cytoplasme des cellules musculaires squelettiques et séquestre Eed en absence de stress. Cette isoforme contrôle l'assemblage du PRC2 contenant Ezh1 α en réponse à un stress atrophique. Ezh1 β se lie à Eed dans le cytoplasme, ce qui permet de réguler la formation du complexe PRC2 par Eed, Suz12 et Ezh1 α (ce dernier possédant un domaine catalytique) au niveau des gènes cibles, figure 2 (Bodega et al. 2017).

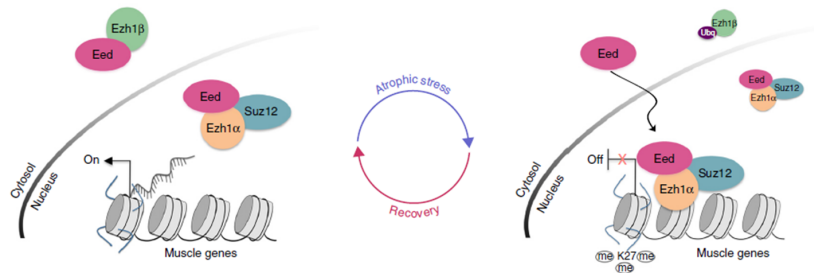


FIGURE 2: Représentation schématique du rôle de l'isoforme Ezh1 β dans les cellules musculaires squelettiques suite à un stress atrophique. Ezh1 β séquestre Eed dans le cytoplasme afin de réguler la formation du complexe PRC2-Ezh1 α dans le noyau et ainsi contrôler l'expression génique. Après un stress atrophique, Ezh1 β est dégradée par le protéasome et libère Eed, permettant l'assemblage du complexe PRC2-Ezh1 α . Adaptée de Bodega et al. 2017.

EZH2. EZH2 est retrouvée mutée chez 48 patients atteints du syndrome de Weaver. Le syndrome de Weaver est caractérisé par une camptodactylie et des dé-

formations faciales. Parmi ces patients, 12 portent une mutation dans le domaine SET (Tatton-Brown et al. 2013). Ceci suggère un rôle important d'EZH2 dans le développement.

Ezh2 est indispensable au développement précoce de la souris. La mutation à l'état homozygote cause la mortalité des embryons avant la gastrulation (O'Carroll et al. 2001)

L'inactivation de la protéine EZH2 dans les cellules souches embryonnaires (délétion des exons 14 et 15 : décalage de la phase ouverte de lecture et expression d'une protéine tronquée) entraîne une diminution mais pas une perte de la marque H3K27me3. Si *EZH1* est mutée dans des cellules *EZH2*^{-/-}, la marque H3K27me3 est totalement abolie (Shen et al. 2008).

EED. L'orthologue de la protéine Esc est EED. La protéine EED est indispensable à la fonction et à la formation du complexe PRC2 (Montgomery et al. 2005). Elle est importante pour la formation de l'axe antéro-postérieur chez la souris. Eed contrôle la croissance cellulaire, son absence cause un arrêt du développement au moment de la gastrulation (Faust et al. 1995).

La protéine EED se lie à la queue des histones triméthylées au niveau de la lysine 27, ce qui permet une activation allostérique d'EZH2. La mutation d'Esc chez la drosophile empêche la reconnaissance de H3K27me3 et inhibe le complexe PRC2. Ceci conduit à une diminution de la marque H3K27me3 (Margueron et al. 2009).

Il existe différentes isoformes de la protéine EED. Ces isoformes sont issues de différents sites d'initiation de la traduction. L'incorporation des différentes isoformes d'EED donne naissance à différents complexes. Le complexe PRC2 contient l'isoforme 1 (la plus longue), le complexe PRC3 contient les isoformes 3 et 4 (les plus petites) et l'isoforme 2 (intermédiaire) est incorporée à un autre complexe contenant EZH2 avec une activité préférentielle pour l'histone H1. La présence des isoformes dans le complexe est dynamique (Kuzmichev et al. 2004).

SUZ12. Chez les mammifères, l'orthologue de Su(z)12 est conservé. La protéine SUZ12 est requise pour l'activité et la stabilisation du complexe PRC2 (Pasini et al.

2004). La diminution de son expression dans un modèle cellulaire cause un déclin de la prolifération cellulaire et une perte partielle de la marque H3K27me3 (Cao et al. 2004). Elle est essentielle pour le développement embryonnaire de la souris, la mutation à l'état homozygote est létale après l'implantation de l'embryon, à 7,5 jours. Les analyses montrent un défaut de prolifération cellulaire et des anomalies sévères du développement (absence d'organogénèse). Son absence conduit à une réduction de la marque H3K27me2/3 et renforce l'apoptose.

Structure du complexe PRC2. La conformation du complexe PRC2 a été mise en évidence par cristallographie chez le champignon filamentueux *Chaetomium thermophilum*. Jiao et al. 2015, montrent que la partie N-terminale d'EZH2, entoure les domaines WD40 d'EED alors que sa partie C-terminale contenant le domaine catalytique SET forme un arrangement compact à la surface de SUZ12, figure 3.

1.2 EZH2 contrôle l'expression génique

EZH2 associée aux autres composants du PRC2 triméthyle H3K27 (Kirmizis et al. 2004), à partir du substrat S-adenosylméthionine (SAM) (Joshi et al. 2008). Cette marque épigénétique permet de recruter le complexe PRC1, empêche l'accès à des facteurs comme SWI/SNF et conduit à la formation d'hétérochromatine (Cao et al. 2002). La présence de la marque H3K27me3 bloque l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II (Dellino et al. 2004). L'ensemble de ces événements contrôle ainsi l'expression génique (Papp et al. 2006).

Ajout/suppression de la marque H3K27me3. La présence des marques H3K4me3 et H3K26me2/3 sur la même histone inhibe l'activité du complexe PRC2 (Schmitges et al. 2011). Ainsi H3K4me3 et H3K36me2/3 fonctionnent comme barrière pour l'ajout de H3K27me3. Cependant, dans les cellules souches embryonnaires, des domaines bivalents H3K27me3/H3K4me3 sont trouvés. Deux hypothèses peuvent expliquer la formation de ces domaines. Premièrement, l'inhibition du complexe PRC2 dans les cellules embryonnaires est différente, et deuxièmement, H3K27me3 peut être

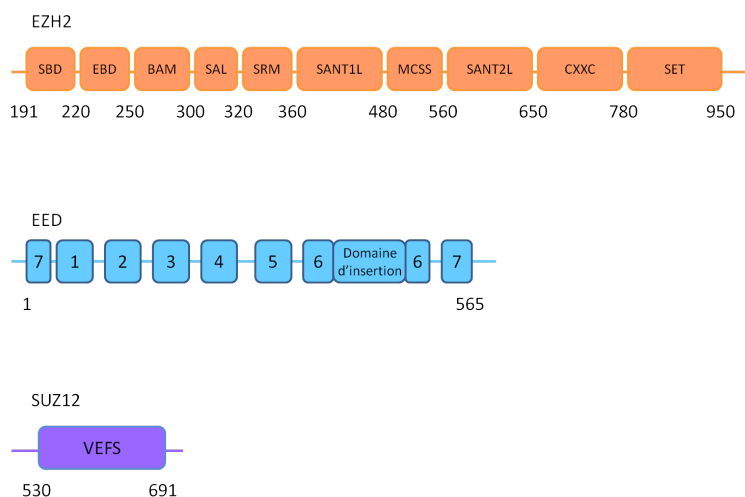


FIGURE 3: Organisation des domaines protéiques d'EZH2, EED et SUZ12 composant le complexe PRC2 chez le champignon filamentueux *Chaetomium thermophilum*. EZH2 est composée de différents domaines. Le domaine **SBD** pour **SANT1L Binding Domain** est un élément en hélice qui se lie au domaine SANT1L au niveau de la partie N-terminal. Le domaine suivant, **EBD** est le domaine de liaison à la protéine EED. Il est composé de petites hélices suivies d'une région flexible en boucle. Ce domaine interagit à la surface d'EED au niveau du domaine β -propeller. Le domaine **BAM** est composé de 3 feuillets β . Le domaine **SAL** pour **SET Activation Loop**, ce domaine permet de connecter le domaine SET, MCSS et SUZ12^{vefs}. Le domaine **SRM** est une hélice mobile fonctionnelle en présence de H3K27me3. **SANT1L** interagit avec le domaine SBD pour former une boucle autour de EED. **MCSS** est un domaine contenant des motifs de liaison au zinc. Le domaine **SANT2L** contient également des motifs de liaison au zinc et participe à la liaison avec SUZ12^{vefs}. Le domaine **CXC**, permet le contact direct avec SUZ12^{vefs}, MCSS, SANT2L et le domaine SET. Le domaine **SET** possède l'activité méthyltransférase. La protéine EED est composée de 7 β -propeller. Ces structures composent les domaines WD40. Les β -propeller sont des structures tertiaires. Ils sont organisés en 7 feuillets β en forme de lame autour d'un axe central. SUZ12^{vefs} est composée d'un domaine de 160 acides aminés proches du domaine C-terminal de la protéine totale. Ce domaine est formé de 5 hélices. SUZ12^{vefs} est indispensable à la conformation correcte d'EZH2. Adapté de Jiao et al. 2015 et Ciferri et al. 2012.

déposée avant H3K4me3 ou H3K36me2/3. L'histone méthyltransférase NSD2 catalyse la méthylation au niveau de H3K36, elle n'est pas inhibée par la présence de H3K27me3 (Schmitges et al. 2011). Ainsi l'activité du complexe PRC2 est favorisée par la présence de H3K27me3 et est inhibée par la présence de H3K4me3 et H3K36me2/3.

D'autres protéines peuvent contrôler l'activité du complexe PRC2. Lorsque les pro-

téines du complexe PRC2 de drosophile sont liées à la protéine polycomblike (Pcl), l'activité histone méthyltransférase est améliorée (Nekrasov et al. 2007).

La protéine polycomblike (PHF1) chez les mammifères est l'orthologue de Pcl, elle interagit avec EZH2 et favorise l'ajout de la marque H3K27me3 (figure 4) (Sarma et al. 2008).

La marque H3K27me3 peut également être régulée par les déméthylases. La déméthylase UTX de la famille JumonjiC, se trouve au niveau des promoteurs des gènes du locus HOX et régule leur expression en modulant le recrutement du complexe PRC1 par la marque H3K27me3 (Lee et al. 2007).

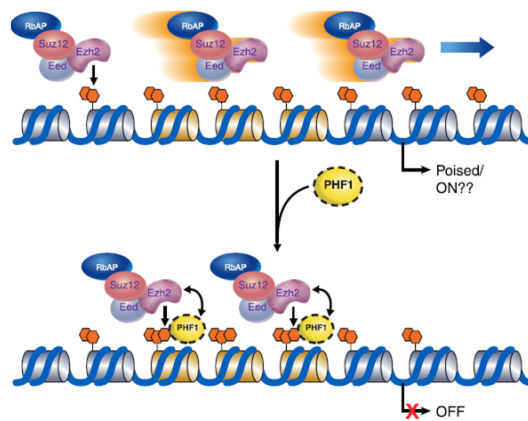


FIGURE 4: Modulation de l'activité du complexe PRC2 en fonction de la présence de PHF1. En haut de la figure, si PHF1 est absente, le complexe PRC2 ne se fixe pas stablement au niveau des promoteurs. Cet état peut permettre la catalyse de H3K27me2 mais pas de H3K27me3. H3K27me2 peut être une marque intermédiaire à la répression. En bas de la figure, PHF1 est exprimée et permet de stabiliser la liaison du complexe PRC2 à la chromatine. Lorsque le complexe est lié, la triméthylation est catalyée et permet la répression génique. Figure de Sarma et al. 2008.

EZH2, rôle dans les cellules souches et le développement. Par son activité histone méthyltransférase ciblée, EZH2 contrôle le devenir cellulaire. Ezh2 régule le développement des cellules B (Su et al. 2003), réprime l'expression de Wnt durant l'adipogénèse (Wang et al. 2010a) et régule la différenciation des cellules musculaires squelettiques. Le déclin d'expression d'EZH2 permet l'expression des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire.

EZH1 et EZH2 sont indispensables à la différenciation des cellules de muscle squelettique. Le complexe PRC2 contenant EZH2 (PRC2-EZH2) lie le promoteur de la myogénine et celui de la créatine kinase dans les myoblastes en prolifération. Après mitose, le complexe PRC2 contenant EZH1 (PRC2-EZH1) remplace le PRC2-EZH2 au niveau des ces promoteurs. La phosphorylation de la sérine 28 de l'histone H3 (H3S28) régulée par Msk1 contrôle ce changement PRC2-Ezh2/PRC2-Ezh1 (Stojic et al. 2011). Son et al. 2013, montrent que dans les myoblastes, EZH2 est important pour l'établissement de la marque H3K27me3 dans les cellules prolifératives alors que EZH1 permet la maintenance dans des cellules non prolifératives.

L'existence de domaines bivalents (contenant H3K27me3 et H3K4me3) dans les cellules pluripotentes permet de tenir l'expression génique prête à la différenciation (Bernstein et al. 2006a). En effet, le complexe PRC2 joue un rôle dans le maintien de la pluripotence et la plasticité des cellules souches embryonnaires lors du développement (Boyer et al. 2006 Ezhkova et al. 2009 Leeb et al. 2010), SUZ12 est associée à plus de 200 gènes impliqués dans la régulation du développement (Lee et al. 2006, Mohn et al. 2008). Ezh2 est indispensable au développement précoce de la souris (O'Carroll et al. 2001); elle est essentielle à la différenciation des cellules du trophoctoderme (couche externe de la morula) et au maintien de la pluripotence des cellules de l'épiblaste (Erhardt et al. 2003).

Ainsi, dans les cellules souches le PRC2 réprime l'expression des gènes impliqués dans la différenciation. Puis, lors de la différenciation, le complexe PRC2 est relocalisé afin de réprimer les gènes associés à la pluripotence. Le complexe PRC2 est indispensable au développement.

Régulation de l'expression d'EZH2. EZH2 régule l'expression génique, son expression est également régulée, notamment par les microARN (miR). Le miR let-7 régule l'expression d'EZH2 en se liant directement à son UTR3'. L'inhibition de let-7 cause une surexpression d'EZH2 (Kong et al. 2012).

EZH2 est aussi régulée négativement par d'autres miR comme le miR-141 dans le cancer de la prostate (Liu et al. 2017a), le miR-138 dans les cellules d'ostéosarcome

(Zhu et al. 2016b).

Dans les astrocytes le transcrit EZH2 est régulé négativement par les miR26a, miR26b, miR27a et miR498.

La régulation d'EZH2 par les miR est complexe, c'est le cas notamment avec le miR26a. EZH2 régule négativement l'expression du miR26a en ajoutant la marque H3K27me3 au niveau de son promoteur, ceci crée une boucle de rétro-contrôle entre EZH2 et le miR26a (figure 5)(Sharma et al. 2016). Le miR26a permet de contrôler la progression du cycle cellulaire via Myc dont l'expression est régulée positivement par EZH2 ; Myc réprime le miR26a. Ce mécanisme permet une boucle de rétro-contrôle positif de l'expression d'EZH2 (Sander et al. 2008).

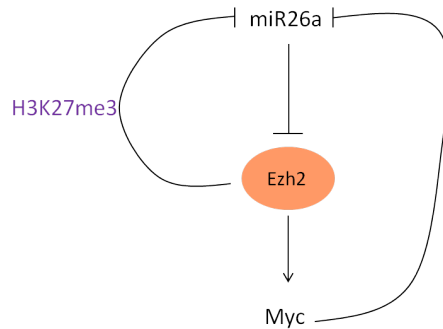


FIGURE 5: Boucle de rétro-contrôle positif d'Ezh2. Ezh2 est régulée négativement le miR26a. Le miR26a est régulé négativement par Ezh2 via deux mécanismes, la triméthylation de H3K27 au niveau du promoteur ou la répression par Myc.

1.3 Mécanismes de recrutement d'EZH2 à la chromatine

Chez la drosophile, le complexe PRC2 se lie à la chromatine via des séquences particulières appelées PRE (Lavigne et al. 2004, Min et al. 2003, Fischle et al. 2003). La liaison du complexe aux PRE est associée aux protéines de liaison à l'ADN, Pleiohomeotic (Pho) et Pho-like (PhoL) (Schuettengruber et al. 2009, Schwartz et al. 2006, Mihaly et al. 1998). Chez les mammifères ces éléments de liaison à la chromatine ne sont pas bien définis et nombreuses sont les études qui mettent en

évidence le rôle d'intermédiaires qui possèdent la capacité de se lier à la chromatine (ARN, protéines) pour recruter le PRC2.

1.3.1 Par les longs ARN non codants

Selon leur taille, les ARN non codants sont classés en deux groupes : les petits ARN non codants (sRNA) et les longs ARN non codants (lncRNA). Les lncRNA sont impliqués dans de nombreux processus biologiques (Pauli et al. 2012, Guttman et al. 2009). Les lncRNA guident le complexe PRC2 à la chromatine (Kretz et al. 2014). Tu et al. 2017, identifient des séquences communes aux ARN qui se lient au PRC2 et sont conservées dans l'évolution. Une étude à grande échelle montre que 20% des lncRNA lient le complexe PRC2, leur inhibition par siRNA cause des changements d'expression génique notamment des gènes réprimés normalement par le PRC2. Ces changements ont lieu au niveau des locus distants des lncRNA. Cette étude met en évidence un mécanisme de régulation en trans. Ainsi les lncRNA collaborent avec le complexe PRC2 afin de contrôler l'expression génique à différents locus (Khalil et al. 2009)(figure 6). Les lncRNA sont retrouvés dérégulés dans les cancers et ceci peut causer un recrutement anormal d'EZH2 aux gènes cibles (Hibi et al. 1996, Berteaux et al. 2005, Pasmant et al. 2011, Ma et al. 2014). Le tableau 2 est une liste non exhaustive des longs ARN non codants pouvant interagir avec EZH2.

H19. H19 est le premier lncRNA à avoir été mis en évidence. L'expression d'H19 est dérégulée dans les cancers (Yoshimura et al. 2018, « Regulation of Human Breast Cancer by the Long Non-Coding RNA H19 »). Dans les cardiomyocytes, le lncRNA H19 lie EZH2 et favorise la triméthylation de H3K27 au niveau du promoteur de DIRAS3 (Zhuo et al. 2016). L'expression de H19 est augmentée dans les cancers de la vessie, cette expression est corrélée à la migration. H19 et EZH2 activent la voie Wnt/ β caténine, ce qui régule négativement la E-cadhérine et favorise la migration cellulaire (Luo et al. 2013). H19 atténue l'apoptose en inhibant la transcription du gène BIK via le recrutement d'EZH2 au niveau de son promoteur et l'ajout de la marque H3K27me3 (Si et al. 2016b).

Xist. Xist est impliqué dans la répression du chromosome X (Brockdorff 2017, Lu et al. 2017). Maenner et al. 2010, mettent en évidence que la région A du lncRNA Xist permet la liaison avec le complexe PRC2 dans ces cellules souches embryonnaires. Par cette interaction, le lncRNA et le complexe PRC2 jouent un rôle dans l'inactivation du chromosome X.

HOTAIR. HOTAIR favorise le recrutement du PRC2 à la chromatine. HOTAIR est un lncRNA transcrit au niveau du locus HOXC. Il cible le complexe PRC2 au niveau du locus HOXD situé sur un autre chromosome (action en trans) (Gupta et al. 2010). HOTAIR et le PRC2 sont impliqués dans la reprogrammation de l'organisation de la chromatine et promeuvent les métastases dans les cancers du sein et du côlon. HOTAIR et SUZ12 sont sur-exprimés dans le tissu du cancer colorectal (Kogo et al. 2011).

Le complexe PRC2 peut ainsi interagir avec de nombreux longs ARN non codants, cependant ces interactions ne sont pas si évidentes. En effet Portoso et al. 2017, montrent que HOTAIR pourrait contrôler l'expression génique indépendamment du complexe PRC2. Ce champs d'étude reste très controversé.

EZH2 est ciblée au niveau de différentes cibles à l'aide des lncRNA mais EZH2 contrôle également leur expression via la triméthylation de H3K27 de façon type cellulaire spécifique. Ainsi les lncRNA comme les protéines sont régulés et jouent un rôle dans le devenir cellulaire (Wu et al. 2010).

LncRNA	Promoteur lié par EZH2 et lncRNA	Références
H19	DIRAS3, E-CADHERINE, BIK	Zhuo et al. 2016, Luo et al. 2013, Si et al. 2016b
HNF1A-AS1	NKD1, P21	Wang et al. 2017a
HOTAIR	favorise l'invasion et les métastases	Gupta et al. 2010, Kogo et al. 2011
HOXA11-AS	miR200b	Chen et al. 2017a
HOXA-AS2	P21, KLF2	Ding et al. 2017
HOXA-AS3	RUNX2	Zhu et al. 2016a
IL7R	P21, P16-INK4A	Ye et al. 2017
Kcnq1ot1	Cdkn1c	Pandey et al. 2008
MALAT1	PCDH10, P21, P27	Qi et al. 2016, Wang et al. 2016a
MEG3	CDH1, miR200	Terashima et al. 2017
PVT1	LATS2, miR200b	Wan et al. 2016, Zhang et al. 2016a
ROR1-AS1	P16, SOX11	Hu et al. 2017a
SNHG20	E-CADHERINE	Liu et al. 2017b
SPRY4-IT1	E-CADHERINE	Zhou et al. 2017
TINCR	CaMKII	Shao et al. 2017
TUG1	LIMK2b, CELF1	Niu et al. 2017, Lin et al. 2016
UCA1	P27Kip1, P21, E-CADHERINE	Hu et al. 2016, Cai et al. 2017
UBC1	favorise la prolifération et l'invasion	He et al. 2013
Xist	Inactivation du chromosome X	Maenner et al. 2010
Expression activée		
UCA1	CYCLINE D1	Wang et al. 2017c

TABLE 2: Longs ARN non codants impliqués dans le recrutement d'EZH2 au niveau de promoteurs cibles. (liste non exhaustive)

1.3.2 Par les protéines

Le complexe PRC2 peut être recruté à la chromatine via les lncRNA mais aussi via des protéines.

La protéine de liaison à l'ADN Pleiohomeotic (Pho) est essentielle pour la répression par le PRC2 chez la drosophile, et permet sa liaison aux séquences PRE (Polycomb

Responsive Element) et peut interagir avec l'histone H3 (Fritsch et al. 1999, Lavigne et al. 2004, Min et al. 2003, Fischle et al. 2003). Chez les mammifères, YY1 peut jouer le même rôle que Pho, c'est un facteur de transcription qui est retrouvé lié aux sites d'initiation de la transcription (Thomas et al. 1999, Xi et al. 2007, Brown et al. 1998). Wilkinson et al. 2006, mettent en évidence que le domaine REPO d'YY1 (acides aminés 201 à 226), est nécessaire et suffisant pour recruter le PRC2 au niveau de la chromatine, permettre la répression génique et est indispensable au maintien du statut indifférencié des cellules de myotome (Caretto et al. 2004).

JARID2 recrute à la fois le complexe PRC1, le complexe PRC2 et l'ARN polymérase II afin de réguler l'expression génique dans les cellules souches embryonnaires (Landeira et al. 2010).

Le complexe PRC1 peut également favoriser le recrutement du complexe PRC2 à la chromatine indépendamment des marques épigénétiques (Kahn et al. 2016).

1.4 EZH2 et cancer

Ce sujet a fait l'objet d'une revue par le laboratoire (annexe).

1.4.1 EZH2 dans les cancers hématologiques

L'expression d'EZH2 est altérée dans les cancers hématologiques (perte de fonction). La perte d'expression d'Ezh2 dans les cellules souches hématopoïétiques de souris est suffisante pour causer une leucémie lymphoblastique aigüe T agressive (Simon et al. 2012).

La capacité d'EZH2 à trimétyler H3K27 est augmentée dans les lymphomes (gain de fonction). EZH2 est retrouvée mutée à l'état hétérozygote au niveau de la tyrosine 641 (Y641) présente dans le domaine SET (Morin et al. 2010).

1.4.2 EZH2 dans les tumeurs solides

EZH2 est sur-exprimée dans les cancers de la prostate métastatique (Varambally et al. 2002). Elle est facteur de mauvais pronostic dans les cancers gastriques et est

associée à l'augmentation de la taille de la tumeur, l'invasion, l'angiogénèse et les métastases (Matsukawa et al. 2006). EZH2 est retrouvée sur-exprimée dans les tissus de cancer de sein invasif et est un marqueur d'agressivité de ces cellules cancéreuses (Kleer et al. 2003). Cependant Wassef et al. 2015, montrent que la dérégulation de l'expression d'EZH2 dans le cancer du sein est une conséquence et non pas une cause du développement cancéreux.

Le séquençage de 48 échantillons de tumeurs de glioblastome multiforme pédiatrique (GBM) met en évidence des mutations dans le gène H3F3A codant pour un variant de l'histone H3, l'histone H3.3. Cette mutation est retrouvée dans 31% des tumeurs. La lysine 27 est remplacée par une méthionine (K27M). La mutation H3.3K27M est retrouvée dans les tissus avant tout traitement. Cette mutation empêche l'ajout de la méthylation et de l'acétylation (Wu et al. 2012). La mutation H3.3K27M induit une réduction drastique des marques H3K27me2 et H3K27me3 (Justin et al. 2016).

1.4.3 Cibler EZH2 dans les cancers

EZH2 joue un rôle important lors de la tumorigénèse et est retrouvée dérégulée dans de nombreux cancers. La recherche d'inhibiteurs spécifiques d'EZH2 est donc un enjeu important dans la découverte de nouveaux anti-cancéreux.

Suite à ces résultats, de nombreuses études cherchent à mettre en place des inhibiteurs d'EZH2 spécifiques et de faible toxicité, figure 7.

DZNep. Historiquement Glazer et al. 1986, montrent le rôle du DZNep, un inhibiteur de l'hydrolase S-adénosylhomocystéine comme anti-cancéreux. Depuis, le DZNep est largement étudié afin d'inhiber EZH2 dans les cancers. Cependant le DZNep n'est pas spécifique d'EZH2 (Richon et al. 2011). Le DZNep inhibe la catalyse de H3K27me3 et H4K20me3, il permet la ré-expression de gènes réprimés dans le cancer (Miranda et al. 2009). Dans les tissus de tumeurs mammaires de souris déficientes en BRCA1, EZH2 est sur-exprimée. Le DZNep est 20 fois plus efficace pour tuer les cellules déficientes en BRCA1 en comparaison aux cellules exprimant BRCA1. Malheureusement, cette étude met également en évidence la toxicité du

DZNep dans le traitement des souris (Puppe et al. 2009).

La famille des GSK (GlaxoSmithKline). Diaz et al. 2012, identifient un composé dans la collection GlaxoSmithKline, le GSK-A qui est un inhibiteur compétitif du S-adenosyl-L-méthionine (SAM). Cet inhibiteur diminue l'abondance de la marque H3K27me3 dans des cellules cancéreuses de sein. Cette molécule peut servir de base afin de développer d'autres composés compétiteurs du SAM dans le cadre de chimiothérapie.

Le GSK126 inhibe la prolifération des cellules de lymphome à larges cellules B portant la mutation Y641. Le GSK126 est 1000 fois plus spécifique d'EZH2 que d'autres histones méthyltransférases et 150 fois plus spécifique d'EZH2 que d'EZH1 qui possède un domaine SET identique à 96%. Le GSK126 diminue les marques H3K27me3 et H3K27me2 mais n'affecte pas fortement la marque H3K27me1. Cette molécule, contrairement au DZNep, n'entraîne pas la dégradation d'EZH2. Elle peut être utilisée pour comprendre le rôle d'EZH2 dans la progression tumorale et le développement (McCabe et al. 2012).

La famille des EPZ (Epizyme). La protéine EZH2 mutée aux acides aminés tyrosine 641 (Y641) et Alanine 677 (A677) est hyperactive (hypertriméthylation de H3K27) et est retrouvée dans les lymphomes. L'utilisation de l'inhibiteur EPZ005687 réduit la marque H3K27me3, entraîne l'apoptose cellulaire des cellules mutantes et a peu d'action sur les cellules non mutées. EPZ005687 est 500 fois plus spécifique pour EZH2 que pour d'autres histones méthyltransférases et est 50 fois plus spécifique d'EZH2 que d'EZH1. Ce composé pourrait être utilisé pour traiter les patients portant les mutations activatrices d'EZH2 (Knutson et al. 2012).

EI1. L'EI1 est un inhibiteur compétitif d'EZH2. Cet inhibiteur diminue l'abondance de marque H3K27me3, ralentit la prolifération cellulaire et induit l'apoptose des cellules de lymphomes diffus à grandes cellules B, mutées pour EZH2 (Y641) (Qi et al. 2012).

UNC1999. Konze et al. 2013, ont développé un composé ciblant EZH2 et EZH1, l'UNC1999. Ce composé peut être ingéré, il est un compétiteur de SAM et permet la diminution de la marque H3K27me3 dans des cellules de lymphomes mutées EZH2-Y641.

Composés naturels. Certains composés trouvés dans notre alimentation présentent également un pouvoir d'inhibition d'EZH2. C'est le cas des acides gras polyinsaturés riches en omega 3. Ce composé cause la dégradation d'EZH2 par le protéasome, il réduit l'abondance de la marque H3K27me3 et permet la ré-expression de la E-cadhérine et de IGFBP3 dans des cellules cancéreuses de sein (Dimri et al. 2010).

La curcumine contenu dans le curcuma réduit la prolifération cellulaire par une accumulation des cellules en phase G1. La curcumine ne réduit pas l'expression de l'ARNm d'EZH2 mais diminue son abondance protéique ainsi que son activité (Hua et al. 2010). Un analogue synthétique permet également de diminuer la survie des cellules cancéreuses pancréatiques, de réduire l'invasion, la migration et réduit la population de cellules souches cancéreuses (moins de formation de sphères). Le traitement des cellules permet de retrouver l'expression de microARN suppresseurs de tumeurs (let7a, b, c ; miR26a, miR101, miR146a, miR200b, c) (Bao et al. 2012).

Les isothiocyanates contenus dans les légumes crucifères causent une réduction de l'expression d'EZH2 en conduisant à sa dégradation par le protéasome, diminuent l'abondance de la marque H3K27me3 et arrêtent le cycle cellulaire en G2/M (Balasubramanian et al. 2011).

Inhibition du complexe PRC2. La synthèse d'une hélice α qui mime le domaine de liaison d'EED à EZH2 permet la dissociation d'EZH2 et EED, diminue l'abondance de H3K27me3 et diminue la présence de la protéine EZH2. L'utilisation de cette hélice α dans des cellules de leucémie entraîne un arrêt de la croissance cellulaire, la différenciation des macrophages et la ré-expression des gènes lignée-spécifiques (Kim et al. 2013).

Qi et al. 2017b, ont découvert un inhibiteur permettant d'empêcher la reconnaissance

de la marque H3K27me3 par EED, l'EED226. Cette molécule induit un changement de conformation d'EED et diminue l'activité du complexe PRC2. EED est 500 fois plus affin pour EED226 que H3K27me3. L'abondance de la marque H3K27me3 est réduite et permet la régression de tumeurs xéno greffées.

L'A-395 inhibe également la liaison de EED à H3K27me3. Ce composé réduit l'abondance de la marque H3K27me3, inhibe la prolifération cellulaire et possède une activité anti-tumorale (He et al. 2017).

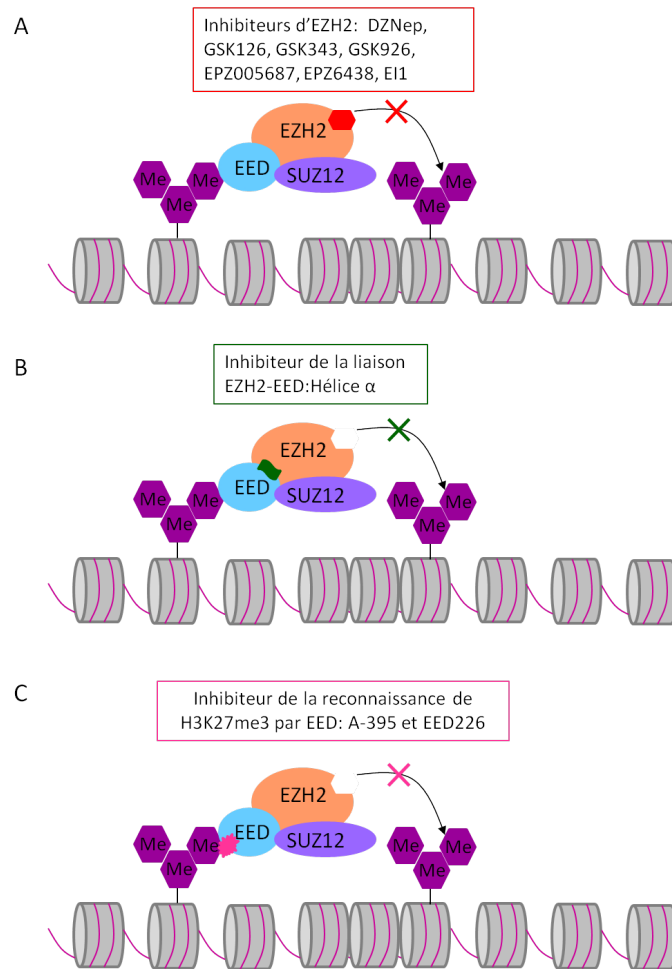


FIGURE 7: L'inhibition d'EZH2. EZH2 peut être inhibée de différentes façons **A.** Utilisation de molécules compétitrices du SAM. Le DZNep est un inhibiteur de SAM pour toutes les histones méthyltransférases tandis que les molécules de la famille GSK et EPZ sont plus spécifiques de la protéine EZH2. **B.** Le complexe PRC2 peut être dissocié par un peptide en hélice α qui inhibe la liaison d'EZH2 avec EED. **C.** L'inhibition de la reconnaissance de H3K27me3 par EED permet de diminuer l'abondance de la marque épigénétique.

1.5 Les modifications post-traductionnelles d'EZH2

Récemment plusieurs équipes ont montré la régulation d'EZH2 par diverses modifications post-traductionnelles, figure 8.

1.5.1 Phosphorylation

Phosphorylation d'EZH2 au niveau de la Sérine 21 par AKT. Cha et al. 2005, montrent que AKT phosphoryle EZH2 au niveau de la sérine 21 (S21). Celle-ci supprime l'activité histone méthyltransférase d'EZH2 et son affinité pour l'histone H3. Ce site de phosphorylation est conservé entre les espèces. La phosphorylation de S21 entraîne une diminution de la marque H3K27me3 et permet la ré-expression de gènes réprimés initialement. Ce mécanisme de régulation d'EZH2 pourrait être impliqué dans la cancérogénèse. En réponse à l'E2 (17 β -estradiol) et aux xénoestrogènes, le récepteur ER via la voie PI3K/AKT phosphoryle EZH2 au niveau de la S21 (diminution de la marque H3K27me3). Ainsi, les xénoestrogènes peuvent reprogrammer l'expression génique et favoriser le développement du cancer du sein (Bredfeldt et al. 2010).

Phosphorylation d'EZH2 par les CDK.

Thr 350. Les kinases dépendantes des cyclines, CDK1 et CDK2, phosphorylent EZH2 au niveau de la thréonine 350 (Thr350), ce motif est conservé entre les espèces. La phosphorylation de ce résidu est importante pour le recrutement d'EZH2 et la maintenance de la marque K3K27me3 au niveau des loci cibles d'EZH2.

Thr 372. La phosphorylation au niveau de la thréonine 372 (Thr372) accroît l'interaction entre YY1 et EZH2, elle est catalysée par la voie Tnf/P38 α . Ce mécanisme conduit à la répression de Pax7 lors de la régénération musculaire (Palacios et al. 2010).

Thr 487. EZH2 est phosphorylée au niveau de la thréonine 487 par CDK1. Dans des cellules embryonnaires de rein, cette phosphorylation dissocie le complexe PRC2 et inhibe l'activité histone méthyltransférase d'EZH2.

Thr 416. La protéine NIPP1 régule la sérine/thréonine phosphatase PP1. PP1 régule la présence d'EZH2 aux loci cibles par la phosphorylation de la thréonine 416 (Thr416). La phosphorylation EZH2-Thr416 crée une plateforme d'accueil pour NIPP1. Ce recrutement permet d'augmenter la phosphorylation d'EZH2 en inhibant sa déphosphorylation par PP1 (Minnebo et al. 2013).

Phosphorylation d'EZH2 au niveau de la S734 par ATM. Dans l'ataxie télangiectasie la marque H3K27me3 est fortement abondante. L'ataxie télangiectasie est une dégénération neuronale progressive causée par une déficience en protéine ATM. La protéine ATM est une kinase qui phosphoryle EZH2 à la sérine 734 (S734) et diminue la stabilité de la protéine. La localisation de la marque H3K27me3 est changée et provoque une dérégulation du cycle cellulaire et l'apoptose (Li et al. 2013b).

1.5.2 Acétylation

EZH2 est acétylée par l'acétyltransférase PCAF (P300/CBP-associated factor) au niveau de la lysine 348 (K348) et déacétylée par SIRT1. Cette acétylation cause une diminution des phosphorylations au niveau des Thr345 et Thr487. EZH2-K348 acétylée augmente la stabilité d'EZH2 sans influencer son association au complexe PRC2 et augmente son activité enzymatique (Wan et al. 2015).

1.5.3 Ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui contrôle la dégradation des protéines. Elle est liée de façon covalente à un résidu lysine. L'ubiquitination est régulée par une cascade d'enzymes E1, E2 et E3. Il existe dans les cancers des dérégulations d'ubiquitination (activation ou désactivation). L'ubiquitination

modère la dégradation d'oncogènes et suppresseurs de tumeurs ainsi que le cycle cellulaire (Popovic et al. 2014). Il existe plusieurs protéines qui peuvent ubiquitinyler Ezh2 : Smurf2 (polyubiquitine EZH2 et cause sa dégradation par le protéasome), la protéine β -TRCP a pour cible EZH2 phosphorylée au niveau de la tyrosine Y641 par JAK2 (dégradation d'Ezh2), YC-1 favorise l'ubiquitination et la dégradation d'EZH2 par c-CBL (Casitas B-lineage lymphoma), le DZNep favorise l'expression de la protéine ubiquitine ligase PRAJA1 qui favorise la dégradation des composants du PRC2 par le protéasome (Yu et al. 2013, Sahasrabuddhe et al. 2015, Chang et al. 2014, Zoabi et al. 2011).

1.5.4 O-GlcNacylation

La O-GlcNacylation est catalysée par l'enzyme O-GlcNac transférase (OGT), requise pour la triméthylation H3K27. La sérine 75 est le site de O-GlcNacylation d'EZH2, elle favorise sa stabilité et inhibe une phosphorylation d'EZH2 responsable de sa dégradation (Chu et al. 2014).

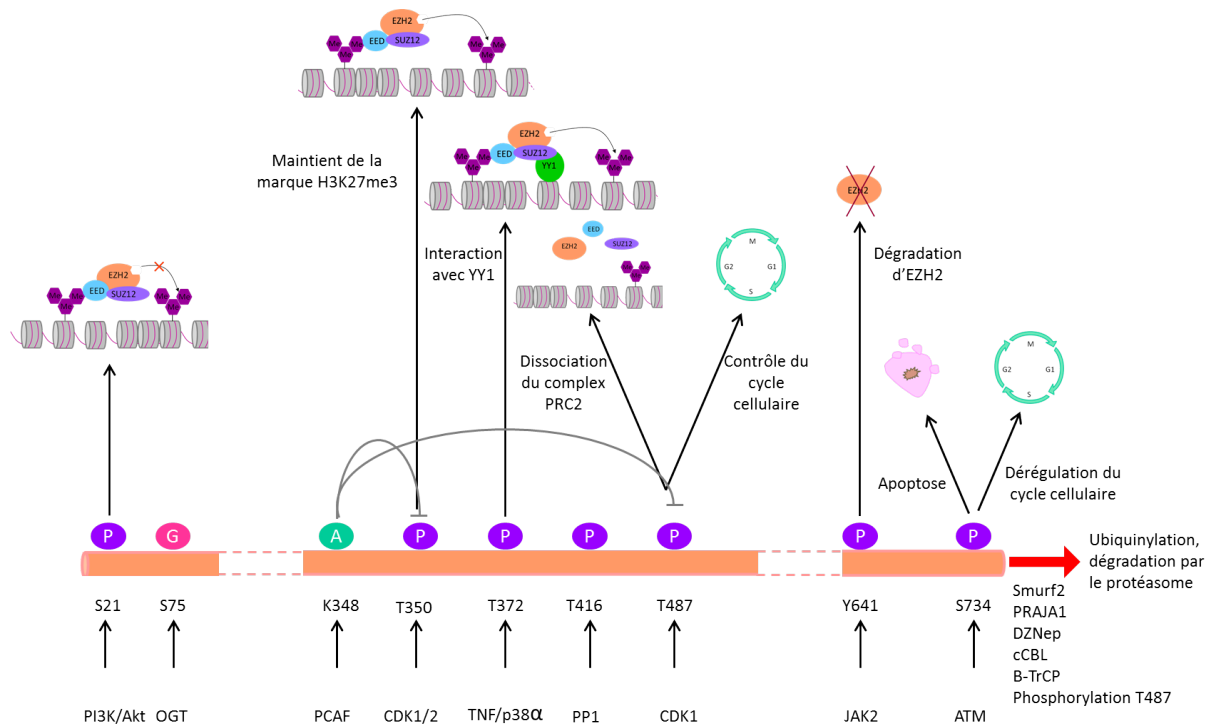


FIGURE 8: Modifications post-traductionnelles d'EZH2. L'activité d'EZH2 est modulée par les modifications post-traductionnelles. Les phosphorylations de la sérine 21 (S21), thréonine 350 (T350), 372 (T372), 416 (T416) et 487 (T487) régulent l'ajout de la marque H3K27me3. Le cycle cellulaire peut également être modulé par les modifications post-traductionnelles d'EZH2 notamment par la phosphorylation de la thréonine 487 et celle de la sérine 734 (S734). L'acétylation de la lysine 348 (K348) inhibe la phosphorylation des thréonines 350 et 487. La phosphorylation de la tyrosine 641 (Y641) par JAK2 conduit à la dégradation d'EZH2. A : Acétylation, G : O-GlcNacylation, P : Phosphorylation.

Chapitre 2

Le complexe PRC1

2.1 Composition du complexe PRC1

Le complexe PRC1 chez la drosophile est composé de 4 composants ; Polycomb (Pc), Sex combs extra (Scs), Polyhomeotic (Ph) and Posterior sex combs (Psc) (figure 9).

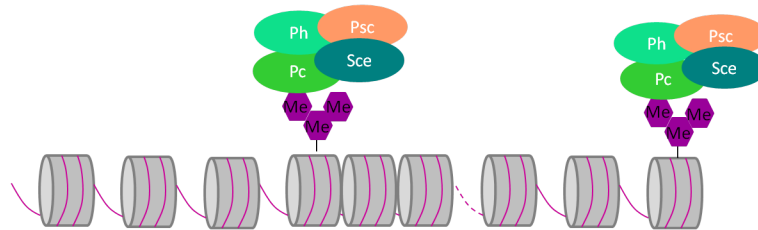


FIGURE 9: Le **complexe PRC1 chez la drosophile**. Composition du complexe PRC1 chez la drosophile. Le complexe est formé des protéines Pc, Scs, Ph et Psc.

Le complexe PRC1 est conservé chez les mammifères, composé respectivement des protéines CBX, RING1A/RNF2, PHC et BMI1/PCGF, table 3. La majeure différence entre les mammifères et la drosophile est la présence de nombreux orthologues des différentes protéines du complexe, différents complexes PRC1 peuvent être formés par exclusion mutuelle (Levine et al. 2002), figure 10.

PHC. Chez les mammifères il existe 3 orthologues de la protéine Ph : PHC1, PHC2 et PHC3. Les protéines PHC2 et PHC3 ont une plus grande homologie de

séquence. Elles possèdent deux domaines conservés dans la partie N-terminale (N-A et N-B) (Tonkin et al. 2002).

CBX. La protéine Pc est conservée chez les mammifères. Les invertébrés expriment une protéine Pc tandis que les mammifères expriment 5 orthologues : CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 et CBX8. Ils sont composés en N-terminale d'un chromodomaine (reconnaît la queue des histones), adjacent à ce domaine, un domaine de liaison à l'ADN, AT-hook-like (ATHL) (se lie à l'ADN) et en C-terminale d'un domaine Polycomb Repressor Box (permet l'interaction avec les protéines du complexe PRC1, homologues de Sce) (figure 11).

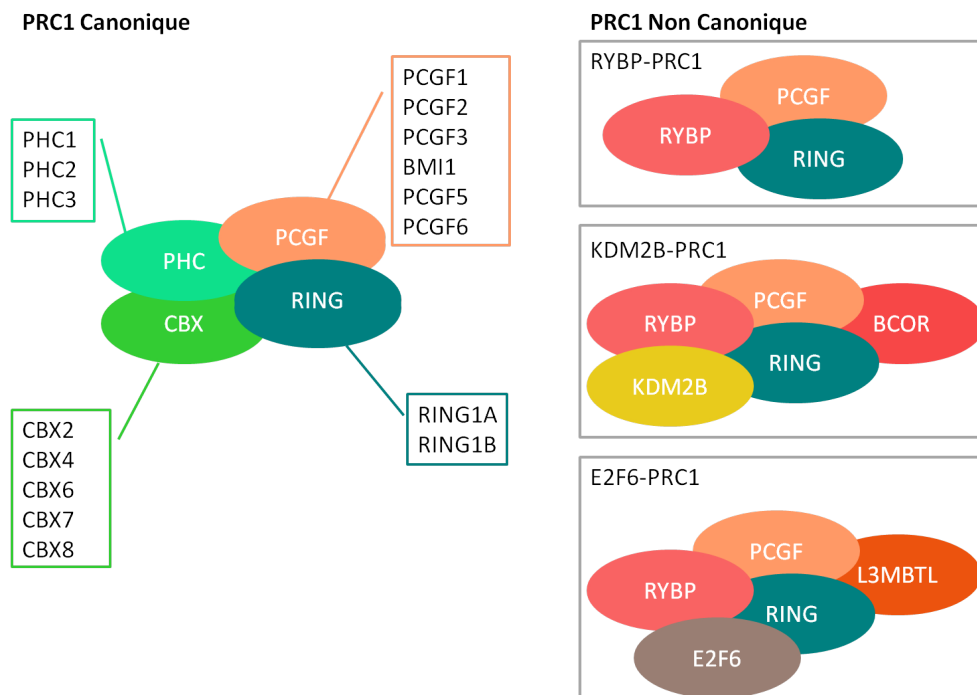


FIGURE 10: **Composition des complexes PRC1 canoniques et non canoniques.**

Les complexes canoniques contiennent les sous-unités CBX, les complexes non canoniques peuvent contenir RYBP, KDM2B et E2F6. Figure adaptée de Gil et al. 2014.

PCGF. La protéine Psc est conservée chez les mammifères. Il existe 6 orthologues : PCGF1, PCGF2, PCGF3, BMI1, PCGF5 et PCGF6 (Connelly et al. 2017).

Nom utilisé	Alias
CBX2	M33, PC1
CBX3	HP1 γ
CBX4	HPC2, PC2
CBX8	HPC3, PC3
PCGF1	NSPC1, RNF68
PCGF2	MEL18, MEL-18, RNF110, Zinc Finger Protein 144
PCGF3	RNF3
BMI1	PCGF4, RNF51
PCGF5	RNF159
PCGF6	MBLR, RNF134
RING1A	RNF1
RNF2	RING1B, RING2, HIPI3
PHC1	HPH1, RAE28, PH1, MHP1, Polyhomeotic-like 1
PHC2	HPH2, PH2, Polyhomeotic-like 2
PHC3	HPH3, PH3, Polyhomeotic-like 3
KDM2B	FBXL10, NDY1, JHDM1B

TABLE 3: Les différents noms des protéines du complexe PRC1 trouvés dans la littérature.

RING. Les orthologues de la protéine Sce sont RING1A et RNF2. L'expression de la protéine Ring1A est indispensable pour l'organisation de l'axe antéro-postérieur de la drosophile (Gorfinkiel et al. 2004). Ce complexe catalyse la marque H2AK119ub1. L'absence de Rnf2 cause une perte de H2AK119ub1, l'arginine 70 contenue dans le domaine Ring est indispensable à l'activité catalytique de Rnf2 (Wang et al. 2004a).

2.1.1 Activité et formation des complexes PRC1

Activité. La formation minimale du complexe PRC1 requiert les protéines Sce et Psc chez la drosophile. Ce complexe agit comme une E3 ligase qui catalyse la mono-ubiquitination de l'histone H2A au niveau de la lysine 118 (H2AK118ub1) (figure 12). L'ubiquitination de l'histone H2A contrôle l'interaction entre les nucléosomes (Levinger et al. 1982).

Chez les mammifères, les protéines Ring1A et Rnf2 catalysent la marque H2AK119-ub1. Buchwald et al. 2006, mettent également en évidence le rôle de Bmi1 dans l'ubiquitination de H2AK119 par Ring1A et Rnf2. Rnf2 entoure Bmi1 avec sa partie

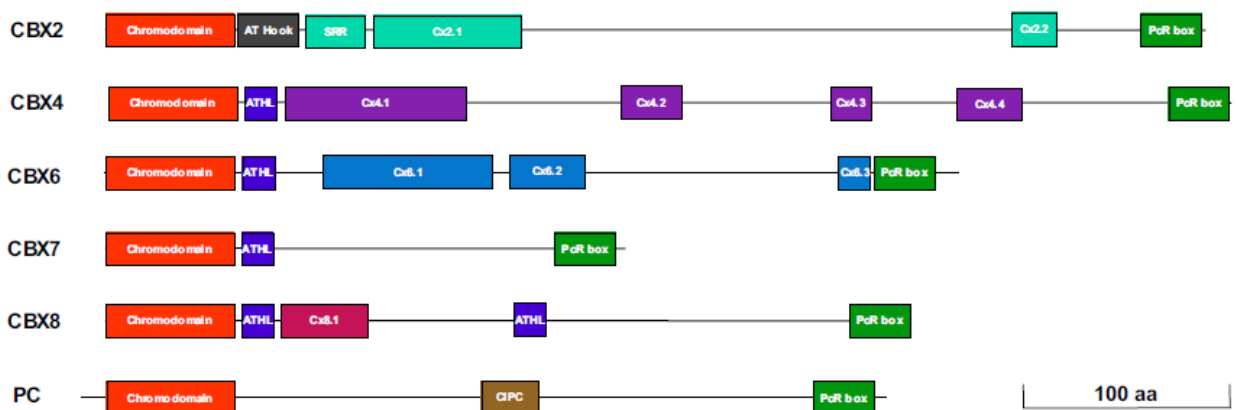


FIGURE 11: **Représentation schématique des régions conservées des homologues de Pc.** ATHL : AT Hook-Like, régions conservées pour CBX4, CBX6, CBX7 et CBX8, CIPC : région conservée chez les insectes, PcR box : Polycomb Repressor Box, SRR : région riche en sérine. Figure de Senthilkumar et al. 2009.

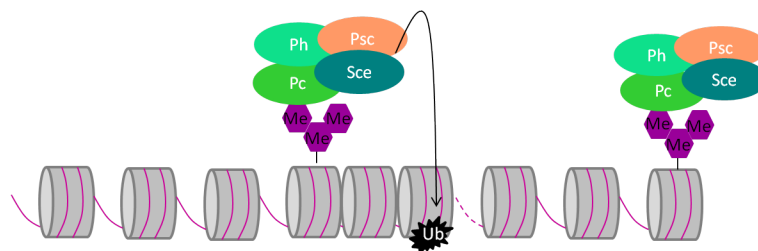


FIGURE 12: **Mono-ubiquitination de la lysine 118 de l'histone H2A (H2AK118ub1) par le complexe PRC1 chez la drosophile.** L'ajout de la marque H2AK118ub1 permet de contrôler l'expression génique chez la drosophile.

N-terminale. Cette interaction permet un meilleur transfert de l'ubiquitine (Li et al. 2006).

Formation de différents complexes PRC1. Les complexes PRC1 diffèrent par leur composition et leur localisation, très peu sont co-localisés à la marque H3K27me3. Cela suggère que chaque complexe PRC1 possède des cibles et des fonctions biologiques différentes. La présence des protéines CBX définit les complexes PRC1 canoniques, et leur absence les complexes PRC1 non canoniques. Les complexes canoniques et non canoniques sont capables de compacter la chromatine (Gao et al. 2012).

2.1.2 Régulation de l'expression

Le complexe PRC1 régule l'expression génique via la compaction de la chromatine. Pour cela, un complexe peut compacter 3 nucléosomes (Francis et al. 2004). Lorsque le complexe PRC1 est présent l'ARN polymérase ne peut pas initier la transcription.

Un modèle de drosophile mutant pour *Sce* et déficient en H2AK118ub1 (équivalent de H2AK119ub1 chez les mammifères) ne présente pas de phénotype caractéristique des mutants Polycomb mais meurt à la fin de l'embryogénèse. La répression des gènes cibles du PRC1 est maintenue, notamment au niveau des gènes Hox (Pengelly et al. 2015). Chez la drosophile, le complexe PRC1 bloque le remodelage de la chromatine par le complexe Swi/Snf, ceci pourrait être due au fait que le PRC1 et Swi/Snf lient des séquences identiques ou se chevauchant à la surface du nucléosome (Shao et al. 1999, Dellino et al. 2004). H2AK119ub1 bloque l'ARN polymérase II au début de l'élongation (Zhou et al. 2008).

Pemberton et al. 2014, rapportent que différents complexes PRC1 peuvent être fixés à la même séquence d'ADN. Dans les fibroblastes, les complexes PRC1 possèdent des sites de liaison communs ce qui suggère qu'ils agissent collectivement plutôt qu'individuellement.

Le complexe PRC1 est nécessaire au maintien de la compaction de la chromatine dans les cellules souches embryonnaires (ESC) au niveau des loci HoxB et HoxD. Dans les cellules ES le recrutement du PRC1 dépend de la marque H3K27me3, l'inactivation du gène *Eed* est corrélée à la perte de liaison du complexe PRC1 et l'absence de répression génique (Eskeland et al. 2010).

Chez de nombreux organismes 5% à 15% des histones H2A sont mono-ubiquitinylées au niveau de la lysine 119. Chez les femelles H2AK119ub1 est retrouvée au niveau du chromosome X inactif. Cette marque est déposée par les protéines Ring1A et Rnf2 qui présentent une fonction redondante dans l'inactivation du chromosome X (de Napoles et al. 2004).

2.1.3 Le complexe PRC1 canonique

Vandamme et al. 2011, ont mis en évidence que chaque protéine CBX fait partie d'un complexe PRC1 différent et interagit avec différentes protéines du complexe PRC1. Ils identifient 20 protéines co-éluées avec CBX2 et CBX7, 40 protéines éluées avec CBX4 et 60 avec CBX6 et CBX8. Les protéines BMI1, PCGF2, PCGF6, PHC2, RING1A et RNF2 ne sont éluées qu'avec les CBX4, CBX7 et CBX8. La protéine CBX6 interagit avec PHC2, RNF2 et RING1 mais pas les protéines de la famille BMI1/PCGF. Ces résultats suggèrent que les protéines CBX possèdent des affinités différentes pour les autres membres du complexe PRC1. Les protéines PHC2 et RNF2 sont les seules composantes du complexe PRC1 qui interagissent avec tous les CBX.

Par la suite Gao et al. 2012 mettent en évidence l'existence de 6 complexes PRC1 contenant chacun une unité PCGF distincte couplée à RING1A/RNF2, PRC1.1 à PRC1.6 (figure 13).

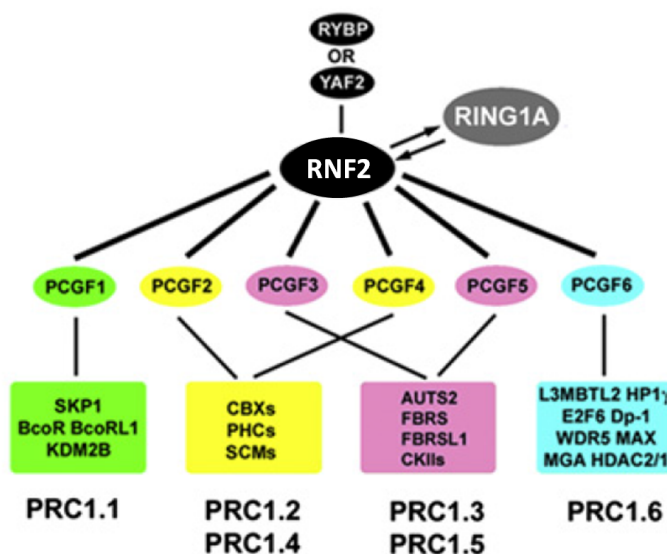


FIGURE 13: Les protéines PCGF forment différents complexes. Chaque protéine PCGF forme un complexe PRC1 différent. Figure adaptée de Gao et al. 2012.

Les CBX sont importants pour le recrutement des complexes canonique à la chromatine. Cao et al. 2002, ont montré que les protéines Polycomb Pc (Homologues chez les mammifères : CBX) ont la capacité de se fixer à H3K27me3 par

leur chromodomaine via une interaction hydrophobe (Kaustov et al. 2011). Chez les mammifères, les CBX possèdent deux acides aminés essentiels et conservés sont importants pour cette interaction, le Trp 47 et le Trp 50 (Min et al. 2003). La liaison des complexes PRC1 contenant Pc au niveau de la marque H3K27me3 réprime l'expression génique (Wang et al. 2004b). Cbx2 recrute le complexe PRC1 au niveau de l'hétérochromatine péricentrique via son chromodomaine et son domaine ATH (AT hook) (Tardat et al. 2015).

2.1.4 Complexes PRC1 non canoniques

Les complexes PRC1 formés en l'absence des protéines CBX sont appelés non canoniques. Différentes protéines peuvent s'associer à RING1A/RNF2 et aux PCGF pour former les complexes non canoniques (table 4).

RYBP. La protéine RYBP qui lie Ring1A/Rnf2 et YY1, est une protéine avec des motifs en doigt de zinc essentielle au développement embryonnaire. Cette protéine seule ne possède pas de structure secondaire ni tertiaire. La protéine acquiert une conformation uniquement lorsqu'elle se lie via sa partie C-terminale à Ring1A/Rnf2 ou à l'ADN (Neira et al. 2009). La présence de RYBP stimule l'activité catalytique de RNF2, elle joue un rôle central dans l'activité du complexe PRC1. L'inactivation de RYBP cause une absence de maintenance de la marque H2AK119ub1 et un défaut de prolifération des cellules ES.

La protéine Rybp est capable de lier H2AK119ub1, ainsi le recrutement de PRC1 est favorisé et permet de maintenir le contrôle de l'expression génique (Arrigoni et al. 2006). Le complexe Rybp-PRC1 est retrouvé dans les cellules souches embryonnaires murines, le recrutement est indépendant de la marque H3K27me3 (Tavares et al. 2012). L'association des protéines Rybp, Cbx et Rnf2 est indispensable à la stabilité de la liaison à la chromatine des complexes canoniques et la régulation de l'expression génique (Wang et al. 2010b).

KDM2B. KDM2B est une déméthylase de la lysine 36 de l’histone H3. Elle peut être coimmunoprécipitée avec BCOR, RING1A, RYBP, PCGF et RNF2. Ce complexe est co-localisé avec H2AK119ub1. BCOR recrute à la fois une E3 ligase et une histone déméthylase ce qui suggère qu’elle crée une combinaison unique pour contrôler les modifications épigénétiques régulant l’expression génique (Gearhart et al. 2006). L’interaction de Kdm2b avec Bcor, Lsd1/Aof2 et Rnf2 a été mise également en évidence par Sánchez et al. 2007.

Chez la souris, Kdm2b interagit avec Ring1b et Pcgf1, ce complexe est requis pour H2AK119ub1 dans les cellules ES. La délétion de Kdm2b cause une diminution de la liaison de Rnf2 au niveau des gènes cibles et une perte de H2AK119ub1 (figure 14) (Wu et al. 2013).

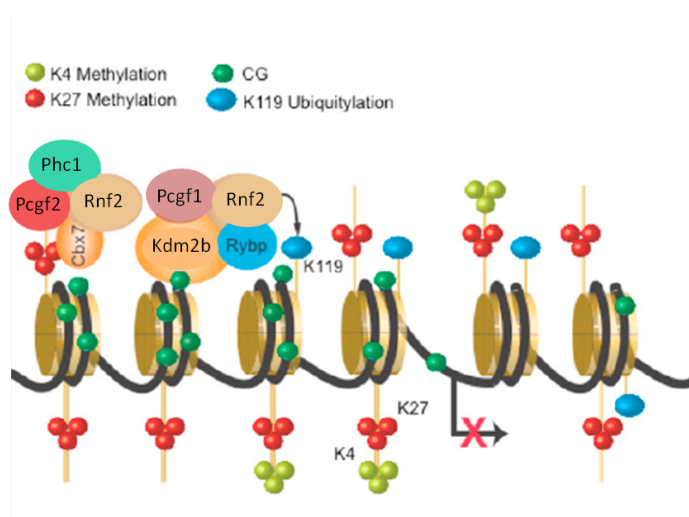


FIGURE 14: **Recrutement via Kdm2b.** Le complexe PRC1 contenant Kdm2b est recruté au niveau des séquences d’ADN riches en îlots CpG. Le complexe PRC1 catalyse la marque H2AK119ub1. Figure adaptée de Wu et al. 2013.

Blackledge et al. 2014, mettent en évidence que le complexe PRC1 composé de PCGF1/ KDM2B permet le recrutement du PRC2 via H2AK119ub1.

La réduction de Kdm2b conduit à une diminution de Rnf2 liée à la chromatine et une perte de H2AK119ub1 (Farcas et al. 2012). Le complexe PRC1 non canonique formé par Kdm2b, Pcgf1 et Rnf2 ; est requis pour la formation de H2AK119ub1 dans les cellules souches embryonnaires murines. Les cellules n’exprimant pas Kdm2b ne se différencient pas correctement. Wu et al. 2013 montrent que Kdm2b est indis-

pensable au recrutement de Rnf2 aux gènes cibles via son domaine CXXC afin de catalyser H2AK119ub1.

E2F6. E2F6 associée à L3MBTL2, HPl γ , RING1A, RNF2 et PCGF6 forme le complexe PRC1 like 4 (PRC1L4). Ce complexe compacte la chromatine, son recrutement ne dépend pas de H3K27me3 (Trojer et al. 2011). La protéine E2F-6 se lie à l'ADN et s'associe aux protéines RING1A, RNF2, PCGF6, H-1(3)mbt-like protein et YAF2. Ce complexe est appelé E2F6.com-1. Grâce à son domaine de liaison E2F-6 recrute le complexe PRC1 à la chromatine et pourrait former une plateforme permettant la propagation de la chromatine compactée (Ogawa et al. 2002).

Complexe PRC1 non canonique	Homologues		Autres protéines associées	Références
	Psc	Sce		
PRC1-1/ Complexe BCOR	PCGF1	RING1A/RNF2	BCOR, KDM2B, RYBP, SKP1	Gearhart et al. 2006
PRC1-2	PCGF2	RING1A/RNF2	PHC2, CBX8	Elderkin et al. 2007
PRC1L4	PCGF6	RING1A/RNF2	L3MTBLT2, HPl γ , E2F6	Trojer et al. 2011

TABLE 4: Variation du complexe PRC1 non canonique chez l'Homme.

2.2 Autres recrutement à la chromatine du complexe PRC1

Il existe d'autres mode de recrutement du complexe PRC1 à la chromatine par des ARN non codant ou par des protéines.

2.2.1 Recrutement via les ARN non codants

ANRIL. L'ARN non codant ANRIL interagit avec CBX7 et contrôle l'expression du locus INK4B/ARF/INK4a (Yap et al. 2010).

Xist. Rnf2 est recrutée par Xist et catalyse H2AK119ub1. Lorsque le complexe PRC2 est absent, l'inactivation du chromosome X n'est pas altérée. Une fois mise en place la structure de la chromatine se maintient seule et ne nécessite ni Xist, ni PRC1, ni PRC2. Il existe une mémoire chromosomique (Schoeftner et al. 2006).

PANDA. Dans les cellules en prolifération, l'ARN non codant PANDA et la protéine SAFA (Scaffold Attachment Factor A) interagissent avec le complexe PRC1-BMI1 et la protéine SAFA avec le complexe PRC2. Ainsi, PANDA et SAFA permettent la répression des gènes impliqués dans la sénescence. Dans les cellules sénescentes, les complexes PRC1 et PRC2 ne sont plus recrutés et PANDA interagit avec NF-YA (un facteur de transcription capable de se lier à l'ADN et à l'ARN) afin de promouvoir le processus de sénescence (figure 15) (Puvvula et al. 2014).

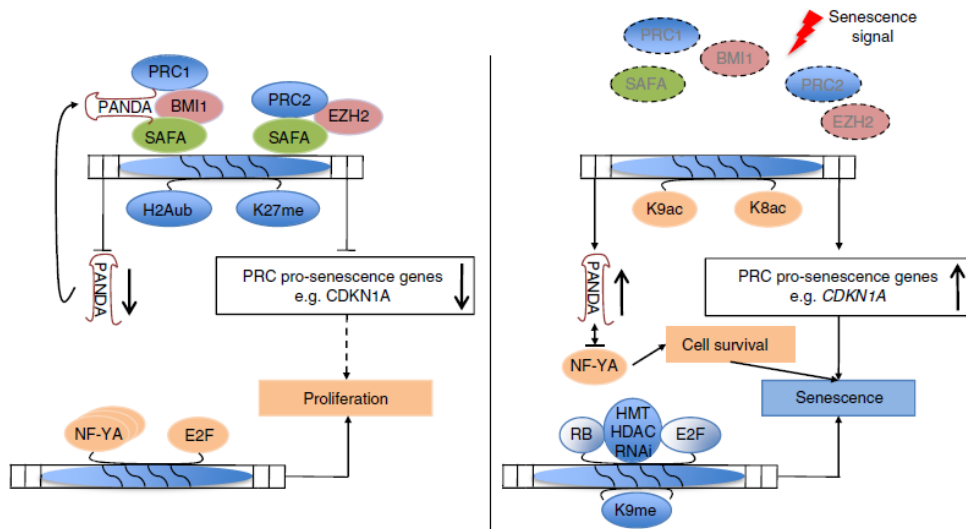


FIGURE 15: Rôle du complexe PRC1 dans la sénescence. Contrôle de l'entrée en sénescence via l'ARN PANDA. L'ARN PANDA dans les cellules prolifératives (à gauche) interagit avec le complexe PRC1-BMI1 et SAFA. SAFA interagit également avec le complexe PRC2. Ainsi ces deux complexes sont amenés au niveau des loci associés à la sénescence et les répriment. Les signaux favorisant la sénescence dissocient les complexes formés par PANDA-PRC1 et SAFA-PRC2. PANDA interagit avec NF-YA et favorise l'entrée en sénescence (à droite). PANDA régule son expression via la liaison des complexes PRC1 et PRC2 à son locus. Figure de Puvvula et al. 2014.

2.2.2 Par les protéines.

PRE-like. Chez la drosophile, les séquences PRE (Polycomb Responsive Element) permettent de recruter les protéines Polycomb. Cependant ces séquences ne sont pas retrouvées chez les mammifères. Woo et al. 2010, mettent en évidence une séquence entre les gènes HOXD11 et HOXD12 associée aux protéines Polycomb et similaire aux séquences PRE retrouvées chez la drosophile. La répression de cette région dépend des protéines YY1, RYBP, BMI1 et EED, .

RUNX1. Le complexe PRC1 peut également être recruté par des facteurs de transcription, comme Runx1/CBF β (Arnold et al. 2013, Yu et al. 2012). Rnf2 est trouvée au niveau des sites de liaison de Runx1 dans les thymocytes primaires murins. La réduction de Runx1 cause une perte de liaison de Rnf2 à ces sites.

REST. Rest est un facteur de transcription qui interagit avec les Cbx dans les cellules ES de souris et se lie aux séquences RE1. La délétion de Rest cause une diminution de la liaison du PRC1 au niveau des sites distaux à RE1 mais cause une augmentation de sa liaison au niveau des sites proximaux. Ainsi le recrutement de PRC1 varie en fonction de la distance aux éléments RE1, Rest favorise le recrutement de PRC1 uniquement aux sites distaux à RE1 alors que le PRC1 interagit directement avec la chromatine aux sites proximaux. Rest peut à la fois favoriser la liaison du PRC1 et entraîner la répression génique (figure 16) (Ren et al. 2011, Dietrich et al. 2012)

En conclusion, afin de réguler l'expression génique le PRC1 peut être recruté à la chromatine par différents mécanismes, figure 17.

2.3 PRC1, devenir cellulaire et développement

Il existe une grande diversité de complexe PRC1 en fonction des protéines qui le compose. Les protéines du PRC1 sont impliquées dans le développement. En effet, la composition du complexe peut contrôler le maintien ou la différenciation des cellules

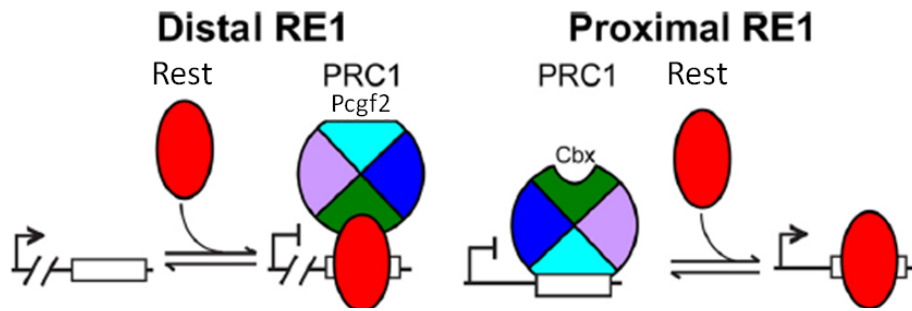


FIGURE 16: **Rôle de REST dans la liaison du complexe PRC1 en fonction de la distance aux éléments RE1.** Représentation de différents complexes PRC1 par différentes couleurs. La configuration du PRC1 influence le rôle de REST pour la liaison aux éléments RE1. Les Cbx (verts) peuvent se lier à REST. REST favorise la liaison du complexe PRC1 aux sites distaux de RE1 (partie gauche). Le PRC1 se lie directement à la chromatine aux sites proximaux (partie droite). Figure adaptée de Ren et al. 2011.

souches. Les différents complexes, contrôlent la spécification tissulaire grâce à leur expression particulière (Luis et al. 2012, Gil et al. 2014).

La protéine catalytique Rnf2 est importante dans le développement embryonnaire. Chez la souris, l'inactivation de Rnf2 est à l'origine d'un arrêt du développement au stade gastrulation (Voncken et al. 2003). La génération d'un modèle murin portant un allèle hypomorphe Rnf2 génère des anomalies postérieures du squelette axial et au niveau du mésoderme, une dé-répression de certains gènes *Hox*, (*Hoxb4*, *Hoxb6* et *Hoxb8*). Chez le poulet, la surexpression de Rnf2 réprime *HoxB9* dans le tube neural. Ainsi, Rnf2 régule les gènes *Hox* de façon tissu spécifique (Suzuki et al. 2002).

Les protéines Cbx sont également indispensables à la répression génique et peuvent se coordonner afin de contrôler l'expression (Moazed et al. 1992). En effet, Cbx2 est impliquée dans la spécification de l'axe antéro-postérieur chez la souris (Schoorlemmer et al. 1997). L'inactivation de *cbx2* cause des anomalies du développement des gonades, des surrénales et de la rate. Cbx2 est impliquée dans la différenciation sexuelle en régulant l'expression de *Sry* (Katoh-Fukui et al. 2012).

La protéine Cbx4 est fortement exprimée dans l'épithélium thymique et est importante pour l'organogénèse et la maintenance de l'épithélium. L'inactivation de *cbx4*

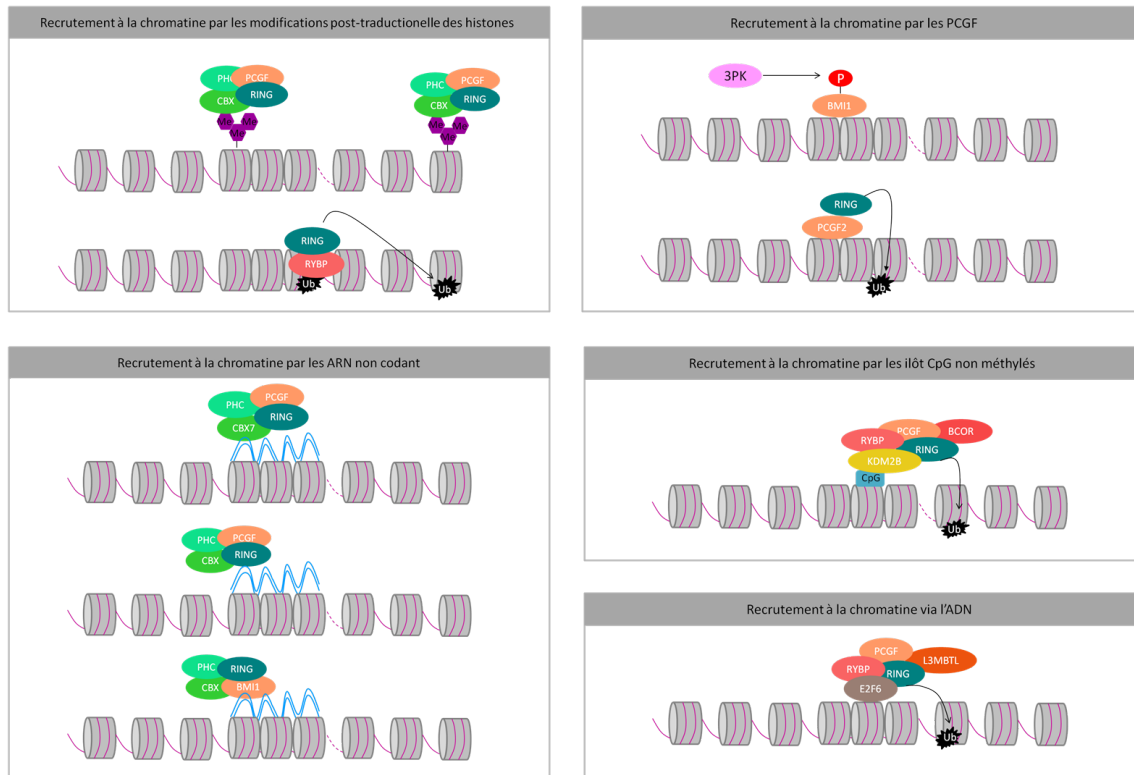


FIGURE 17: Les différents modes de recrutement des complexes PRC1. Le complexe PRC1 peut être recruté au niveau de la chromatine par différents mécanismes. Les protéines CBX ont la capacité de lier H3K27me3 catalysée par le complexe PRC2. Le complexe PRC2 peut reconnaître H2AK119ub1 et permettre une auto-amplification de la catalyse de H2AK119ub1. La protéine RYBP peut lier la marque H2AK119ub1. Les ARN non codants recrutent le complexe PRC1 au niveau de la chromatine via CBX7, RING ou BMI1. BMI1 peut se lier à la chromatine lorsqu'elle a été phosphorylée par 3PK, PCGF2 peut également recruter RING à la chromatine. Le PRC1 peut être recruté par les protéines composant les complexes non canoniques comme KDM2B et E2F6.

est à l'origine d'une grave hypoplasie du thymus foetal due à une diminution de la prolifération cellulaire. Cbx4 interagit avec p63 impliquée dans la maintenance du caractère souche des progéniteurs épithéliaux (Liu et al. 2013).

Le modèle des cellules ES met en évidence la complexité et la dynamique d'expression des protéines CBX. Lors de la différenciation des cellules ES, l'expression de Cbx7 est diminuée alors que l'expression de Cbx2, Cbx4 et Cbx8 est augmentée. Ces dernières sont réprimées par Cbx7 dans les cellules ES. Une expression ectopique de Cbx7 inhibe la différenciation cellulaire, inhibe l'inactivation du chromosome X et favorise l'auto-renouvellement des cellules ES. A l'opposé l'inactivation de

cbx7 induit la différenciation et permet l'expression des marqueurs lignée-spécifique. L'expression de cbx7 est régulée par les miR-125 et miR-181 (exprimés lors de la différenciation) (figure 18) (O'Loghlen et al. 2012).

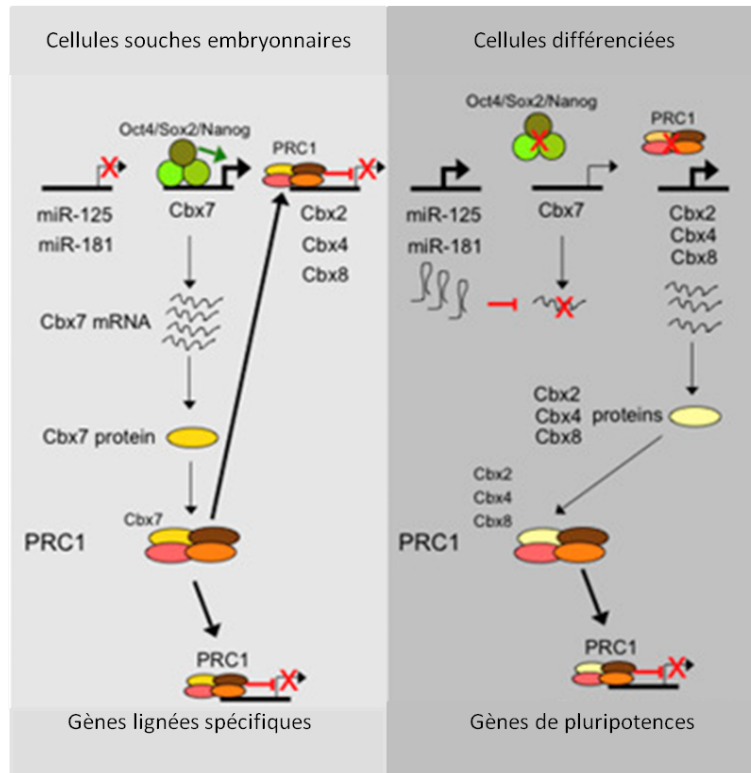


FIGURE 18: **Cbx7 contrôle l'expression de Cbx2, Cbx4 et Cbx8 dans les cellules ES.** L'expression de Cbx7 permet de maintenir le statut indifférencié des cellules ES grâce aux facteurs de pluripotence Oct4, Sox2 et Nanog. En l'absence de ces facteurs de pluripotence, Cbx7 va être réprimée par les miR6125 et 181. L'expression de Cbx2, Cbx4 et cbx8 conduit à l'expression des gènes de différenciation. Figure de O'Loghlen et al. 2012.

Cbx7 est exprimée dans les cellules souches hématopoïétiques, favorise leur auto-renouvellement et est impliquée dans l'initiation de certaines leucémies. Cbx7 et Cbx8 partagent les mêmes gènes cibles. Ainsi, l'expression des protéines Cbx7 et Cbx8 crée une balance entre auto-renouvellement et différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Klauke et al. 2013). La pluripotence des ESC est régulée par l'association des différents CBX (CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 et CBX8) pour former le complexe PRC1. La maintenance de la pluripotence dépend de Cbx7 alors que la différenciation et le devenir cellulaire dépendent de Cbx2 et Cbx4. En effet, la protéine Cbx7 réprime l'expression des Cbx pro-différenciation afin de maintenir

l'état de pluripotence. De plus, l'expression de Cbx7 est directement régulée par les facteurs de pluripotence, le facteur Oct4 est lié à son promoteur.

Le recrutement de Cbx7 au niveau des promoteurs dépend de la marque H3K27me3. Lors de la différenciation Cbx2 et Cbx4 sont couplées à Rnf2 mais pas Cbx8. Différents complexes PRC1 sont formés au cours de la différenciation des ESC. Les protéines Cbx permettent de recruter le complexe PRC1 au niveau de différents loci et permettent de moduler la balance auto-renouvellement et différenciation des ESC (Morey et al. 2012).

Les protéine PCGF sont également impliquées dans le contrôle du devenir cellulaire. Effectivement, Pcgf2 est requis pour la différenciation des cellules cardiaques. Les sous-unités composant le complexe PRC1 contenant Pcgf2 changent de façon stade spécifique et permettent ainsi de contrôler l'expression génique, le devenir et la différenciation cellulaire. Les mutants Pcgf2 meurent juste après la naissance. Pcgf5 pourrait compenser la perte de Pcgf2 (Morey et al. 2015). Les souris déficientes pour Bmi1 ont des anomalies du squelette axial et présentent une déficience du système immunitaire. Le phénotype est identique lorsque Pcgf2 est inactivée. Pcgf2 et Bmi1 agissent en synergie pour réprimer les gènes Hox de façon cellule spécifique. Pcgf2 et Bmi1 contrôlent la survie cellulaire lors du développement embryonnaire, les embryons doubles mutants Bmi1 et Pcgf2 meurent à 9.5 jours (Akasaka et al. 2001). Bmi1 est indispensable à l'intégrité du complexe PRC1 car elle interagit avec les différentes sous unités du complexe (Wei et al. 2006). La surexpression de Bmi1 cause l'augmentation des progéniteurs multipotents et favorise le renouvellement de la population des cellules souches hématopoïétiques via la répression de l'expression de p16 et p19. L'absence de Bmi1 entraîne un déficit de l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques. Ces résultats montrent un rôle central de Bmi1 dans le renouvellement des cellules souches hématopoïétiques et soulignent l'intérêt de cibler Bmi1 en thérapie (Iwama et al. 2004, van der Lugt et al. 1994).

Les souris déficientes pour Phc2 ont des anomalies de la partie postérieure du squelette axial et une sénescence prématurée des fibroblastes embryonnaires. Les gènes

Hox et *Cdkn2a* ne sont plus réprimés. Elles agissent en synergie pour réprimer les gènes *Hox* (Isono et al. 2005).

Pcgf1 interagit avec Rnf2 pour ajouter la marque H2AK119ub1. Le PRC2 ajoute H3K27me3 et permet le recrutement de Pcgf1 et Dnmt1 (méthylation de l'ADN). La méthylation de l'ADN et l'ajout de H2AK119ub1 par Pcgf1 sont deux mécanismes différents mais interdépendants. Ces deux mécanismes contribuent à la formation de plus de marques répressives et participent à la répression de *HoxA7* (Wu et al. 2008).

Zdzieblo et al. 2014, mettent en évidence que Pcgf6 est le seul paralogue exprimé dans les cellules ES indifférenciées, lors de la différenciation l'expression de Pcgf6 diminue. L'expression de Pcgf6 peut remplacer Sox2 dans la génération de cellules souches pluripotentes induites (iPS). Pcgf6 unie à Ring1A/Rnf2 et E2F6 est associée aux promoteurs des gènes marqueurs de cellules germinales et impliquée dans la méiose. L'inactivation de *pcgf6* engendre un défaut de prolifération cellulaire et viabilité. Pcgf6 joue également un rôle dans la pré et péri-implantation de l'embryon de souris (Endoh et al. 2017).

Les protéines composant les complexes PRC1 non canonique sont également importantes lors du développement. La protéine L3mbtl2 recrute le complexe PRC1 non canonique composé de E2F6, Ring1b, G9A et Hdac1 dans les cellules ES. Les promoteurs ciblés par L3mbtl2 portent H2AK119ub1. L'inactivation de L3mbtl2 cause l'arrêt du développement de l'embryon de souris après implantation, un défaut de prolifération, l'absence de répression des gènes de différenciation des cellules ES (Qin et al. 2012).

Dans les cellules ES de souris, Rybp joue un rôle important dans le maintien de H2AK119ub1 et dans la communication entre le PRC1 et le PRC2. L'inactivation de *Rybp* est à l'origine de la réduction de H3K27me3 et H2AK119ub1. Sans les modifications post-traductionnelles des histones, la communication entre ces deux complexes n'est pas maintenue et l'expression génique est anormale. Les modifications des histones créent une mémoire requise pour la répression par les Polycomb

(Rose et al. 2016).

Les complexes PRC1 sont important lors de la mise en place des tissus mais également lors du vieillissement. L'inactivation de Bmi1 dans les fibroblastes embryonnaires de souris engendre une absence de progression en phase S et une sénescence prématurée. La surexpression de Bmi1 permet l'immortalisation des fibroblastes, la diminution d'expression de p16 et p19 (Jacobs et al. 1999).

Cbx8 régule la prolifération des cellules de fibroblastes de souris en se liant directement au locus Ink4a-Arf (Dietrich et al. 2007). Maertens et al. 2009, montrent que CBX7 et CBX8 répriment le locus Ink4a en s'associant à PCGF2 et BMI1. Leur inactivation permet l'expression du locus Ink4a et l'arrêt de la prolifération. CBX7 interagit avec l'ARN non codant ANRIL afin de réprimer le locus Ink4A/Arf et de contrôler l'entrée en sénescence (Yap et al. 2010).

CBX4 maintient la faible prolifération des cellules souches de l'épiderme indifférenciées et les protège de la sénescence via son activité SUMO en régulant des facteurs comme EZH2, DNMT1 et BMI1 (Luis et al. 2011).

L'inactivation de Kdm2b dans les fibroblastes embryonnaires de souris provoque l'inhibition de la prolifération cellulaire, induit la sénescence via les voies pRb et p53 et la perte de répression de p15^{ink4b}. Via son activité déméthylase Kdm2b contrôle l'expression de p15^{ink4b} afin de réguler la prolifération cellulaire et la sénescence (He et al. 2008).

Le maintien de l'expression de Kdm2b permet de contourner la sénescence des fibroblastes embryonnaires de souris grâce à son activité histone déméthylase, elle favorise l'expression d'Ezh2. L'expression de Kdm2b est faible lors de la sénescence. Kdm2b lie Ezh2 et permet sa liaison au locus Ink4A/Arf, ajoute la marque H3K27me3 qui recrute Bmi1 et permet de réprimer l'expression de ce locus (figure 19) (Tzatsos et al. 2009).

Ainsi, les protéines du complexe PRC1 contrôlent le devenir cellulaire et tissulaire, figure 20.

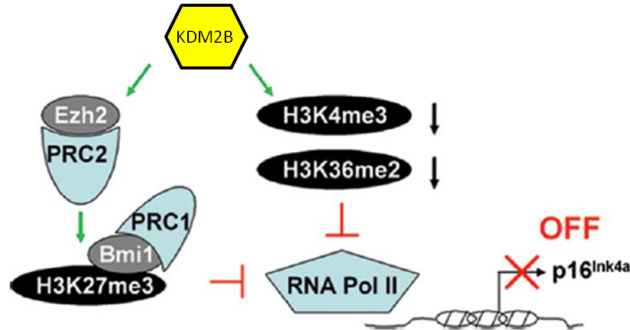


FIGURE 19: **Contrôle de l'expression du locus Ink4a/Arf par Kdm2b, Ezh2 et Bmi1.** Kdm2b cible le complexe PRC2-Ezh2 au locus Ink4a/Arf. Le PRC2 catalyse la marque H3K27me3 ce qui permet le recrutement du complexe PRC1 contenant Bmi1 afin de réprimer l'expression du locus. L'inhibition du locus est également mise en place par la perte des marques activatrices H3K4me3 et H3K36me2. Figure de Tzatsos et al. 2009.

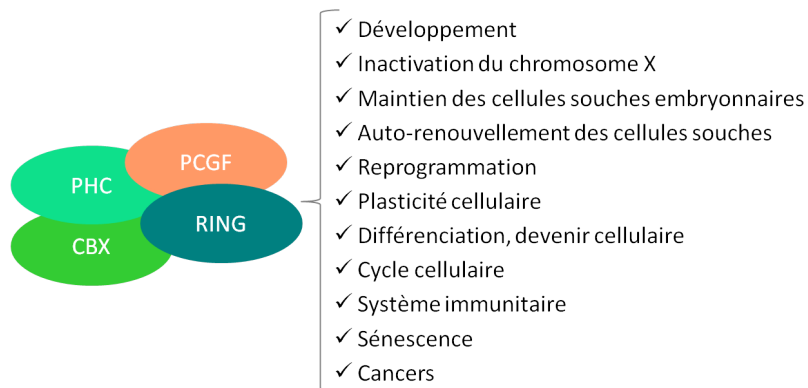


FIGURE 20: **Rôles du complexe PRC1 dans le devenir cellulaire.** Le complexe PRC1 contrôle le devenir cellulaire, la population de cellules souches, la sénescence, le développement cancéreux par son activité H2AK119ub1. Cette marque épigénétique permet de contrôler l'expression génique de façon cellule et tissu dépendant.

Chapitre 3

TALEN

3.1 Réparation des cassures d'ADN double brin

Chez les eucaryotes, les cassures d'ADN double brin peuvent être réparées par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) ou réparation par homologie (HR). La réparation par NHEJ a lieu durant les phases G0/G1 et au début de la phase S. La recombinaison homologue a lieu principalement dans les phases S/G2 (Grabarz et al. 2012, Lieber 2008, Burma et al. 2006).

Réparation par NHEJ. La majorité des réparations des cassures d'ADN est faite par le mécanisme de NHEJ. Des protéines sont indispensables à cette réparation : premièrement l'hétérodimère KU70/80 puis le complexe ADN ligase IV/XRCC4. Les protéines KU sont des protéines nucléaires qui ont une affinité pour les extrémités d'ADN, cette liaison ne nécessite pas d'énergie (Yano et al. 2009, Blier et al. 1993). KU recrute XLF (XRCC4-like factor) au niveau de l'ADN qui favorise le recrutement de XRCC4 (Yano et al. 2008). XRCC4 et les cassures d'ADN double brin favorisent l'interaction entre KU et l'ADN ligase IV (figure 21) (Costantini et al. 2007, Nick McElhinny et al. 2000, Mari et al. 2006). La liaison de l'ADN ligase IV via son domaine BRCT1 dépend de l'interaction entre la partie C-terminale de KU80 et l'ADN PKcs. L'ADN PKcs favorise la formation du complexe KU-ADN ligase IV et XRCC4. Le complexe XRCC4-ADN ligase IV permet de ressouder les extrémités de

la cassure d'ADN double brin (Wu et al. 2009). La réparation des cassures d'ADN doubles brins par ce mécanisme n'est pas précise. Lors de la réparation il peut y avoir des insertions et/ou délétions de nucléotides.

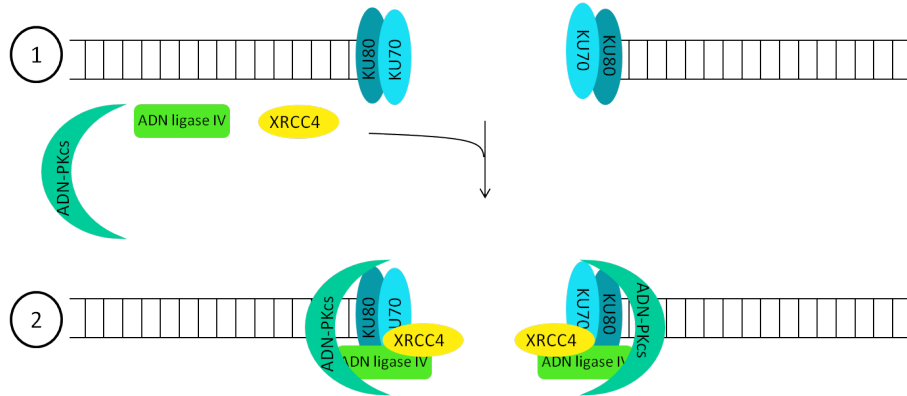


FIGURE 21: **Réparation des cassures d'ADN doubles brins par NHEJ.** Les cassures d'ADN double brin sont reconnues par l'hétérodimère KU70/KU80. L'ADN ligase IV, XRCC4 et l'ADN-PKcs vont être recrutées et permettre ainsi la réparation de la cassure d'ADN double brin par jonction des extrémités non homologues (NHEJ). Adaptée de Costantini et al. 2007.

Réparation par homologie (HR). La réparation par HR a lieu suite à la formation d'une cassure d'ADN double brin, les extrémités de cette cassure double brin vont être excisées afin de créer des extrémités 3'-OH. L'ADN simple brin ainsi formé va être reconnu par les protéines RPA. La protéine RAD52 ôte les protéines RPA afin de favoriser la liaison de RAD51 (qui favorise l'appariement des séquences homologues). La boucle D est formée afin que l'ADN polymérase synthétise l'extension du brin cassé. Il existe deux mécanismes qui permettent la synthèse du second brin cassé. Soit le brin est synthétisé en l'absence de la boucle D (SDSA, synthesis-dependent strand annealing), soit le brin est synthétisé en présence de la boucle D, cette formation cruciforme est appelée jonction Holliday et peut être la cause d'échanges entre chromatides (crossover). Les différentes étapes de la réparation par homologie sont résumées figure 22 (San Filippo et al. 2008, Tokunaga et al. 2016).

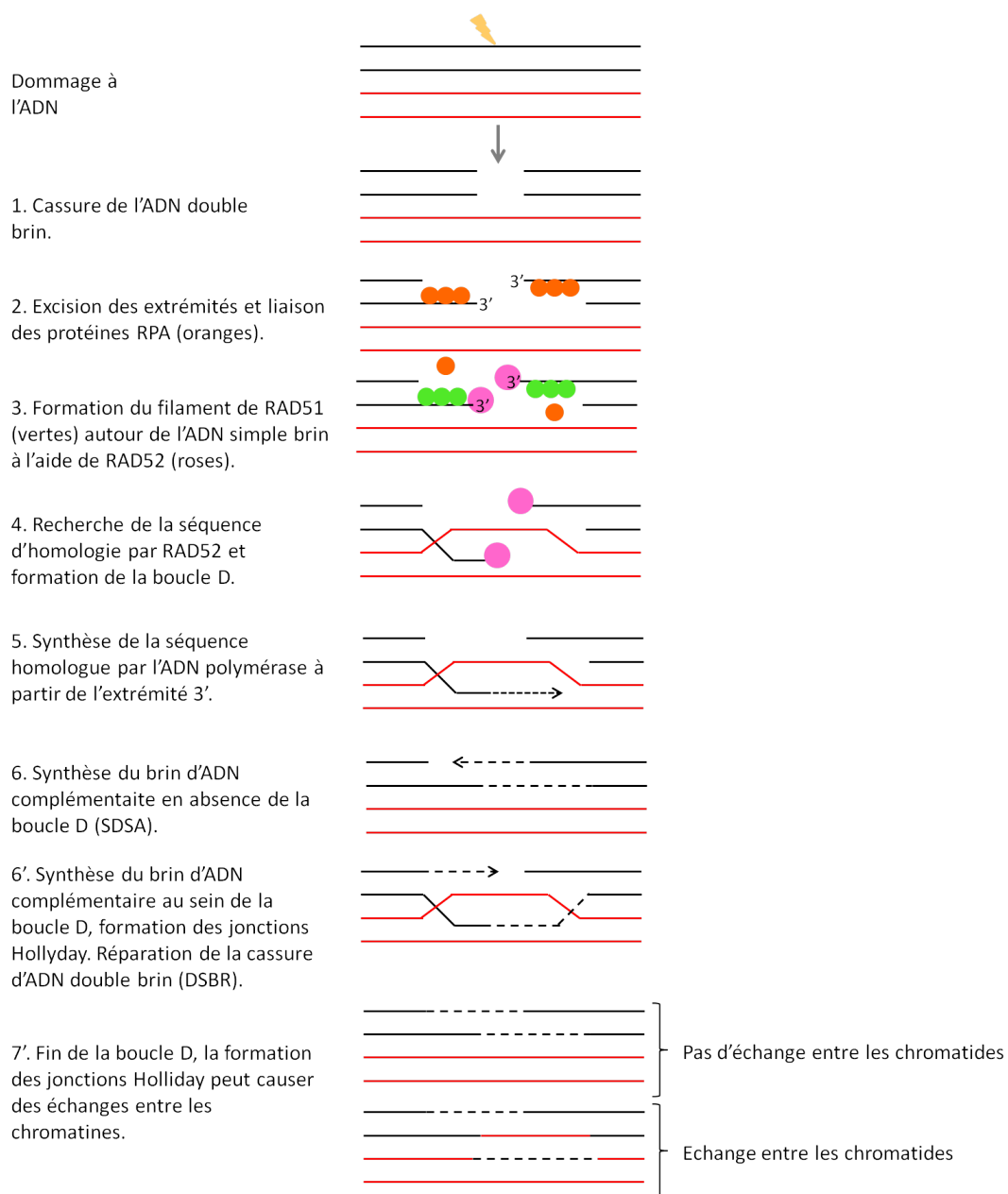


FIGURE 22: **Réparation des cassures d'ADN doubles brins par HR.** Les cassures d'ADN doubles brins peuvent être réparées par recombinaison homologue grâce à un double brin d'ADN homologue. Des extrémités d'ADN simple brin vont être formées pour permettre à RAD52 de chercher une séquence homologue et synthétiser la séquence d'ADN endommagée.

3.2 Les ZFN

Les Zinc-Finger Nucleases (ZFN), sont composés du domaine de clivage à l'ADN de l'endonuclease FokI fusionnée aux protéines zinc-finger (doigt de zinc). Les pro-

téines doigt de zinc proviennent du facteur de transcription IIIA chez le Xénope (*Xenopus laevis*) (Miller et al. 1985). FokI agit sous forme de dimère. Chaque dimère est lié à une répétition de protéines doigt de zinc (demi-site). Un demi-site reconnaît une séquence spécifique d'ADN. La spécificité des ZFN peut être altérée par l'homodimérisation de FokI. Afin de répondre à ce problème, Miller et al. 2007, développent un variant FokI dont l'homodimérisation n'est pas possible. Ce variant permet donc d'améliorer la spécificité des ZFN.

Chaque demi-site est composé de 3 à 6 protéines doigt de zinc ; ils sont séparés par 5 à 6 paires de bases. La dimérisation des deux demi-sites associés à FokI permet la cassure d'ADN doubles brins. Elle peut être réparée par NHEJ ou HR (Urnov et al. 2010).

Une protéine doigt de zinc est composée de 30 acides aminés organisés en une hélice α et deux feuillets β . Ce sont les acides aminés de l'hélice α qui se lient à l'ADN (figure 23). Une protéine doigt de zinc se lie à 3 nucléotides (figure 23B). Les ZFN sont assemblés de façon à reconnaître 9 paires de bases (18 paires de bases après dimérisation) de façon spécifique (Gaj et al. 2013).

Les ZFN ont été utilisés pour éditer les génomes *in vivo* (drosophile, souris, rat, poisson zèbre, lapin et bovin) (Chou et al. 2012). Les ZFN ont été testés en phase I d'essai clinique pour corriger l'expression du récepteur CCR5 chez les patients atteints du SIDA. En effet, le récepteur CCR5 est un des co-récepteurs majeurs de l'entrée du virus VIH-1. Les patients qui possèdent une délétion homozygote dans ce gène sont résistants au virus. C'est pour cette raison que Perez et al. 2008 ont développé des ZFN qui ciblent le gène CCR5 dans les lymphocytes T CD4+ humains. Ainsi, les ZFN permettent de réaliser l'édition du génome sans nécessiter l'intégration d'une séquence d'ADN étrangère.

L'absence de code de reconnaissance des nucléotides et la difficulté d'assemblage des ZFN limite leur utilisation. Actuellement, les TALEN et CRISPR sont plus couramment utilisés.

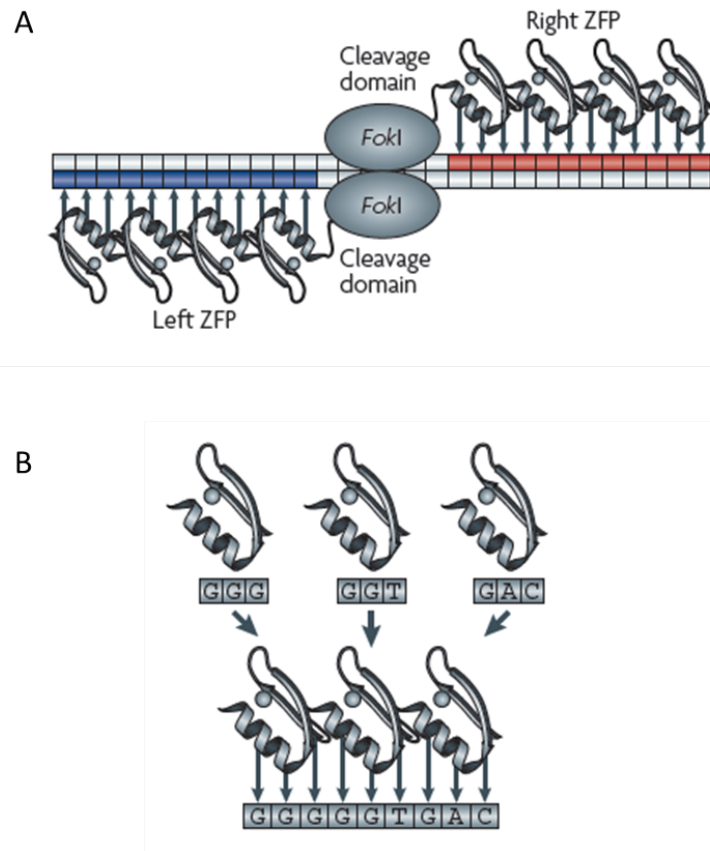


FIGURE 23: **La liaison des ZFN à l'ADN.** **A.** Schéma de la liaison d'un dimère de ZFN (composé de 4 protéines zinc-finger) à l'ADN. Chaque ZFN contient un assemblage de 3 à 6 protéines zinc-finger associé à un domaine FokI. Chaque ZFN reconnaît une séquence spécifique (rouge ou verte) séparée par 5 ou 6 nucléotides. **B.** Schéma d'une protéine zinc-finger. Chaque protéine reconnaît 3 nucléotides. (Figure de Urnov et al. 2010).

3.3 Le TALEN

Ce sujet a fait l'objet d'une revue par le laboratoire (annexe).

3.3.1 Description du TALEN.

Le TALEN est composé du domaine de liaison à l'ADN des TALE (Transcription Activator Like-Effector) fusionnés aux domaines endonucléasiques FokI. Les TALE ont été découverts chez les phytopathogènes du genre *Xanthomonas*, ce sont des facteurs de virulence qui agissent comme les activateurs de la transcription, figure 24.

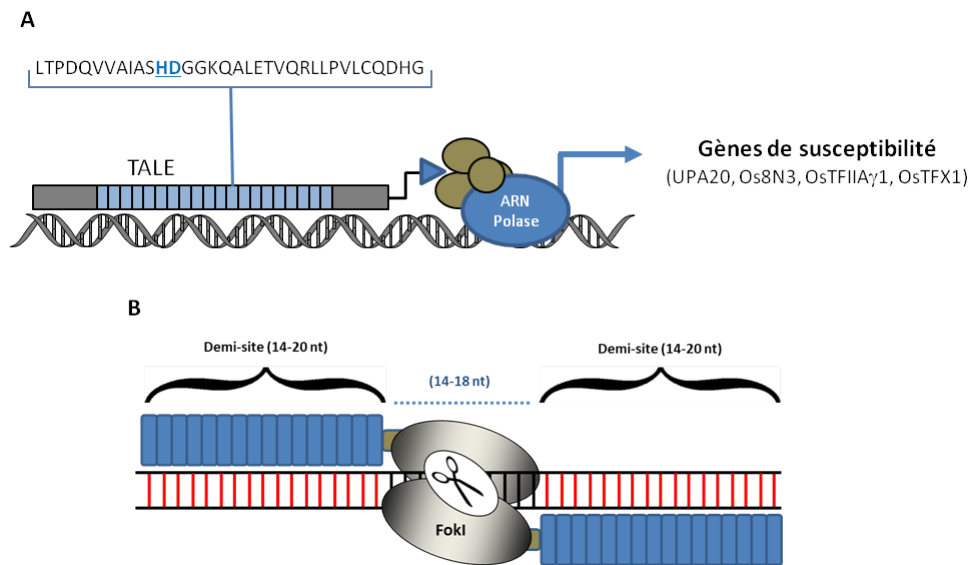


FIGURE 24: **Structure des TALEN.** **A.** Les TALE sont des facteurs de transcription, ils sont constitués de répétitions de 33 à 35 acides aminés. Les acides aminés 12 et 13 sont hypervariables et reconnaissent spécifiquement un nucléotide. **B.** Association d'un TALE au niveau de la séquence cible d'ADN. Chaque demi-site est lié à un hétérodimère de FokI. Lorsque les deux demi-sites reconnaissent leur cible, FokI est dimérisée et coupe le double brin d'ADN. Adaptée de Dupret et al. 2014

Les TALE se lient à l'ADN via la partie centrale des répétitions qui le composent. Les répétitions sont composées de 33 à 35 acides aminés. Les acides aminés 12 et 13 sont hypervariables et permettent l'interaction avec l'ADN via la reconnaissance spécifique d'une seule paire de base. Chaque répétition est composée de deux hélices α et d'une boucle contenant les deux acides aminés variables, figure 25 (Deng et al. 2012b). L'acide aminé 12 permet de stabiliser la liaison du TALE à l'ADN alors que l'acide aminé 13 reconnaît spécifiquement le nucléotide par une liaison de van der Waals ou une liaison hydrogène (Mak et al. 2012). Les di-résidus variables NI, HD, NK/NH, NN et NG reconnaissent respectivement A, C, G, G/A et T, table 5 (Boch et al. 2009).

L'utilisation de NN pour reconnaître le nucléotide G peut influencer positivement l'activité du TALEN mais pour plus de spécificité pour la guanine, il est préférable d'utiliser NK ou NH (Streubel et al. 2012). NH a une forte spécificité de reconnaissance de la guanine dans le génome des mammifères (Cong et al. 2012). La présence d'une base T en position 0 est importante pour l'activité et la liaison stable du

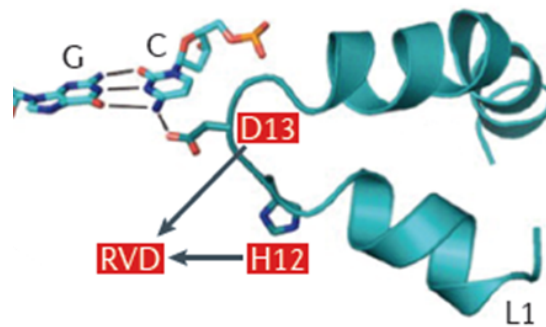


FIGURE 25: **Liaison du RVD à l'ADN.** Les TALE sont composés de répétitions qui se lient à l'ADN via deux acides aminés hypervariables, les 12 et 13 qui forment le RVD (répétition variable de dirésidus). Adaptée de Kim et al. 2014.

Di-résidus variables	Nucléotides
NI	A
HD	C
NK/NH	G
NN	G/A
NG	T

TABLE 5: **Reconnaissance des nucléotides par les di-résidus variables du TALE.**

TALE (Doyle et al. 2013). La liaison des TALEN est sensible à la méthylation de l'ADN au niveau des cytosines. L'utilisation des di-résidus HN ou NG à la place de HD permet au TALEN de se lier à l'ADN méthylé (Valton et al. 2012, Deng et al. 2012a).

Les TALE reconnaissent efficacement l'ADN et peuvent induire des cassures d'ADN double brin lorsqu'ils sont fusionnés à FokI. FokI est une endonucléase qui agit sous forme de dimère. Chaque dimère est lié à un TALE ciblant la séquence cible d'ADN, figure 24. Les cassures d'ADN double brin pourront être réparées par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) ou réparation par homologie (HR) (Miller et al. 2011). La réparation des cassures d'ADN double brin permet l'insertion de mutations aléatoires ou dirigées. L'efficacité du TALEN est améliorée lorsque 12 à 15 paires de bases séparent les sites de liaison des deux TALEN. Les TALEN peuvent se lier

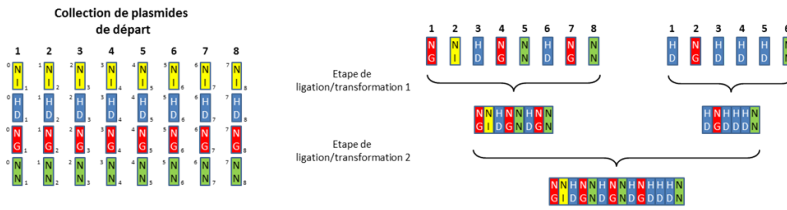
au niveau de sites aspécifiques, de off-target et créer des mutations additionnelles (Mussolino et al. 2011).

3.3.2 Assemblage des TALEN.

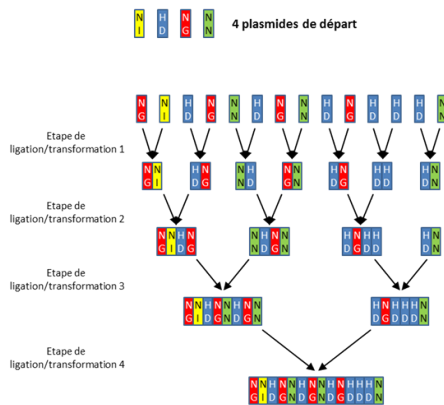
Les TALEN sont composés de nombreuses séquences répétitives ce qui complique leur assemblage. Plusieurs méthodes ont été développées :

- Cermak et al. 2011, ont développé l'assemblage des TALEN par la méthode du Golden Gate. Cette méthode est rapide et peu coûteuse, permet d'assembler jusqu'à 31 modules via deux étapes de clonage, figure 26A.
- La liaison des différents modules peut également être réalisée par des cycles de digestion-ligation grâce à l'ajout d'extrémités uniques (Li et al. 2011, Morbitzer et al. 2011, Li et al. 2012), figure 26B.
- La méthode ICA (Iterative Capped Assembly), les monomères sont ajoutés individuellement par ligation ; la construction est couplée à la biotine liée à une bille magnétique couverte de streptavidine.
- Un système de capping (ajout d'oligonucléotides qui bloquent les assemblages incomplets) permet l'assemblage de 21 monomères en 3 heures (Briggs et al. 2012).
- La technique de l'assemblage FLASH (Fast Ligation base Automatable Solid-phase High-throughput) permet d'assembler les TALEN de manière automatique. Les répétitions sont assemblées sous forme de monomère, dimère, trimère ou tétramère et sont assemblées par ligation ; la construction est liée à une biotine (Reyon et al. 2012), figure 26C.
- L'assemblage LIC (Ligation-Independent Cloning) permet la liaison des répétitions en absence de ligation et peut être automatisée. Des extrémités complémentaires sont créées en utilisant l'activité exonucléase de la T4 en absence de nucléotides. La longueur des extrémités permet aux différents fragments de former un ADN circulaire (Schmid-Burgk et al. 2013).

A. Assemblage des TALEs par clonage modulaire de type Golden Gate.



B. Assemblage d'unités par ligations successives.



C. Assemblage automatisé des répétitions en phase solide (FLASH).

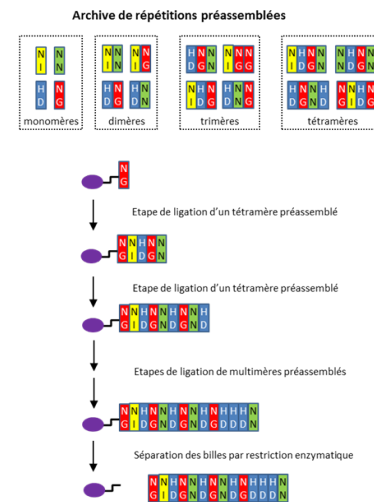


FIGURE 26: Les différentes méthodes d'assemblage des TALEN. **A.** Le Golden gate permet d'assembler les différentes répétitions grâce aux extrémités cohésives différentes créées par les enzymes de restriction de type IIS **B.** Assemblage des unités par ligations successives et l'ajout d'extrémités uniques. **C.** FLASH permet d'assembler les TALEN de manière automatique par ligation (Figure de Dupret et al. 2014).

3.3.3 Edition des génomes.

Afin de concevoir des TALEN spécifiques et n'ayant pas de off-target, des outils ont été développés comme E-TALEN (<http://www.e-talen.org>) (Heigwer et al. 2013) et le logiciel TALENoffer (Grau et al. 2013). Les TALEN permettent d'éditer les génomes facilement et rapidement *in vivo* en injectant l'ARNm des TALEN chez les embryons. L'injection des TALEN dans le cytoplasme des zygotes de cochon, permet de développer des mutants mono-allélique ou bi-allélique (Carlson et al. 2012). L'injection de deux couples de TALEN chez le poisson zèbre pour cibler deux

sites distaux sur le même chromosome, permet de créer des délétions et inversions dans le génome d'une centaine à un millier de paires de bases (Xiao et al. 2013). Les TALEN peuvent également être utilisés pour insérer des séquences d'ADN. La méthode Obligare utilise l'efficacité de la réparation via NHEJ pour insérer 15kb dans des cellules humaines. La séquence cible du génome (où l'on souhaite insérer une séquence d'ADN) et celle du vecteur donneur sont coupées par l'endonucléase. Par ce système, des extrémités complémentaires sont créées et vont permettre la réparation par insertion du vecteur donneur (Maresca et al. 2013). L'insertion de séquences spécifiques peut également être réalisée par réparation par homologie. Chez le poisson zèbre au stade une cellule, l'ARNm des TALEN est co-injecté avec un ADN double brin donneur contenant des séquences homologues pour la recombinaison ; la longueur des séquences homologues influence l'efficacité de la recombinaison homologue.

3.4 Application des TALEN

Les TALEN sont majoritairement utilisés pour comprendre les fonctions géniques dans les modèles animaux. Ils ont permis de rendre possible la génétique inverse chez la drosophile (Lin et al. 2014). Chez la drosophile le gène *yellow* a été muté avec une efficacité de 31,2%, cette mutation est retrouvée dans la lignée germinale (Liu et al. 2012). Chez la souris les TALEN sont micro-injectés au stade 1 cellule, pour muter le gène *Rab38* et créer une mutation ponctuelle grâce à l'utilisation d'un oligonucléotide. Les souris hétérozygotes ont été obtenues en 18 semaines (Wefers et al. 2013). Les mutations induites sont transmises via la lignée germinale des individus F0 et les mutations générées sont retrouvées chez les descendants F1 (Sung et al. 2013). Chez le poisson zèbre, les TALEN ont permis de générer des mutants de façon efficace et spécifique, les mutations obtenues par réparation par homologie sont maintenues et transmises aux descendants F1 (Bedell et al. 2012). Les TALEN permettent de générer rapidement des modèles *in vivo* pour l'étude de maladies humaines.

Les nucléases comme les TALEN sont développées dans le but de pouvoir un jour les utiliser en thérapie génique. Les TALEN peuvent être intégrés au génome de l'adenovirus pour être ensuite intégrés au génome humain (Holkers et al. 2013). L'objectif est de les utiliser en thérapie génique dans les hépatites B, en ciblant les sites spécifiques du génome du virus de l'hépatite B (Bloom et al. 2013). Les TALEN permettent de créer des mutations spécifiques dans les cellules humaines pluripotentes (Cellules ES humaines, Cellules iPS) (Hockemeyer et al. 2011). Ils sont également utilisés pour inactiver le gène CCR5 dans les cellules T humaine afin d'empêcher la réplication du virus HIV-1 (Shi et al. 2017). Les TALEN ont été utilisé pour la première fois en clinique dans les leucémies lymphoblastiques aigües, lors des greffes de cellules souches hématopoïétiques. Ils ont permis d'inactiver le gène TCR des cellules T responsable des rejets de greffes et d'inactiver CD52, responsable de la résistance à l'Alemtuzumab (Qasim et al. 2015).

3.5 Les CRISPR

Plus récemment, les CRISPR sont largement utilisés pour éditer les génomes. Les CRISPR sont plus efficaces dans les cellules souches humaines pluripotentes et ne sont pas sensibles à la méthylation de l'ADN (Ding et al. 2013). De plus, leur assemblage est plus facile que celui des TALEN, un seul clonage est nécessaire (celui de l'ARNg, décrit plus loin). Le système Crispr-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat- CRISPR Associated Protein) protège les bactéries contre les phages et les plasmides. Un petit ARN crRNA (CRISPR RNA) est utilisé pour supprimer les acides nucléiques étrangers de façon spécifique. Le crRNA va reconnaître de façon spécifique l'ADN cible (figure 27). Il est composé de 42 nucléotides dont 20 reconnaissent la séquence cible (protospacer). Afin d'être ciblée à l'ADN, Cas9 a besoin de la séquence appelée PAM (Protospacer Adjacent Motif) située en amont de la séquence cible (figure 27), celle-ci est dépendante des espèces. Cette séquence est indispensable car elle serait impliquée dans l'ouverture du double brin et la stabilisation de la boucle R (liaison ADN-ARN) (Gasiunas et al. 2012). L'effica-

cité ne dépend pas du brin cible (Hwang et al. 2013). Chez *Streptococcus pyogenes*, un petit ARN de 24 nucléotides complémentaires des régions répétées du crRNA permet sa maturation et son association à Cas9, c'est l'ARN tracrRNA (Trans-Activating CRISPR RNA) (figure 27). Les CRISPR peuvent être utilis es pour créer des cassures d'ADN double brin, réparées par le système NHEJ ou par homologie (Mali et al. 2013). Pattanayak et al. 2013, mettent en évidence que plus l'ARN est petit, moins il est actif mais plus spécifique que s'il est plus long (jusqu'à 12 bp) (plus actif, moins spécifique). La diminution de la concentration de Cas9 permet de réduire les off-target. Cas9 accepte des mismatches ARN-ADN lors de son activité nucléase. Ces mismatches sont accept es en fonction de la s equen e, de leur position, de leur nombre et de leur distribution (Hsu et al. 2013, ;Fu et al. 2013).

L'utilisation d'enzymes mutées qui produisent des cassures d'ADN simple brin permettent d'augmenter la spécificité. Un couple d'ARNg est alors utilis e pour réaliser la cassure doubles brins après dimérisation de Cas9 (Ran et al. 2013).

Lors de l'utilisation de la technologie CRISPR, le facteur limitant est l'assemblage ARN-Cas9 pour le clivage de l'ADN. L'élongation de l'ARN à l'extr emitt e 3' permet d'améliorer la liaison à l'ADN (ajout de 5 nucléotides). Le crRNA peut être fusionn e au tracrRNA pour conduire Cas9 à l'ADN cible, cet ARN est appel e ARNg (figure 27) (Jinek et al. 2013).

Les CRISPR sont efficaces chez la drosophile et les mutations sont efficacement transmises via la lignée germinale (Gratz et al. 2013). Chez la souris, l'ajout d'une s equen e NLS à l'enzyme Cas9 permet d'augmenter son efficacité (Shen et al. 2013). La co-injection de Cas9 et de l'ARNg au stade une cellule permet d'obtenir 80% de mutation bi-allélique des gènes *Tet1* et *Tet2* chez la souris (Wang et al. 2013). La mutation bi-allélique des individus F0 a été également obtenue chez le poisson zèbre avec une efficacité de 75% à 99%, la plupart des cellules possèdent la mutation bi-allélique. L'efficacité a été améliorée en ajoutant deux s equen es NLS   Cas9. Cinq loci ont été cibl es simultanément, ainsi, avec une injection, on peut obtenir la perte de fonction de plusieurs gènes et étudier rapidement le phénotype (Jao et al. 2013). Les CRISPR sont également efficaces dans les cellules humaines.

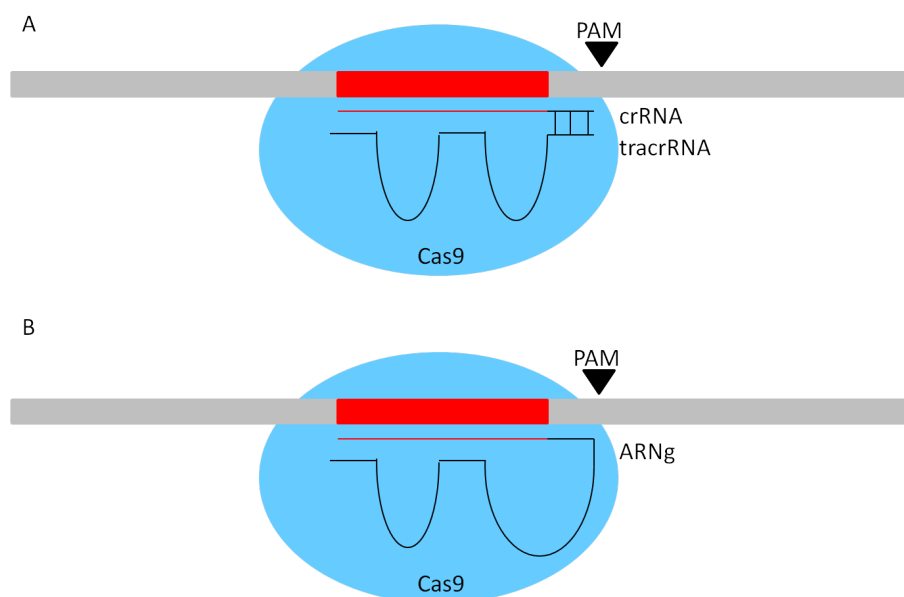


FIGURE 27: **Liaison des CRISPR à l'ADN.** **A.** Reconnaissance de l'ADN cible par le crRNA lié au tracrRNA. Ce complexe d'ARN s'associe à Cas9 et la conduit à la séquence cible d'ADN afin de générer la cassure d'ADN double brin. La séquence PAM en amont permet de cibler le crRNA **B.** Liaison du crRNA au tracrRNA afin de générer l'ARNg. L'ARNg cible l'enzyme Cas9 au niveau de la séquence cible.

Chapitre 4

Le poisson zèbre

4.1 Origine du poisson zèbre, environnement

Les téléostéens apparaissent il y a 350 millions d'années (Meyer et al. 2005). Le poisson zèbre est un poisson de la famille des Cyprinidae, il est originaire du Nord-Ouest de l'Inde, du Bangladesh et du Népal où il vit en bancs dans les plaines inondées et les rizières (eaux à faible courant) (figure 28).



FIGURE 28: **Distribution naturelle du poisson zèbre**, les points noirs indiquent les lieux où le poisson zèbre est présent. Figure Spence et al. 2008.

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est petit (40 mm longueur totale), robuste et pond toute l'année ce qui rend son élevage facile et peu coûteux. Le poisson zèbre

a un corps fusiforme avec une bouche oblique dirigée vers le haut. La pigmentation à l'âge adulte est une alternance de lignes latérales bleues (mélanophores), dorées (xanthophores) sur tout le corps et d'iridophores iridescents au niveau des flancs (figure 29 A) (Parichy 2006). En réponse aux stimuli extérieurs les mélanophores peuvent être concentrés ou dispersés. Ceci permet au poisson de se camoufler en réponse à l'intensité de la lumière, une couleur plus foncée est associée à un comportement agressif. Les mâles sont plus jaunes que les femelles. A l'âge adulte, les femelles ont une forme plus ronde que les mâles et une papille génitale devant la nageoire anale (figure 29 B).

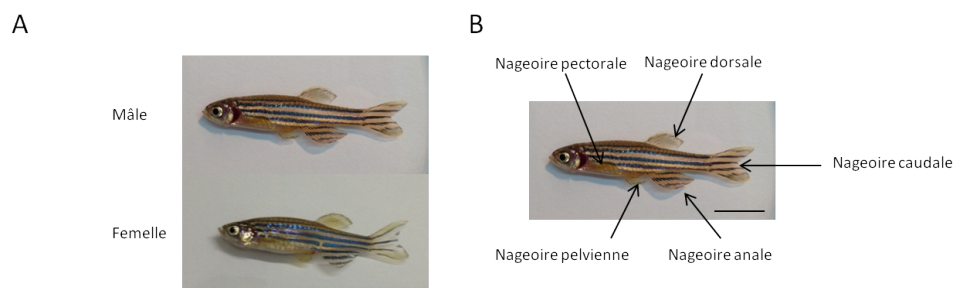


FIGURE 29: **Le poisson zèbre.** **A.** Le poisson zèbre a une pigmentation composée d'une alternance de lignes bleues foncées et dorées. Le mâle est plus jaune que la femelle. La femelle a un corps plus rond que le mâle. **B.** Les différentes nageoires du poisson zèbre. Echelle 1 cm.

Dans leur milieu naturel la température de l'eau varie de 6°C à 38°C. Il vivent en surface et jusqu'à une profondeur de 30 cm, dans des lieux contenant de la végétation aquatique et du limon. Le régime naturel du poisson zèbre est le zooplancton, les insectes, le phytoplancton, les algues filamenteuses, les plantes aquatiques, les spores, les oeufs des invertébrés et les arachnides. La durée de vie est de 2 ans en moyenne. Le poisson zèbre a un système immunitaire fonctionnel à 4-6 semaines (Lam et al. 2004). Le phénotype associé au vieillissement est la déformation de la colonne vertébrale causée par la dégénération musculaire. Ce phénotype est visible chez les poissons d'élevage à partir de 2 ans mais n'a pas été observé dans le milieu naturel, les poissons meurent avant ce stade de vieillissement. Le poisson zèbre a une durée de vie moyenne en captivité de 42 mois (la durée de vie la plus longue est de 66 mois) (Gerhard et al. 2002).

C'est un animal diurne, son activité est synchronisée avec le cycle jour/nuit. Le premier pic d'activité a lieu dès les premières minutes d'exposition à la lumière (jusqu'à une heure), c'est à ce moment qu'ils vont pondre. Les femelles pondent toutes les semaines, des centaines d'oeufs par ponte (jusqu'à 300) (Hisaoka et al. 1962). Les oeufs ont une taille de 0.7 mm après fécondation et ils sont transparents. Le développement est rapide, les adultes sont fertiles à 3-4 mois. Le développement est *ex utero* et les embryons sont transparents jusqu'à 24 heures, ainsi, les stades précoces du développement peuvent facilement être observés. Ensuite la pigmentation se met en place. Le développement du poisson est divisé en 4 étapes : embryon jusqu'à 3 jours post fécondation (jpf) ils sont dans un chorion, après l'éclosion débute le stade larvaire jusqu'à 29 jpf, puis juvénile jusqu'à 90 jpf et enfin adulte (Parmentier 2009). A 24 heures post fécondation (hpf) les organes commencent à se différencier, les larves se nourrissent à partir de 5 jpf.

4.2 Elevage

L'utilisation du poisson zèbre en recherche a débuté à la fin des années 70, l'université de l'Oregon a utilisé ce modèle en neuroscience (Vascotto et al. 1997). Le poisson zèbre est élevé à une température de 28.5°C, le pH de l'eau est maintenu entre 7.0 et 8.0. L'eau est renouvelée régulièrement, 10% par jour. Les poissons sont nourris au moins 2 fois par jour avec de la nourriture variée (nourriture déshydratée, artémias). La photopériode est importante pour le bon développement du poisson et son bien-être. Le cycle courant est de 14 heures de lumière et 10 heures dans l'obscurité. Une apparition et disparition progressive de la lumière est conseillée. Les poissons sont gardés dans des aquariums avec une profondeur n'excédant pas 25 cm, car se sont des poissons de surface. Le nombre de poissons par aquarium peut influencer le ratio mâle/femelle. Plus la densité est faible plus le nombre de femelles sera important. Les recommandations sont de 20 embryons pour 100 mL d'eau, 20 larves pour 400 mL d'eau et 5 adultes par litre. La densité des poissons dans les aquariums est importante car le poisson zèbre vit en banc cependant une

sur-population cause des comportements agressifs.

4.3 Reproduction

Chez le poisson zèbre toutes les gonades se développent d'abord en ovaires puis le phénotype mâle apparaît chez les individus d'environ 5 à 7 semaines (10-15mm). Le poisson zèbre est un hermaphrodite au stade juvénile. A 11 semaines le développement des testicules est visible (spematogonies, spermatocytes, spermatides) (Maack et al. 2003). La production des oeufs chez la femelle dépend de la nourriture mais pas des saisons. Les poissons élevés à 28.5°C sont matures sexuellement à 75 jours (femelle 24.9 mm, mâle 23.1 mm).

L'ovulation dépend de l'exposition des femelles aux phéromones mâles, l'exposition aux mâles améliore la qualité et la viabilité des oeufs (Gerlach 2006). Les glucuronides contenus dans le sperme induisent l'ovulation (van den Hurk et al. 1987). Le contact de la femelle et du mâle pendant 7 heures est suffisant pour déclencher la ponte le lendemain matin. Tous les ovocytes matures sont relâchés en une seule ponte. Afin de déclencher la ponte, le mâle chasse la femelle en poussant sur ses flancs. La femelle pond 5 à 20 oeufs à la fois. Lorsque les embryons sont sortis du chorion ils restent attachés à une surface solide de leur environnement afin de les aider à atteindre la surface et gonfler leur vessie natatoire (Spence et al. 2008).

4.4 Le développement du poisson zèbre

Il y a 450 millions d'années, les poissons à nageoires rayonnées, actinoptérygiens sont apparus (Meyer et al. 2005). Des gènes supplémentaires du cluster Hox (impliqués dans l'identité cellulaire le long de l'axe antéro-postérieur) ont été identifiés chez le poisson zèbre dus à une duplication du génome chez les téléostéens il y a 350 millions d'année. Il y a 47 gènes *hox* chez le poisson zèbre et un pseudogène *hox*, seulement 40 chez la souris (Amores et al. 1998, Crow et al. 2006). Le génome du poisson zèbre et de l'Homme sont très proches, 70% des gènes chez l'Homme ont leur

orthologue chez le poisson zèbre (Howe et al. 2013). Grâce à cette conservation le poisson zèbre est un excellent modèle d'étude des maladies humaines et du développement. En 1996, un numéro spécial de *Development* est consacré au poisson zèbre (Nüsslein-Volhard 2012). Ce numéro contient 37 articles, 1500 mutations impliquées dans le développement ont été décrites et 400 nouveaux gènes impliqués dans le développement et l'organogénèse ont été découverts. Depuis ce jour, le modèle du poisson zèbre a une importance significative en recherche (développement, régénération, recherche d'anti-cancéreux...). De plus, aujourd'hui la génétique inverse est possible et simple chez le poisson zèbre grâce aux TALEN, ZFN, CRISPR.

Dans la suite de l'écrit le développement de l'oeil, du pancréas, de l'intestin et du foie sera traité plus en détail, ces organes sont importants dans l'étude du phénotype des mutants du laboratoire.

4.4.1 L'oeil

L'oeil se développe à partir de 3 tissus embryonnaires. Le neuroectoderme est à l'origine de la rétine, de l'épithélium pigmenté, du nerf optique et de la marge ciliaire. Le cristallin et la cornée sont issus de l'ectoderme. Le mésenchyme forme le tissu entre la cornée et le sclère (figure 30). Les mutants *chokh* (facteur de transcription Rx3) ne développent pas d'yeux, les cellules formant la rétine se développent mais il n'y a pas de processus d'invagination nécessaire à la formation de l'oeil, ni de développement des cellules neurales (Loosli et al. 2003).

La rétine. L'oeil se forme à partir d'une masse cellulaire qui s'invagine du prosencéphale à 22 hpf. Le gène *chokh* contrôle le développement de la rétine (Loosli et al. 2003), *sonic hedgehog* contrôle la différenciation des neurones de la rétine (à partir de la couche interne) et *mitf* contrôle le développement de l'épithélium pigmenté de la rétine (couche externe) (Shkumatava et al. 2004). La rétine est composée de 7 types cellulaires, 6 types de cellules neurales, un type de cellules gliales (les cellules de Müller). Le poisson zèbre est un animal diurne et la rétine contient différents cônes et bâtonnets.

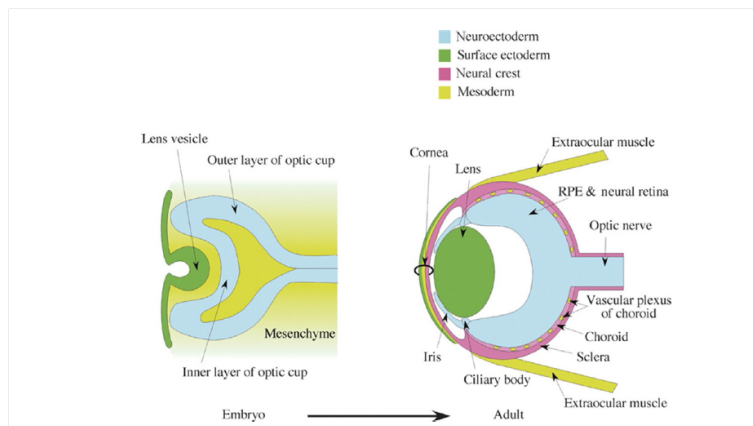


FIGURE 30: **Structure de l'oeil chez les vertébrés.** Chez le poisson zèbre l'oeil se développe à partir de 3 tissus : le neuroectoderme (bleu), l'ectoderme (vert foncé) et le mésenchyme (vert clair). Optic Nerve : Nerf Optique, Sclera : Sclère, Ciliary body : Marge ciliaire, Cornea : Cornée, Lens : Cristallin, Neural retina : Rétine, RPE : Retinal Pigmented Epithelium : épithélium pigmenté de la rétine. Figure de Stenkamp 2015.

Le cristallin et la cornée. Le cristallin est formé par l'ectoderme (chez les mammifères, le cristallin est formé par invagination). Pax6 est indispensable au développement normal de la cornée (Takamiya et al. 2015), les mutants *pax6* ont une cornée plus épaisse, une hypoplasie de l'iris, une humeur vitrée (entre le cristallin et la cornée) plus petite ainsi qu'un plus petit cristallin. La cornée est formée à 3 jpf puis se développe et est composée à 5 jours de 3 couches principales : l'épithélium, le stroma et l'endothélium séparés par la membrane de Bowman et la membrane de Descemet (figure 31). La membrane de Bowman joue un rôle crucial dans la cicatrisation de la cornée (Zhao et al. 2006, Soules et al. 2005), elle peut se régénérer à 60% en 7 jours (Heur et al. 2013).

La vision. La vision se développe entre 68 à 79 hpf et les mouvements des yeux apparaissent entre 73 et 80 hpf. A 72 hpf, les muscles des yeux sont dans la même configuration que ceux des adultes. Les embryons distinguent la lumière de l'obscurité, la vision des formes apparaît quelques heures après (Brockerhoff et al. 1995). A 4 jpf les larves ont développé des réflexes optiques en réponse aux objets en mouvement (Fadool et al. 2008). Les mouvements de l'oeil associés à la lumière se développent à des stades variables selon les individus (Easter et al. 1997). L'oeil des

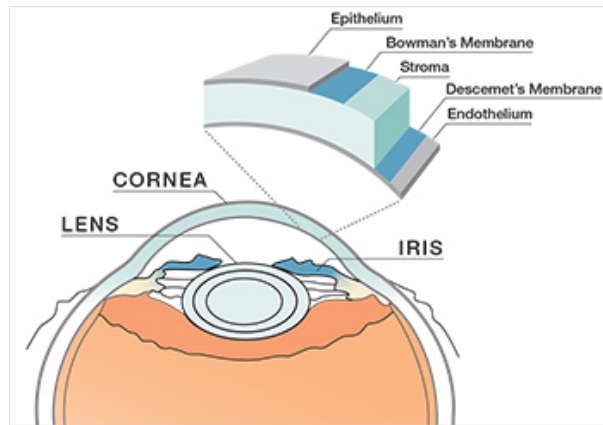


FIGURE 31: **Structure de la cornée**, elle est composée de 3 couches l'épithélium, le stroma et l'endothélium, séparées respectivement par la membrane de Bowman et la membrane de Descemet. Adaptée de *What Is Cornea & Eye Donation?*

larves contrairement aux adultes ne possède pas de corps vitré (figure 32) (Easter et al. 1996).

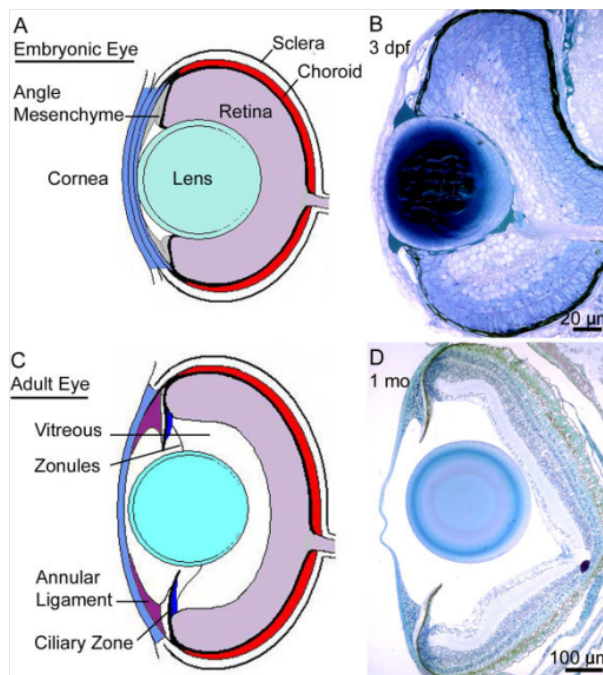


FIGURE 32: **Comparaison de l'oeil de la larve et de l'adulte chez le poisson zèbre.** Vitreous : corps vitré, Cornea : Cornée, Lens : Cristallin, Retina : Rétine, Sclera : Scière, Ciliary body : Marge ciliaire. Figure de Soules et al. 2005.

4.4.2 Le pancréas

A 6hpf, les cellules à l'origine du pancréas exocrine proviennent de la partie ventrale de l'embryon alors que les cellules endocrines sont localisées au niveau dorsale. Le pancréas est formé de deux ébauches : une ventrale et une dorsale (Ward et al. 2007).

Développement du pancréas à partir des deux ébauches. Afin d'étudier le développement du pancréas, Field et al. 2003b, utilise la lignée transgénique Tg(Xla.Eef1a1:GFP), gutGFP, dont les tissus qui dérivent de l'endoderme sont fluorescents en vert et la lignée mutante *heart and soul (Has)* dont les deux ébauches ne fusionnent pas. Les deux ébauches pancréatiques se joignent pour former le pancréas.

L'ébauche dorsale (postérieure) donne uniquement le tissu endocrine, l'ébauche ventrale (antérieure) donne le canal pancréatique, les cellules exocrines et quelques cellules endocrines proches du canal pancréatique (figure 33 et 37).

A 34 hpf l'ébauche dorsale exprime les gènes caractéristiques des cellules endocrines (*pax6*, *nkx2.2*, *pdx1* et *isl1*). Les deux ébauches fusionnent à 52 hpf pour former le pancréas. L'ébauche dorsale n'est plus en contact avec l'intestin alors que l'ébauche ventrale (antérieure) reste en contact avec le tube digestif (à la jonction entre l'oesophage et le bulbe intestinal). C'est au niveau de cette connection que va se former le canal hépatique (Yee et al. 2005).

Le tissu endocrine. Le tissu endocrine sécrète les hormones : insuline, somatostatine, polypeptide pancréatique et le glucagon, dans la circulation sanguine (Huang et al. 2001).

La première hormone exprimée est l'insuline, suivie par la somatostatine et le glucagon (Biemar et al. 2001). A 48 hpf l'îlot est formé et constitué des cellules beta, alpha et delta. Le tissu endocrine adulte est composé des cellules alpha, beta, delta, epsilon et des cellules PP (Tiso et al. 2009).

Le tissu exocrine. Le pancréas exocrine entoure l'unique îlot de cellules endocrines. Le tissu exocrine produit les enzymes nécessaires à la digestion : trypsine, amylase et carboxypeptidase A, qui sont libérées dans l'intestin via le canal pancréatique. Le marqueur du pancréas exocrine le plus précoce est la Trypsine à 48 hpf (Biemar et al. 2001). Les ARN de *trypsine* sont exprimés au niveau de l'ébauche ventrale. A 76 hpf le pancréas exocrine allongé est visible et enrobe totalement l'îlot pancréatique.

Les différentes étapes du développement sont résumées figure 33, la formation du pancréas chez le poisson zèbre se réalise par la formation de deux ébauches distinctes, dont la partie dorsale donne naissance uniquement aux cellules exocrines. Cette formation particulière en fait un modèle intéressant pour étudier ces cellules isolées. A 84 hpf les acini sont formés (Yee et al. 2005). Le pancréas exocrine chez l'adulte est diffus et constitué d'un réseau de canaux associés à des glandes acineuses situées entre les plis de l'intestin. La structure du pancréas et l'histologie sont conservées entre les mammifères et le poisson zèbre. Les résultats de Yee et al. 2005, ne sont pas en accord avec Field et al. 2003b et montrent que le tissu du pancréas exocrine serait développé à partir de l'endoderme proche de l'intestin mais ne provient pas d'une extension de l'épithélium de l'intestin.

4.4.3 L'intestin

Ng et al. 2005, utilisent le poisson zèbre transgénique Tg(Xla.Eef1a1:GFP) (gutGFP) dont les tissus du système digestif sont fluorescents en vert. Ils étudient le développement entre 26 hpf et 126 hpf. L'intestin est issu de l'endoderme et se divise en 3 parties : le bulbe intestinal, l'intestin moyen et l'intestin postérieur, figure 34A.

L'intestin provient de l'endoderme, les marqueurs définitifs de l'endoderme sont *foxA3* (*Eef1a1*) et *gata-6* pour l'intestin, *foxA2* pour le pharynx et *gata-6* pour l'oesophage. A 26 hpf les cellules forment un ruban au dessus du vitellus (figure 35), de la bouche à l'anus et adoptent une structure en bi-couche ; les cellules acquièrent la polarité apico-basale et les signaux pour la formation de la matrice extra-cellulaire.

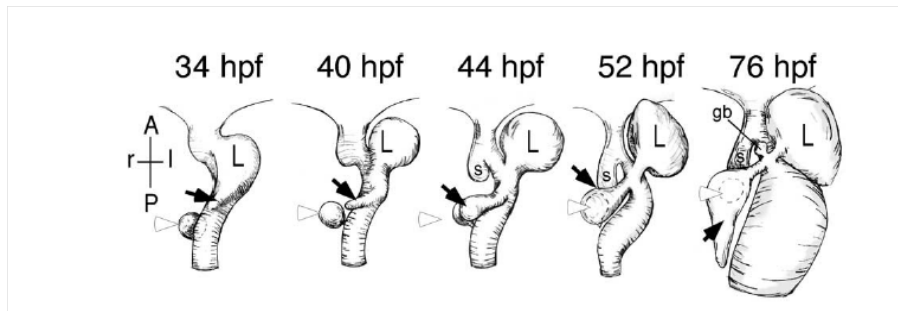


FIGURE 33: **Représentation schématique des différents stades de développement du pancréas chez l'embryon de poisson zèbre entre 34 hpf et 76 hpf.** Tout les schémas représentent la vue ventrale, la partie antérieure est en haut. La flèche blanche montre l'ébauche dorsale (postérieure) et la flèche noire l'ébauche ventrale (antérieure). A 34 hpf une ébauche se forme dans la partie ventrale issue de l'intestin et dans la continuité du foie. A ce stade l'ébauche dorsale est formée par une masse cellulaire proche de l'intestin. A 40 hpf l'ébauche ventrale se développe vers la droite. A 44 hpf les deux ébauches sont juxtaposées, la connection entre l'intestin et la partie ventrale est à l'origine du canal hépatique. A 52 hpf elles fusionnent, les gènes caractéristiques des cellules exocrines sont exprimés. A 76 hpf le tissu exocrine entoure totalement l'îlot pancréatique. Le tissu exocrine s'allonge vers la partie postérieure. L : foie (liver), s : vessie natatoire (swim bladder), gb : vésicule biliaire (gall bladder). Figure de Field et al. 2003b.

La lumière de l'intestin se forme sans processus de mort cellulaire. La mort cellulaire est rare au niveau de l'intestin pendant les deux premières semaines de développement. La mortalité cellulaire dans la lumière de l'intestin à 96 hpf est observée chez les mutants *flotte lotte* (Chen et al. 1996).

Ng et al. 2005 détaillent la formation de l'intestin entre 26 hpf et 96 hpf en 3 stades. Le premier stade se déroule entre 26 et 52 hpf, le stade II jusqu'à 76 hpf puis le dernier stade jusqu'à 4 jpf.

Stade I. Le Stade I, se déroule entre 26 hpf et 52 hpf. Une lignée transgénique Tg(*nkx2.2a:mEGFP*) permet de suivre le développement. Le gène *nkx2.2a* est exprimé dans le cerveau, la partie ventrale du tube neural et le pancréas en développement. Durant cette phase la morphogénèse de l'intestin est rapide et les cellules de l'endoderme prolifèrent rapidement. A 48 hpf les progéniteurs des neurones entériques et des cellules musculaires lisses sont présents. Puis, à 52 hpf, les cellules endocrines de l'intestin sont formées dans la partie terminale de l'intestin en cours de développement, les cytokératines sont trouvées au pôle apical des cellules. Le

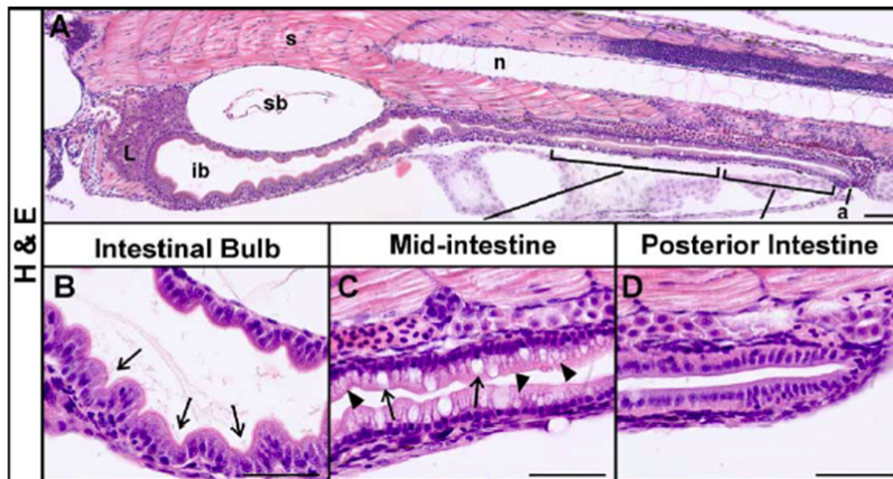


FIGURE 34: **Structure de l'intestin des larves de poisson zèbre.** Coupes longitudinales d'une larve de 5 jpf colorées à l'hématoxyline-éosine. **A.** L'intestin est divisé en 3 parties : le bulbe intestinal (intestinal bulb), l'intestin moyen (mid-intestine) et l'intestin postérieur (posterior intestine). A 5 jpf le vitellus est complètement résorbé et la larve commence à manger. **B, C, D.** Grossissement des différentes parties de l'intestin. Les plis sont présents dans le bulbe intestinal (**B**, flèches) alors que l'intestin moyen et postérieur ne présentent pas encore de pli à ces stades. **C, D.** L'intestin moyen est caractérisé par la présence des cellules caliciformes (**C**, flèches) et des entérocytes à larges vacuoles (**C**, triangles). Echelle 50 μm . Figure de Ng et al. 2005.

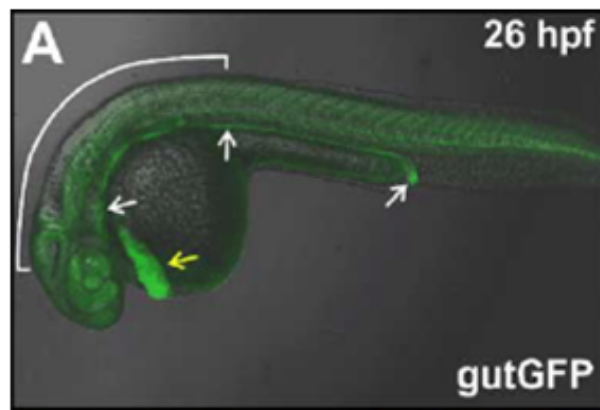


FIGURE 35: **Marquage de l'endoderme chez l'embryon.** Expression de la FoxA3 au niveau de la fine couche d'endoderme formant l'intestin à 26 hpf (lignée transgénique gutGFP, expression de la GFP au niveau de l'endoderme). La partie dorsale est en haut et la partie caudale à gauche. Les flèches blanches montrent l'intestin situé au dessus du vitellus. La flèche jaune montre le canal de Cuvier permettant à l'embryon d'absorber les nutriments du vitellus. Figure de Ng et al. 2005.

poisson zèbre ne possède pas d'estomac, l'oesophage est connecté directement à l'intestin ; c'est le bulbe intestinal qui a la fonction de l'estomac (digestion des lipides

et des protéines). La lumière se forme d'abord au niveau de l'oesophage puis avance vers la partie caudale de l'intestin, la bouche est ouverte.

Stade II. Le stade II, se déroule jusqu'à 74-76 hpf, l'intestin est un tube creux mais l'anus est toujours fermé. Les cellules de l'endoderme sont polarisées et se différencient. Les protéines de jonction serrées sont exprimées. Les cellules adoptent une forme de colonne avec le noyau situé à la base de la cellule. Une fine couche mésenchymateuse est trouvée autour de l'épithélium. A 72 hpf, les cellules continuent à proliférer selon l'axe rostro-caudal, les neurones entériques se différencient. André et al. 2000, ont mis en évidence un marqueur de l'intestin, *fabp2*, *fabp2* (Intestinal Fatty Acid-Binding Protein) de la famille des FABP (Fatty Acid-Binding Proteins). Le transcrit *fabp2* est exprimé au niveau de l'intestin dès 3 jpf. Les protéines FABP lient les acides gras à longues chaînes et participent à l'absorption des lipides.

Stade III Le stade III, se déroule jusqu'à 4 jpf. L'anus est ouvert, l'intestin possède une lumière sur toute sa longueur. L'intestin est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales polarisées. On peut alors distinguer les 3 parties de l'intestin. Les cellules caliciformes synthétisant les mucines sont visibles à 100 hpf ainsi que des entérocytes à larges vacuoles, au niveau de l'intestin moyen.

A partir de 4 jours le bulbe intestinal s'élargit pour adopter une forme arrondie, les plis apparaissent, les cellules prolifératives se trouvent alors uniquement dans la partie basale du pli (analogue des cryptes de Lieberkühn chez les mammifères). L'expression de *fabp2* est augmentée et retrouvée au niveau de l'épithélium (André et al. 2000). Les cellules entéro-endocrines sécrètent du glucagon et la somatostatine, les deux hormones sont exprimées par les même cellules contrairement à ce qui est trouvé chez les mammifères où les deux hormones sont sécrétées par deux populations cellulaires différentes. Les cellules entéro-endocrines sont visibles d'abord dans l'intestin postérieur puis dans le bulbe intestinal et l'intestin moyen. Ce mécanisme est contraire au reste du développement de l'intestin qui se fait selon l'axe rostro-caudal.

Le développement après 4 jpf. A **5 jpf**, le canal alimentaire est composé d'une bouche, du pharynx, de l'oesophage, du bulbe intestinal, de l'intestin moyen, de l'intestin postérieur et de l'anus. L'intestin est alors fonctionnel. Le bulbe intestinal est formé de plis, la prolifération cellulaire est restreinte à la base des plis. L'intestin moyen et l'intestin postérieur n'ont pas de pli et sont formés d'une mono-couche de cellules épithéliales (il y a peu ou pas de prolifération). Le vitellus est complètement résorbé et la larve commence à se nourrir. *fabp2* est retrouvé de l'oesophage jusqu'au niveau du rectum. L'expression de *fabp2* dans la partie antérieure de l'intestin des larves nourries est corrélée à l'absorption intra-cellulaire des gouttelettes lipidiques par les entérocytes et la formation des lipoprotéines. De cette façon *fabp2* permet de suivre le développement de l'intestin et l'absorption des acides gras (Her et al. 2004). A **8 jpf**, les plis sont présents de façon aléatoire ; dans la partie de l'intestin moyen ils commencent à apparaître. A **12 jpf**, les plis sont présents au niveau de l'intestin postérieur. A **deux semaines** l'intestin est toujours un tube linéaire, les plis de l'intestin moyen sont plus petits que ceux du bulbe intestinal. Les plis sont composés d'une monocouche de cellules épithéliales qui repose sur le tissu conjonctif. Un marquage cellulaire montre que les cellules du bulbe intestinal mettent 5-7 jours pour atteindre le haut du pli alors que les cellules prolifératives de la base du pli de l'intestin moyen atteignent le sommet du pli en 7-10 jours. A 14 jpf les cellules caliciformes sont retrouvées dans tout l'intestin. Dans le bulbe intestinal les cellules caliciformes sécrètent des mucines acides et neutres, elles couvrent la surface de la muqueuse pour protéger les cellules de la phagocytose et de la déshydratation. Le bulbe intestinal et l'intestin moyen ont le rôle d'absorption des nutriments, les enzymes digestives y sont exprimées. Le bulbe intestinal est composé de 3 types cellulaires : les entérocytes en forme de colonne avec des bordures en brosse, les cellules caliciformes et les cellules endocrines. Les cellules de Paneth ne sont pas trouvées dans l'épithélium intestinal du poisson zèbre. La formation du tube digestif est résumée figure 38 et l'anatomie de la larve est représentée figure 39.

Chez l'adulte. Chez l'adulte la lamina propria sépare l'épithélium intestinal de la couche musculaire lisse. Le tissu conjonctif du poisson zèbre (lamina propria et submucosa) est moins complexe que chez les mammifères. Des cellules nerveuses entériques sont trouvées au niveau de la couche de cellules musculaires lisses, figure 36 (Wallace et al. 2005).

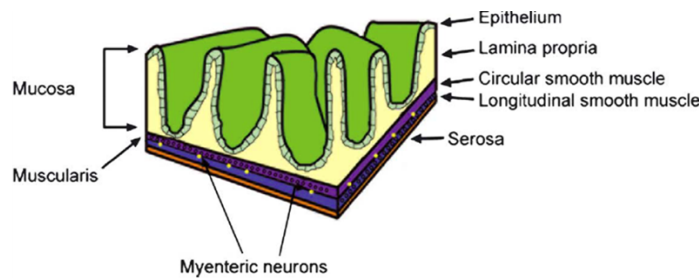


FIGURE 36: **Architecture de la paroi intestinale chez l'adulte** organisée en couches concentriques. Il n'y a pas de crypte de Lieberkühn chez le poisson zèbre. L'épithélium repose sur la lamina propria et compose la muqueuse. La muqueuse repose sur une couche de cellules musculaires lisses circulaires et longitudinales (muscularis) contenant des cellules nerveuses entériques. La couche la plus externe est la séreuse. Figure de Wallace et al. 2005.

4.4.4 Le Foie

Durant la gastrulation à 6 hpf les cellules situées au niveau de l'endoderme ventral donneront le foie (Tao et al. 2009).

Les hépatocytes constituent la majorité du foie et sa fonction (production de la bile, détoxification du sang, production des protéines du plasma, production des facteurs de coagulation et stockage des lipides, acides aminées, fer et glycogène). Chez le poisson zèbre l'hématopoïèse a lieu dans les reins.

Le foie bourgeonne du bulbe intestinal et ne nécessite pas la présence des cellules endothéliales contrairement à ce qui a été montré chez la souris. Field et al. 2003a, utilisent la lignée transgénique gutGFP, Tg(Xla.Eef1a1:GFP), afin d'étudier le développement du foie. Le développement du foie a lieu en deux phases : le bourgeonnement et la croissance. Le bourgeonnement peut être divisé en trois phases qui commencent lorsque les hépatocytes s'agrègent à 24 hpf et se terminent lorsque le canal hépatique est formé à 50 hpf. Durant le bourgeonnement, les hépatocytes

émergent de l'intestin en masse désorganisée. L'expression de *foxA3* est retrouvée dans tous les organes digestifs et permet de visualiser la morphologie des différents organes entre 24 hpf et 48 hpf.

Entre 26 hpf et 30 hpf le bourgeonnement commence du côté gauche ventral (figure 37). C'est la première phase du bourgeonnement. Le bourgeon grossit durant la deuxième phase à 30 hpf.

A 48 hpf le facteur de transcription *hnf4* est exprimé dans le foie et *foxA2* est exprimé dans le canal hépatique. A 50 hpf le canal hépatique reliant le foie et le bulbe intestinal est formé. A 52 hpf l'expression de FoxA3 est retrouvée dans la canal alimentaire (pharynx, oesophage, bulbe intestinal, intestin moyen, intestin postérieur et l'anus) mais aussi dans d'autres organes dérivés de l'endoderme : le foie, le pancréas, la vésicule biliaire et la vessie natatoire.

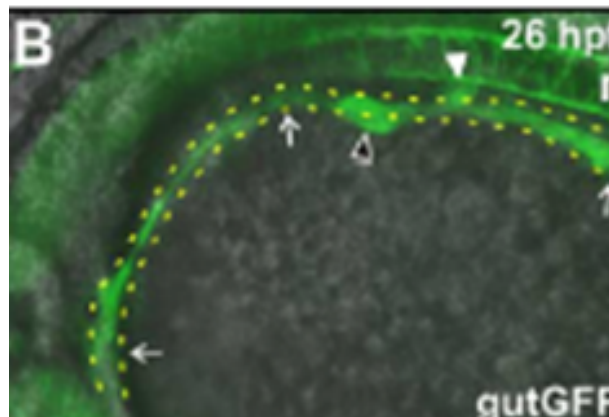


FIGURE 37: **Développement des organes digestifs.** La GFP sous le contrôle du promoteur de FoxA3 est exprimée au niveau des tissus dérivés de l'endoderme. La ligne pointillée jaune délimite le tube digestif. Deux petits agrégats cellulaires apparaissent pour donner le futur foie (tête de flèche noire) et le futur pancréas (tête de flèche blanche). Le flèche blanche à gauche indique la future bouche et celle de droite le futur anus. n : notochorde. Figure adaptée de Ng et al. 2005.

La phase de croissance suit le bourgeonnement et conduit au changement de taille et de forme du foie. A 72 hpf le foie est plus gros mais n'a pas changé de forme.

A 96 hpf le foie s'allonge sur le côté gauche de la larve. Il se situe entre le péricarde et le canal de cuvier (au niveau du vitellus). Le développement du foie est résumé figure 38.

La différenciation des hépatocytes peut être suivie grâce à un modèle transgénique exprimant la dsRed sous le contrôle du promoteur de *l-fabp* (Liver Fatty Acid Binding Protein), *fabp10a* (Her et al. 2003).

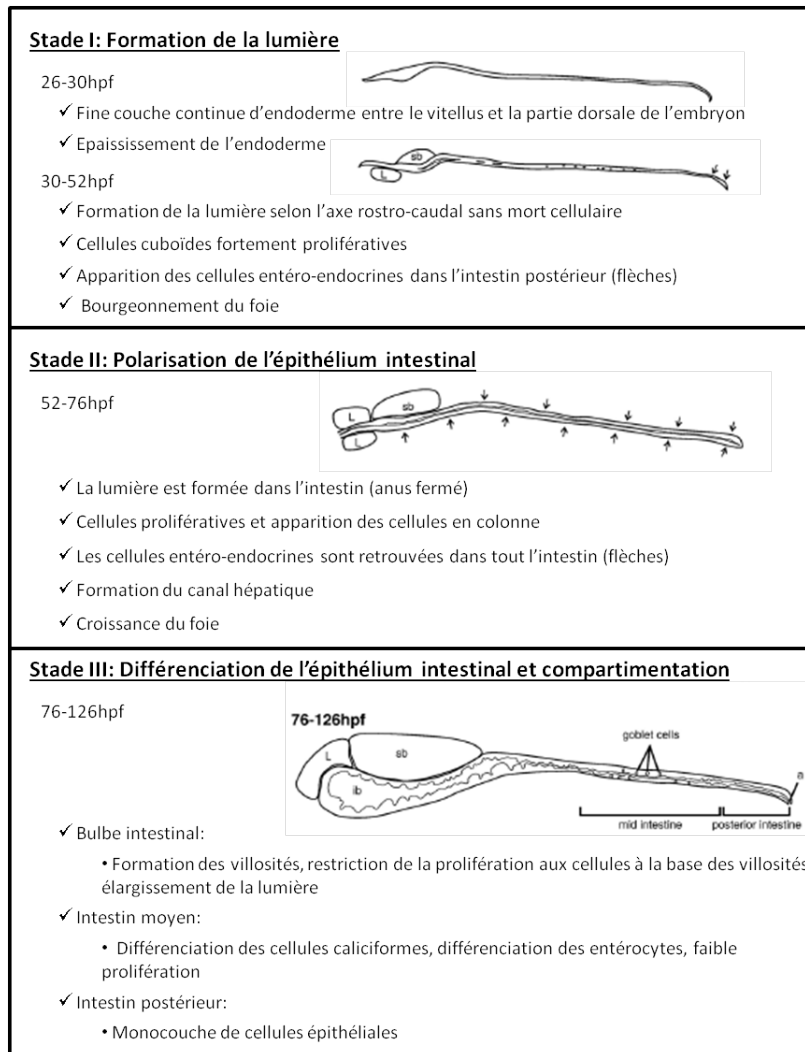


FIGURE 38: **Les différents stades de développement du tube digestif et du foie.** Récapitulatif schématique des différents stades de développement du tube digestif et du foie de l'embryon de poisson zèbre entre 26 hpf et 126 hpf (5 jpf). a : anus, ib : bulbe intestinal (intestinal bulb), L : foie (liver), sb : vessie natatoire (swim bladder). Figure adaptée de Ng et al. 2005.

4.5 Régénération de la nageoire caudale

La régénération de la nageoire caudale a lieu chez le poisson zèbre dès le stade larvaire. Ce modèle est intéressant pour la mise en évidence des mécanismes impli-

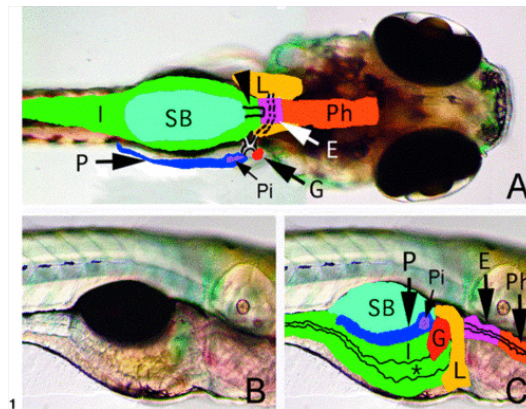


FIGURE 39: Anatomie du système digestif de la larve à 5 jpf. **A.** Vue dorsale, E : oesophage, G : vésicule biliaire, I : intestin, L : foie, P : pancréas, Ph : pharynx, Pi : unique îlot pancréatique, SB : vessie natatoire. Les lignes en pointillées et pleines représentent le canal du foie, du pancréas et de la vésicule biliaire. La tête de flèche noire indique le canal de la vessie natatoire. **B, C.** Vue latérale de la larve à 5 jpf, l'astérisque montre la lumière de l'intestin. Figure de Wallace et al. 2003.

qués dans la régénération des appendices.

Lors de la régénération deux domaines doivent être mis en place, l'épiderme de cicatrisation et le blastème. L'épiderme de cicatrisation permet de créer une niche pour le blastème. Le blastème contient les cellules nécessaires à la formation du nouvel appendice. Le devenir des cellules dépend de leur position dans le blastème : la partie apicale contient les cellules indifférenciées et la partie basale contient les cellules qui entrent en différenciation.

Le processus de régénération nécessite une balance entre prolifération/auto-renouvellement et différenciation. La régulation de l'expression génique par les mécanismes épigénétiques est importante pour le contrôle de la plasticité cellulaire et de la différenciation. Le processus de régénération nécessite la ré-expression des gènes exprimés lors de l'embryogénèse. Les gènes réprimés lors du développement contiennent les marques H3K4me3 et H3K27me3. Lors de la régénération la marque H3K27me3 est perdue et les gènes sont ré-exprimés (Stewart et al. 2009). La régénération de la nageoire caudale est complète entre 2 à 4 semaines chez l'adulte. L'initiation de la régénération ne nécessite pas le processus d'inflammation par les neutrophiles et les macrophages (Mathew et al. 2007). Chaque rayon se régénère indépendamment. La

nageoire caudale est composée de 16 à 18 segments principaux osseux séparés par des tissus mous composés de fibroblastes, de vaisseaux sanguins et de cellules nerveuses (figure 40A et B). La partie distale de la nageoire caudale est cartilagineuse et se termine par une structure en brosse appelée actinotriches.

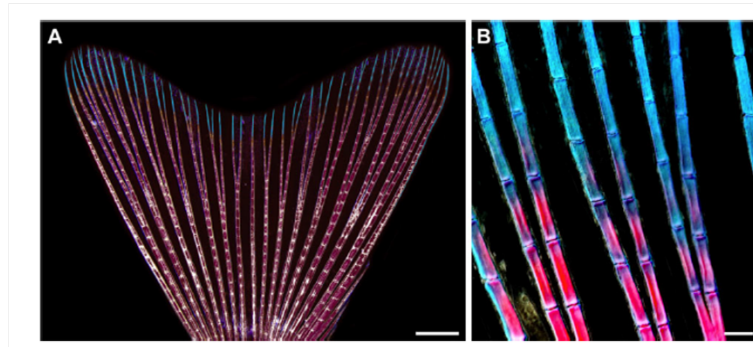


FIGURE 40: Structure de la nageoire caudale. Visualisation du squelette de la nageoire caudale, coloration bleu alcian (cartilage) et rouge alizarine (os). **A.** La nageoire caudale possède une morphologie bi-lobulée, elle est composée de 16 à 18 segments qui parfois se ramifient, cette structure est appelée lépidotriche (structures colorées). La coloration au rouge alizarine montre que les lépidotriches sont des structures osseuses sauf la partie distale colorée en bleu (cartilage). Les segments sont inter-connectés par des tissus mous (non colorés). Les segments des lépidotriches contiennent les ligaments (partie blanchâtre). **B.** La calcification n'est pas totale ou absente dans la partie la plus distale. Echelle A. 1000 μm B. 100 μm . Figure de Pfefferli et al. 2015.

La nageoire caudale est composée de différents types cellulaires qui se régénèrent afin de former le nouvel appendice. La régénération est permise par la formation au niveau apical d'un tissu prolifératif contenant des cellules indifférenciées ; appelé le blastème. Après amputation un tissu blanchâtre (épiderme de cicatrisation et quelques cellules du blastème) est formé entre le jour 1 et 2 post amputation (jpa), ce tissu croît jusqu'à 4 jpa. A partir de 6 jpa le tissu blanchâtre est toujours présent mais la base se différencie pour former les nouveaux tissus et il est pigmentée. A 3 semaines post amputation la taille et la forme de la nageoire sont retrouvées, cette évolution est représentée figure 41 et schématisée figure 43.

Formation de l'épiderme de cicatrisation et du blastème. 1jpa. Un jour après amputation l'épiderme de cicatrisation s'épaissit et le tissu situé en dessous est désorganisé, les vaisseaux sanguins ont cicatrisé. L'épiderme de cicatrisation sécrète

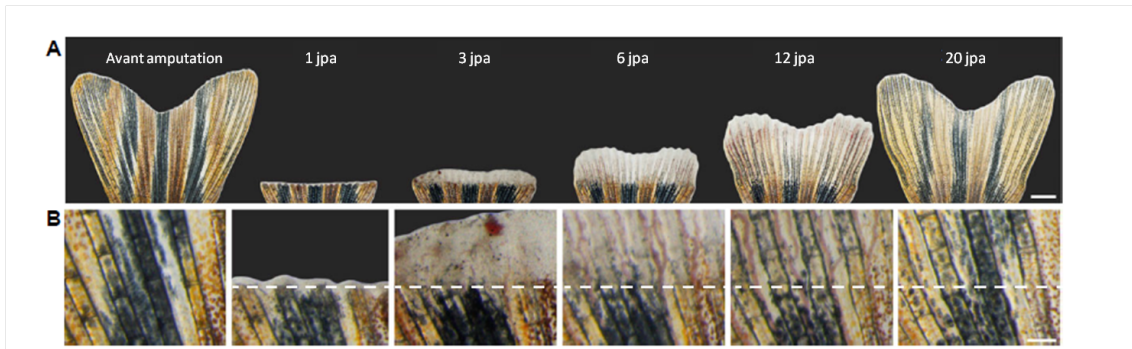


FIGURE 41: **Echelle de temps de la régénération de la nageoire caudale chez l'adulte.** **A.** Appendice original avant amputation, à 1 jpa formation du tissu blanchâtre composé de l'épiderme de cicatrisation et de quelques cellules du blastème. A 3 jpa le blastème est formé, à 6 jpa la croissance est rapide, le tissu blanchâtre se trouve au niveau apical, à la base les cellules se différencient et la pigmentation apparaît. A 20 jpa la taille de la nageoire caudale et sa forme sont proches de la nageoire avant amputation. Le tissu blanchâtre reste à l'apex de la nageoire pour la croissance et la régénération. **B.** Grossissement des différents stades de la régénération au niveau de la zone amputée (ligne pointillée). Echelle A. 1000 μm B.-D. 100 μm . Figure adaptée de Pfefferli et al. 2015.

des facteurs comme Sonic Hedghog, Wnt5b, Fgf24 pour contrôler la fonction du blastème. La formation de l'épiderme de cicatrisation est dépendante du blastème qui sécrète Fgf20, Sdf1, Igf2 et l'acide rétinoïque. Si ces facteurs sont inhibés, il n'y a pas de formation ni du blastème ni de l'épiderme de cicatrisation. L'acide rétinoïque est présent quelques heures après l'amputation et maintient la prolifération des cellules du blastème et permet la survie cellulaire (Blum et al. 2012). Les glucocorticoïdes sont importants pour la mise en place du blastème et de l'épiderme de cicatrisation. L'inhibition des glucocorticoïdes empêche la régénération (Mathew et al. 2007).

3 jpa. A 3 jpa le blastème acquiert une organisation selon l'axe apico-basal. Les cellules prolifératives expriment *msxb* induite par le Fgf lors de la formation du blastème, plus tard son expression est restreinte aux cellules non prolifératives à la base du blastème ; ainsi l'expression de *msxb* permet de mettre en place un axe de régénération (Nechiporuk et al. 2002). Notch maintient les cellules du blastème en prolifération et dans un état indifférencié (Pfefferli et al. 2015).

Régénération des structures osseuses et cartilagineuses. Les gènes *actinodine 1* et *actinodine 2* sont essentiels pour la formation des actinotriches (Zhang

et al. 2010a). Le blastème est formé par des cellules indifférenciées. Les ostéoblastes matures se dédifférencient et font partie du blastème afin de former les nouveaux lépidotriches. La dédifférenciation des ostéoblastes est permise grâce à l'expression de la voie Wnt/ β Caténine, l'activation de cette voie induit la transition épithélio-mésenchymateuse des ostéoblastes (Stewart et al. 2014). Les ostéoblastes dédifférenciés ne se différencient qu'en ostéoblastes, leur prolifération et migration vers le blastème est dépendante du Fgf.

Les ostéoblastes dédifférenciés se trouvent au bord du blastème (Knopf et al. 2011). Selon Singh et al. 2012, d'autres types cellulaires peuvent se différencier en ostéoblastes et participer à la régénération des lépidotriches. La différenciation des ostéoblastes se fait par l'activation de *sp7* et *dkk1b* via Bmp (Bone Morphogenetic Protein), Bmp contrôlent la croissance et la différenciation des os lors de la régénération de la nageoire caudale (Stewart et al. 2014).

Régénération des vaisseaux sanguins. Les vaisseaux sont cicatrisés 1 jpa puis connectés aux veines et aux artères 2 jpa. La régénération se fait par la formation d'un plexus (anastomose des différents vaisseaux) non structuré. Cependant le réseau sanguin identique à l'initial est retrouvé à 35 jpa. L'angiogénèse et la formation du plexus dépendent de l'expression de *reg6* (figure 42) (Huang et al. 2003).

4.6 La répression Polycomb chez le poisson zèbre

Protéines homologues. Les protéines Polycomb sont conservées dans l'évolution et les orthologues des protéines composant les complexes PRC1 et PRC2 de la drosophile sont retrouvés chez le poisson zèbre. Cependant, le génome des téléostéens a subi une duplication. Les protéines du complexe PRC2 chez le poisson zèbre sont conservées. Le complexe PRC2 est composé de Suz12 (deux orthologues : Suz12a et Suz12b), Eed et Ezh1 ou Ezh2 (Whitcomb et al. 2007). Cependant il existe 19 gènes codant pour les protéines du complexe PRC1 chez le poisson zèbre. Il y a 8 orthologues de Pc (Cxb2, Cbx4, Cbx6a, Cbx6b, Cbx7a, Cbx7b, Cbx8a et Cbx8b), 6 orthologues de Psc (Bmi1a, Bmi1b, Pcgf1, Pcgf5a, Pcgf5b et Pcgf6), 4 orthologues

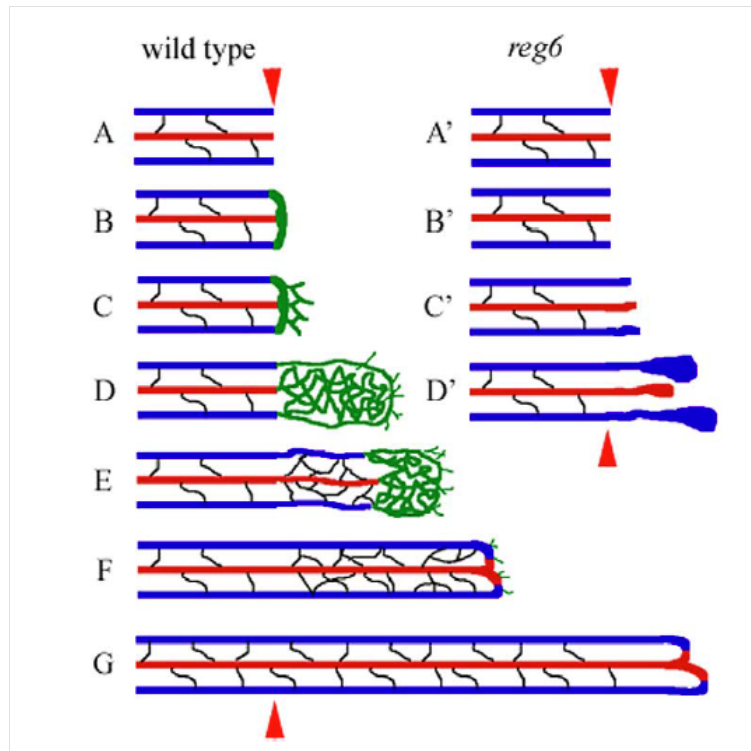


FIGURE 42: **Schéma des différentes étapes de la régénération des vaisseaux sanguins chez les sauvages et chez les mutants *reg6*.** Les lignes rouges et bleues schématisent respectivement les artères et les veines. Les nouveaux vaisseaux sont représentés en vert et ne sont pas différenciés en veines ou artères. Les lignes noires représentent le réseaux de capillaires. **A.** A 1 jpa le vaisseau amputé est cicatrisé. **B.** L'anastomose a lieu entre 1 et 2 jpa, la circulation sanguine a lieu au niveau du site d'amputation. **C, D** Après l'anastomose un plexus non structuré (vert) est mis en place. **E, F.** Les nouvelles veines et artères se différencient à partir de 4 jpa. La formation des nouveaux vaisseaux arrête la formation du plexus à 8 jpa. **G.** A 35 jpa le réseau sanguin est totalement régénéré. **A'.** Chez les mutants *reg6* la cicatrisation a lieu normalement mais l'anastomose n'a pas lieu **B'** et la formation du plexus est altérée **C', D'**. Figure de Huang et al. 2003.

de Ph (Phc1, Phc2a, Phc2b et Phc3) et un seul orthologue de Sce (Rnf2). Il n'y a pas d'orthologue de PCGF2 et PCGF3 chez le poisson zèbre (Le Faou et al. 2011a).

Mutants. Afin d'étudier le rôle de ces protéines dans le développement des mutants ont été développés (table 6).

Schéma de la régénération de la nageoire caudale :

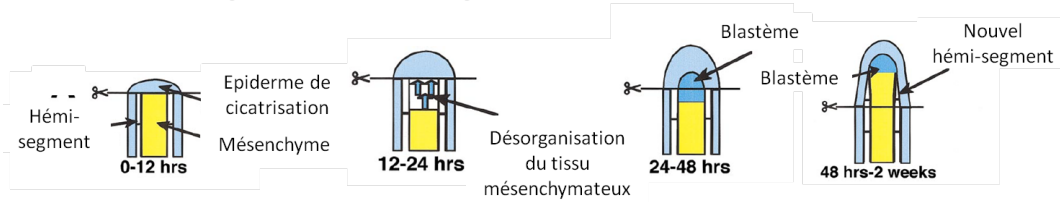


FIGURE 43: Schéma des différentes étapes de la régénération de la nageoire caudale. **A.** Cicatrisation : formation de l'épiderme de cicatrisation, indispensable à la formation du blastème. **B.** Désorganisation du tissu situé sous l'épiderme de cicatrisation. Les cellules se dédifférencient, recrutement des cellules souches. **C.** Formation du blastème constitué de cellules dé-différenciées, cellules souches. **D.** Différenciation au niveau de la partie basale du blastème, morphogenèse. La régénération a lieu en 2 à 4 semaines. Figure adaptée de Tawk et al. 2003.

Nom des gènes mutés	Ciblage	Phénotypes	Références
<i>ezh2</i>	ENU	Mortelle à 2 jpf en l'absence d'ARN maternel (malformations : coeur, foie, pancréas)	San et al. 2016
<i>suz12</i>	Morpholino	hématopoïèse anormale	Eckfeldt et al. 2005
<i>bmi1a/ bmi1b</i>	Morpholino	Développement anormal du cerveau	Mochida et al. 2012
<i>rmf2</i>	ZFN	Développement cranio-facial anormal (absence de cartilage, os et muscles) et absence de nageoires pectorales	van der Velden et al. 2013, van der Velden et al. 2012

TABLE 6: Protéines du complexe PRC2 mutées chez le poisson zèbre.

4.7 Poisson zèbre et cancer

Une part importante de la recherche est dédiée au cancer. Celle-ci se base sur des modèles cellulaires mais aussi des modèles animaux murins. Le poisson zèbre est utilisé comme modèle en cancérologie afin de réduire l'utilisation des mammifères (Mione et al. 2010).

Xénogreffes. Couramment des xénogreffes de cellules cancéreuses sont réalisées chez les embryons. Les cellules sont micro-injectées chez les embryons de 2 jours. L'utilisation d'embryons transparents permet d'étudier l'extravasation des cellules

cancéreuses lors du processus de métastase (Stoletov et al. 2010). Le comportement des cellules xénogreffées peut être étudié jusqu'à ce que la larve soit âgée de 11 jours. A partir de ce stade, la larve développe son système immunitaire et les cellules xénogreffées peuvent être rejetées. Le système est totalement développé à 4 semaines. Afin de placer les cellules et l'embryon dans un environnement idéal pour leur croissance, les embryons injectés sont gardés à 34°C (Eguiara et al. 2011). Les cellules humaines xénogreffées répondent aux cytokines du poisson zèbre et sont capables de moduler le micro-environnement du poisson zèbre. Les molécules et composants cellulaires impliqués dans la tumorigénèse sont conservés entre l'Homme et le poisson zèbre (Chen et al. 2017b).

La génération de lignées transgéniques exprimant la GFP spécifiquement au niveau de la vascularisation comme Tg(Flk1:EGFP) permet d'observer le processus de vascularisation de la masse tumorale (Zhao et al. 2011).

Chapman et al. 2014, montrent que la xénogreffe de cellules de mélanome met en évidence un phénomène d'invasion coopérative. Lors de l'invasion les cellules initiatrices du processus favorisent le passage de cellules peu invasives, ce qui peut expliquer l'hétérogénéité des métastases.

Modèles mutants. La génération d'une lignée mutante exprimant le gène *BRAF^{V600E}* sous le contrôle du promoteur *mitfa* spécifique des mélanocytes, cause l'apparition de naevi chez les poissons. Si *tp53* est muté alors les lésions se transforment rapidement en mélanomes invasifs avec une histologie similaire à celle de l'Homme. Ce résultat met en évidence que la mutation de *braf* est un des premiers événements lors du développement du mélanome ; les voies Braf et P53 agissent ensemble (Patton et al. 2005).

L'expression de la protéine mutée Ras^{V12}, cause le développement de mélanomes dès le stade larvaire. Ce mutant permet d'identifier PI3K comme possible cible thérapeutique (Michailidou et al. 2009). L'utilisation du système Gal/UAS permet d'étudier rapidement l'effet tumorigène de la mutation *KRAS^{G12V}* *in vivo*. Elle est exprimé spécifiquement dans le pancréas exocrine grâce au contrôle de l'expression de Gal4

par le promoteur spécifique du pancréas exocrine, *ptf1a*. (Park et al. 2015). Les poissons développent des tumeurs pancréatiques avec une histologie semblable à celle de l'Homme (Liu et al. 2011).

Afin de faciliter l'imagerie et l'observation du développement tumoral et des xéno-greffes, White et al. 2008, développent une lignée transgénique transparente, *casper*. Elle permet de visualiser facilement les cellules exprimant la GFP *in vivo* de 2 heures à 5 semaines post-greffe. Ce modèle permet de visualiser les métastases 3-5 jours après la greffe et jusqu'à 3-4 semaines plus tard.

Modèle transgénique. La génération d'une lignée transgénique exprimant le gène de souris *C-Myc* fusionné à la GFP sous le contrôle du promoteur *rag2* cause le développement d'une leucémie en 52 jours et chez 100% des individus. La leucémie survient dans le thymus puis les cellules se propagent dans les branchies, le tissu rétro-orbitaire, les muscles squelettiques et les organes abdominaux. Ce modèle transgénique peut être utilisé pour tester des drogues et pour identifier les mutations associées à la tumorigénèse par C-myc car ce modèle de tumorigénèse spontanée est semblable à celui de l'Homme (Langenau et al. 2003). Cependant le développement de la leucémie chez les modèles transgéniques Rag2, Tg(zRag2-EGFP-mMyc), cause la mort des poissons. Pour résoudre ce problème et entretenir des lignées viables, Langenau et al. 2005, développent une lignée viable rag2-loxP-dsRED2-loxP-EGFP-cMyc, les thymocytes sont fluorescents en rouge et les poissons ne développent pas de leucémie. L'expression de EGFP-cMyc peut être induite en injectant l'ARN Cre dans les embryons au stade une cellule. Les poissons développent une leucémie et les thymocytes fluorescent en vert.

Découvertes de drogues. Le poisson zèbre xéno-greffé ou transgénique est largement utilisé pour découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques. L'application des drogues est facile, les embryons absorbent les molécules de petits poids moléculaires diluées dans le milieu via la peau et les branchies. Les composés hydrophobes peuvent être injectés aux stades 1 à 4 cellules dans le vitellus ou plus tard dans le sinus veineux. Les larves de plus de 7 jours et les adultes absorbent oralement les

composés (Langheinrich 2003).

La lignée transgénique *mitf-Braf^{v600e}-p53^{-/-}* développant des mélanomes a permis d'identifier un inhibiteur de la DHODH (dihydroorotate déhydrogénase), le leflunomide. Le leflunomide ralentit la croissance des cellules de mélanome en inhibant l'élongation des transcrits (diminution de 49% des gènes sur-exprimés dans le mélanome). Utilisé seul ou en combinaison avec un inhibiteur de Braf, le leflunomide cause un arrêt marqué de la croissance cellulaire (White et al. 2011). Le leflunomide a été testé en essai clinique en 2012 : NCT01611675 (*NCT01611675*).

Deuxième partie

Matériels et Méthodes

Chapitre 1

Contexte scientifique

Le cancer a d'abord été associé à un certain nombre de mutations génétiques (Hanahan et al. 2011). Les gènes impliqués dans le cancer comme par exemple *RB*, *PTEN* ou *BRCA1/2* sont retrouvés mutés. Cependant la dé-régulation des mécanismes épigénétiques prend également part au développement cancéreux. La mutation des protéines impliquées dans les régulations épigénétiques (HDAC, Polycomb...) sont impliquées dans le développement cancéreux et l'embryogénèse où elles régulent l'expression génique (Sparmann et al. 2006, You et al. 2012). Les développements embryonnaires et cancéreux sont très proches et impliquent les mêmes voies de signalisation (WNT, FGF, NOTCH, HEDGEHOG), les mêmes expressions géniques (c-MYC, RB) et ont le même comportement (invasion (implantation), échappement au système immunitaire, prolifération) (Ma et al. 2010, Surface et al. 2010). Ainsi l'utilisation du modèle embryonnaire peut aider à mieux comprendre le développement cancéreux. Le modèle du poisson zèbre est largement utilisé pour étudier le développement embryonnaire et le développement cancéreux (White et al. 2013). Le laboratoire a choisi ce modèle pour étudier le rôle des protéines Polycomb pour ses divers avantages (nombreux embryons, développement *ex-utero*, cancer identique à l'Homme au niveau génétique et histologique, test d'inhibiteur à grande échelle). Les protéines du complexe PRC1 sont impliquées dans le cancer (Gil et al. 2014), ainsi que celles du PRC2. Nous nous intéressons particulièrement aux protéines Pcgf1 et Ezh2. PCGF1 est impliquée dans la mise en place de la marque H2AK119ub1.

EZH2 est retrouvée mutée dans de nombreux cancers et joue un rôle fondamental dans la biologie des cellules souches cancéreuses (Völkel et al. 2015). Cependant le rôle d'EZH2 dans le développement n'est pas encore bien établi. C'est pourquoi notre étude s'intéresse à la compréhension du rôle des protéines Polycomb dans le développement du poisson zèbre.

Chapitre 2

Objectifs de la thèse

Notre laboratoire étudie le rôle de la plasticité cellulaire dans les cancers. Les protéines des complexes Polycomb PRC1 et PRC2 sont impliquées dans de nombreux cancers et dans la biologie des cellules souches cancéreuses (Gil et al. 2014, Valk-Lingbeek et al. 2004, Laugesen et al. 2016, Margueron et al. 2011). Les gènes retrouvés mutés et dérégulés dans les cancers sont également des gènes clés dans le développement embryonnaire (Ma et al. 2010). O'Carroll et al. 2001, créent un mutant homozygote d'Ezh2 chez la souris, ce mutant meurt avant le stade gastrulation et ne permet pas d'identifier un rôle particulier d'Ezh2. Le Faou et al. 2011b ont montré que les protéines Polycomb sont conservées chez le poisson zèbre. L'objectif de ma thèse est d'utiliser le modèle du poisson zèbre afin d'étudier le rôle des protéines Polycomb Pcgf1 et Ezh2. En comparaison au modèle murin, notre modèle pourra nous permettre de visualiser facilement les premières étapes du développement. Les protéines Pcgf1 et Ezh2 ont été inactivées à l'aide des TALEN. Ainsi j'ai pu étudier leur rôle dans le développement du poisson zèbre.

Chapitre 3

Matériels et méthodes

La lignée de poisson zèbre utilisée au laboratoire est la lignée Tuebingen (TU). Les TALEN ont été injectés au stade une cellule, les lignées F0 obtenues ont été génotypées par "fin-clipping", amputation d'une partie de la nagoire caudale. Les individus sont triés sur la perte d'un site de restriction au niveau du site de coupure du TALEN, ceci nous permet de génotyper facilement nos embryons par RFLP (restriction fragment length polymorphism). Les individus possédant une transmission germinale de la mutation ont été conservés. La mutation a été identifiée par séquençage. Le phénotype a été étudié sur des lignées rétro-croisées afin d'éliminer les possibles mutations off-target des TALEN. La lignée Ezh2 homozygote mutante n'est pas viable. Au cours de ma thèse j'ai dû développer des protocoles qui m'ont permis de réaliser un génotypage à la fin de chaque expérience afin d'avoir la certitude que le phénotype est lié au génotype.

3.1 TALEN

Tous les TALEN ont été conçus et assemblés dans les vecteurs d'expression pCS2TAL3DD et pCS2TAL3RR par la technique du Golden Gate (Cermak et al., 2011). Dans ces vecteurs, l'expression des TALEN est sous le contrôle du promoteur SP6 (Dahlem et al., 2012).

Préparation des ARNm des TALEN. L'ARNm des TALEN est synthétisé par transcription *in vitro* grâce au kit mMessage mMachine SP6 (Ambio) par l'ARN polymérase SP6 à partir du vecteur d'expression. Pour cela, les vecteurs sont digérés dans un premier temps par NotI (New England Biolabs) puis sont purifiés par le kit Mini Elute (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. Les ARNm synthétisés sont purifiés par le kit RNeasy (Qiagen). La concentration des ARN est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop Multiskan Go Thermo. La qualité des ARN est ensuite vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose 2%.

Micro-injections. Les ARN obtenus sont dilués dans du tampon 10X Ringer (75 g/L NaCl; 2 g/L KCl; 2 g/L CaCl₂; 0,2 g/L NaHCO₃, pH7) contenant 5% de rouge de phénol jusqu'à une concentration finale de 200 ng/ μ L. Les ARN sont injectés grâce à un micro-injecteur (Femto-Jet, Eppendorf) dans les embryons de poisson zèbre au stade une cellule.

3.2 Génotypage

Les TALEN sont choisis de manière à ce que la mutation de type indel générée, détruit un site de restriction au niveau de l'ADN génomique. C'est la présence ou l'absence de ce site de restriction qui sera utilisée pour le génotypage et l'identification des poissons mutants. L'ADN génomique des embryons ou des échantillons de nageoires caudales de poissons adultes est extrait, amplifié par PCR et soumis à l'analyse par restriction enzymatique.

Extraction d'ADN génomique à partir d'embryons de poissons zèbres.

Par la protéinase K. Les embryons de poissons zèbres sont placés dans 20 μ L de tampon (10 mM Tris-HCl pH8,0; 2 mM EDTA; 0,2% Triton X-100; 100 μ g/mL protéinase K (Sigma)) et incubés toute la nuit à 50°C. La protéinase K est ensuite inactivée à 95°C pendant 5 minutes puis la région cible du TALEN est amplifiée par PCR.

Par la soude. Les embryons sont placés dans une tube de 0,2mL et le glycérol (utilisé pour l'imagerie) est lavé avec 200 μ L de PBS et centrifugés brièvement. L'ADN est extrait dans 20 μ L de 50mM NaOH et chauffé 20 min à 95°C puis refroidi 15 min à 4°C. Afin d'acidifier le milieu 2 μ L de 1M Tris-HCL pH 7.4 sont ajoutés. Les échantillons sont vortexés et centrifugés.

Extraction d'ADN génomique à partir de la nageoire caudale de poissons adultes. Les poissons sont anesthésiés dans une solution de tricaine 0,016% (MS-222, Sigma). La moitié de la nageoire caudale est coupée avec du matériel stérile puis placée dans 20 μ L de tampon d'extraction (10 mM Tris-HCl pH8,0; 2 mM EDTA; 0,2% Triton X-100; 100 μ g/mL protéinase K) et incubés 4 h à 50°C. La protéinase K est ensuite inactivée à 95°C pendant 5 minutes puis la région cible du TALEN est amplifiée par PCR.

Amplification par PCR de l'ADN génomique. La PCR est effectuée dans un volume réactionnel de 20 μ L, contenant 2,5 μ L de solution d'ADN génomique extrait, 2 μ L de tampon 10x (Euromedex), 0,2 mM de dNTP, 0,5 μ M de chacune des amorces, 0,2 μ L de Taq Polymérase (5 U/ μ L; Euromedex). Les conditions de PCR sont : 2 min à 94°C, suivies de 39 cycles de 20 sec à 94°C – 45 sec à 65°C – 30 sec à 72°C, suivis d'une période d'élongation de 5 min à 72°C. Les amorces employées pour amplifier la région génomique qui encadre le site reconnu par les TALEN utilisés pour inactiver les gènes *pcgf1* et *ezh2* sont :

ezh2-sens : GGTATGGTTGTTGCAGTTCACAGAC
ezh2-antisens : AACACCAAACCTCTACACAAGCAGCA
pcgf1-sens : GAACACAATGAACACAATGGC
pcgf-antisens : GGACAATACTTGCTGGTCTGG

Digestion enzymatique de l'amplicon. Les produits de PCR sont analysés par restriction enzymatique dans un volume final de 15 μ L. Toutes les réactions de digestion pour le génotypage des mutants *pcgf1* contiennent 3 μ L de produit PCR, 3U d'enzyme de restriction et 1,5 μ L de tampon de restriction NEB (10x, New

England Biolabs) et celles pour le génotypage des mutants *ezh2* contiennent 4 μL de produit de PCR, 4 U d'enzyme de restriction et 1,5 μL de tampon de restriction NEB 10X. Les tubes sont mis à 37°C toute la nuit avant séparation des produits de digestion par électrophorèse en gel d'agarose à 2%. Les enzymes de restriction utilisées sont DdeI (New England Biolabs) pour identifier l'inactivation d'*ezh2* et ClaI (New England Biolabs) pour identifier l'inactivation de *pcgf1*.

Séquençage de l'ADN. Les plasmides sont séquencés par la société GATC (Allemagne).

3.3 Quantification de la courbure de la colonne vertébrale

Les adultes ont été anesthésiés dans une solution de MS-222 (0,168mg/mL) puis photographiés. A l'aide du logiciel image J, une ligne a été tracée entre le centre de l'oeil et la fin de la nageoire caudale puis une ligne perpendiculaire à cette dernière est tracée au niveau de l'apex du corps du poisson (figure 44). La quantification de la courbure de la nageoire caudale est obtenue par le ratio $\frac{a}{b}$ (Gorman et al. 2007).



FIGURE 44: **Etude de la courbure de la colonne vertébrale chez les mutants *pcgf1*^{-/-} en comparaison aux sauvages.** Cette méthode a été utilisée par Gorman et al. 2007 et permet de quantifier la courbure de la colonne vertébrale grâce au ratio $\frac{a}{b}$.

3.4 Amputation de la nageoire caudale.

Chez les adultes. Les poissons sont anesthésiés dans un b cher contenant environ 100 mL solution de tricaine 0,016% (MS-222, 3-amino benzoic acid ethyl

ester, Sigma) dont le pH est ajusté à 7. Après quelques secondes, le poisson anesthésié est prélevé avec une cuillère en plastique. La moitié de la nageoire caudale est coupée à l'aide de ciseaux nettoyés à l'alcool 70%. Après amputation, les poissons sont mis dans un bac contenant de l'eau d'aquarium propre et leur comportement est suivi. Les poissons retrouvent une nage normale après environ 2 min.

Chez les embryons. Les embryons sont anesthésiés dans une plaque 6 puits contenant 5 mL de solution tricaine 0,016% dont le pH est ajusté à 7. Après quelques secondes, les embryons anesthésiés sont placés sous la loupe binoculaire. La nageoire caudale est amputée juste après la fin du vaisseau lors de l'étude de la régénération (figure 45) à l'aide d'un scalpel. A la fin de l'expérience, les larves sont placées dans 20 μ L de tampon NaOH pour l'extraction d'ADN. Lorsque les larves sont génotypées dans le but de réaliser un western-blot ou des inclusions en paraffine, la queue est coupée juste après la fin du système digestif. Les queues sont utilisées pour le génotypage (extraction d'ADN dans 10 μ L de NaOH) et les larves sont congelées (extraction d'histones) ou fixées (inclusion en paraffine).

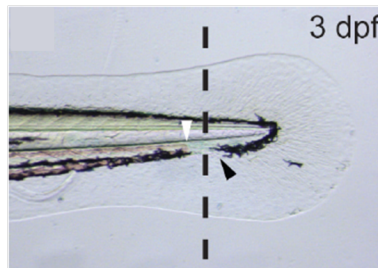


FIGURE 45: **Amputation de la nageoire caudale des embryons à 3 jpf** après le vaisseau sanguin. Figure adaptée de Wilkinson et al. 2013.

3.5 Hybridation *in situ*

Préparation des embryons pour l'hybridation *in situ*. Le bon développement des œufs collectés est contrôlé visuellement à l'aide d'une loupe binoculaire. Les œufs sont placés dans des boîtes de pétri en présence de milieu E2 (875 mg/L NaCl; 37,5 mg/L KCl; 120 mg/L MgSO₄; 20,5 mg/L KH₂PO₄; 6 mg/L Na₂HPO₄;

145 mg/L CaCl₂; 60 mg/L NaHCO₃) à 28,5°C jusqu'au stade de développement souhaité. Les oeufs sont déchorionés par incubation 1 min en présence de pronase (P6911, sigma) 1% préchauffé à 28,5°C. Les embryons sont alors fixés par du paraformaldéhyde (PFA) (Sigma) 4% dans le PBS (phosphate buffer saline, pH7,2) à 4°C pendant 24 h. Les embryons sont ensuite déshydratés dans du méthanol (100%) 15 min à température ambiante avant d'être conservés à -20°C.

Préparation des nageoires caudales en régénération pour l'hybridation *in situ*. Quatre jours après l'amputation (jpa), les poissons sont euthanasiés selon les recommandations en vigueur, par une surdose de tricaine (0,03%). La nageoire caudale en régénération est prélevée et fixée par du paraformaldéhyde 4% dans le PBS à 4°C toute la nuit. Les nageoires caudales sont ensuite déshydratées dans du méthanol 15 min à température ambiante avant d'être conservées à -20°C.

Synthèse des sondes pour l'hybridation *in situ*. Pour l'hybridation *in situ*, des sondes ARN contenant un nucléotide marqué à la digoxygénine (DIG) sont synthétisées *in vitro*. L'ADNc préalablement cloné dans le vecteur pSPT18-GW est placé entre les promoteurs SP6 en 5' et T7 en 3'. L'utilisation du promoteur SP6 permet de générer une sonde contrôle sens alors que le promoteur T7 est utilisé pour générer la sonde test antisens. Avant synthèse de la sonde, 1 µg de plasmide doit être linéarisé par 5 U d'enzyme de restriction (HindIII pour la sonde antisens, XbaI pour la sonde contrôle sens) pendant au moins 1 heure à 37°C. L'efficacité de la linéarisation des plasmides, est évaluée par électrophorèse en gel d'agarose à 1% dans du TAE (Tris-Acétate, 40 mM EDTA 1mM) en présence de BET (Promega). Avant de synthétiser les sondes, il est nécessaire d'éliminer les enzymes de restriction présentes avec les plasmides linéarisés. Pour cela, le kit MiniElute Gel Extraction (Qiagen) est utilisé suivant les instructions du fabricant. La synthèse de la sonde ARN est effectuée à l'aide du kit DIG RNA Labeling SP6/T7 (Roche), en suivant les instructions du fabricant et en utilisant l'ARN polymérase T7 pour générer la sonde antisens ou en utilisant l'ARN polymérase SP6 pour générer la sonde sens, à partir des plasmides. Le kit contient un des nucléotides marqués à

la digoxygénine, l'uridine-5'-triphosphate digoxigénine, permettant ainsi la synthèse d'une sonde marquée qui pourra être reconnue par un anticorps anti-digoxygénine. Après synthèse de la sonde à 37°C pendant 2 h, cette dernière est purifiée à l'aide du kit RNeasy Mini (Qiagen) selon les instructions du fabricant. La sonde ARN est éluée dans 40 μ L et sa concentration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop Multiskan Go Thermo. Un volume égal de formamide déionisée (Sigma) est ajouté afin de protéger la sonde avant son stockage à -20°C. La qualité de la sonde est évaluée par électrophorèse en gel d'agarose à 2% dans du TAE (40 mM Tris-Acétate; 1mM EDTA, pH8,3) en présence de BET (Promega). La synthèse de la sonde et sa purification s'effectuent dans des conditions qui évitent la contamination par les RNases (utilisation d'eau traitée au DEPC, nettoyage des plans de travail avec la solution RNase AWAY).

Hybridation *in situ* sur embryons entiers et nageoires caudales de poisson zèbre. Le protocole d'hybridation *in situ* est dérivé du protocole décrit par Thisse et Thisse, 2008, et suit plusieurs étapes. Les embryons et échantillons de nageoires caudales, placés dans de petits paniers, sont d'abord progressivement réhydratés par des lavages de 5 min dans des solutions à concentration décroissante (75% [vol/vol], 50%, 25%) de méthanol dans du PBS 1x, suivis par quatre lavages de 5 min dans du PBS - 0,1% Tween 20 (PBST). Les embryons sont ensuite perméabilisés dans un bain de Protéinase K (10 μ g/mL). La durée d'incubation dépend de la nature de l'échantillon :

- Stade 1-cellule : 30 secondes
- Stade 2-cellules : 30 secondes
- 24 heures après fécondation : 10 minutes
- 48 heures après fécondation : 30 minutes
- Nageoire caudale de la larve : 10 min
- Nageoire caudale adulte : 40 minutes

La réaction est arrêtée par incubation 20 min dans du paraformaldéhyde 4% dans du PBS. Quatre nouveaux lavages de 5 min dans le PBST sont réalisés avant

d'incuber les embryons 5h à 70°C dans 700 μ L de tampon d'hybridation [50% formamide déionisé, 5x SSC (solution saline de citrate de sodium ; 150 mM NaCl ; 15 mM Na₃Citrate.2H₂O), 0,1% Tween 20, ajusté à pH6,0 avec de l'acide citrique 1M] auxquels sont ajoutés 50 μ g/mL d'héparine (Sigma) et 500 μ g/mL d'ARNt (R7876, Sigma). Le tampon d'hybridation est remplacé par 200 μ L de tampon d'hybridation contenant 200 ng de la sonde d'ARN marquée. L'hybridation se déroule sur la nuit à 70°C. Une série de lavages de 10 min à 70°C est réalisée dans les solutions suivantes : 75% (vol/vol) tampon d'hybridation (TH) dans 2x SSC, 50% TH dans 2x SSC, 25% TH dans 2x SSC puis 100% TH dans 2x SSC. Les échantillons sont ensuite placés, 2 fois 30 min à 70°C dans une solution de 0,2x SSC puis 4 autres lavages sont effectués, 10 min par lavage, à température ambiante : 75% (vol/vol) 0.2x SSC dans le PBST, 50% 0,2x SSC dans le PBST, 25% 0,2x SSC dans le PBST et 100% PBST. Les embryons sont ensuite incubés dans du tampon de saturation (1x PBST, 2% sérum de mouton, 2 mg/mL BSA) pour une durée de 4 h à température ambiante et sous agitation (balance horizontale). Enfin les embryons sont placés dans une solution contenant l'anticorps anti-digoxigénine (DIG) couplé à la phosphatase alcaline (Roche – 150 U, dilution 1/10000), une nuit à 4°C sous agitation horizontale. La solution d'anticorps est enlevée. Un bref lavage dans du PBST est réalisé. Six bains de 15 min sont réalisés dans du PBST à température ambiante sous agitation. Le maximum de PBST est enlevé à l'aide d'un papier absorbant. Trois rinçages de 5 min dans du tampon Tris-Alcalin (100 mM Tris-HCl pH9,5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20) à température ambiante sous agitation sont effectués. Le tampon Tris-Alcalin est remplacé par 700 μ L pour les embryons, ou 2,1 mL pour les nageoires caudales, de solution de coloration (22,5 mg/L NBT, 17,5mg/L BCIP dans du tampon Tris-Alcalin) révélant les zones marquées par l'anticorps anti-DIG. L'évolution de la coloration est suivie sous une loupe binoculaire et peut apparaître après 15 min à 21 h. La réaction est stoppée une fois que l'intensité de coloration désirée est atteinte. Trois bains de 15 min sont effectués dans la solution Stop (1x PBS pH5,5 ; 1 mM EDTA ; 0,1% Tween 20), à température ambiante, avec agitation à l'abri de la lumière. Les embryons sont enfin transférés dans une boîte de pétri

contenant du glycérol 70% toute la nuit.

3.6 Extraction des ARN

Extraction des ARN totaux : méthode phénol/chloroforme/isopropanol.

L'extraction des ARN totaux est effectuée sur 50 embryons au stade précoce et 20 embryons à partir du stade 1 jpf. Les embryons sont placés dans un tube Eppendorf de 1,5 mL, 1 mL de TRIzol (Life Technologies) est ajouté directement après anesthésie des embryons sur glace puis les tubes sont placés à -80°C une nuit complète au minimum. Les tubes sont ensuite décongelés sur glace, et dans un environnement traité au RNase Away (Molecular BioProducts), les embryons sont broyés avec un piston de Dounce. Pour isoler les ARN, 200 μL de chloroforme est ajouté avant d'homogénéiser vivement et de centrifuger 20 min à 14450 g et à 4°C . La phase aqueuse supérieure est récupérée et les ARN sont précipités avec 500 μL d'isopropanol à température ambiante pendant 20 minutes avant d'être centrifugés pendant 5 min à 5890g à 4°C . Le culot est ensuite lavé avec 1 mL d'éthanol 75% à froid (-20°C) qui est par la suite enlevé. Une fois séché à l'air libre, l'ARN total est dissout dans 30 μL d'eau exempts de RNase (MilliQ, Millipore) et est stocké à -20°C .

Traitement à la DNase des ARN totaux. Les ARN totaux sont traités à la DNase selon le protocole : 5 μg ARN, 7 μl de tampon RDD (10 X, Quiagen), 2,72 unités Kunitz de DNaseI (2,72U/ μL , Quiagen) dans un volume final de 25 μL . La réaction est portée à 37°C pendant 20 min, puis 0,5 μM d'EDTA pH 8 est ajouté pendant 2h à température ambiante afin de protéger l'ARN lors de l'étape d'inactivation de la DNase. Enfin, la DNase est inactivée en chauffant à 75°C pendant 10 min. Les ARN traités sont stockés à -20°C .

Rétro-transcription et PCR. Sur les ARN totaux traités à la DNase, la RT-PCR est réalisée en deux étapes : la rétro-transcription et l'amplification d'un fragment de l'ADNc d'intérêt. Pour la rétro-transcription : 1 μg d'ARN, 500 ng d'oligo (dT)18 (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Fermental), 4 mM de dNTP (Promega). L'échantillon est placé

5 min à 65°C puis au moins une minute sur glace. L'échantillon est ensuite complé-
menté avec 4 μ L de 5 X buffer, 0,1 M de DTT, 40 U de RNase OUT et 200 U de
la rétro-transcriptase Superscript III (Thermofisher). La rétro-transcription se fait
alors grâce au programme : 5 min à 25°C, 60 min à 50°C puis 15 min à 70°C. Enfin,
2U de RNaseH (2U/ μ L, Invitrogen) sont ajoutées. L'enzyme agit à 37°C durant 20
min puis l'échantillon est stocké à +4°C si utilisé immédiatement ou à -20°C. Pour
la deuxième étape, les PCR sont réalisées avec les amorces suivantes :

Amorces ADNc ezh2 : 5' GAGGTGAAAGGACCCTCTACC 3'
Amorces ADNc ezh2 : 5' CTCAGTTTCCATTCCTGATTTAAG 3'
Amorces ADNc β -actine : 5' CGTGACATCAAGGAGAAGCT 3'
Amorces ADNc β -actine : 5' ATCCACATCTGCTGGAAGGT3'

Puis 2 μ L d'ADNc sont introduits dans chaque tube ainsi que 1,25 mM de MgCl₂,
5 Mm de dNTPs, 0,5 μ M de chaque amorce, 2,5 μ L de tampon 10X, 2,5 U de Taq
Polymérase (5U/ μ L, Euromedex) et de l'eau qsp 25 μ L. Ensuite la réaction est me-
née de telle manière : 4 min à 95°C, 35 cycles : 45 s à 95°C, 45 s à 55°C, 1 min à
72°C ; puis 72°C durant 10 min. Les températures d'hybridation des amorces sont :
60°C pour ezh2, 55°C pour la β -actine.

3.7 Western Blot

Extraction des histones. Pour pouvoir extraire efficacement les histones, les
larves sont congelées dans de l'azote liquide et stockées à -80°C. Dans le cas de
l'extraction d'histones des embryons provenant du croisement ezh2^{+/-} x ezh2^{+/-}, les
larves sont génotypées, la queue est coupée, l'ADN est extrait dans 10 μ L de NaOH
et les larves sont ensuite regroupées par génotype lors de l'étape d'homogénéisation
des tissus. Pour les embryons issus des croisement pcgfl^{-/-} x pcgfl^{-/-} et sauvages,
5 embryons entiers sont utilisés pour réaliser l'extraction. Après congélation dans
l'azote liquide, les embryons sont homogénéisés dans un volume de tampon d'ex-
traction au Triton (TBE) de 15 μ L pour 5 et 10 larves. Les tubes sont gardés sur

glace pendant 10 min puis centrifugés à 330 g à 4°C pendant 10 min. Le culot est resuspendu avec la moitié de volume de TEB utilisé dans l'étape d'homogénéisation des tissus, puis les échantillons sont à nouveau centrifugés à 330 g à 4°C pendant 10 min. Les culots sont resuspendus dans le même volume de 0,2 N HCl. Les tubes sont ensuite placés horizontalement et laissés la nuit à 4°C sur un agitateur horizontal. Le lendemain, les tubes sont centrifugés comme précédemment à 330 g à 4°C pendant 10 min afin de récupérer le surnageant contenant les histones ; le culot contenant les autres protéines, non solubles dans l'acide, n'est pas conservé. La concentration en protéines de chaque échantillon est ensuite évaluée par la méthode spectrophotométrique de Bradford. Les concentrations des échantillons sont calculées grâce à un dosage de solutions d'une gamme étalon de BSA. Les échantillons sont en parallèle, dilués au 1/5 dans de l'eau désionisée. Dans chaque tube échantillon et étalon, 1 mL de la solution de réaction de Bradford (Protein Assay, Biorad) est ajouté. Après avoir vortexé les tubes et les avoir incubés entre 5 et 60 min, l'absorbance des échantillons et des étalons est mesurée à $\lambda = 595\text{nm}$ (Eppendorf, Biophotometer). Les points obtenus par la mesure des étalons nous permettent ensuite de tracer une droite. Enfin, les quantités protéiques contenues dans les échantillons sont calculées grâce à la pente de la droite. Pour chaque échantillon, un tube contenant 15 μg de protéines sera préparé.

Western-blot. Les échantillons sont ensuite préparés pour la migration sur gel de polyacrylamide. Chaque échantillon est complété par 1 X de tampon bleu (4 X, Invitrogen) et 1 X de tampon fast red (10 X ; 14,7 M β -mercaptoethanol ; 3,78 g DL-Dithiothreitol) qsp 15 μL avec 0,2N HCL, puis est porté à 70°C durant 10 min. Le gel de polyacrilamide pré-coulé (4-14% Bis-Tris acrylamide, Invitrogen NuPage) est monté dans un système contenant du tampon 1 X MES SDS Buffer (Invitrogen). Les échantillons sont ensuite déposés sur le gel pré-coulé et la migration est réalisée à 150 V. Après migration, le gel est extrait de la cassette en plastique et est placé sur la membrane en nitrocellulose dans l'appareil de transfert sec (iBlot Dry Blotting System, Invitrogen). La membrane est ensuite lavée deux fois avec de l'eau

distillée et est colorée au rouge Ponceau (Sigma), puis décolorée au PBS-0.1%Tween. La membrane est ensuite bloquée dans une solution de lait écrémé à 5% dans du PBS-0.1%Tween à température ambiante. La solution est remplacée et la membrane est incubée avec l'anticorps primaire (H3K27me3-mouse, dilution 1/1000, réf. ab6002, Abcam ou H2AK119ub1, 1/500, ABE569, Millipore ou H3-rabbit, 1/5000, ab1791, Abcam) une heure à température ambiante. Après avoir retiré la solution, la membrane est lavée trois fois pendant 10 min avec du PBS-0.1%Tween sur agitateur horizontal. La membrane est ensuite incubée 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (HRP-anti-souris, 1/5000, 115-035-003, FRP Jackson ou HRP-anti-lapin, 1/5000, 711-035-152, FRP Jackson). La membrane est ensuite lavée trois fois au PBS-0.1%Tween pendant 10 min. La révélation par chimiluminescence se fait ensuite avec le kit Femto (Thermo) selon les instructions du fournisseur. La lecture de la membrane est réalisée par la machine LAS-4000 et commandée par le logiciel Image Reader LAS-4000 (Fujifilm).

3.8 Coloration par l'Oil-red-O

Les larves sont fixées une nuit à 4°C dans une solution 4% PFA-PBS. Les larves sont rincées deux fois pendant 1 min avec du PBS, puis sont transférées dans un tamis 40 μ M (Falcon) et décolorées pendant 2h30 avec une solution de 1% KOH et 3% de H₂O₂ dans de l'eau. Les larves sont ensuite lavées cinq fois pendant 3 min dans du PBS et sont colorées durant 15 min dans de l'Oil-Red-O (Hamiya Biochemical Company) dilué à 60% dans de l'eau. Après coloration elles sont lavées une fois au PBS pendant 15 min puis une deuxième fois dans le PBS pendant 5 min. Elles sont ensuite transférées dans du glycérol 70% pour être imagées.

3.9 Bleu alcian-Rouge alizarine

Les larves sont fixées dans 4%PFA toute la nuit à 4°C. Ensuite les larves sont déshydratées 10 min dans 50% d'éthanol puis colorées toute la nuit avec la solution de

bleu alcian (0.02% bleu alcian (A5268 Sigma), 60mM MgCl₂, 70% éthanol). Le jour suivant les larves sont colorées au rouge alizarine (0.1% rouge alizarine (A5533-25G Sigma) diluée dans l'eau). Ensuite les larves sont dépigmentées (3% H₂O₂, 1% KOH dans de l'eau) puis digérés à la trypsine afin de visualiser les os et cartilages. Entre 2 jpf et 7 jpf les larves sont digérées entre 2h et 4h avec 0.05% de trypsine (Gibco), pour les larves âgées de 21 jpf, la digestion se fait avec 1% de trypsine pendant 3h. Finalement la coloration est fixée par des bains croissants d'éthanol (30% [vol/vol], 70%, 95%) dans de l'eau, puis placée en 70% glycérol pour l'imagerie.

3.10 Acridine orange

Les larves vivantes sont placées dans du milieu E2 (875 mg/L NaCl; 37,5 mg/L KCl; 120 mg/L MgSO₄; 20,5 mg/L KH₂PO₄; 6 mg/L Na₂HPO₄; 145 mg/L CaCl₂; 60 mg/L NaHCO₃) contenant 2µg/mL d'acridine orange pendant 30 min à température ambiante. Les larves sont rincées 5 fois 5 min avec du milieu E2 chaud puis anesthésiées dans 0.01mg/mL de MS222 (Sigma) afin d'être imagées.

3.11 Coloration, SA-β Galactosidase

Les larves sont fixées toute la nuit dans 4% PFA à 4°C. Les embryons sont placés dans le PBS pH 7.4 et sont conservés à 4°C jusqu'à utilisation. Ensuite les larves sont rincées 2 fois 1h à 4°C dans le PBS pH 7.4 puis 1h à 4°C dans le PBS pH 6.0. La coloration est réalisée toute la nuit à 37°C, sans CO₂, dans l'obscurité avec 5 mM de potassium ferrocyanide, 5mM de potassium ferricyanide, 2mM de MgCl₂ et 1mg/mL X-gal dans 1X PBS pH6.0. Le lendemain, les larves sont transférées en 70% glycérol, imagées et génotypées. L'analyse des résultats se fait en comptant le nombre de pixels bleus à l'aide du logiciel Photoshop. La coloration est quantifiée par le rapport nombre de pixels bleus/ nombre de pixels totaux.

3.12 Immunomarquage sur embryons entiers

H3S10P, marquage des cellules prolifératives. Les embryons sont fixés toute la nuit à 4°C dans 4% PFA. Les embryons sont ensuite déshydratés dans du méthanol (100%) 15 min à température ambiante avant d'être conservés à -20°C. Les embryons sont progressivement réhydratés par des lavages de 5 min dans des solutions à concentration décroissante (75% [vol/vol], 50%, 25%) de méthanol dans du PBS 1X, suivis par deux lavages de 5 min dans du PBST. Les embryons sont ensuite perméabilisés dans un bain de Protéinase K (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), d'une durée de 10 min. La réaction est arrêtée par une incubation 20 min dans du paraformaldéhyde 4% dans du PBS. Les sites aspécifiques sont bloqués par un bain de 30 min dans la solution de blocage (0.2% blocking reagent (ICN Biomedicals), 10% SVF, 1% DMSO dans du PBST). L'anticorps est incubé dans la solution de blocage (0.2% blocking reagent (ICN Biomedicals), 10% SVF, 1% DMSO dans du PBST) toute la nuit à 4°C sous agitation (H3S10P-rabbit, 1,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sc-8656-R, Santa Cruz). Le jour suivant l'excès d'anticorps est rincé 5 fois 10 min avec le PBST. L'anticorps secondaire couplé au fluorophore est incubé 2h à température ambiante (Anti-rabbit, 1/5000, 94635, FRP Jackson ImmunoResearch). L'excès d'anticorps est lavé par 5 lavages de 10 min au PBST. Les embryons sont imagés et le nombre de cellules positives est compté afin de quantifier la prolifération.

Myosine, coloration des muscles. Les embryons sont fixés toute la nuit à 4°C dans 4% PFA. Les embryons sont ensuite déshydratés dans du méthanol (100%) 15 min à température ambiante avant d'être conservés à -20°C. Les embryons sont progressivement réhydratés par des lavages de 5 min dans des solutions à concentration décroissante (75% [vol/vol], 50%, 25%) de méthanol dans du PBS 1X, suivis par un lavage de 5 min dans du PBST. Les embryons sont dépigmentés (3% H_2O_2 , 1% KOH dans de l'eau) puis perméabilisés par la protéinase K (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Les embryons sont placés 1h à température ambiante dans la solution de blocage (2% de serum de mouton dans le PBST) puis incubés toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (Myosine-mouse, 1/5, MF20, developmental studies hybridoma bank). L'excédent

d'anticorps est lavé par 3 bains de 10 min avec du PBST. L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase est incubé 1h30 à température ambiante (anti-mouse, 1/4000, 115-035-003, peroxydase conjugated, Jackson Immuno Research), puis lavé par du PBST. Le marquage est révélé par l'utilisation de tablettes de diaminobenzidine (D4168-50 SET, Sigma), la coloration est fixée par un bain de 20 min dans 4% PFA. Les embryons sont placés en solution 70% glycérol afin d'être imagés et génotypés.

Ezh2, expression de la protéine chez les mutants. Les embryons sont fixés toute la nuit à 4°C dans 4% PFA. Les embryons sont ensuite déshydratés dans du méthanol (100%) 15 min à température ambiante avant d'être conservés à -20°C. Les embryons sont progressivement réhydratés par des lavages de 5 min dans des solutions à concentration décroissante (75% [vol/vol], 50%, 25%) de méthanol dans du PBS 1X, suivis par un lavage de 5 min dans du PBST. Les embryons sont dépigmentés (3% H_2O_2 , 1%KOH dans de l'eau) puis perméabilisés par un bain de 15 min dans 0,5%triton-X100 dans du PBST. Les embryons sont placés 1h à température ambiante dans la solution de blocage (10% de serum de veau dans le PBST) puis incubés toute la nuit à 4° avec l'anticorps primaire (Ezh2-rabbit, 1/100, ab3748, abcam). L'excédent d'anticorps est lavé par 3 bains de 10 min avec du PBST. L'anticorps secondaire fluorescent est incubé 1h à température ambiante (anti-rabbit, 1/5000, A11035, Invitrogen), puis lavé par du PBST. Les embryons sont placés en solution 70% glycérol afin d'être imagés et génotypés.

H3K27me3, marque de l'activité du PRC2. Les embryons sont fixés toute la nuit à 4°C dans 4% PFA. Les embryons sont ensuite déshydratés dans du méthanol (100%) 15 min à température ambiante avant d'être conservés à -20°C. Les embryons sont progressivement réhydratés par des lavages de 5 min dans des solutions à concentration décroissante (75% [vol/vol], 50%, 25%) de méthanol dans du PBS 1X, suivis par un lavage de 5 min dans du PBST. Les embryons sont dépigmentés (3% H_2O_2 , 1%KOH dans de l'eau) puis perméabilisés par la protéinase K (10 μ g/mL) diluée dans le PBST pendant 30 min pour les larves de 4 jpf. Les embryons sont placés 1h à température ambiante dans la solution de blocage (2% de serum de

mouton, 2mg/mL BSA dans le PBST) puis incubés toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (H3K27me3-rabbit, 1/750, 07-449, Millipore). L'excédent d'anticorps est lavé par 3 bains de 10 min avec du PBST. L'anticorps secondaire fluorescent est incubé 1h à température ambiante (anti-rabbit, 1/5000, A11035, Invitrogen), puis lavé par du PBST. Les embryons sont placés en solution 70% glycérol afin d'être imagés.

3.13 Inclusion des larves en paraffine

Les larves issues du croisement $ezh2^{+/-}$ x $ezh2^{+/-}$ sont génotypées. La queue est coupée et génotypée dans 10 μ L de tampon d'extraction NaOH. Puis les larves sont fixées toute la nuit à 4°C dans 4%PFA. Les larves sont gardées en PFA pendant le génotypage et conservées à 4°C pendant 2 jours maximum. Les larves génotypées sont déshydratées par des bains de 10 min dans 30% éthanol, 50% éthanol, 70% éthanol et 15 min dans 100% éthanol. Puis les larves sont mises progressivement en milieu hydrophobe par un bain de 10 min dans 50% claral (CML)-50% éthanol puis 15 min en 100% claral. Les larves sont incubées 2 fois 15 min à 58°C dans 100% paraffine (Leica). Les larves sont incluses dans les moules en inox et stockées à 4°C jusqu'à la coupe au microtome. Les larves sont sectionnées en coupes de 5 μ M.

3.14 Coloration sur lames

Hématoxyline-Eosine. Les lames sont déparaffinées 5 min dans le claral et dans un bain de 5 min 50% claral-50% ethanol, puis réhydratées par un bain de 5 min dans 100% éthanol, 1 min dans 70% éthanol et finalement un bain dans l'eau du robinet. Puis les noyaux sont colorés 1 min à l'hématoxyline. Cette solution est rincée avec l'eau du robinet 4 fois 5 min, la coloration est fixée par un bain de 1 min dans 100% éthanol. Les lames sont rincées à l'eau du robinet rapidement puis colorées 1 min avec l'éosine. La coloration est rincée par l'eau du robinet 2 fois 5 min. Les lames sont déshydratées par un bain de 1 min 70% éthanol, 95% éthanol, 50% claral-50%

éthanol et 100% éthanol. Finalement les lames sont séchées 15 min à température ambiante puis les lamelles sont montées avec le milieu Duolink (DUO80102, Sigma).

Immunomarquage. Les coupes sont déparaffinées pendant 1h à 60°C puis avec 2 bains de 5 min dans le claral. Puis les lames sont réhydratées progressivement par des bains successifs de 5 min dans 50%claral-50%éthanol, 2 fois 100% éthanol, 2 fois 70% éthanol puis 30% éthanol et finalement 3 fois dans l'eau. Les antigènes sont activés grâce à un tampon citrate (8mM de citrate de sodium et 1mM d'acide citrique dans de l'eau) pendant 20 min à 95°C. La fluorescence aspécifique du PFA est supprimée en lavant les lames 3 fois 5 min dans 100mM glycine. Puis les sites aspécifiques sont bloqués en incubant les lames 30 min à température ambiante dans 5%BSA dans le TBST (TBS (Tris Buffered Saline)-0.1%Tween 20). L'anticorps primaire est incubé toute la nuit à 4°C, 150 μ L sont déposés par lame, l'anticorps anti-phalloïdin (Alexa 594, A12381, ThermoFisher) est dilué au 1/100; l'anticorps anti-actine (A2066, Sigma) est dilué au 1/50. Le lendemain l'excès est lavé par 4 bains de 5 min dans le TBST puis les lames sont contre-colorées par le Hoechst 33285 à 1mM pendant 30 min. Le colorant est lavé par 2 bains de 5 min de PBS. Finalement les lamelles sont montées avec le milieu Dako (Fluorescent mounting medium S3023) et du vernis à ongles. Les lames sont stockées à l'abri de la lumière et à 4°C.

Hybridation *in situ*.

Jour 1. Le premier jour, les lames sont déparaffinées deux fois 5 min dans le claral puis réhydratées par 2 bains de 1 min dans 100% éthanol et par 1 bain de 1 min dans 70% éthanol. Ensuite les lames sont lavées 5 min avec 2X SSPE (20X SSPE : 175.3g NaCl, 27.6g NaH₂PO₄, 7.4g EDTA, pH 7.4, qsp 1L eau distillée) puis refixées 20 min dans 4% PFA et rincées à nouveau 5 min avec 2X SSPE. Les tissus sont perméabilisés avec la protéinase K (3 μ g/mL dans le PBS) à 37° pendant 30 min. Les lames sont ensuite incubées 15 min dans 0,2N HCl et rincées avec 2X SSPE. La sonde marquée à la digoxygénine est incubée toute la nuit à 70°C à une concentration

de 300ng dans 300 μ L de tampon d'hybridation (1X solution salée (1X : 0.2M NaCl, 10mM Tris HCl pH9.5, 5 mM NaH₂PO₄ , 5 mM Na₂HPO₄, 1 mM Tris Base, 5mM EDTA qsp 1L), 50% formamide déionisé (Sigma), 10% dextran sulphate (Sigma), 1mg/mL ARNt (stock 50mg/mL)(Sigma), 1X Denhardt (100X Denhardt : 2g BSA (Sigma), 2g ficoll (Sigma) , 2g polyvinylpyrrolidone (Sigma), qsp 100 mL)). La lame est recouverte d'une lamelle et mise en chambre humide afin d'éviter l'évaporation.

Jour 2. Le deuxième jour, les lamelles sont retirées par un bain de 15min dans la solution A (50% formamide, 1X SSC, 0.1% tween) à 65°C, puis l'excès de sonde est lavé par 2 bains de 30 min dans la solution A à 65°C et 2 bains de 30 min dans le TBST à température ambiante. Les sites aspécifiques sont bloqués 3h30 à température ambiante par la solution de blocage (10% serum de veau dans le TBST) en chambre humide. L'anticorps est dilué au 1/10000 et incubé toute la nuit à 4°C puis recouvert d'une lamelle.

Jour 3. Le troisième jour, la lamelle est retirée grâce à un bain de 20 min dans le TBST puis l'anticorps est lavé par 3 bains de 20 min. Le pH des tissus est ajusté par 2 lavages de 10 min dans le tampon Tris-alkalin (100mM Tris HCL pH9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1% tween). La coloration par les substrats NBT et BCIP (22,5 mg/L NBT, 17,5mg/L BCIP dans du tampon Tris-Alcalin) est réalisée à l'abri de la lumière et est réalisée en 24h à 5 jours.

Jour 4. Le dernier jour, lorsque la coloration est terminée, elle est arrêtée par 4 bains de 10 min dans le PBST et fixée dans 4% PFA 2h à température ambiante. Les lames sont rincées à l'eau rapidement et elles sont séchées 15 min à température ambiante. Le tissu est déshydraté par un bain de 1 min dans 70% éthanol, 1 bain de 10 min dans 100% éthanol suivi d'un bain de 1 min et finalement un bain de 3 min dans le claral. Les lames sont séchées une nouvelle fois 15 min à température ambiante. La lamelle est montée avec le milieu de montage Duolink (Sigma).

Test de mort cellulaire, kit Roche 11 684 817 910. Les lames sont déparaffinées en chauffant 1h à 60°C dans le four d'hybridation puis, les coupes sont placés 2 fois 5 min dans le Claral, 5 min dans 50% éthanol-50% claral, 2 fois 5 min 100% éthanol, 2 fois 5 min 70% éthanol, 5 min dans 30% éthanol et finalement 3 fois 5 min dans l'eau. Les tissus sont perméabilisés grâce à la protéinase K (3µg/mL diluée dans le PBS) et recouverte d'une lamelle pendant 30 min à 37°C, en chambre humide. Pour le contrôle positif, une lame est incubée 10 min à température ambiante avec 3U/mL DNaseI, 50mM Tris HCl pH7.5, 10mM MgCl₂, 1mg/mL BSA. Pour le contrôle négatif, l'expérience est réalisée en absence de l'enzyme (sans la solution 1 du kit).

Pour la réaction enzymatique les solutions 1 et 2 sont mélangées. Afin de recouvrir la totalité des coupes présentent sur la lame, un volume de 300µL est nécessaire. Dans un souci d'économie du kit, ce mélange est dilué 5 fois dans du PBST. Une lamelle est déposée afin d'éviter l'évaporation et de permettre une bonne répartition du liquide. La réaction a lieu à 37°C pendant 1h en chambre humide.

Les lames sont lavées 3 fois 5 min dans le PBS afin de faire tomber les lamelles et de laver l'excédant de la solution enzymatique. Ensuite les lames sont couvertes de la solution 3 (POD converter) diluée 3 fois afin de pouvoir recouvrir les échantillons avec 150µL. Les lames sont recouvertes d'une lamelle et la réaction a lieu pendant 30 min à 37°C en chambre humide.

Les lames sont lavées à nouveau 3 fois 5 min dans le PBS. Le marquage est révélé grâce au DAB (Coloration de la peroxidase : diaminobenzidine tablets D4168-50 SET), les lames sont recouvertes d'une lamelle afin de pouvoir suivre la coloration sous la loupe sans perde de solution. La coloration est arrêtée après 45 min à température ambiante.

La solution est arrêtée avec 3 lavages de 5 min dans le PBS. Les échantillons sont déshydratés afin de monter la lamelle par un bain de 1 min dans 70% d'éthanol, 10 min dans 100% éthanol puis 1 min dans 100% éthanol. Finalement les lames sont placées en milieu hydrophobe par un bain de 3 min dans le claral. Les lames sont séchées pendant 15 min à température ambiante sous la sorbonne puis la lamelle est

montée à l'aide du milieu de montage Duolink mounting medium.

3.15 Drogues

Les embryons sont déchorionés et placés en plaques 6 puits dans le milieu E2 contenant la drogue ou le DMSO (en contrôle). Le GSK126 est utilisé à la concentration de $1\mu\text{M}$, l'UNC1999 à $5\mu\text{M}$. Le lendemain les embryons sont triés : les embryons correctement développés sont séparés des embryons anormalement développés. Les embryons sont pris en photo afin de représenter les phénotypes observés puis le développement est suivi jusqu'à 4 jpf.

3.16 Imagerie

Les photographies des expériences suivantes : hybridation *in situ*, Oil-Red-O, bleu alcian-rouge alizarin, acridine orange et coloration des muscles sont prises avec une loupe binoculaire Leica MZ10 couplée à une caméra Leica DFC295, et accompagnée du logiciel Leica Application Suite Version 3.6.0. Les résultats par fluorescence et de tests des drogues sont visualisés à l'aide de la loupe binoculaire Leica MZ10 couplée à la caméra DFC3000G. Les lames sont imagées avec le microscope Nikon Eclipse Ti.

3.17 Publication : Identifier le phénotype d'une lignée homozygote mutante

Publication en annexe. Dans la littérature, un grand nombre de mutations géniques est associé à un phénotype mortel (table 7). Ces mutations mortelles précocement à l'état homozygotes ne permettent pas de générer des lignées homozygotes mutantes adultes. La recherche du phénotype s'effectue donc sur un mélange d'embryons : $\frac{1}{4}$ sauvages, $\frac{1}{2}$ hétérozygotes mutants et $\frac{1}{4}$ homozygotes mutants obtenus d'un croisement d'hétérozygotes adultes. Ainsi, il est important de pouvoir asso-

cier le phénotype observé au génotype. C'est pourquoi, pour étudier les phénotypes associés à nos mutants, nous avons mis en place différentes techniques qui nous permettent d'obtenir le génotype après les analyses phénotypiques. Ces techniques mises en place feront l'objet d'une publication dans *methods* X.

Références	Gènes	Stade de la mort	Description du phénotype
Grunwald et al. 1988	<i>ned-1</i>	6 jpf	mort cellulaire au niveau du système nerveux central
Kimmel et al. 1989	<i>spt-1</i>	<7 jpf	Pas de formation du mésoderme et des somites au niveau du tronc de l'embryon
Westerfield et al. 1990	<i>nic-1</i>	7 jpf	Absence de mobilité, pas de contraction du tronc
Abdelilah et al. 1996	<i>hör</i> <i>guw</i> <i>uhi</i> <i>ssw</i> <i>sad</i> <i>anh</i> <i>bub</i> <i>faa</i> <i>sat</i> <i>spw</i>	28hpf	Dégénération du cerveau
Hammerschmidt et al. 1996	<i>din^{tm84}</i> <i>din^{tt250}</i> <i>mes^{tm305}</i> <i>mes^{tz209}</i>	2-3 jpf	Phénotype ventral
Karlstrom et al. 1996	<i>esr</i> <i>til</i>		Pas de vessie nataoire
Mullins et al. 1996	<i>swr</i>	24hpf	Phénotype dorsal
Piotrowski et al. 1996	<i>ham</i> <i>pek</i> <i>hen</i> <i>jig</i> <i>she</i>	6-7 jpf	Défaut de formation de la machoire nageoires pectorales plus petites

Ransom et al. 1996	<i>mon^{tb222b}</i>	5-7 jpf	Sévère anémie
Trowe et al. 1996	<i>nev</i>	8 jpf	Pas de vessie natatoire
	<i>woe</i>	12 jpf	Petits mouvements spontanés
Whitfield et al. 1996	<i>ugo</i>	12 hpf	Oedème généralisé
Becker et al. 1998	<i>nrf</i>	2 semaines	Défaut de la rétine
Cretekos et al. 1999	<i>aln</i>		Anomalies du développement précoce de la crête neurale défaut de la fonction du cœur
Daly et al. 2000	<i>yhd</i> <i>shr</i>	7-8 jpf	Petits yeux, cerveau et grand sac péricardiaque
Donovan et al. 2000, Fraenkel et al. 2005	<i>weh</i>	10-14 jpf	Anémie
Riley et al. 2000	<i>mnl</i>		Coordination moteur
Solnica-Krezel et al. 2001	<i>boz</i>	Développement embryonnaire précoce	Forme du corps
Garrity et al. 2002	<i>hst</i>	6-7 jpf	Pas de développement des nageoires pectorales et dysfonction cardiaque
Xu et al. 2002	<i>pik^{m171}</i>	3 jpf	Défaut de contraction cardiaque
Young et al. 2002	<i>nrs</i>	3 jpf	Embryons de taille réduite
Maaswinkel et al. 2003	<i>nbc</i>	9 jpf	Développement anormal
Nissen et al. 2003	<i>foo</i>	6-7 jpf	Défaut de la placode otique et de la machoire
Traver et al. 2003	<i>mon</i>	14 jpf	Absence totale de cellules érythroïdes
	<i>gata1</i>		
Rodino-Klapac et al. 2004	<i>topped^{b458}</i>	30% meurent à 14 jpf	Perturbation de l'orientation des neurones moteurs primaires
Taylor et al. 2004	<i>noa</i>	12 jpf	Défaut de métabolisme de la pyruvate déshydrogénase
Ebert et al. 2005	<i>ncx1h</i> <i>serca2</i>	6 jpf	Arythmie cardiaque

Kane et al. 2005	<i>hab</i>	Arrêt au stade épibolie	
Sonawane et al. 2005	<i>pen</i>	6 jpf	Excroissance de l'épiderme ventral
Bendig et al. 2006	<i>msq</i>	A la fin du stade larvaire	Défaut cardiaque
Semina et al. 2006	<i>bal^{a69}</i>	12 jpf	Axe de corps plus petit sévères défauts des yeux
Woods et al. 2006	<i>nsf^{st25}</i>	Jeune larve	Défaut de la vessie natatoire et de la mobilité
	<i>nfs^{st53}</i>		
Arnaout et al. 2007	<i>kcnh2^{s213}</i> <i>kcnh2^{s290}</i>	10 jpf	Dépolarisation de la membrane des cellules du ventricule cardiaque chez les embryons
Baye et al. 2007	<i>dry^{a64}</i>	8-12 jpf	Petits yeux, prosencéphale réduit, plus petit corps défaut du développement des vésicules otiques, du coeur, de la pigmentation et de la réponse au toucher
Camaschella et al. 2007	<i>shiraz</i>	7-10 jpf	Sévère anémie
Pfaff et al. 2007	<i>csp</i>	10-12 jpf	Augmentation de l'index mitotique
Steffen et al. 2007	<i>ruz</i>	10-12 jpf	Diminution de l'organisation musculaire
Trede et al. 2007	<i>egy</i>	7-8 jpf	Défaut de certains organes hypoplasie du thymus
Kok et al. 2007	<i>sbu2</i>	2 jpf	24 hpf : pas de définition des somites anomalie de développement de la queue, des muscles, de la pigmentation du système circulatoire et de la différenciation neurale
	<i>pan</i>	7 jpf	Développement anormal
Davuluri et al. 2008	<i>flo</i>	> 5 jpf	Anomalie de développement du système digestif et d'autres organes

Iwanami et al. 2008	<i>hkc</i> (medaka)	8-10 jpf	Taille anormale du thymus
	<i>wdr55</i> (<i>hi2786B</i>)	10-12 jpf	Arcs pharyngé
Kishi et al. 2008	<i>nrs/spinster</i>	4 jpf	Substance opaque dans le vitellus
	<i>terf2</i>		Neurodégénération de la rétine forte activité SA β galactosidase
	<i>psm2, 5, 6, 8, 9, 10, 11</i>	6 jpf	Courbure modérée du tronc et importante mort cellulaire
	<i>psm7</i>	7 jpf	Protrusion de la machoire vitellus opaque
Abbas et al. 2009	<i>ite</i>	6 jpf	Perte du fluide endolymphatique de l'oreille inflammation de la vessie natatoire
Dodd et al. 2009	<i>clint1</i>		Petite taille, oedème cardiaque et anomalie de développement du foie et de l'intestin
Dovey et al. 2009	<i>can4</i>	4-5 jpf	Arrêt du cycle cellulaire
Fukui et al. 2009	<i>ko095</i>	72 hpf	Vaisseaux désorganisés et ramification anormale
Hammond et al. 2009	<i>ptch1</i>	12 jpf	Augmentation de l'ossification et prolifération des chondrocytes
	<i>ptc2</i>	3 mois	Retard de formation des cartilages, ossification prématurée et prolifération anormale des chondrocytes
Hinits et al. 2009	<i>myf5^{hu2022}</i>	Pas d'adultes	
Reischauer et al. 2009	<i>pen/lgl2</i>	4-5 jpf	néoplasie de l'épiderme transition épithélio-mésenchymateuse des cellules basales épithéliales
Yabe et al. 2009	<i>aurB</i>	24 hpf	Nécrose du cerveau
	<i>cei/aurB</i>	5 jpf	
Madsen 2010	<i>cataprophe</i>	3 jpf	Carence de cuivre

Robinson 2010	<i>nij</i> <i>hbk</i>	6 jpf 3 jpf	Absence de neurones entériques
Vicente-Crespo et al. 2010	<i>upf1</i> <i>upf2</i>	Mort embryonnaire	Défaut de croissance cellulaire
Andreeva et al. 2011	<i>ftt</i> <i>lyo</i> <i>kn3</i> <i>vdr</i>	8 jpf 6 jpf 5 jpf 5 jpf	Phénotype craniofacial
Hinits et al. 2011	<i>myod</i>	13 jpf	Défaut craniofacial
Kim et al. 2011	<i>tsc2^{vu242}</i>	12 jpf	Augmentation de la taille des cellules du cerveau et du foie
Rösel et al. 2011	<i>u1c</i>	5 jpf	Nécrose du système nerveux central et anomalie du développement
Vanoevelen et al. 2011	<i>matt-und-schlapp</i>	7-9 jpf	Défaut de formation des os, des vertèbres de la colonne et anomalies craniofaciales
An et al. 2012	<i>tst^{b460}</i> locus <i>sf3b1</i>	40 hpf	Mort cellulaire du système nerveux et absence de circulation sanguine
Taylor et al. 2012	<i>rps29</i>	5 jpf	Diminution du nombre de cellules souches hématopoïétiques
Ding et al. 2013	<i>mat2aa</i>	3 jpf	Oedème péricardiaque
	<i>mrps18b</i>	12 jpf	Retard de développement anomalie contraction cardiaque
Keightley et al. 2013	<i>cph</i>	96 hpf	Oedème péricardiaque
Bonetti et al. 2014	<i>ptpn11a-ptpn11b</i>	5-6 jpf	Axe du corps réduit défaut craniofacial
Butterfield et al. 2014	<i>las1l</i>	24 hpf	Perturbation du développement des muscles et neurones périphériques
Linder et al. 2014	<i>prpf4</i>	4 jpf	Anomalie de forme du corps
Markmiller et al. 2014	<i>clbn</i>	7-10 jpf	Phénotype pléiotropique plus petite tête, yeux, la vessie nataoire

			ne se gonfle pas, retard de consommation du vitellus
Pathania et al. 2014	<i>lama1^{a69}</i>	12 jpf	Défaut du cristallin
Chua et al. 2015	<i>mdm2</i>	96 hpf	Noircissement des tissus de l'embryon, yeux malformés, pas de circulation et pas d'élongation du tronc
Guemez-Gamboa et al. 2015	<i>mfsd2a</i>	3 jpf	Perte d'intégrité de la barrière hémato-encéphalique
Jia et al. 2015	<i>kri1l</i>	6-10 jpf	Anomalie de la formation de la tête, oedèmes cardiaques et petits yeux
Jensen et al. 2015	<i>vgf1</i> <i>nrp1</i>	> 72 hpf	Défaut de la vascularisation du cerveaux
Percival et al. 2015	<i>esco2</i>	4 jpf	Absence de croissance
Quach et al. 2015	<i>ws0069</i> <i>ws01962</i> <i>ws21322</i>	7 dpf	Mort cellulaire au niveau du cerveau Développement anormal des vaisseaux Défaut du métabolisme du gras du vitellus
Stumpf et al. 2015	<i>ptena/ptenb</i>	6 jpf	Hyper prolifération des cellules endothéliales, hyper ramification des vaisseaux sanguins
Solin et al. 2015	<i>rb1</i>	7 jpf	Pas de vessie natatoire, développement de tumeur chez les embryons
Frohnhofer et al. 2016	<i>ide</i>	7 jpf	Pas d'épibolie et gastrulation pour certains embryons, défaut et malformation de la tête, oedèmes cardiaques, corps courbés, pas d'inflation de la vessie natatoire
Ji et al. 2016	<i>pitx2c</i>	2 jpf	Sévères anomalies de développement
Patel et al. 2016	<i>α1 laminine C56S</i>	12 jpf	Défaut de développement

			du cristallin, de la cornée, de la rétine
Rudeck et al. 2016	<i>smyd1b</i>		Défaut des muscles et du coeur
Seytanoglu et al. 2016	<i>gle1</i>	9 jpf	Anomalie sévère du développement, des neurones moteurs, arborisation nerveuse anormale, mort cellulaire dans l'oeil et au niveau de la corde
Ulrich et al. 2016	<i>reck</i>	10 jpf	Pas d'angiogénèse des artères intracérébrale après 5 jpf

TABLE 7: Phénotype mortel jusqu'au stade juvénile de poisson zèbre.

3.18 Valorisation des résultats

L'ensemble des résultats obtenus ont fait l'objet de deux publications soumises dans des journaux internationaux (annexes).

Article 1 : **The Polycomb Group Protein Pcgf1 Is Dispensable in Zebrafish but Involved in Early Growth and Aging**

Article 2 : **The histone lysine methyltransferase Ezh2 is required for maintenance of the intestine integrity and for caudal fin regeneration in zebrafish**

Troisième partie

Résultats

Chapitre 1

Pcgf1

Le premier objectif de ma thèse a été d'analyser l'expression des transcrits *pcgf* et de caractériser le phénotype de la lignée mutante *pcgf1*^{-/-} dans le but de comprendre la fonction de la protéine Pcgf1. Les protéines Pcgf étant nombreuses, deux raisons sont possibles pour expliquer cette diversité : soit les protéines sont redondantes soit elles ont une fonction particulière.

Une lignée de poissons zèbres mutants hétérozygotes *pcgf1* a été mise en place. Cette lignée a été obtenue en inactivant le gène *pcgf1* à l'aide de la technologie des TALEN. Les TALEN ont été développés afin de cibler le deuxième exon pour éviter les sites de transcription alternatifs (figure 46A). Le TALEN cible une séquence d'ADN génomique contenant un site de restriction ClaI qui me permettra de génotyper les embryons, ce site est situé au niveau de l'espace où FokI va se dimériser et créer la cassure d'ADN double brin. Si le site de restriction est détruit, le TALEN a agi, la cassure d'ADN double brin a été réparée et a causé l'insertion de mutations. Le produit PCR amplifié à partir d'ADN génomique des mutants n'est pas digéré par ClaI (figure 46B). Nous avons séquencé la séquence mutante et ainsi identifié un adulte portant une délétion de 11 nucléotides (figure 46C) qui cause un décalage de la phase ouverte de lecture et la formation d'un codon stop. La protéine Pcgf1 prédite est tronquée et non fonctionnelle, le domaine RING n'est pas conservé (figure 46D). Les adultes ont été croisés afin d'obtenir une lignée homozygote mutante.

Les homozygotes mutants *pcgf1*^{-/-} ainsi que leur descendance sont viables et fer-

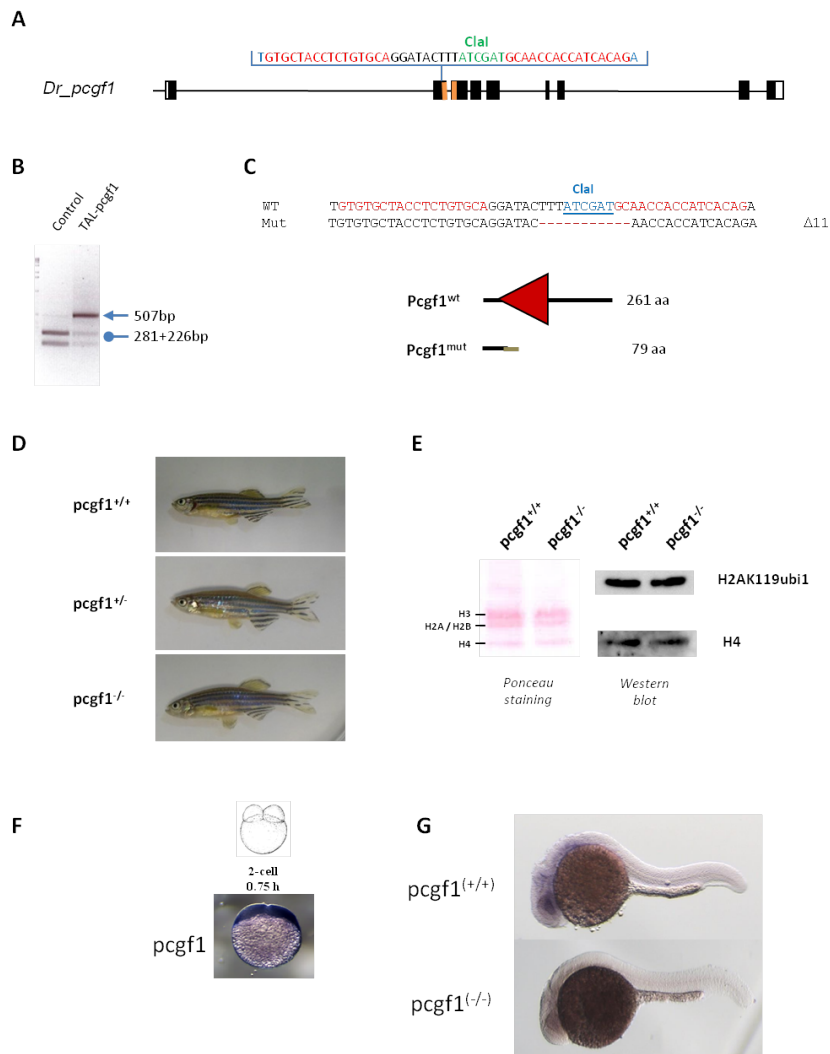


FIGURE 46: Inactivation du gène *pcgf1* chez le poisson zèbre. A. Structure schématique du gène *pcgf1*. Les exons sont représentés par les cadres noirs, ceux codants pour le domaine conservé RING de Pcgf1 sont colorés en orange. Les TALEN ciblent le deuxième exon du gène *pcgf1*. Le site de liaison du TALEN est indiqué en rouge. Le site de restriction ClaI est représenté en vert. **B.** Exemple de génotypage par profil de restriction. La séquence cible du TALEN est amplifiée par PCR puis digérée par ClaI. La molécule d'ADN sauvage est digérée (281+226 bp) par ClaI alors que la molécule mutante n'est pas digérée (507 bp). **C.** Résultats de la mutation induite par le TALEN par comparaison à la séquence sauvage. Le séquençage montre que le TALEN a induit une délétion de 11 nucléotides (tirets) causant un décalage de la phase ouverte de lecture avec pour conséquence l'apparition d'un codon stop. Schéma de la protéine Pcgf1, le triangle rouge représente le domaine RING de pcgf1. La protéine sauvage a une taille de 261 acides aminés (aa), la taille prédite de la protéine mutée est de 79 aa. **D.** Les mutants adultes *pcgf1*^{-/-} sont viables et fertiles. **E.** La marque H2AK119ub1 catalysée par le complexe PRC1 n'est pas affectée lorsque Pcgf1 est absente. **F.** Expression de l'ARN maternel *pcgf1* chez les sauvages au stade 2 cellules. **G.** Etude de l'expression de *pcgf1* par hybridation *in situ* (en violet) chez les sauvages et embryons mutants *pcgf1*^{-/-} à 24 hpf.

tiles (figure 46D). L'analyse par western blot montre que la marque épigénétique H2AK119ub1 catalysée par le complexe PRC1 n'est pas affectée lorsque *Pcgf1* est mutée. Ce résultat a été obtenu en réalisant l'extraction d'histones à partir d'un groupe de 5 larves à 7 jpf. Il est possible que le dépôt de la marque ne soit affectée que dans un très petit nombre de cellules. L'analyse de la marque sur les larves entières ne nous permettra donc pas de voir cette possible différence, il faudrait pouvoir réaliser l'étude de cette marque de façon tissu spécifique par immunofluorescence ou collecter les différents tissus après dissection. Le transcrite maternel *pcgf1* est exprimé au stade 2 cellules (figure 46F). Cette expression prédit un rôle important de *Pcgf1* lors des premières étapes du développement. Cependant, son absence ne cause pas de défaut de développement, les adultes *pcgf1*^{-/-} sont viables et fertiles. Toutes les expériences sont réalisées à partir d'un croisement d'adultes homozygotes mutants et montrent que les embryons sont capables de se développer correctement en l'absence du transcrite maternel. J'ai observé par hybridation *in situ* l'absence d'ARNm chez les homozygotes mutants (figure 46G). Les transcrits et les protéines maternels et zygotiques ne sont pas nécessaire au développement des embryons mutants.

Il existe de nombreux complexes PRC1 et chacun semble avoir une expression spécifique (Gil et al. 2014). Pour documenter cette hypothèse j'ai réalisé des hybridations *in situ* sur des embryons entiers entre 0,75 et 24 hpf, sur coupes de la tête d'embryon à 2 jpf et de la nageoire caudale d'adulte en régénération 4 jours post amputation (4 jpa) inclus en paraffine (figure 47 et 48). On remarque que les transcrits des différents homologues *pcgf* sont exprimés durant le développement. Tous les transcrits maternels excepté *pcgf5b* sont présents. L'expression du transcrite *bmi1b* est constante au cours du développement alors que celle de *bmi1a* diminue jusque 4hpf, elle est absente à 8 hpf (dégradation de l'ARN maternel) puis à 12 hpf l'expression zygotique de *bmi1a* est détectée (figure 47).

On remarque au niveau du cerveau la spécificité d'expression des différents transcrits *pcgf* (figure 48). Le transcrite *pcgf1* est exprimé au niveau des zones très prolifératives du thalamus (PTD, PTV du diencéphale) mais n'est pas exprimé au niveau du rhombencéphale (figure 48A). Les transcrits *bmi1a* et *bmi1b* sont plus fortement

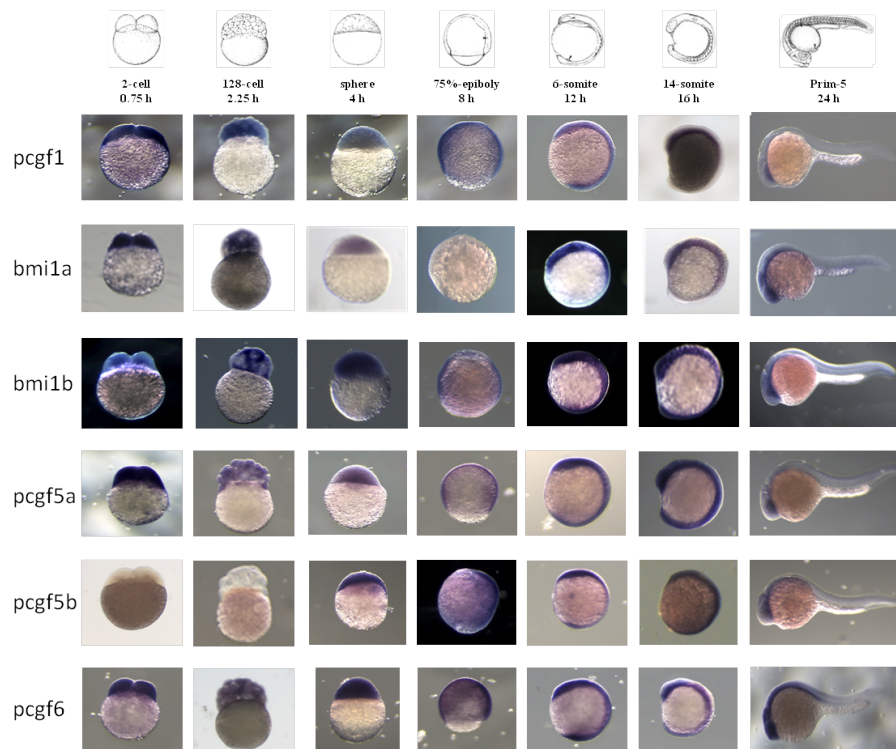


FIGURE 47: Expression des transcrits *pcgf* au cours du développement chez le poisson zèbre. Hybridation *in situ* chez les embryons sauvages aux stades 0,75, 2,25, 4, 8, 12, 16 et 24 hpf des différents homologues *pcgf* (*pcgf1*, *bmi1a*, *bmi1b*, *pcgf5a*, *pcgf5b* et *pcgf6*).

exprimés que *pcgf1* au niveau des zones prolifératives du prosencéphale (PTd et PTV) et de l'oeil ; ils sont également présents au niveau de la zone proliférative du mésencéphale appelé le tectum optique. Cependant leur expression est différente dans la partie du rhombencéphale, *bmi1b* est exprimé au niveau de la zone de prolifération de la plaque cérébelleuse (CeP, rhombencéphale) mais l'expression de *bmi1a* n'a pas la même intensité. Les transcrits de *pcgf5a*, *pcgf5b* et *pcgf6* ont une expression restreinte ; *pcgf5b* est fortement exprimé au niveau du prosencéphale (zone de prolifération PTd et PTV) mais pas au niveau du mésencéphale et du rhombencéphale, *pcgf5b* est retrouvé exprimé au niveau du mésencéphale (Zone de prolifération PTV), finalement *Pcgf6* est retrouvé au niveau du rhombencéphale (plaque cérébelleuse CeP) (figure 48A). On a pu remarquer que les *pcgf* ne sont pas exprimés dans les mêmes régions du cerveau, ces derniers semblent être impliqués dans de nombreuses structures du cerveau et dans les différentes zones impliquées dans la prolifération cellulaire (figure 48A).

J'ai réalisé la même expérience sur des nageoires caudales en cours de régénération 4 jours post amputation. Les transcrits *pcgf* jouent un rôle dans la régénération de la nageoire caudale, ils sont exprimés dans les différentes structures qui permettent la régénération (l'épiderme, le scléroblaste, le scléroblaste en formation, le blastème et le mésenchyme). *pcgf1* n'est pas exprimé dans la partie en régénération (figure 48B) contrairement aux autres transcrits *pcgf*. Le transcrit *bmi1a* est exprimé au niveau de l'épiderme mais uniquement au niveau de la partie amputée, l'expression semble plus intense à l'apex de la nageoire caudale. *bmi1b* est aussi exprimé au niveau du scléroblaste mais uniquement dans la partie médiane ; ce transcrit semble avoir un rôle important dans le renouvellement de la partie osseuse de la nageoire. L'ARNm de *pcgf5a* a une expression plus large et il est retrouvé dans l'épithélium et le blastème à l'apex de la nageoire, comme *pcgf6* qui semble exprimé dans toutes les structures de l'apex. Finalement *pcgf5b* est exprimé dans toute la nageoire en cours de régénération et dans la zone non amputée. Les transcrit *pcgf* semblent importants dans le processus de la régénération de la nageoire caudale.

J'ai débuté l'analyse du phénotype des mutants *pcgf1^{-/-}* par l'étude du dévelop-

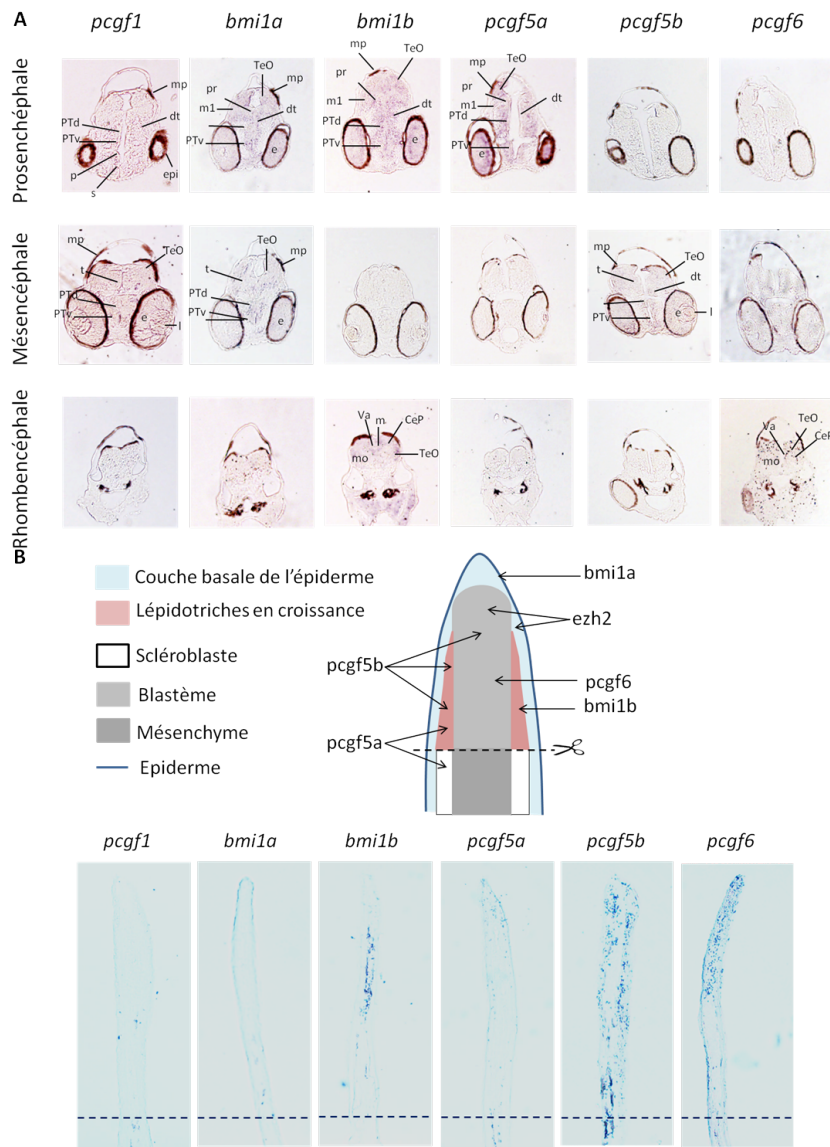


FIGURE 48: Expression des protéines Pcgf chez les embryons dans le cerveau et la régénération de la nageoire caudale chez l'adulte. **A.** Analyse de l'expression des transcrits *pcgf* (en violet) au niveau de la tête à 48 hpf chez des embryons sauvages. Les protéines Pcgf ont des expressions particulières. Les *pcgf* sont exprimés à 48 hpf dans les zones de prolifération *pcgf1* au niveau du diencephale, *bmi1a*, *bmi1b* et *pcgf5a* au niveau du tectum optique. CeP : plaque cérébelleuse; dt : Thalamus dorsal e : oeil epi : pigment ; de l'œil ; l : cristallin ; m : Zone de prolifération tectale ; m1 : région préteectale ; mo : medulla oblongata ; mp : pigment des méninges ; p : pallium ; pr : preteectum ; PTd : partie dorsale du tubercule ; PTv : partie ventrale du tubercule : subpallium, t : tegmentum ; TeO : tectum optique ; Va : valvula **B.** Etude par hybridation *in situ* de l'expression des transcrits *pcgf* lors de la régénération de la nageoire caudale chez l'adulte 4 jours post amputation. Les *pcgf* ont des expressions restreintes lors de la régénération. Le transcrit de *pcgf1* n'est pas exprimé. Les transcrits *pcgf5a* ; *pcgf5b* et *pcgf6* ont une expression plus large que *bmi1a* et *bmi1b* qui sont exprimés respectivement au niveau de l'épiderme et du lépidotriche en croissance.

pement des cartilages car van der Velden et al. 2013, montrent que Ring1/Rnf2, l'unité catalytique du PRC1, est essentielle au développement cranio-facial du poisson zèbre. Pour cela ; j'ai coloré au bleu alcian les cartilages et au rouge alizarine les os. A 6 jpf les mutants ne présentent aucune anomalie du développement du cartilage (figure 49A). Cependant les mutants *pcgf1^{-/-}* présentent un retard de développement du cartilage à 2 jpf. En effet, les otholites ne sont pas visibles à 2 jpf mais sont correctement formés à 6 jpf. Ainsi le développement des cartilages des mutants *pcgf1^{-/-}* est retardé en comparaison aux *pcgf1^{+/+}*. De manière à savoir si ce retard touche également l'ossification j'ai réalisé une coloration des os grâce au rouge alizarine. La coloration à 8 jpf rapporte que l'ossification a débuté chez les sauvages mais pas chez les mutants *pcgf1^{-/-}* (figure 49A), ce retard d'ossification est rattrapé à 21 jpf (figure 49B).

Dans le but de compléter l'analyse du phénotype cranio-facial, j'ai également vérifié le développement des tissus de la tête en réalisant des coupes de la tête d'embryons à 2 jpf inclus en paraffine. Cette expérience montre l'absence d'anomalie de formation des structures antérieures de l'embryon (figure 50A). Puis, finalement, par immunomarquage j'ai mis en évidence que le retard de développement cranio-facial est également visible lors de la mise en place des muscles. Le marquage des muscles à 3 jpf montre que les embryons mutants *pcgf1^{-/-}* ont un retard de développement musculaire, celui-ci n'est plus visible à 6 jpf ; tous les muscles cranio-faciaux sont correctement développés (figure 50B).

Les résultats de coloration des cartilages, des os et l'immunomarquage des muscles mettent en évidence un retard de développement des embryons mutants *pcgf1^{-/-}*. Chez le poisson zèbre le stade de développement est corrélé à la longueur de l'embryon (Kimmel et al. 1995). C'est pourquoi je me suis, par la suite, intéressée à la taille des embryons mutants. Par la mesure de la longueur des embryons j'ai pu remarquer que les embryons *pcgf1^{-/-}* étaient toujours plus petits, signe d'un retard du développement précoce (figure 51C).

En conclusion, les embryons *pcgf1^{-/-}* ont un développement plus lent que les sauvages, ce retard est visible par la taille des embryons et le retard de mise en place des struc-

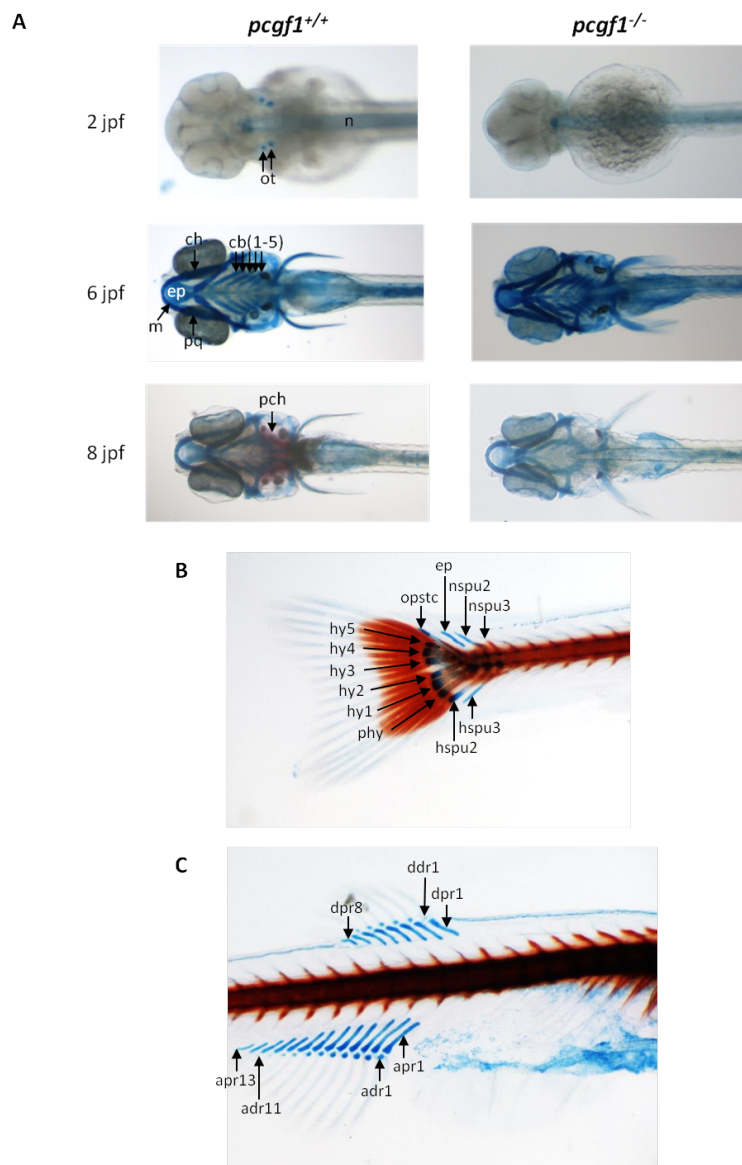


FIGURE 49: Coloration des os et cartilage chez les embryons et les larves. A. Coloration des cartilages au bleu alcian et des os au rouge alizarine. A 2 jpf les otholites ne sont pas encore visibles contrairement aux otholites chez les sauvages. A 6 jpf les cartilages sont bien développés chez les mutants *pcgf1*^{-/-}. Le développement de l'ossification est retardé chez les mutants à 8 jpf. cb : ceratobranchials; ch : ceratohyal; ep : ethmoid plate; m : Meckel's cartilage; n : notochord; ot : otoliths; pch : parachordal plate; pq : palatoquadrate. **B, C.** Coloration des cartilages au bleu alcian et des os au rouge alizarine chez les mutants *pcgf1*^{-/-} à 21 jpf. Les *pcgf1*^{-/-} ont une ossification normale. **B.** Coloration de la nageoire caudale. **C.** Coloration des nageoires dorsale et anale. ep, epural; hspu : haemal spine of preural; hy : hypural; nspu : neural spine of preural; opstc : opisthural cartilage; phy : parhypural; adr : anal distal radial; apr : anal proximal radial; ddr : dorsal distal radials; dpr : dorsal proximal radial.

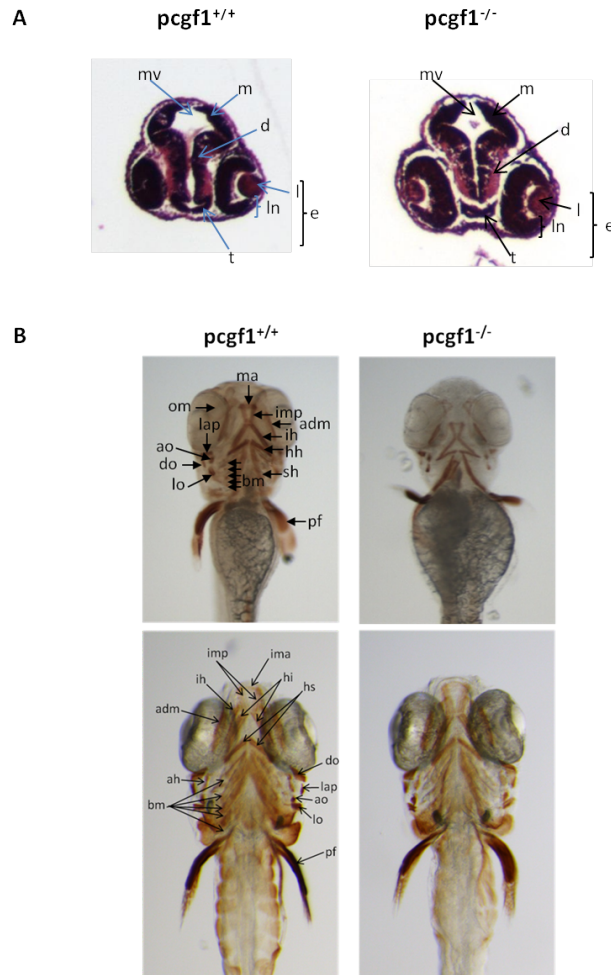


FIGURE 50: **Absence de phénotype cranio-facial des embryons *pcgf1*^{-/-}.** **A.** Coloration à l'hématoxyline-éosine des sections de la tête des embryons sauvages et mutants à 2 jpf. Les embryons mutants ne montrent pas d'anomalie de développement. **B.** Marquage des muscles cranio-faciaux des embryons de 3 jpf et des larves 6 jpf. Les embryons mutants *pcgf1*^{-/-} présentent un retard de développement. Les muscles des larves mutantes sont correctement développés à 6 jpf.

tures cranio-faciales. Afin de confirmer ce résultat à des stades plus précoces, j'ai compté le nombre de cellules par embryon entre 0h et 2h après fécondation. Pour cela j'ai compté le nombre de cellules par oeuf sous la loupe binoculaire. Ceci a permis de confirmer que les embryons *pcgf1*^{-/-} se développent moins rapidement car le nombre de cellules par embryon est toujours moins important chez les *pcgf1*^{-/-} que chez les sauvages (figure 51A) ; donc le nombre de divisions cellulaires doit être affecté. L'observation de la forme des embryons entre 4,5 hpf et 6 hpf confirme ce retard de développement, les embryons *pcgf1*^{-/-} à 4,5 hpf et 6 hpf n'ont pas la même morphologie et ne sont pas autant développés sur le vitellus (figure 51B). Ce retard de développement pourrait être la cause d'une anomalie dans le cycle cellulaire. Pour analyser la prolifération cellulaire chez les embryons de poisson zèbre j'ai choisi d'utiliser un immunomarquage de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10P). Cette marque est présente lors de la mitose (phase G2/M) et est utilisée pour étudier la prolifération cellulaire (Shepard et al. 2005, Verduzco et al. 2011). Le marquage met en évidence qu'il y a moins de cellules positives H3S10P chez les mutants que chez les sauvages (figure 51D). Cette différence est significative (figure 51E). Ces résultats permettent de conclure que le retard de développement observé chez les mutants *pcgf1*^{-/-} jusqu'à 8 jpf est lié à une prolifération cellulaire ralentie (figure 51D).

La croissance est le résultat de la balance entre prolifération et mort cellulaire. Les mutants *pcgf1*^{-/-} présentent une prolifération cellulaire ralentie, c'est pourquoi je me suis par la suite intéressée à la mort cellulaire. Une plus forte mortalité cellulaire ralentirait le processus de développement. Pour cela, j'ai réalisé un marquage des cellules apoptotiques par l'acridine orange sur les embryons vivants. Ce marquage, figure 52A, ne m'a pas permis d'observer de différence du nombre de cellules apoptotiques entre les sauvages et les mutants *pcgf1*^{-/-}. J'ai également marqué l'activité de la β galactosidase associée à la sénescence des embryons mutants par comparaison aux sauvages (figure 52A). Il n'y a pas de différence de l'activité de la β galactosidase entre les sauvages et les mutants.

Les embryons mutants *pcgf1*^{-/-} présentent un retard de développement jusqu'à 8 jpf.

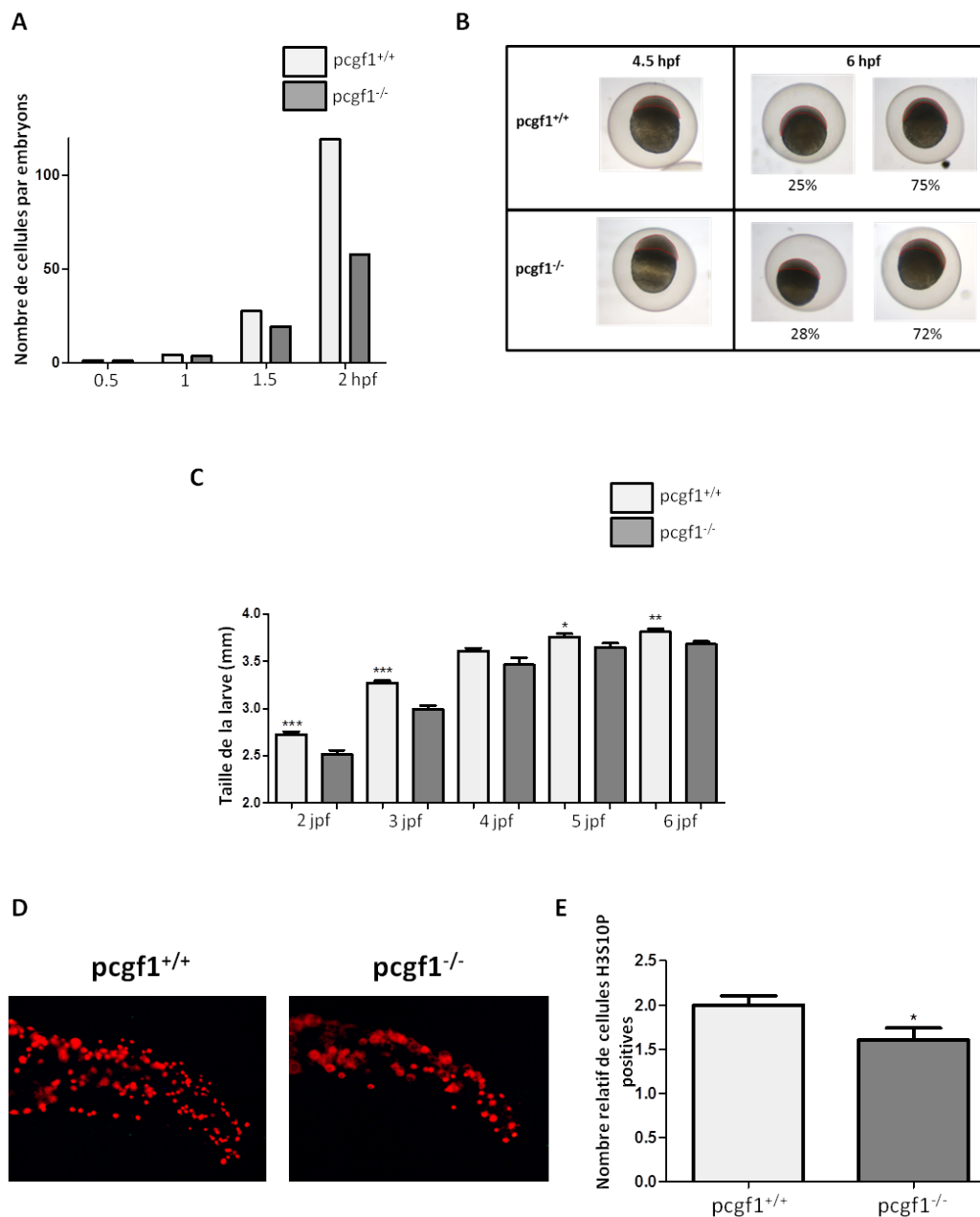


FIGURE 51: Retard de développement précoce des embryons et larves *pcgf1*^{-/-}.

A. Quantification du nombre de cellules par oeuf entre 0 hpf et 2 hpf. Les mutants *pcgf1*^{-/-} présentent moins de cellules que les sauvages. **B.** Photographie des oeufs à 4,5 hpf et 6 hpf. Les oeufs du croisement *pcgf1*^{-/-} x *pcgf1*^{-/-} montrent un retard de développement par comparaison aux sauvages. **C.** Mesure de la longueur des larves entre 2 jpf et 6 jpf. Les embryons *pcgf1*^{-/-} sont plus petits. **D.** Immunomarquage de la marque H3S10P, marque de prolifération des cellules de la queue de l'embryon. Les mutants *pcgf1*^{-/-} ont moins de cellules positives, la prolifération cellulaire est ralentie. **E.** Quantification du nombre de cellules positives pour H3S10P. Les embryons *pcgf1*^{-/-} ont moins de cellules positives pour la marque H3S10P.

Ce retard de développement est expliqué par une prolifération cellulaire ralentie mais l'absence de Pcgf1 n'affecte pas la viabilité cellulaire. Ce retard de développement n'affecte pas la vie du mutant jusqu'à l'âge adulte. A l'âge adulte, les mutants *pcgf1*^{-/-} montrent des signes de vieillissement accéléré. Les adultes à 1 an ont une courbure de la colonne vertébrale retrouvée normalement chez les individus plus âgés. J'ai calculé la courbure de la colonne vertébrale selon la méthode de Gorman et al. 2007 qui permet de la mesurer à partir de photos. J'ai ainsi pu démontrer, que les mutants *pcgf1*^{-/-} ont une courbure de la colonne vertébrale accentuée par comparaison aux sauvages (figure 52B), ce phénotype est associé au vieillissement (Gerhard et al. 2002). Dans le but de documenter le vieillissement accéléré, j'ai réalisé un test SA- β galactosidase chez les adultes afin de visualiser le processus de sénescence (figure 52C). Ce résultat montre que l'adulte mutant *pcgf1*^{-/-} possède une activité SA- β galactosidase supérieure à celle retrouvée chez le sauvage. La quantification du nombre de pixels bleus à l'aide du logiciel Adobe Photoshop confirme ce résultat visuel.

La protéine Pcgf1 est redondante et n'est pas essentielle au développement du poisson zèbre, les individus mutants sont viables et fertiles. L'absence de la protéine Pcgf1 pourrait être compensée par un homologue.

Néanmoins, Pcgf1 semble avoir un rôle non redondant lors des étapes précoces du développement et lors du vieillissement. En effet, la division cellulaire est ralentie lors du développement précoce, les embryons et larves sont plus petits jusqu'à 6 jpf, les muscles, les cartilages et les os se développent plus lentement. Ce retard de développement est associé à un ralentissement de la division cellulaire (marquage H3S10P) chez les embryons de 24 hpf. Ainsi, l'absence de la protéine Pcgf1 affecte le cycle cellulaire et cause un ralentissement du développement précoce. **Très tôt dans le développement Pcgf1 est associé à un ralentissement cellulaire alors que lorsque les poissons sont adultes, Pcgf1 est associé au vieillissement prématuré. Les adultes âgés de 1 an présentent des signes de vieillissement prématuré comme la courbure de la colonne vertébrale. Il**

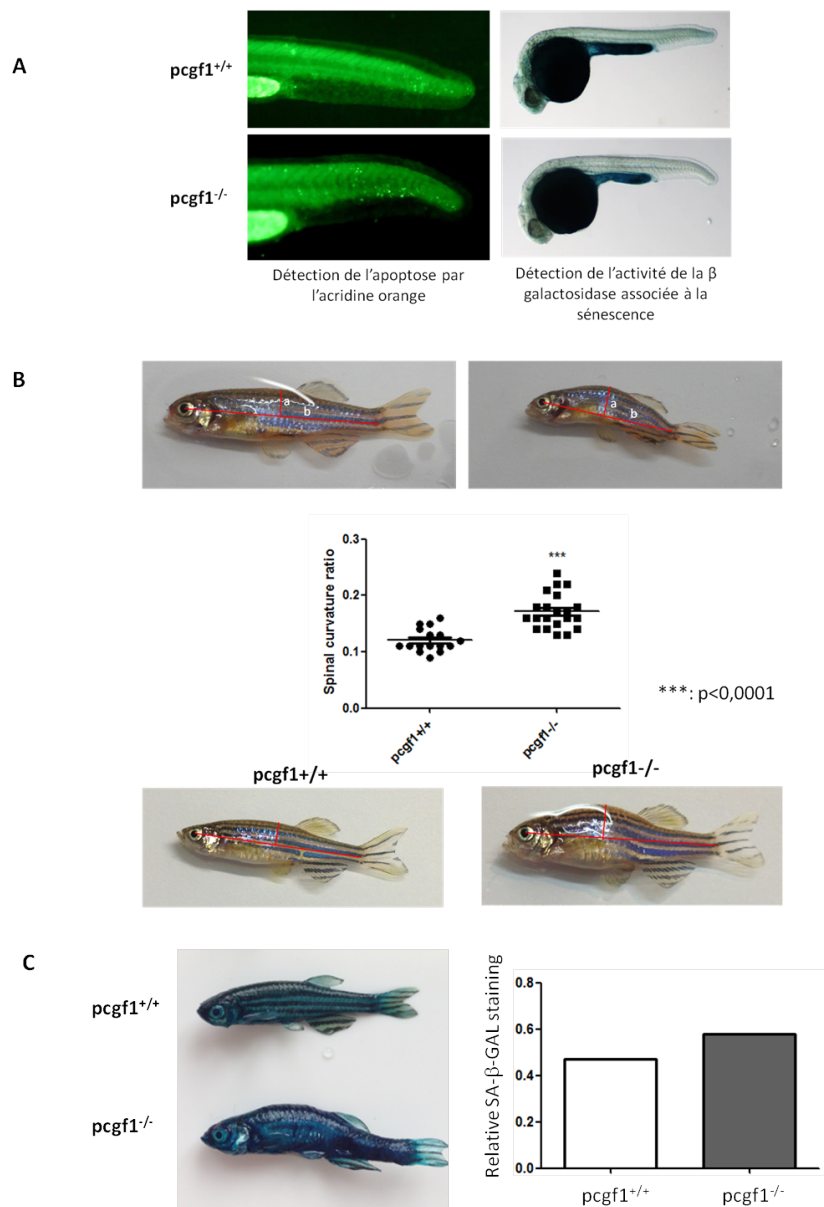


FIGURE 52: **Vieillesse accélérée chez les individus *pcgf1*^{-/-}.** **A.** Marquage des cellules apoptotiques chez des embryons de 24 hpf (à gauche). Le retard de développement n'est pas expliqué par une mortalité cellulaire plus importante. A droite, marquage de l'activité de la SA-βgalactosidase, marqueur de la sénescence. Les embryons mutants *pcgf1*^{-/-} ne présentent pas de processus de sénescence accéléré. **B.** Etude de la courbure de la colonne vertébrale chez les mutants *pcgf1*^{-/-} grâce à la méthode de Gorman et al. 2007. **C.** La méthode de Gorman est la suivante : ratio de courbure = $\frac{a}{b}$. **D.** Quantification de la courbure des poissons sauvages et *pcgf1*^{-/-} âgés de 1 an. **E.** A gauche, marquage de l'activité de la SA βgalactosidase des adultes sauvages et mutants. Les mutants présentent une coloration plus bleue ce qui montre que les mutants subissent une sénescence plus rapide que les sauvages. A droite, quantification du nombre de pixels bleus à l'aide du logiciel Adobe PhotoShop. Les mutants ont une activité SA-βgalactosidase plus importante que les sauvages.

serait possible que *Pcgf1* joue un rôle dans le renouvellement des cellules souches impliquées dans la prolifération nécessaire au développement et à la régénération des tissus vieillissants. Les résultats sont discutés dans la partie Discussion.

Chapitre 2

Ezh2

Le second objectif de ma thèse a été d'étudier le rôle de la protéine Ezh2 lors du développement du poisson zèbre. La protéine Ezh2 est impliquée dans le développement de nombreux cancers (Völkel et al. 2015). Le laboratoire cherche à comprendre le rôle de cette protéine dans le développement tumoral en utilisant un modèle de développement embryonnaire. O'Carroll et al. 2001, montrent que la mutation à l'état homozygote d'Ezh2 cause la mort des embryons chez la souris, ils n'entrent pas en gastrulation. Nous souhaitons utiliser le modèle du poisson zèbre car si la mutation d'*ezh2* induit le même phénotype, grâce à son développement *ex-utero*, le poisson zèbre nous permettra de mieux comprendre le rôle d'Ezh2 aux étapes de gastrulation. Pour cela, nous avons inactivé le gène *ezh2* à l'aide des TALEN. Le TALEN cible l'exon deux du gène afin d'éviter les sites de transcription alternatifs. La région de clivage de FokI contient le site de restriction DdeI qui permettra de génotyper les embryons. Les mutants seront criblés sur la perte de ce site de restriction (figure 53A et B). Le mutant que nous avons identifié possède une insertion nette de 22 nucléotides; résultat de la délétion de 5 nucléotides et l'insertion de 27 nucléotides (figure 53C). L'analyse du séquençage indique que cette mutation cause un décalage de la phase ouverte de lecture et la formation d'un codon stop. La protéine résultante est tronquée et ne contient aucun domaine fonctionnel (figure 53D).

Le mutant F0 ainsi obtenu nous a permis d'obtenir une lignée mutante *ezh2*^{+/-} viable et fertile. Néanmoins, les mutants à l'état homozygote meurent à 12 jpf.

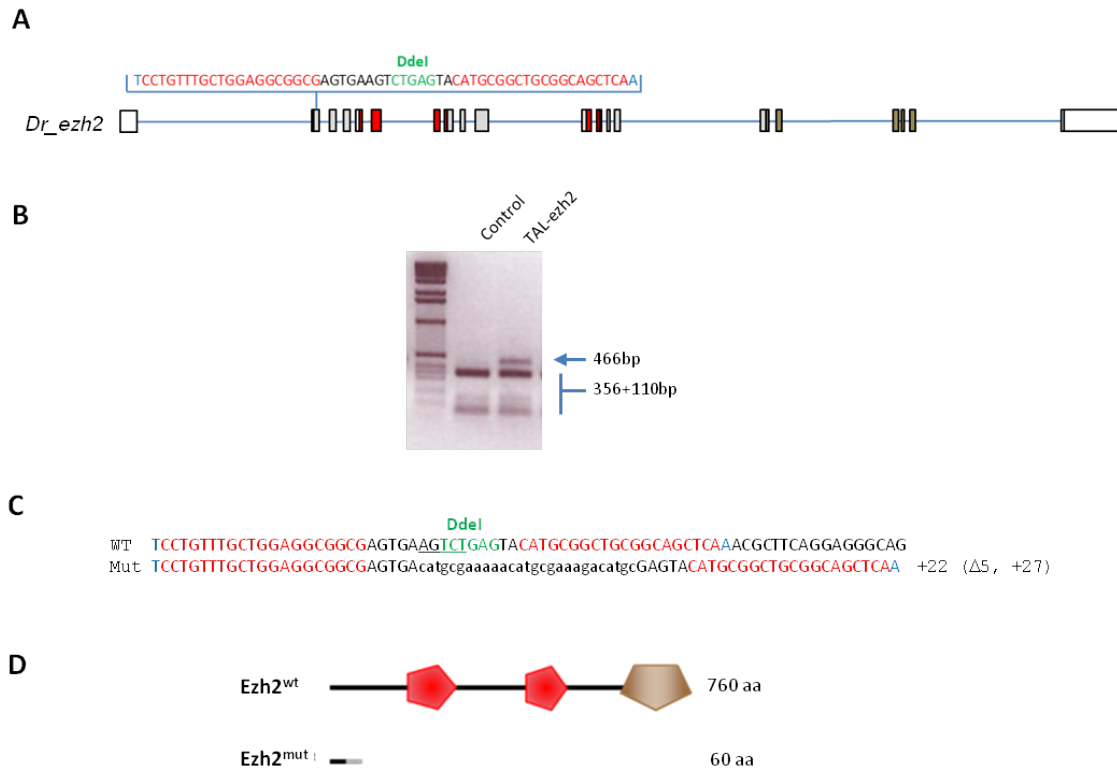


FIGURE 53: Inactivation du gène *ezh2* chez le poisson zèbre à l'aide des TALEN.

A. Représentation schématique de la structure génomique du gène *ezh2*. Les exons sont représentés par des carrés (noir : codant, non coloré : non codant). Les régions conservées des domaines SANT et SET sont respectivement en rouge et marron. Le site de liaison du TALEN a été choisi au niveau de l'exon deux afin d'éviter des sites de transcription alternatifs. La séquence cible du TALEN est représentée en rouge, le site de restriction de DdeI est indiqué en vert et nous permet de génotyper les embryons. **B.** Exemple de génotypage par profil de restriction. La séquence cible du TALEN est amplifiée par PCR puis digérée par DdeI. La molécule d'ADN sauvage est digérée par DdeI alors que la molécule mutante n'est pas digérée car le site a été muté. **C.** Comparaison de la séquence sauvage d'*ezh2* et de celle du mutant *ezh2*, la cassure d'ADN double brin causée par le TALEN a permis la délétion de 5 nucléotides (soulignés) et l'insertion de 27 nucléotides (en petit caractère). Cette mutation cause un décalage de la phase ouverte de lecture et la formation d'un codon stop précoce. **D.** Représentation schématique de la protéine Ezh2 sauvage (760 aa) contenant les domaines SANT (en rouge) et SET (en marron) ; la protéine prédite chez le mutant (60 aa) ne contient aucun domaine fonctionnel.

L'absence de lignée *ezh2*^{-/-} viable m'oblige à génotyper les embryons après chaque expérience dans le but d'être sûre que le phénotype est lié au génotype et que celui-ci n'est pas simplement une altération du développement ponctuel et aléatoire. L'observation du phénotype macroscopique de ces mutants ne montre aucune anomalie (figure 54A). J'ai d'abord analysé la formation des cartilages cranio-faciaux chez les larves à 6 jpf grâce à une coloration au bleu alcian. Les mutants *ezh2*^{-/-} ont un développement du cartilage normal, aucun phénotype n'est mis en évidence (figure 54B). De même, l'analyse du développement musculaire cranio-facial n'est pas altérée lorsque la protéine Ezh2 est absente (figure 54C). L'absence de la protéine Ezh2 n'affecte pas le développement cranio-facial et le phénotype n'est pas visible macroscopiquement. De plus, la mortalité des larves n'est pas due à une sénescence prématurée (figure 54C).

Par la suite, j'ai étudié l'expression du transcript *ezh2* au cours du développement. Tout d'abord, nous avons pu remarquer que la mère hétérozygote dépose un transcrite maternel *ezh2* au stade 1-4 cellules (figure 55A). Le transcrite issu de l'allèle sauvage est uniquement déposé (figure 55B). Comme on peut le voir avec la RT-PCR à 2 hpf, le produit amplifié est totalement digéré par DdeI (séquence sauvage). La présence du transcrite maternel sauvage pourrait protéger le développement précoce de l'embryon. *ezh2* est fortement présent à 24 hpf chez les sauvages dans la partie antérieure de la tête, au niveau des yeux, et du cerveau ; *ezh2* est également exprimé dans la queue. A 72 hpf, 96 hpf et 120 hpf, l'expression se trouve uniquement dans la partie antérieure de la larve au niveau des bourgeons des nageoires pectorales (accolade bleue), au niveau des zones de prolifération du cerveau (pointes de flèches grises) et des yeux (flèche noire) (figure 55C). A partir de 96 hpf en vue latérale, le transcrite *ezh2* est exprimé au niveau de l'intestin (figure 55D). Chez le mutant *ezh2*^{-/-}, le transcrite est faiblement exprimé, cet ARN pourrait échapper au système NMD (dégradation de l'ARN non-sens) et être détecté par hybridation *in situ*.

Les résultats de l'hybridation *in situ* montrent que le transcrite *ezh2* a une expression de plus en plus faible et restreinte au cours du temps, l'analyse de l'expression de l'ARNm par RT-PCR confirme ce résultat. L'expression de l'ARNm diminue au

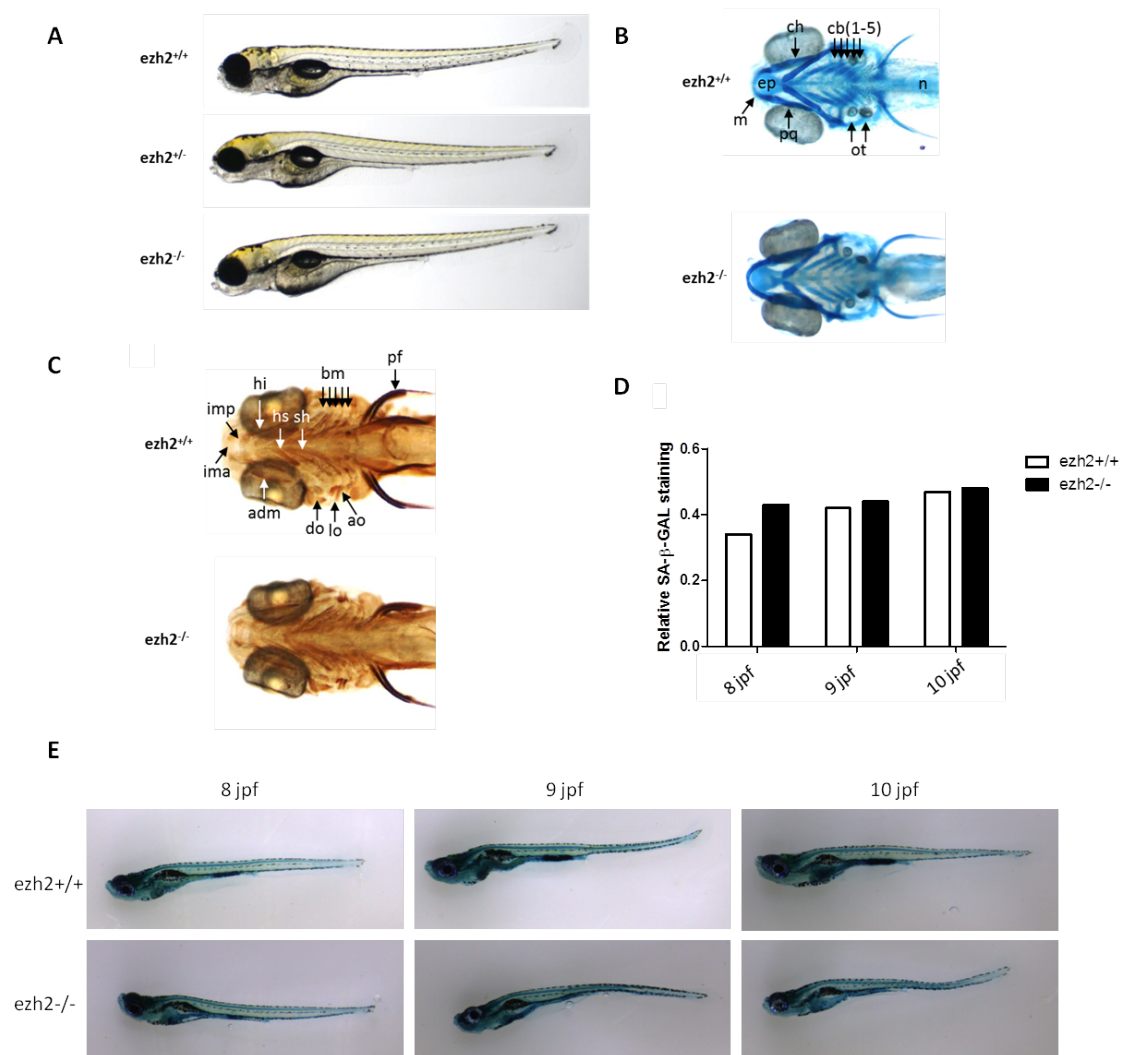


FIGURE 54: Absence de phénotype macroscopique chez les larves *ezh2*^{-/-}. **A.** Les mutants *ezh2*^{-/-} n'ont pas de phénotype particulier visible en comparaison aux sauvages. **B.** Coloration des cartilages au bleu alcian à 6 jpf. Les mutants *ezh2*^{-/-} ne présentent pas d'anomalie de développement des cartilages. cb : ceratobranchiaux ; ch : ceratohyal ; ep : ethmoid plate ; m : Meckel's cartilage ; n : notochord ; ot : otoliths ; pq : palatoquadrate. **C.** Immuno-marquage des muscles cranio-faciaux des larves de 6 jpf. Le mutant *ezh2*^{-/-} ne présente pas d'anomalie de développement des muscles cranio-faciaux. adm : adductor mandibulae ; ao : adductor operculi ; bm : branchial musculatur ; do : dilatator operculi ; hi : hyoideus inferior ; hs : hyoideus superior ; ima : intermandibularis anterior ; imp : intermandibularis posterior ; lo : levator operculi ; pf : pectoral fin ; sh : sterno-hyoideus. **D.** Quantification de l'activité de la SA-βgalactosidase chez les larves *ezh2*^{+/+} et *ezh2*^{-/-} entre 8 et 10 jpf. **E.** Marquage de l'activité SA-βgalactosidase chez les larves *ezh2*^{+/+} et *ezh2*^{-/-} entre 8 et 10 jpf.

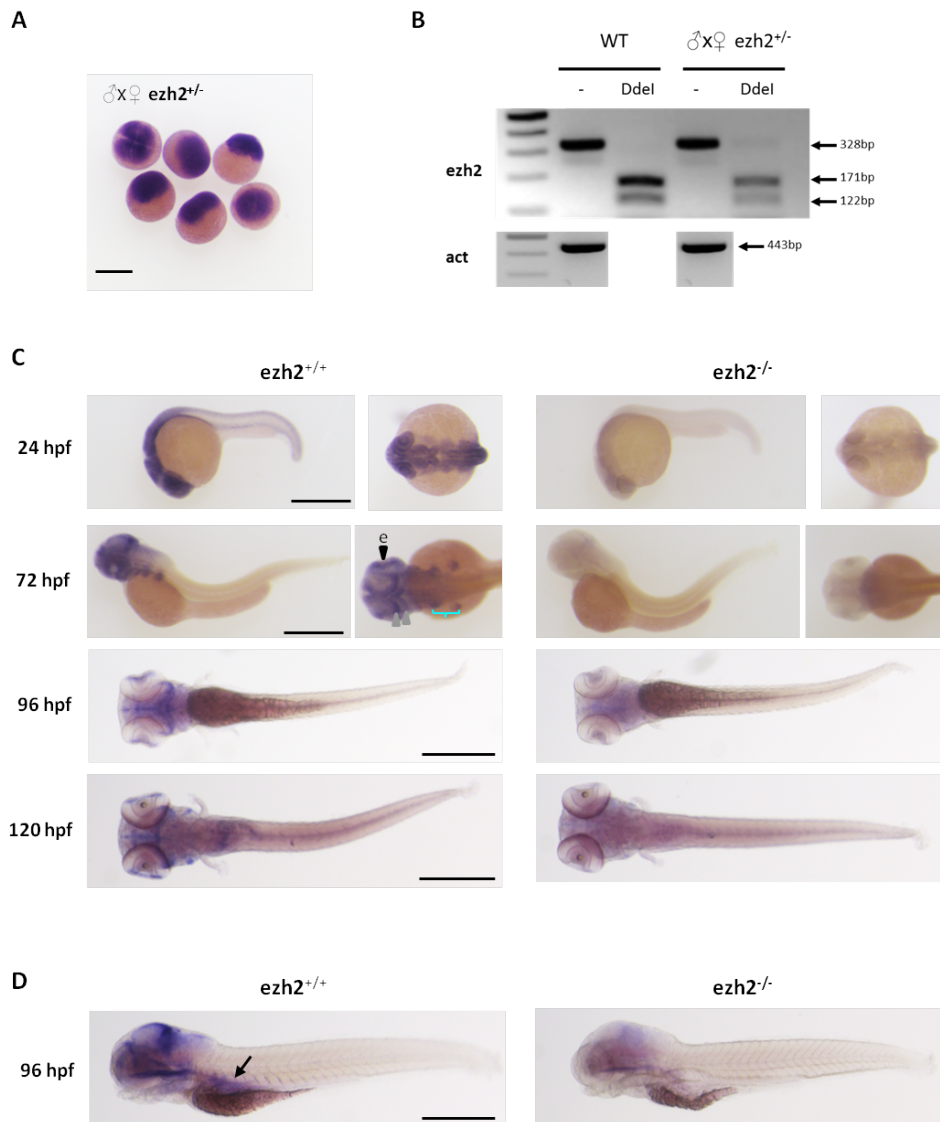


FIGURE 55: Expression d'*ezh2* chez les embryons et les larves au cours du développement. **A.** Expression du transcrite maternel *ezh2* au stade 1-4 cellules vue par hybridation *in situ*. **B.** Analyse de l'expression du transcrite *ezh2* chez les embryons à 2 hpf descendant des sauvages et d'un croisement de deux adultes *ezh2*^{-/-} par RT-PCR. La mère *ezh2*^{-/-} ne dépose que le transcrite sauvage dans les oeufs. Le transcrite mutant n'est pas exprimé à 2 hpf. La taille attendue du fragment sauvage est de 328 bp, puis après digestion 171, 122, 31 et 4 bp. Afin de contrôler la quantité d'ARNm rétro-transcrit, l'actine est amplifiée. **C.** Expression du transcrite *ezh2* jusqu'à 120 hpf chez les sauvages et mutants *ezh2*^{-/-} au niveau des yeux (pointe de flèche noire), des zones de prolifération du cerveau (pointes de flèches grises) et des bourgeons des nageoires pectorales (accolade bleue). **D.** Expression du transcrite *ezh2* chez les larves à 5 jpf. Le transcrite est exprimé au niveau de l'intestin (flèche), au niveau du cerveau et des yeux. Echelle 500µM

cours de développement (figure 56A). Le transcrit *ezh2* chez les mutants est faiblement détecté par hybridation *in situ* et l'analyse par RT-PCR confirme que c'est le transcrit mutant qui est observé (figure 56B). Si ce transcrit est faiblement détecté il devrait être majoritairement dégradé par le système de NMD ; les mutants *ezh2^{-/-}* n'exprimeront pas de protéine fonctionnelle. Pour confirmer cette hypothèse, j'ai réalisé un immunomarquage de la protéine Ezh2 chez les embryons de 3 jpf. L'anticorps utilisé cible la partie N-terminale de la protéine, de cette façon même si une protéine tronquée est exprimée à partir du transcrit mutant, elle pourra être détectée. Ce résultat, permet de détecter la protéine Ezh2 sauvage mais pas la protéine mutante (figure 55C). La protéine Ezh2 est une histone méthyltransférase qui catalyse la marque répressive H3K27me3. J'ai extrait les histones des larves génotypés et les ai groupés par 10 pour réaliser un western blot et visualiser l'abondance de la marque H3K27me3 chez les mutants *ezh2^{-/-}* par comparaison aux sauvages à 9 jpf et 12 jpf. Cette expérience a permis de mettre en évidence que l'abondance de la marque H3K27me3 est diminuée d'environ 70% lorsque Ezh2 est absente. Ainsi, les larves mutantes *ezh2^{-/-}* peuvent survivre jusqu'à 12 jpf en l'absence de la protéine Ezh2 et avec une baisse significative de l'abondance de la marque H3K27me3 et donc de la répression génique (figure 57A). La marque H3K27me3 est perdue en partie chez les larves *ezh2^{+/-}* (figure 57B). La baisse de la marque est visible par immunofluorescence, celle-ci touche la totalité du corps de la larve dès 4 jpf. A 24 hpf il n'y pas de différence marquée (figure 55C).

Les mutants *ezh2^{-/-}* se développent normalement jusqu'à 12 jpf. Dans l'objectif de trouver le phénotype, j'ai réalisé une coloration des lipides à l'oil red O des larves de 9 jpf à 11 jpf. J'ai pu remarquer que le foie des mutants a une coloration plus rouge que celui des sauvages (astérisque jaune) (figure 58A). La composition lipidique du foie des mutants doit être différente. Un autre point intéressant est que la structure de la paroi intestinale est altérée chez les mutants. En effet, à 9 jpf et 10 jpf, la paroi intestinale des mutants est plus fine que celle des sauvages et à 11 jpf les plis de l'intestin sont visibles chez les sauvages alors que chez les mutants la paroi intestinale ne possède aucune structure (figure 58A). Pour confirmer ce résultat obtenu à partir

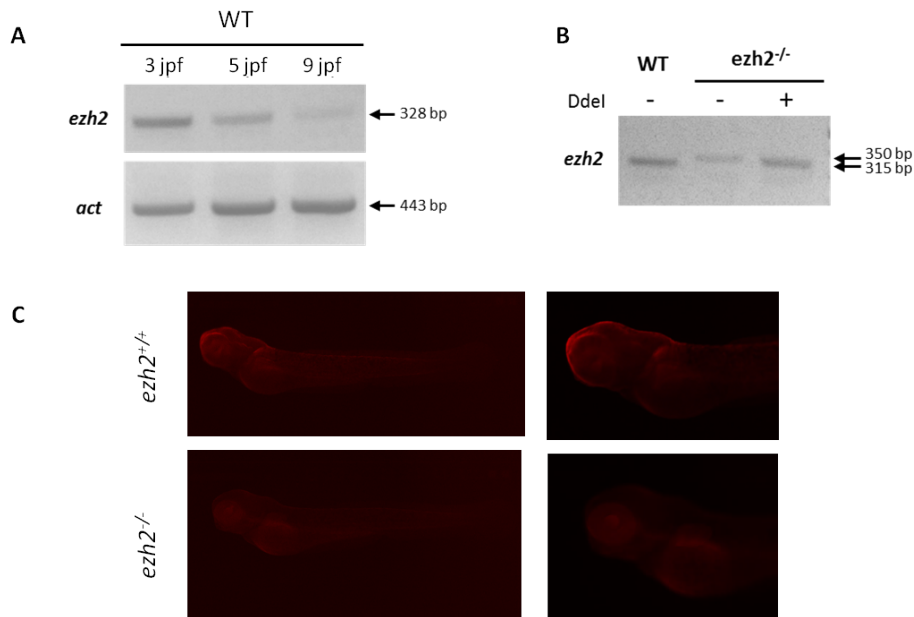


FIGURE 56: **Expression d'*ezh2* au cours du développement.** **A.** Abondance relative du transcrite *ezh2* par RT-PCR chez les embryons sauvages à 3 jpf, 5 jpf et 9 jpf. L'abondance diminue au cours du développement. La charge du produit de RT est mise en évidence par l'amplification de la β actine. **B.** Digestion des produits de RT-PCR par l'enzyme DdeI. L'extraction d'ARN a été réalisée chez les embryons de 3 jpf. La digestion par DdeI montre que le transcrite mutant zygotique est présent chez les embryons *ezh2*^{-/-} issus d'un croisement d'adultes *ezh2*^{+/+}. Le transcrite sauvage amplifié a une taille de 328 bp, le produit mutant une taille de 350 bp et après digestion par DdeI du produit mutant, les fragments attendus sont 315, 31 et 4 bp. **C.** Immuno-marquage de la protéine Ezh2 chez les embryons à 3 jpf. La protéine Ezh2 n'est pas détectée à 3 jpf chez les mutants *ezh2*^{-/-}. Echelle à 24 hpf : 500 μ m et à 4 jpf : 1 mm.

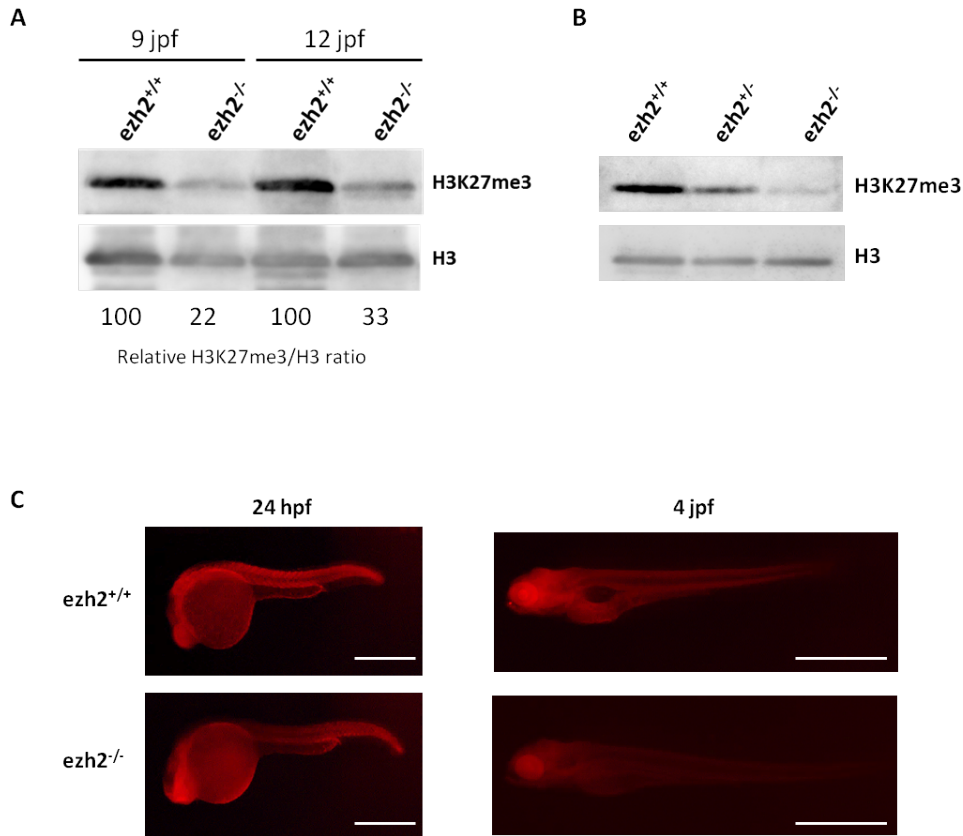


FIGURE 57: Abondance de la marque H3K27me3 chez les *ezh2*^{-/-} en comparaison aux *ezh2*^{+/+}. **A.** Quantification de l'abondance de la marque H3K27me3 chez les sauvages et les mutants *ezh2*^{-/-} issus d'un croisement d'adultes hétérozygotes. L'extraction d'histone a été réalisée à partir d'un groupe de 10 larves génotypés. La marque est moins abondante chez les mutants *ezh2*^{-/-}. **B.** Quantification de l'abondance de la marque H3K27me3 chez les larves à 9 jpf *ezh2*^{+/+}, *ezh2*^{+/-} et *ezh2*^{-/-}. Il existe une baisse de la marque H3K27me3 chez les hétérozygotes en comparaison aux sauvages. **C.** Immunomarquage de H3K27me3 chez les embryons à 24 hpf et chez les larves de 4 jpf. Il n'y a pas de baisse de la marque H3K27me3 visible à 24 hpf. La baisse de la marque H3K27me3 est visible uniquement chez les larves de 4 jpf et touche tous les organes.

de larves *in toto*, j'ai inclus les larves à 5 jpf et 9 jpf en paraffine pour réaliser des sections de l'intestin. L'immunomarquage de l'actine sur ces sections souligne qu'à 5 jpf l'intestin des mutants est correctement développé ainsi que les plis (figure 58B). Pourtant les plis ne sont plus présents au niveau du bulbe intestinal et sont moins marqués dans la partie de l'intestin antérieur à 9 jpf (figure 58B). Donc les larves développent correctement leur intestin mais la structure des tissus à 9 jpf n'est pas maintenue. *Ezh2* joue un rôle dans le maintien de la structure intestinale et donc dans sa fonction d'absorption des nutriments.

J'ai confirmé ce résultat en réalisant une coloration hématoxyline-éosine de sections de larves sauvages et mutantes *ezh2^{-/-}* à 5 jpf et 11 jpf. A 5 jpf il n'y a pas de différence de structure intestinale (figure 59A) mais à 11 jpf on note qu'au niveau de l'oesophage, de la partie antérieure de l'intestin et de la partie postérieure, les plis sont maintenus alors qu'au niveau du bulbe intestinal ces structures ne sont pas maintenues (figure 59B). Le marquage des cellules apoptotiques sur coupes de larves de 9 jpf montre que la majorité des cellules de l'intestin et des organes digestifs (pancréas et foie) sont apoptotiques chez les mutants *ezh2^{-/-}* en comparaison aux sauvages où l'apoptose n'est pas détectée. Ainsi, les tissus du système digestif sont apoptotiques (figure 60).

L'immunomarquage de la phalloïdine (marquage des filaments d'actine) montre l'absence totale de polymérisation à l'apex des cellules mutantes *ezh2^{-/-}* (figure 61A). Ainsi la structure intestinale n'est pas maintenue et est associée à un changement d'organisation des filaments d'actine au niveau cellulaire.

L'absence de plis doit donc empêcher une absorption correcte des nutriments, pour pouvoir obtenir la digestion totale des aliments l'intestin doit également se contracter, pour cela les cellules nerveuses de l'intestin jouent un rôle primordial ; le transcrite *phox2bb* est un marqueur de ces cellules nerveuses entériques. Par hybridation *in situ* j'ai examiné l'expression de ce marqueur chez les larves sauvages et mutantes à 5 jpf, il n'y pas de différence d'expression ; les cellules sont correctement distribuées le long de l'intestin (figure 61B). Le lieu d'expression des transcrits *ezh2* et *phox2bb* dans l'oeil est identique (figure 61D). Étonnamment le transcrite *phox2bb* est exprimé

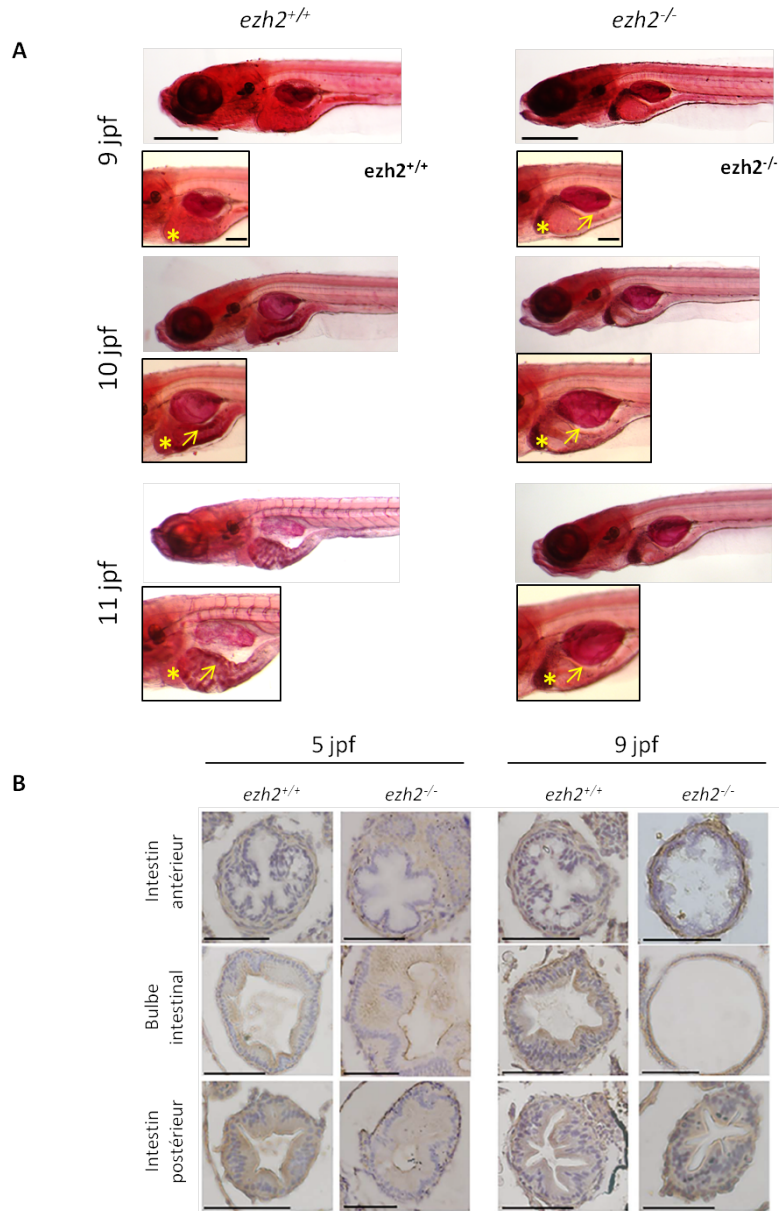


FIGURE 58: **Phénotype intestinal des larves *ezh2^{-/-}* à 9 jpf.** **A.** Coloration des lipides à l'oil red O des larves sauvages et *ezh2^{-/-}* à 9 jpf, 10 jpf et 11 jpf. Le foie est indiqué par l'astérisque jaune et la paroi de l'intestin par la flèche jaune. Echelle 500 μ M, grossissement 200 μ M. **B.** Immuno-marquage de l'actine sur des sections d'intestin paraffinées à 5 jpf et 9 jpf chez les larves sauvages et *ezh2^{-/-}*. Les noyaux sont contre-colorés à l'hématoxyline. Echelle 100 μ M.

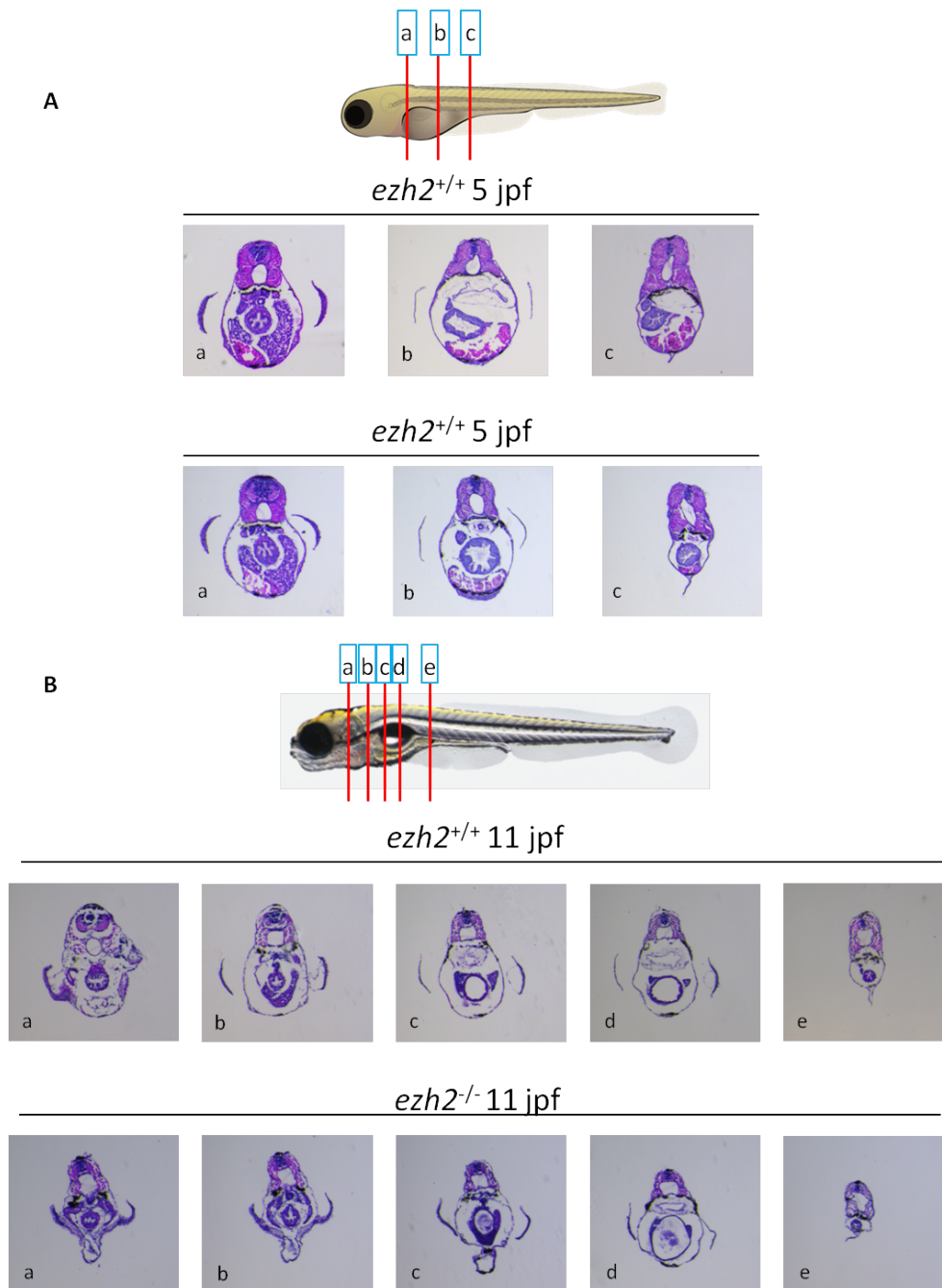


FIGURE 59: Structure du tube digestif chez les larves à 5 jpf et 9 jpf en coupes transversales. **A.** Coloration à l'hématoxyline et l'éosine des sections transversales des larves sauvages et *ezh2^{-/-}* à 5 jpf. Il n'y pas d'anomalie de formation de l'intestin à 5 jpf chez les mutants *ezh2^{-/-}*. **B.** Coloration à l'hématoxyline et l'éosine des sections transversales des larves sauvages et *ezh2^{-/-}* à 11 jpf. A ce stade les plis de l'intestin ne sont pas maintenus au niveau du bulbe intestinal chez les mutants.

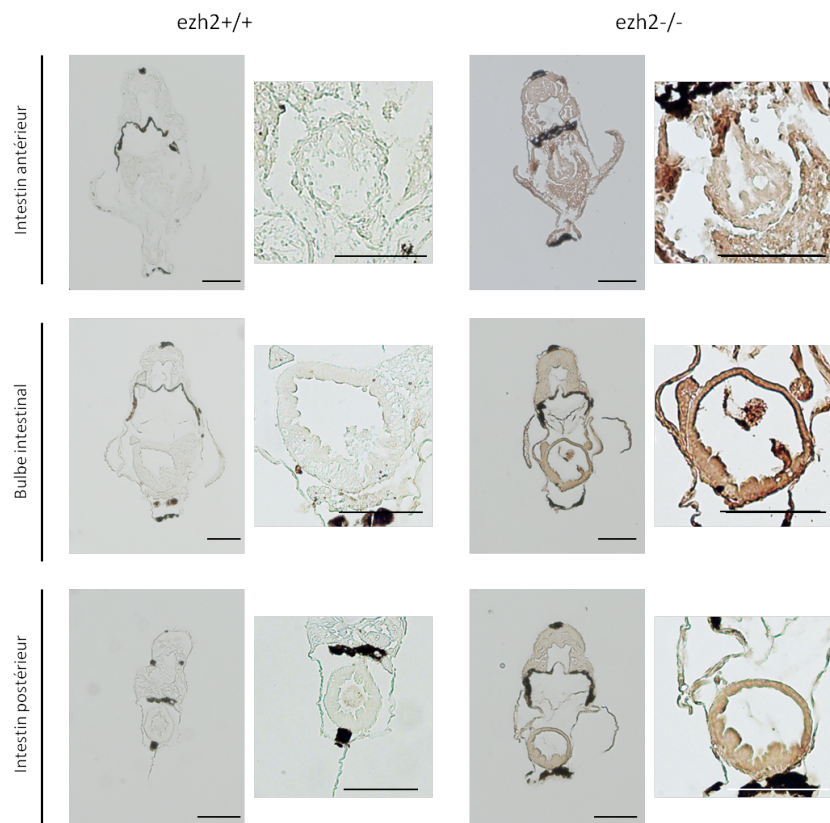


FIGURE 60: **Apoptose des cellules intestinales chez les larves *ezh2*^{-/-}.** Marquage des cellules apoptotiques au niveau de l'intestin chez les larves *ezh2*^{+/+} et *ezh2*^{-/-} à 9 jpf. Il y a une forte apoptose des cellules mutantes au niveau des organes digestifs (intestin, foie et pancréas). Echelle 100 μ M.

dans l'oeil des larves mutantes *ezh2*^{-/-} mais est absent chez les sauvages (figure 61C). Ce résultat met en évidence la répression de *Phox2bb* par *Ezh2* dans l'oeil. C'est uniquement en l'absence d'*ezh2* que *phox2bb* est présent. Par hybridation *in situ* par fluorescence j'ai identifié l'expression d'*ezh2* dans différentes structures de l'oeil (les photo-récepteurs, les cellules amacrines et bipolaires et les cellules ganglionnaires) (figure 61E). Malgré cela, la structure de l'oeil des mutants *ezh2*^{-/-} ne semble pas altérée comme la coloration des sections de l'oeil à l'hématoxyline et éosine à 9 jpf le montre (figure 61F).

En conclusion, la structure du bulbe intestinal des mutants *ezh2*^{-/-} n'est plus maintenue à 9 jpf, cette absence de structure est associée à un changement de formation des filaments d'actine à l'apex des cellules intestinales et à la mort cellulaire. La répartition des cellules nerveuses de l'intestin, dont le marqueur de différenciation est *phox2bb*, n'est pas altérée par l'absence de la protéine *Ezh2* fonctionnelle mais l'expression de *phox2bb* n'est plus réprimée dans l'oeil en l'absence d'*Ezh2*. Ce changement d'expression ne cause pas d'anomalie de formation de l'oeil chez les mutants.

De manière à étudier le maintien des structures et de l'expression d'autres marqueurs de différenciation des organes, nous avons réalisé différentes hybridations *in situ*. L'étude de l'expression des marqueurs du pancréas endocrine (insuline, sécrétée par les cellules β et glucagon sécrété par les cellules α) à 5 jpf ne montre pas d'anomalie. Néanmoins, l'analyse de l'expression du marqueur de différenciation terminale du pancréas exocrine, la *trypsine* (*try*), fait ressortir que ce dernier est plus petit chez les mutants par comparaison aux sauvages (figure 62A). Cette différence n'est pas visible à 3 jpf (figure 62B). La quantification du signal de l'expression de l'ARNm de *trypsine* par le logiciel Adobe Photoshop sur des larves génotypées démontre que le pancréas exocrine des mutants *ezh2*^{-/-} est plus petit que celui des sauvages (figure 63A et B). Comme pour l'intestin, le pancréas exocrine est correctement mis en place mais le maintien des tissus n'a pas lieu correctement. J'ai par la suite étudié l'expression du transcrit *fabp10a* (*lfabp*), marqueur de différenciation

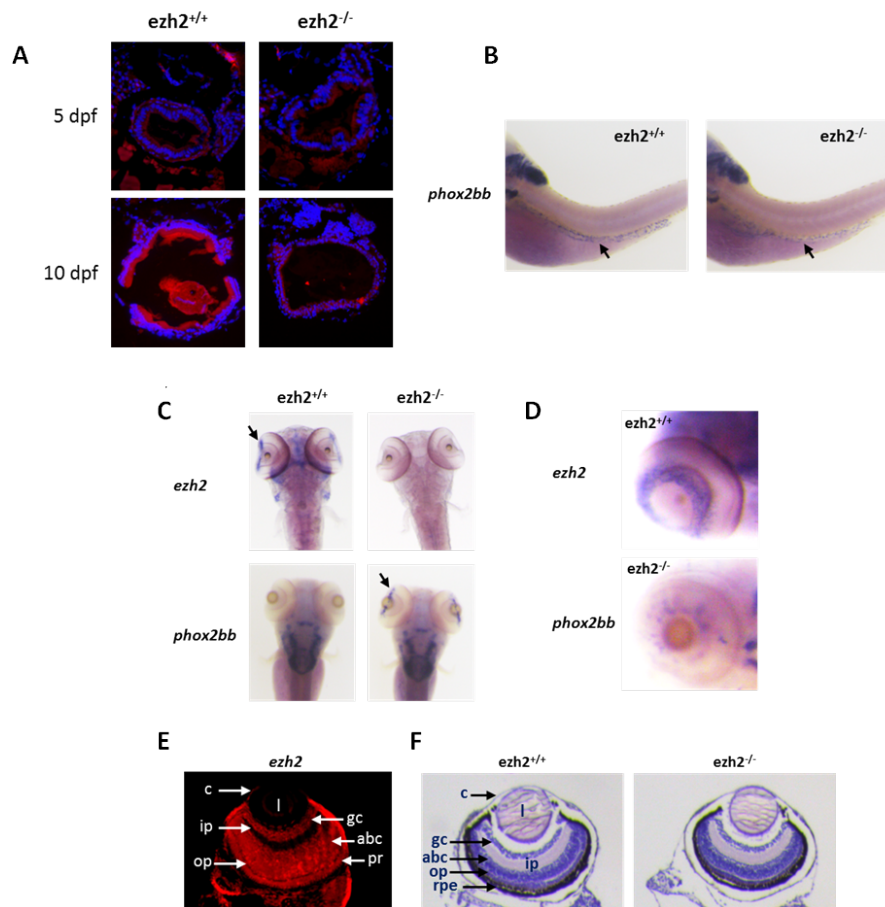


FIGURE 61: **Structure intestinale et contrôle de l'expression de Phox2bb dans l'oeil par Ezh2.** **A.** Immuno-marquage de la phalloïdine au niveau de l'intestin des larves sauvages et mutantes *ezh2*^{-/-} à 5 jpf et 10 jpf. Les noyaux sont contre-colorés au Hoechst 33342. **B.** Expression du transcrit *phox2bb* vu par hybridation *in situ* chez les larves sauvages et mutantes *ezh2*^{-/-} à 5 jpf. Ce gène est exprimé par les cellules nerveuses de l'intestin, il n'y a pas de différence d'expression. **C.** Expression des transcrits *ezh2* et *phox2bb* chez les larves sauvages et mutantes à 5 jpf en vue dorsale. Les expressions sont indiquées par les flèches noires. **D.** Expression des transcrits *ezh2* et *phox2bb* en vue latérale. **E.** Expression d'*ezh2* au niveau d'une section de l'oeil d'une larve sauvage de 5 jpf par hybridation *in situ* en fluorescence. Le marquage a été réalisé sur larve entière puis elles ont été incluses en paraffine et des coupes de 5 μ M ont été réalisées. abc : amacrine and bipolar cells (cellules amacrines et bipolaires) ; c : cornea (cornée) ; gc : ganglion cells (cellules ganglionnaires) ; ip : Inner plexiform (pléxiforme interne) ; l : lens (cristallin) ; op : outer plexiform (pléxiforme externe) ; pr : photoreceptors (photo-récepteurs). **F.** Coloration à l'hématoxyline et l'éosine des sections transversales de l'oeil chez larves sauvages et mutantes à 9 jpf. abc : amacrine and bipolar cells (cellules amacrines et bipolaires) ; c : cornea (cornée) ; gc : ganglion cells (cellules ganglionnaires) ; ip : Inner plexiform (pléxiforme interne) ; l : lens (cristallin) ; op : outer plexiform (pléxiforme externe) ; pr : photoreceptors (photo-récepteurs) ; rpe : retinal pigmented epithelium (épithélium pigmenté de la rétine).

du foie (Her et al. 2003), dont le motif d'expression ne souligne pas d'anomalie de développement du foie (figure 62C). Plus tôt, j'ai mis en évidence figure 58A que le foie présentait une composition lipidique différente mais ce marquage de *fabp10a* montre que ce n'est pas associé à une altération de la différenciation cellulaire. Le transcrit *fabp2* (*ifabp*) est un marqueur de l'intestin dont l'expression ne semble pas être altérée en l'absence d'Ezh2 à 5 jpf, ce qui confirme les résultats précédents (absence de phénotype intestinal à 5 jpf).

J'ai également mesuré la taille des yeux des embryons mutants par comparaison aux sauvages. Comme *ezh2* est exprimé dans l'oeil mais que son absence ne semble pas altérer la mise en place des différentes structures de l'oeil, il se peut que la taille de l'oeil soit altérée. La mesure des yeux montre que lorsque la protéine Ezh2 est absente, la taille des yeux n'est pas significativement différente à 4 jpf (figure 63C).

La présence de l'ARN maternel aux stades précoces du développement pourrait protéger le mutant et lui permettre de passer les premières étapes du développement et de survivre jusqu'à 12 jpf. Pour connaître le rôle des ARN maternels dans le développement nous avons décidé de traiter les embryons avant le stade de gastrulation, à 3 hpf, avec un inhibiteur d'Ezh2, le GSK126. Le GSK126 est 150 fois plus spécifique d'Ezh2 que d'Ezh1 dont leur domaine catalytique SET est identique à 96%. En se basant sur les concentrations utilisées en culture cellulaire nous avons choisi d'utiliser la drogue à des concentrations comprises entre $0,25\mu\text{M}$ et $2\mu\text{M}$ (McCabe et al. 2012). Les embryons et les larves de poisson zèbre absorbent rapidement les composés de faible poids moléculaire dilués dans le milieu via la peau ou les branchies. Une expérience de titrage (figure 64A) nous a permis de choisir la concentration de $1\mu\text{M}$, qui est la concentration où le taux de mortalité est tel qu'il nous permet d'étudier les malformations induites par la drogue. La drogue étant dissoute dans le DMSO, notre contrôle sera le DMSO à une concentration finale équivalente à celle obtenue lorsque la drogue est diluée dans le milieu de culture des embryons. Le traitement des embryons par cet inhibiteur cause une augmentation de la mortalité des embryons et l'apparition d'anomalies du développement notamment des oedèmes cardiaques visibles à 96 hpf et un retard de développement des nageoires pectorales (figure

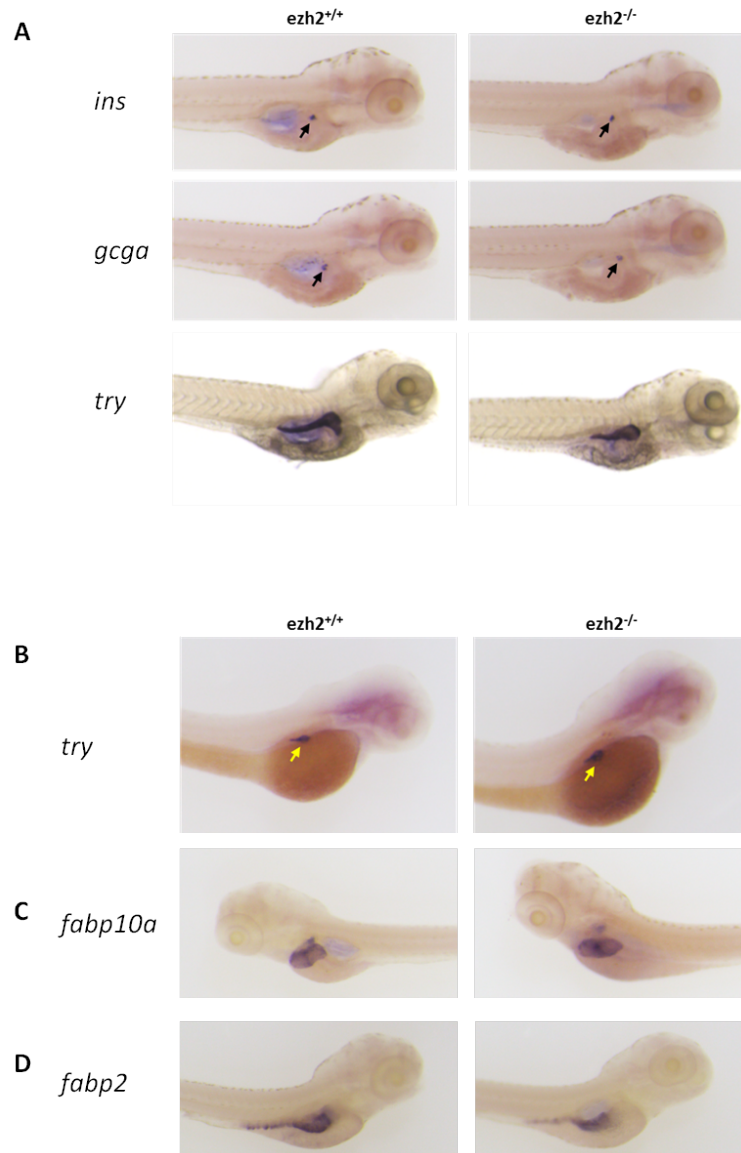


FIGURE 62: **Analyse de la mise en place des organes digestifs.** **A.** Expression des transcrits des larves à 5 jpf *ins* (*insuline*) *gcga* (*glucagon*) marqueurs de la différenciation du pancréas endocrine et *try* (*trypsine*) marqueur de différenciation du pancréas exocrine. **B.** Expression du transcrit des embryons à 3 jpf de *try* indiqué par la flèche jaune. **C.** Expression du transcrit *lfabp* chez les larves sauvages et mutantes à 5 jpf. **D.** Expression du transcrit des larves à 5 jpf *fabp10a* marqueur de différenciation de l'intestin.

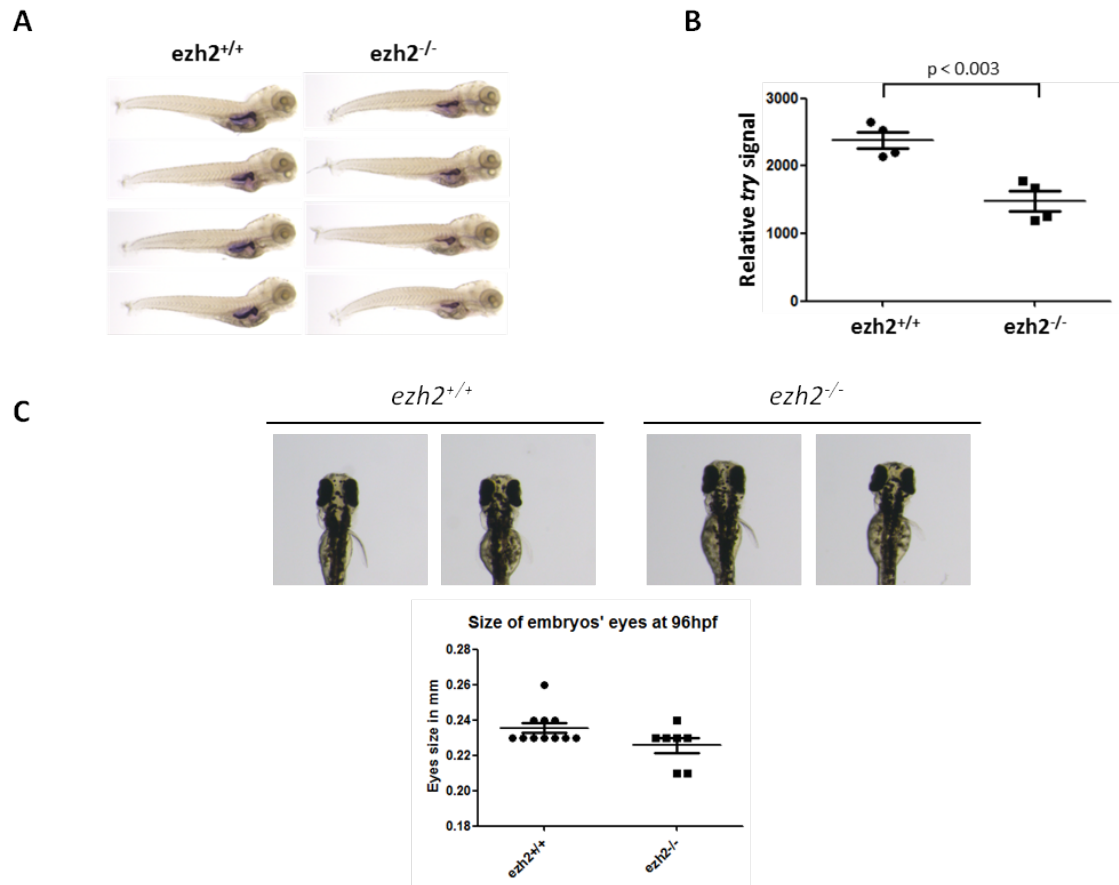


FIGURE 63: **Analyse de la mise en place des organes digestifs.** **A.** Expression du transcrit *try* à 5 jpf chez les larves sauvages et mutantes **B.** Quantification de l'aire du signal à l'aide du logiciel Adobe Photoshop. Le pancréas est plus petit chez les larves *ezh2*^{-/-} par comparaison aux sauvages. Le test statistique est un test-t de student et la significativité est indiquée par la p-value. **C.** Mesure de la taille des yeux chez les larves sauvages et mutantes *ezh2*^{-/-} à 4 jpf. Pas de différence significative.

64B). Le développement des yeux est affecté lorsque *Ezh2* est inhibée avant la gastrulation, les yeux des larves traitées sont plus petits par comparaison aux contrôles (figure 64D). Finalement, l'analyse de l'abondance de la marque H3K27me3 met en évidence que celle-ci est diminuée de 60% lorsque les larves sont traitées par 1 μ M de GSK126 (figure 64E). L'immunofluorescence marquant H3K27me3 montre la baisse de la marque H3K27me3 dans toute la larve à 4 jpf (figure 64F). Le traitement des embryons au stade 2 cellules ne cause pas l'apparition d'un phénotype plus marqué (figure 65A-C). Ainsi, l'ARN maternel *ezh2* présent chez les *ezh2*^{-/-} semble protéger leur développement qu'en partie ; particulièrement pour le développement du coeur, des yeux et des nageoires pectorales. L'inhibition précoce d'*Ezh2* ne cause pas de mortalité embryonnaire comme dans le modèle murin. De façon plus étonnante ces résultats soulignent que les embryons sont capables de passer le stade de gastrulation et de se développer en l'absence d'*Ezh2* contrairement à ce qui a été montré chez la souris (O'Carroll et al. 2001). **En conclusion, *Ezh2* est importante pour le maintien du pancréas exocrine, mais n'est pas impliquée dans le maintien du pancréas endocrine et du foie. Chez les mutants *ezh2*^{-/-} la taille de l'oeil n'est pas altérée. La présence des ARN maternels protège le développement des embryons *ezh2*^{-/-} en partie car l'inhibition de la protéine maternelle par le GSK126 est à l'origine d'un phénotype différent. En effet, les larves ont un retard de développement des nageoires pectorales et des yeux plus petits. En l'absence d'*Ezh2* l'abondance de la marque H3K27me3 est diminuée de façon globale dans l'organisme. En comparaison au modèle murin, le poisson zèbre nous a permis de mettre en évidence le rôle d'*Ezh2* dans le maintien des tissus.**

Le poisson zèbre est un modèle animal également utilisé pour étudier la régénération de la nageoire caudale. J'ai donc étudié le rôle de la protéine *Ezh2* dans la régénération chez l'adulte et la larve. Comme la mutation de *ezh2* ne nous permet pas d'obtenir des lignées mutantes homozygotes adultes, nous avons amputé la nageoire caudale des adultes sauvages et étudié l'expression d'*ezh2* par hybridation *in situ* (figure 66A). Cette expérience suggère qu'*ezh2* est impliquée dans la régénéra-

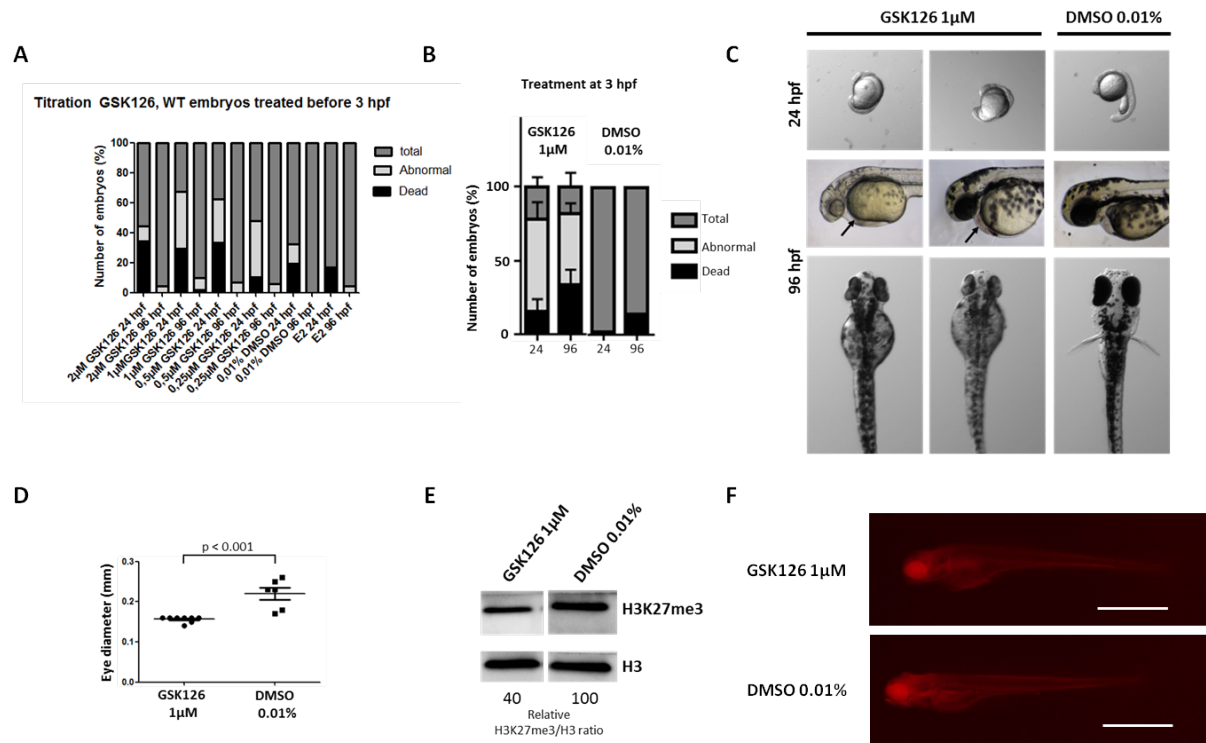


FIGURE 64: Inhibition d'Ezh2 par le GSK126 avant 3 hpf. **A.** Titration de la drogue GSK126 entre $0,25\mu\text{M}$ et $2\mu\text{M}$. Pour chaque concentration, les embryons malformés et morts ont été comptés entre 24 hpf et 96 hpf. **B.** Traitement des embryons à 3 hpf avec l'inhibiteur d'Ezh2 des embryons sauvages, quantification de la mortalité et des anomalies de développement à 24 hpf et 96 hpf des embryons traités avec $1\mu\text{M}$ de GSK126 ($n=397$) ou contrôle, 0,01% DMSO ($n=114$). **C.** Le phénotype des embryons traités est, à 24 hpf, un retard de développement et à 96 hpf des oedèmes cardiaques et un retard de développement des nageoires pectorales. **D.** Mesure de l'oeil des larves traitées au GSK126 à 96 hpf, les yeux sont plus petits. Le test statistique est un test-t de student et la significativité est indiquée par la p-value. **E.** Quantification de l'abondance de la marque H3K27me3 par western blot chez les larves traitées avec $1\mu\text{M}$ de GSK126 par comparaison au contrôle 0,01% DMSO. La marque est moins abondante lorsque les larves ont été traitées. Les histones ont été extraites d'un groupe de 10 larves à 96 hpf. **F.** Immunomarquage de la marque H3K27me3 chez les larves de 4 jpf après traitement à $1\mu\text{M}$ de GSK126 ou 0,01%DMSO. La marque H3K27me3 est moins abondante chez les larves traitées.

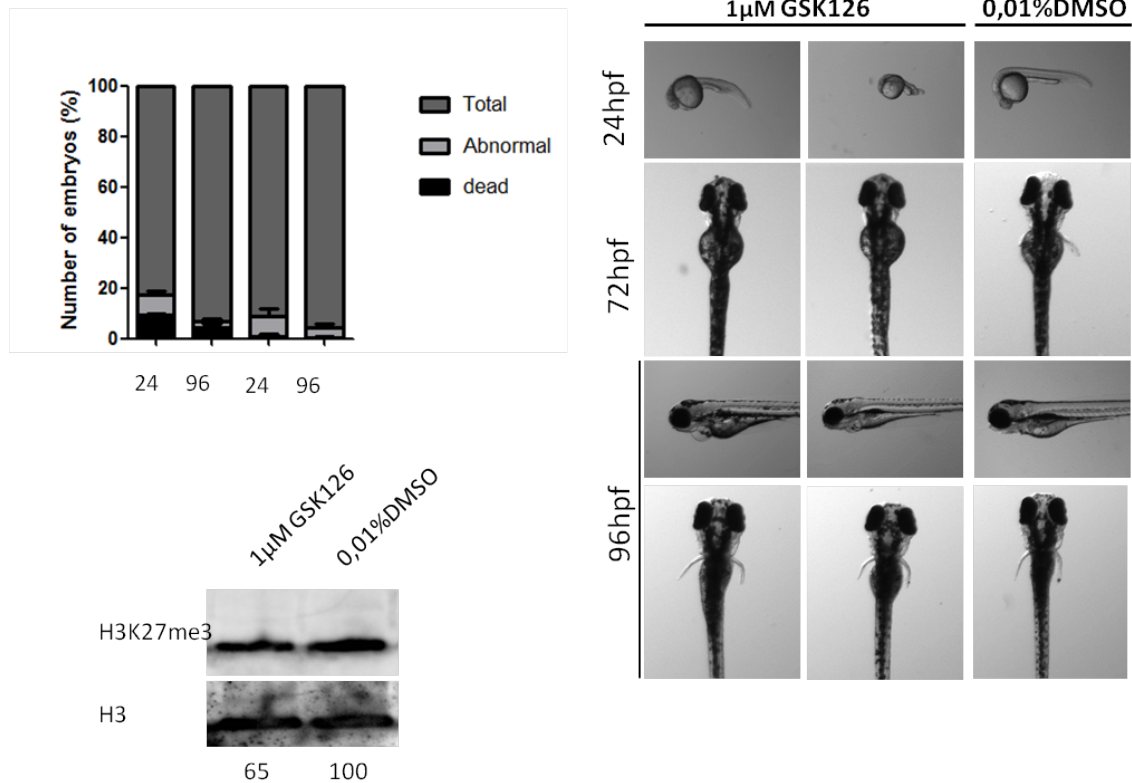


FIGURE 65: **Inhibition d'Ezh2 par le GSK126 à 2 cellules.** **A.** Traitement des embryons à 2 cellules avec l'inhibiteur d'Ezh2, la mortalité et les anomalies du développement sont recensées. **B.** Phénotype des embryons traités avec 1 μM de GSK126 à 2 cellules. Les embryons présentent un retard de développement à 24 hpf et un retard de développement des nageoires pectorales à 72 hpf. L'inhibition d'Ezh2 cause la formation d'oedèmes cardiaques à 96 hpf. **C.** Quantification de l'abondance de la marque H3K27me3 par western blot. La marque H3K27me3 est moins abondante lorsque Ezh2 est inhibée.

tion de la nageoire caudale chez l'adulte. Pour approfondir ces résultats j'ai accompli la même expérience chez les embryons de 3 jpf. La nageoire caudale est amputée à l'aide d'un scalpel juste après le vaisseau sanguin selon la méthode de Wilkinson et al. 2013 et la régénération est observée 2 jours après (2 jpa). Par hybridation *in situ*, j'ai mis en évidence le rôle de *ezh2* dans la régénération de la nageoire caudale chez les larves (figure 66B). Dans le but d'identifier le mécanisme de régénération nécessitant l'expression de *ezh2*, j'ai amputé la nageoire caudale des embryons et je les ai traités avec le GSK126 ; ce traitement cause un défaut de régénération de la nageoire caudale. Les tissus mous semblent être cicatrisés et régénérés en partie mais la notochorde n'est pas régénérée (figure 66C). Le même résultat est obtenu sur des embryons issus d'un croisement d'adultes *ezh2^{+/-}*. Le site d'amputation est cicatrisé et régénéré en partie mais la notochorde n'est pas régénérée (figure 66D). La régénération en absence d'Ezh2 semble affecter majoritairement la notochorde, les tissus l'entourant se régénèrent en partie. Pour confirmer la régénération des tissus mous en l'absence d'Ezh2, j'ai amputé la nageoire embryonnaire unique (membrane) présente du dos au ventre. En l'absence d'Ezh2 cette partie de la nageoire régénère correctement (figure 66E).

Ezh1 peut, comme Ezh2, former le complexe PRC2. L'expression de cette protéine pourrait compenser la perte d'Ezh2 et permettre à l'embryon de se développer. Pour tester cette hypothèse j'ai traité les embryons avec un inhibiteur ciblant Ezh1 et Ezh2, l'UNC1999. Nous avons choisi d'utiliser cet inhibiteur selon les concentrations utilisées en culture cellulaire. L'utilisation de cet inhibiteur à 5 μ M cause un retard de développement des embryons à 24 hpf mais les embryons sont capables de se développer lorsque les protéines Ezh1 et Ezh2 sont inhibées. A 96 hpf les larves développent des oedèmes cardiaques et un retard de développement. Lorsque les embryons sont traités avec l'UNC1999, le retard de développement est différent de celui observé avec le GSK126 : les larves ont une morphologie différente et sont moins pigmentées. En conclusion l'inhibition d'Ezh1 et d'Ezh2 simultanément accentue le phénotype observé lorsque seule Ezh2 est inhibée. Ezh1 semble jouer un rôle dans la pigmentation des embryons.

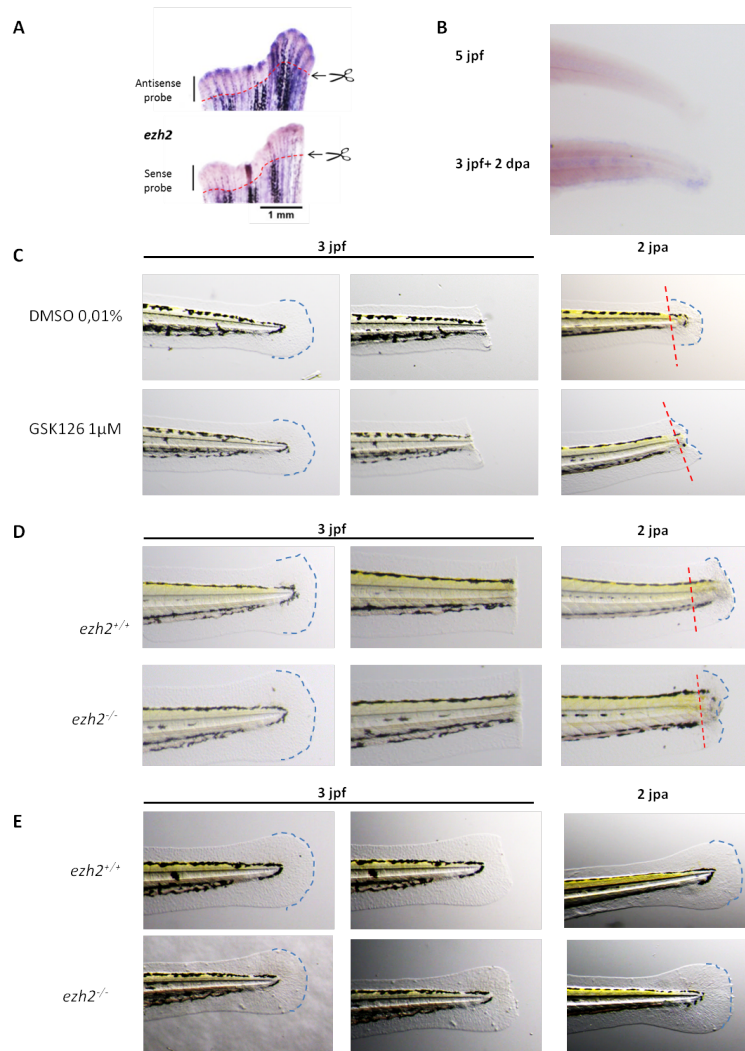


FIGURE 66: Expression d'Ezh2 lors de la régénération de la nageoire caudale.

A. Expression du transcrite *ezh2* lors de la régénération de la nageoire caudale chez l'adulte 4 jpa. **B.** Expression du transcrite *ezh2* 2 jpa lors de la régénération de la nageoire caudale de la larve par comparaison au contrôle non amputé. La nageoire caudale des embryons a été amputée à 3 jpf. **C.** A 3 jpf les nageoires caudales des embryons sont amputées après le vaisseau, les embryons sont traités avec $1\mu\text{M}$ de GSK126 ou 0.01% DMSO ; puis la régénération est observée 2 jpa. **D.** Les embryons sauvages et mutants *ezh2*^{-/-} sont amputées après le vaisseau de la nageoire caudale à 3 jpf et la régénération est observée 2 jpa. **E.** Les embryons sauvages et mutants *ezh2*^{-/-} sont amputées au niveau de l'épiderme de la nageoire caudale à 3 jpf et la régénération est observée 2 jpa.

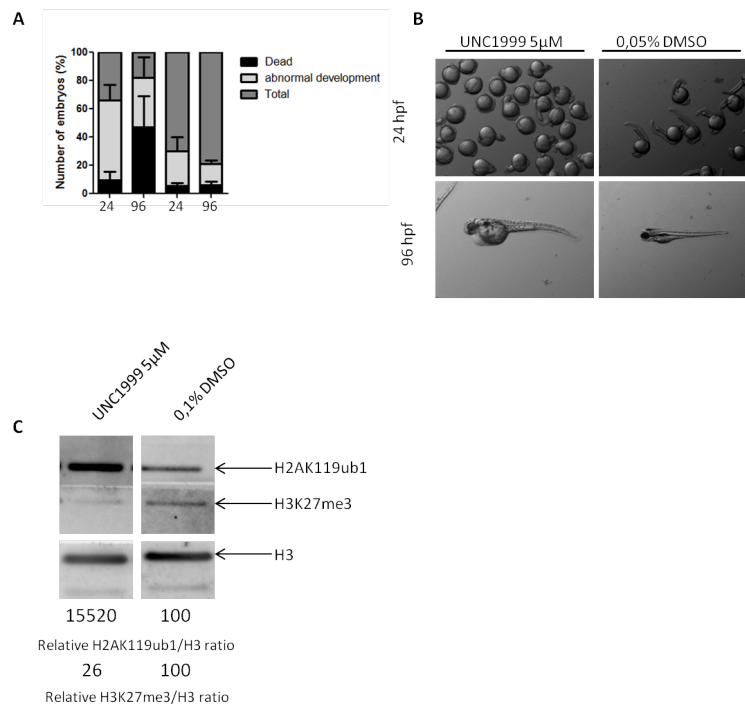


FIGURE 67: Inhibition d'Ezh1 et Ezh2 par l'UNC1999. **A.** Traitement des embryons sauvages à 3 hpf avec l'inhibiteur d'Ezh2 et d'Ezh1, l'UNC1999. Quantification de la mortalité et des anomalies de développement à 24 hpf et 96 hpf des embryons traités avec 5µM de UNC1999 (n=542) ou contrôle, 0,05% DMSO (n=193). **B.** Le phénotype des embryons traités est, à 24 hpf, un retard de développement et à 96 hpf des oedèmes cardiaques. **C.** Quantification de l'abondance des marques H3K27me3 et H2AK119ub1 par western blot chez les larves traitées avec 5µM de UNC1999 par comparaison au contrôle 0,1% DMSO. La marque est moins abondante lorsque les larves ont été traitées. Les histones ont été extraites d'un groupe de 10 larves à 96 hpf.

Quatrième partie

Discussion

Les protéines du groupe Polycomb forment deux complexes distincts, le PRC1 et le PRC2. Ils contrôlent l'expression génique via l'ajout de marques épigénétiques qui sont : H2AK119ub1 pour PRC1 et H3K27me3 pour le PRC2. (Gao et al. 2012, Margueron et al. 2008). Il existe plusieurs complexes PRC1 en fonction de la présence ou de l'absence des protéines CBX (complexe canonique ou non canonique) et de l'homologue *pcgf* qui le compose. Le complexe PRC1.1 contient la protéine *Pcgf1*. Ce complexe catalyse la marque H2AK119ub1. *Ezh1* et *Ezh2* peuvent toutes deux former le complexe PRC2 et catalyser la marque H3K27me3. Mon travail de thèse s'articule en deux parties ; premièrement j'ai étudié le rôle de la protéine *Pcgf1* au cours du développement chez le poisson zèbre, deuxièmement j'ai inactivé le gène *ezh2* chez le poisson zèbre afin d'analyser la fonction d'*Ezh2*.

Chapitre 1

Pcgf1

Grâce aux TALEN, nous avons mis en place un modèle d'inactivation de *pcgf1* chez le poisson zèbre. Le TALEN cible l'exon 2. Le site de restriction ClaI, permet de génotyper les poissons. La mutation obtenue est une délétion de 11 nucléotides. Celle-ci cause un décalage de la phase ouverte de lecture et la formation d'un codon stop prématuré. La protéine prédite, de 79 aa, est non fonctionnelle, elle n'est composée d'aucun domaine conservé. Les poissons homozygotes mutants issus d'un croisement d'homozygotes mutants sont viables et fertiles. L'expression du transcrite maternel et zygotique n'est pas indispensable au développement. Nous avons réalisé plusieurs expériences afin de mettre en évidence le phénotype associé à l'inactivation de *pcgf1*.

1.1 Pcgf1, contrôle de la prolifération cellulaire

Les transcrits *pcgf* (sauf *pcgf1*) chez le poisson zèbre sont exprimés dans les zones prolifératives lors de la régénération de la nageoire caudale. Ils semblent importants pour le processus de régénération. Les poissons homozygotes mutants Pcgf1 sont viables et fertiles, ils ne présentent pas de phénotype macroscopique.

Cependant, l'absence de Pcgf1 cause un retard de développement des embryons et des larves. En effet, les mutants Pcgf1 présentent un ralentissement de mise en place des cartilages et de l'ossification. Le processus d'ossification et les cartilages sont correctement mis en place à 21 jpf comme chez les sauvages. Le retard de

développement est également visible au niveau de la mise en place des muscles cranio-faciaux. Aucune anomalie n'a été mise en évidence au niveau du cerveau et des yeux. Le retard est observé dès les premiers stades ; les embryons *pcgf1*^{-/-} n'ont pas la même vitesse de division cellulaire que les embryons sauvages. En effet, l'embryon est toujours composé de moins de cellules chez les mutants (aux mêmes stades de développement).

Afin de comprendre l'origine de ce retard de développement, je me suis intéressée à la prolifération cellulaire. Par un immunomarquage j'ai quantifié le nombre de cellules H3S10P positives (marque de prolifération cellulaire). Le nombre de cellules positives est significativement réduit chez les embryons *pcgf1*^{-/-}. **Pcgf1 est impliquée dans le développement embryonnaire et contrôle la prolifération cellulaire.**

Le complexe PRC1 contrôle l'expression de *p21*^{waf1/cip1}. Premièrement, Gong et al. 2006 mettent en évidence le rôle de *Pcgf1* dans la progression du cycle cellulaire et la prolifération. Elle contrôle l'expression de *p21*^{waf1/cip1}, qui favorise l'arrêt du cycle cellulaire. *Pcgf1* se lie au niveau de son promoteur (-1357 à -1083) afin de réprimer son expression. Cette région du promoteur est également le site de liaison de l'acide rétinoïque (rôle dans l'embryogénèse) qui favorise l'expression de *p21*^{waf1/cip1}. Deuxièmement, le complexe PRC1 catalyse la marque H2AK119ub1 via RING1A, cette protéine joue un rôle dans la prolifération des cellules cancéreuses gastriques. L'inactivation de RING1A cause la mortalité cellulaire et favorise l'expression de *p21*^{waf1/cip1} et donc l'arrêt du cycle cellulaire (Zhang et al. 2017a). RING1A a un rôle d'oncogène dans les tumeurs gastriques. Ainsi le complexe PRC1 via RING1A et PCGF1 peut contrôler la prolifération via notamment la répression de *p21*^{waf1/cip1} (figure 68).

Perspectives. Ainsi, dans le futur nous pourrions étudier l'expression de la protéine *p21*^{waf1/cip1} lors du développement (Gong et al. 2006). L'expression d'autres protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire comme p27, p14, p16 pourrait être étudiée par immunomarquage (Zhang et al. 2017a). L'expression des cyclines et de PCNA peut être analysée par hybridation *in situ*. Ces expériences

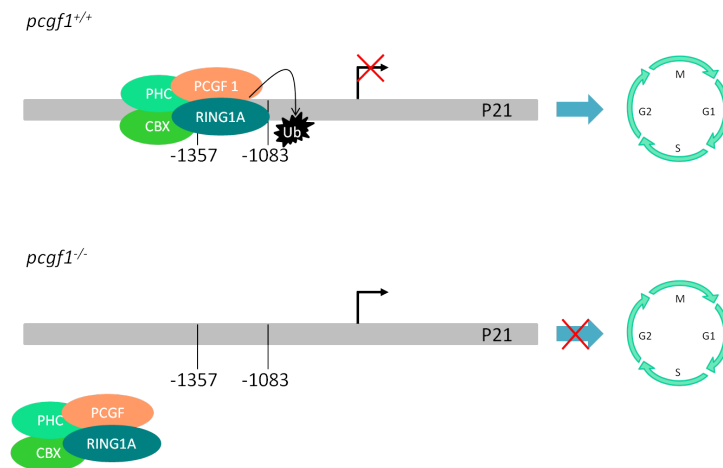


FIGURE 68: **Contrôle du cycle cellulaire par Pcgf1.** En présence de la protéine Pcgf1 le cycle cellulaire progresse normalement car l'expression de la protéine P21 est réprimée par la marque H2AK119ub1. Cependant en l'absence de Pcgf1, cette protéine n'est plus réprimée et cause l'arrêt du cycle cellulaire.

d'étude d'expressions pourraient être complétées par une analyse du cycle cellulaire aux différents stades embryonnaires. Les cellules des embryons pourraient être dissociées et marquées à l'iodure de propidium pour analyser le cycle par cytométrie en flux (Shepard et al. 2004).

1.2 Pcgf1, cellules souches et vieillissement

Lors du développement précoce, les mutants *pcgf1*^{-/-} présentent un retard de développement mais les adultes ont un phénotype de vieillissement accéléré. En effet, à l'âge d'un an, les adultes *pcgf1*^{-/-} ont un phénotype de poisson observé chez des individus beaucoup plus âgés, aux alentours de 3 ans. Ces adultes ont une courbure de la colonne vertébrale significativement plus accentuée, une peau plus fine et semble plus mince. Ainsi, l'inactivation de *pcgf1* cause un vieillissement accéléré. **Le fait que les embryons aient un retard de développement et que les adultes vieillissent prématurément nous laisse penser que Pcgf1 joue un rôle dans la mise à disposition des cellules souches nécessaires au développement embryonnaire et au renouvellement des tissus âgés.**

Le rôle de Pcgf1 dans les cellules souches a été mis en évidence ces dernières années.

Li et al. 2013a, mettent en évidence le rôle de *Pcgf1* dans la régulation de l'expression de *Oct4* en se liant directement à son promoteur (-1021 à -784). Les protéines NANOG, OCT4 (marqueurs de cellules souches), PATZ1 (régulation transcriptionnelle et modelage de la chromatine) et DPPA4 (régulateur impliqué dans le développement) interagissent avec PCGF1. Cette dernière régule positivement l'expression de NANOG et DPPA1 de façon directe ou indirecte. Ainsi, PCGF1 est impliquée dans la pluripotence des cellules souches. Celle-ci est fortement exprimée dans les cellules souches des gliomes et joue un rôle dans leur auto-renouvellement, la formation des neurosphères et l'expression des marqueurs de cellules souches (NESTIN, CD133 et SOX2). Elle réprime l'expression de RDH16 (répresseur de cellules souches, impliqué dans la synthèse de l'acide rétinolique), en se fixant directement à son promoteur (-1073 à -823) (Hu et al. 2017b).

PCGF1 régule positivement les facteurs impliqués dans la différenciation de l'ectoderme et du mésoderme. Elle joue un rôle dans le devenir des cellules souches. L'inactivation de *Pcgf1* dans les cellules embryonnaires souches (ES) n'a pas d'effet sur l'auto-renouvellement cellulaire mais retarde leur différenciation. En effet, les corps embryoides (permettant d'étudier la différenciation des cellules souches pour obtenir les 3 feuillets) sont plus petits dû à un retard de différenciation cellulaire. Les corps embryoides formés de cellules *Pcgf1*^{-/-} expriment plus fortement les marqueurs de pluripotence (OCT4, NANOG) mais expriment peu les marqueurs de différenciation de l'ectoderme (FGF5, NESTIN) et du mésoderme (FLK1). Ainsi, Yan et al. 2017, mettent en évidence le rôle de PCGF1 dans la différenciation des cellules souches. Ces résultats confirment le rôle que *Pcgf1* pourrait avoir dans la mobilisation des cellules souches dans différents tissus aux stades embryonnaires et lors du vieillissement afin de renouveler les tissus.

Ces auteurs montrent également que l'abondance de la marque H2AK119ub1 n'est pas altérée lorsque *Pcgf1* est inactivée dans les cellules ES tout comme dans notre modèle *in vivo*. Ainsi, la perte de *Pcgf1* pourrait être compensée par un homologue, en particulier *Pcgf5*. Si et al. 2016a, mettent en évidence que PCGF5 est exprimée dans les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs multipotents. Son in-

activation ne cause pas d'anomalie dans l'hématopoïèse. Les deux homologues PCGF les plus exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques sont PCGF1 et PCGF5. Il se pourrait dans ce modèle que PCGF1 compense la perte de PCGF5. **Ainsi, la viabilité de nos mutants et l'absence de baisse de la marque H2AK119ub1 pourraient être dues à une compensation de Pcgf1 par un homologue.** Les cellules souches sont indispensables au renouvellement des tissus durant toute la vie de l'organisme. L'arrêt de prolifération des cellules souches particulièrement via les voies p21 et p16 entraîne la sénescence (Oh et al. 2014, LaPak et al. 2014). **En conclusion, les résultats obtenus montrent l'importance de Pcgf1 dans la mobilisation des cellules souches tant lors du développement précoce que lors du vieillissement afin de générer les tissus. Les homologues de Pcgf1 peuvent compenser sa perte et permettre de conserver la marque H2AK119ub1.**

Perspectives. Yan et al. 2017, montrent le rôle de PCGF1 non pas dans le renouvellement des cellules souches mais dans leur différenciation. Lors de prochaines analyses il serait intéressant d'étudier l'expression des facteurs de pluripotence comme Oct4, Sox2 et Nanog chez les larves et les adultes mais également les marqueurs de différenciation des 3 feuillets chez les embryons (endoderme, mésoderme et ectoderme). Chez les adultes il serait important de visualiser la différenciation des cellules souches au niveau de tissus très prolifératifs comme l'intestin et également lors de la régénération de la nageoire caudale. Même si la nageoire caudale est capable de régénérer (data non montrées), la différenciation des cellules du mésenchyme est peut-être affectée. Pcgf1 peut être compensée par d'autres Pcgf, par hybridation *in situ* nous pourrions étudier leur expression et ainsi connaître quel homologue compense la perte de Pcgf1.

Chapitre 2

Ezh2

Au laboratoire nous avons mis en place un modèle d'inactivation d'*ezh2* chez le poisson zèbre grâce aux TALEN. L'exon deux a été choisi comme cible du TALEN. Le site de restriction DdeI situé dans la région spacer du TALEN permet de génotyper les individus. La mutation obtenue est l'insertion de 22 nucléotides (une délétion de 5 nucléotides et une insertion de 27 nucléotides). Celle-ci cause un décalage de la phase ouverte de lecture et la formation d'un codon stop. Les poissons expriment une protéine Ezh2 tronquée de 60 acides aminés. Cette protéine tronquée n'est composée d'aucun domaine conservé. Les poissons hétérozygotes mutants pour cette mutation sont viables et fertiles tandis que les homozygotes mutants meurent à 12 jpf mais ne présentent pas de phénotype macroscopique. Afin de comprendre la raison de la mort de ces larves j'ai réalisé plusieurs expériences. L'analyse du phénotype cranio-facial (coloration des muscles et des cartilages) n'a pas révélé d'anomalie de développement ni de mise en place de l'axe antéro-postérieur.

2.1 Expression au cours du développement.

Par hybridation *in situ*, nous avons mis en évidence que l'ARN maternel d'*ezh2* est exprimé chez les embryons au stade 2-4 cellules. Et par RT-PCR nous avons mis en évidence que la mère dépose principalement l'ARN maternel sauvage dans

les oeufs. A 24 hpf, l'expression d'*ezh2* chez les individus *ezh2^{+/+}* se trouve majoritairement dans la tête, les yeux et au niveau de la queue mais est absente chez les individus *ezh2^{-/-}*. A 96 hpf, *ezh2* est exprimé au niveau de l'intestin. Par RT-PCR nous avons mis en évidence que l'expression d'*ezh2* diminue au cours du développement ; l'expression est plus abondante à 3 jpf qu'à 9 jpf. La digestion du produit PCR par DdeI indique qu'à 3 jpf le transcrit mutant est présent ; il n'est pas totalement dégradé par le système NMD (Nonsense-Mediated Decay). Ainsi, l'ARN mutant est soumis en partie au mécanisme de dégradation des ARN non sens. Cela pourrait être dû au fait qu'il n'existe pas de jonction exon-exon qui permette de reconnaître cet ARN comme anormal (Brognia et al. 2009, Hug et al. 2016). L'expression de la protéine Ezh2 n'est pas détectée par immunofluorescence à 3 jpf. A partir de 9 jpf l'absence de la protéine Ezh2 cause une diminution de 70% de la marque H3K27me3. La mortalité des larves est associée à cette baisse. Lors des divisions cellulaires la marque H3K27me3 recrute le complexe PRC2 et permet le maintien de la marque épigénétique. Le recrutement du complexe PRC2 permet de maintenir la répression des gènes cibles. Si Ezh2 est absente alors cette marque est diluée au cours des divisions ; ce qui explique une légère baisse de H3K27me3 chez les individus *ezh2^{+/-}* et une forte baisse chez les *ezh2^{-/-}* (Hansen et al. 2008). La faible baisse de la marque H3K27me3 chez les larves *ezh2^{+/-}* n'est pas associée à la mort des larves ; alors qu'une plus forte baisse de l'abondance de la marque H3K27me3 est associée à la mort des larves *ezh2^{-/-}*. Il semble qu'il existe un seuil de perte de la marque H3K27me3 au delà duquel la perte de la marque est mortelle.

Perspectives. L'analyse de larves entières nous montre que la perte de H3K27me3 est globale dans toute la larve, cependant cette perte n'est pas totale. Il serait intéressant d'étudier l'abondance de la marque H3K27me3 dans des structures plus fines comme la base des plis de l'intestin ; de visualiser l'abondance de cette marque au niveau des zones contenant les cellules souches et tout au long de la villosité lors de la différenciation sur des coupes d'embryon et de larve. Par western blot il serait intéressant d'extraire les histones de façon tissu spécifique. Grâce à la dissection et

la micro-dissection (Picker et al. 2009, Burns et al. 2006), nous pourrions réaliser les extractions à partir des tissus disséqués et mettre en évidence l'abondance de la marque H3K27me3.

2.2 Expression dans les zones de prolifération.

Lors du développement on remarque que l'expression d'*ezh2* est forte aux zones de prolifération. A 72 hpf *ezh2* est exprimée au niveau des bourgeons des nageoires pectorales. Entre 24 hpf et 120 hpf *ezh2* est exprimée dans les zones de prolifération du cerveau. Ces zones de prolifération permettent la croissance du cerveau tout au long de la vie du poisson (Nguyen et al. 1999) et sont présentes au niveau du tectum optique (mésencéphale). Le tectum optique est composé de différentes couches cellulaires concentriques (figure 69). A l'extérieur, dans la région antérieure du cervebellum, se trouvent les progéniteurs à prolifération lente (jaune). Au centre se trouvent les progéniteurs à prolifération rapide (vert clair). Finalement à l'intérieur, les cellules sorties du cycle cellulaire qui se différencient (vert foncé) (figure 69). Le marquage de l'expression d'*ezh2* par hybridation *in situ* montre qu'*ezh2* est présent dans le tectum optique.

Perspectives. Afin de connaître la couche cellulaire dans laquelle *ezh2* est exprimée nous pourrions réaliser des expériences de double hybridation *in situ*, *ezh2/pcna*; *ezh2/nop56*. Recher et al. 2013, mettent en évidence que *pcna* est exprimée par toutes les cellules en prolifération alors que *nop56* est exprimée uniquement par les cellules progénitrices à faible prolifération. La mise en évidence de la colocalisation d'*ezh2* avec un de ces marqueurs permettrait de documenter le rôle d'*ezh2* dans le tectum optique.

La croissance dans le tectum est contrôlée par la voie Wnt et la famille des facteurs de transcription Tcf/Lef afin de réguler l'expression des gènes *zic1a* et *zic5* (Nyholm et al. 2007). Les cellules du tectum optique chez le medaka (juvéniles et adultes) expriment les marqueurs de cellules souches Sox2, Musashi1, Bmi1 et Oct4 (Alunni et al. 2010, Brombin et al. 2011). L'expression de cette voie de signalisa-

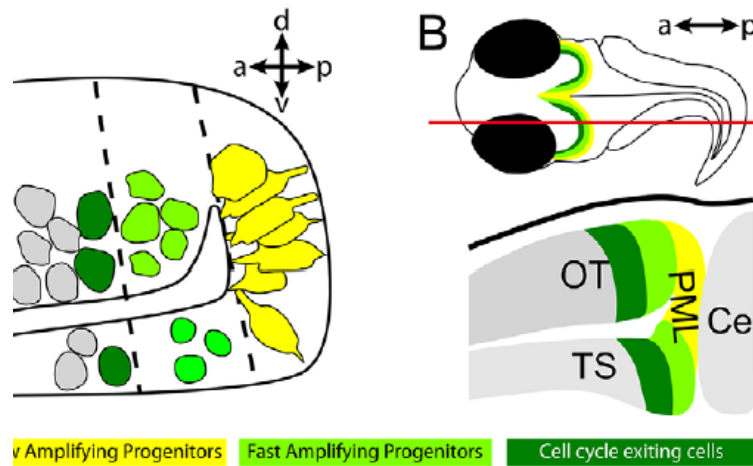


FIGURE 69: **Organisation cellulaire du tectum optique.** **A.** Représentation schématique des différentes couches cellulaires constituant le tectum optique contenu dans le mésencéphale. Les couches sont organisées de façon concentrique. La couche extérieure (jaune) est composée des cellules progénitrices à faible prolifération, au centre les cellules progénitrices à prolifération rapide (vert clair) et finalement à l'intérieur se trouve les cellules sorties du cycle cellulaire (vert foncé). **B.** Représentation schématique du dessus des couches concentriques. La ligne rouge indique le plan de coupe représenté dans la partie basse du schéma. OT : tectum optique, TS : Torus semicircularis (partie du mésencéphale), PML : couche périphérique du mésencéphale. Figure de Recher et al. 2013.

tion et de ces marqueurs de cellules souches pourrait également être étudiée pour documenter le rôle d'Ezh2 dans le renouvellement des cellules souches au niveau du cerveau.

2.3 Ezh2, rôle dans l'adipogénèse

La coloration des lipides à l'Oil Red O met en évidence au niveau du foie un changement de composition lipidique. Les larves *ezh2*^{-/-} présentent un foie plus rouge. Ce changement de couleur peut être associé à une stéatose du foie (présence de triglycérides dans les hépatocytes) (Campbell et al. 2005). La stéatose est accompagnée d'une dérégulation de l'expression génique notamment celle de ChREBP (Carbohydrate Response Element Binding Protein). Cette protéine est importante dans la synthèse des lipides dans le foie (Wang et al. 2010c). Chez le poisson zèbre Chreb est nommé Mlxip (Mlx interacting protein). Ce changement de composition lipidique

pourrait également être associé à l'apoptose (vu par le marquage TUNEL) induite par l'absence d'Ezh2.

Perspectives. Pour caractériser la présence des triglycérides, nous pourrions réaliser des coupes de foie et une coloration Oil-Red-O (Pan et al. 2015). Pour étudier la composition lipidique du foie nous pourrions, en collaboration, utiliser la spectrométrie de masse. Cette technique permet d'identifier les lipides présents sur des coupes qui peuvent être colorées à l'Oil-red-O par exemple. Ainsi, il serait possible de corréler des zones plus rouge et la composition lipidique associée (Gode et al. 2013, Arafah et al. 2014) Il serait intéressant d'observer l'expression du transcrit *mlxip* par hybridation *in situ* chez les larves à 9 jpf. Les protéines Mlxip, C/EBP α , SREBP1, PPAR γ sont sur-exprimées lors de la stéatose (Shieh et al. 2010). Nous pourrions étudier leur expression génique par hybridation *in situ* et l'expression protéique par immunofluorescence ou par Western blot après dissection des organes.

2.4 Ezh2, rôle dans le développement intestinal

De façon plus marquante, la coloration au Oil-Red-O m'a permis de mettre en évidence que la paroi intestinale est beaucoup plus fine chez les mutants *ezh2*^{-/-} dès 9 jpf. Dans le but de savoir si cette paroi plus fine est le résultat d'une anomalie du développement ou d'une absence de maintien des tissus, j'ai réalisé une coloration hématoxyline-éosine sur des coupes de larves à 5 jpf et 9 jpf. Ce marquage révèle que la paroi intestinale est correctement mise en place à 5 jpf et ce dans les 3 parties de l'intestin (intestin antérieur, bulbe intestinal et intestin postérieur). Cette expérience confirme également les résultats obtenus avec l'Oil Red O : la paroi intestinale est plus fine chez les mutants *ezh2*^{-/-} mais plus particulièrement au niveau du bulbe intestinal. L'intestin antérieur et postérieur ne présentent pas le même défaut. Ces coupes histologiques montrent aussi que les plis sont absents. En effet le bulbe intestinal chez les mutants *ezh2*^{-/-} semble composé d'une seule couche cellulaire. Ces observations sont confirmées par les immunomarquages de l'actine et de la phalloïdine sur coupe, les plis formés par les filaments d'actine sont absents. En

effet, chez les mutants, l'actine forme une couche plus fine autour du noyau alors que chez les sauvages l'actine forme la structure des plis. Le marquage TUNEL montre que les tissus du système digestif sont apoptotiques chez les mutants en comparaison aux sauvages où l'on détecte très peu de cellules apoptotiques.

La perte de plis au niveau du bulbe intestinal pourrait être la conséquence d'une absence de renouvellement des cellules souches dans la partie basale du pli (analogue des cryptes de Lieberkühn). Chez l'Homme, EZH2 interagit avec la β CATENINE, provoque son accumulation nucléaire et active la voie WNT *in vitro* et *in vivo* (figure 70).

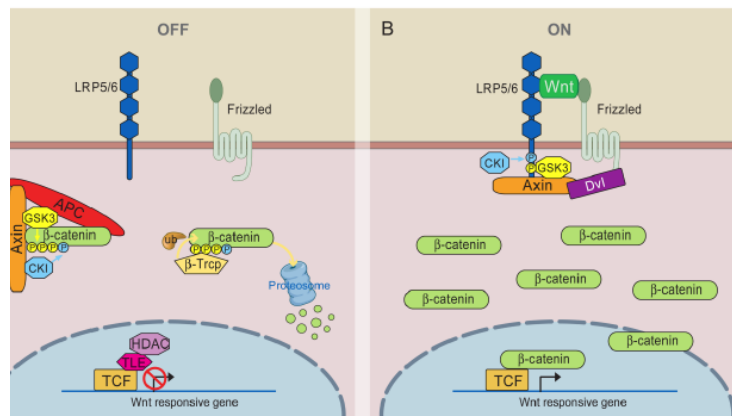


FIGURE 70: **La voie WNT.** **A.** En l'absence de WNT, la β CATENINE se trouve dans le cytoplasme et est associée à AXIN, APC, GSK3 et CK1. CK1 phosphoryle la β CATENINE (en bleu) puis elle est phosphorylée par GSK3 (en jaune). Lorsqu'elle est phosphorylée, elle est reconnue par β -TRCP (une E3 ubiquitine ligase) et dégradée par le protéasome. Les gènes cibles sont réprimés par le facteur de transcription TCF associé aux HDAC. **B.** Lorsque WNT est exprimée, un complexe est formé par les récepteurs Frizzled et LRP5/6, qui recrute l'AXIN, ce qui permet d'accumuler la β CATENINE dans le noyau et l'expression des gènes cibles en association avec le facteur de transcription TCF. Figure de MacDonald et al. 2009.

L'activation de la voie WNT favorise la prolifération cellulaire. EZH2 associée à la β CATENINE se lie aux promoteurs de la CYCLINE D1 et c-MYC, recrute les facteurs de transcription TCF/LEF pour activer la transcription (Li et al. 2009, Shi et al. 2007).

L'activation de la WNT par EZH2 est retrouvée dans les cancers. EZH2 peut activer la voie WNT dans les cancers colorectaux et maintient ainsi le caractère souche

des cellules (Chen et al. 2016a). Ezh2 est exprimée uniquement dans les cryptes de l'intestin et du colon chez la souris. **Ezh2, indépendamment de sa fonction d'histone méthyltransférase, s'associe à la β Caténine pour activer ses gènes cibles.** Cette association est améliorée en présence de PAF (PCNA-Associated Factor, impliquée dans la réparation de l'ADN) (Jung et al. 2013).

La voie Wnt est impliquée dans le développement du tube intestinal chez le poulet et est importante dans la balance prolifération/ différenciation des cellules via la régulation d'expression de facteurs de croissance. Chez le poulet les facteurs de transcriptions Tcf4 et Lef1 ont une expression particulière dans le tube digestif. Tcf4 est exprimé spécifiquement au niveau du mésoderme du gésier postérieur et Lef1 au niveau du duodénum et du mésoderme du gros intestin. Une dérégulation de ces facteurs de croissance cause une absence de formation des microvillosités au niveau du gésier (Tcf4) et une sténose de la lumière du gros intestin (Lef1). Chez la souris Tcf4 est exprimé d'abord au niveau de l'épithélium de l'intestin moyen puis son expression est restreinte aux cryptes. Cette restriction d'expression pourrait expliquer la perte importante des plis spécifiquement au niveau du bulbe intestinal due à un déséquilibre de la balance prolifération/ différenciation (Theodosiou et al. 2003).

Ezh2 pourrait activer la voie Wnt qui contrôle par la suite l'expression de facteur de transcription tissu spécifique et contrôle la balance prolifération/ différenciation des cellules intestinales de façon spécifique selon les différentes parties de l'intestin. Ainsi, dans le bulbe intestinal du poisson zèbre, Ezh2 pourrait réguler la voie Wnt et contrôler l'expression d'un facteur de transcription important pour le maintien de la prolifération des cellules souches du bulbe. L'absence de son expression cause la perte de renouvellement du tissu.

En effet, Fevr et al. 2007, montrent que la voie Wnt est impliquée dans l'homéostasie de l'intestin. La voie Wnt contrôle la balance prolifération/ différenciation, le cycle cellulaire, la migration et la mort cellulaire. La dérégulation de la voie Wnt est associée au développement de cancers colorectaux. L'inhibition de la β Caténine entraîne la différenciation des cellules de l'intestin, l'absence de crypte et une perte de

la fonction intestinale. L'expression de la β Caténine et de Wnt sont indispensables pour maintenir le caractère souche des cellules, la prolifération et l'expansion des cryptes. Chez les mammifères, Wnt contrôle la différenciation des cellules souches de la crypte vers la lumière (figure 71)

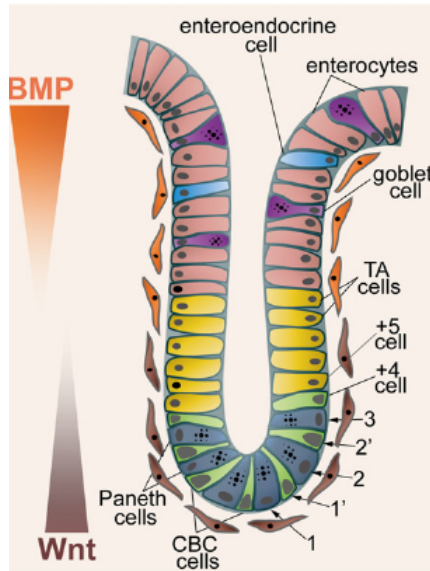


FIGURE 71: **Architecture de la crypte intestinale chez les mammifères.** Les cellules souches de la base de la crypte (CBC) vont se différencier vers la lumière de l'intestin selon le gradient d'expression de WNT. Plus l'expression est forte plus le caractère souche est conservé. La faible expression de WNT et l'expression de BMP permettent la différenciation cellulaire. Figure de Krausova et al. 2014.

Dans le but de compléter l'étude du phénotype intestinal, j'ai réalisé une hybridation *in situ* ciblant l'ARNm de *phox2bb*. Ce gène est exprimé spécifiquement dans le système nerveux entérique qui permet les contractions nécessaires à la digestion (Olden et al. 2008). Le génotypage révèle que l'inactivation d'*ezh2* n'entraîne pas de changement de son expression au niveau intestinal. Cependant, nous avons noté que lorsque *ezh2* est inactivé, *phox2bb* est exprimé au niveau de l'oeil alors qu'il ne l'est pas chez les sauvages. Ainsi, nous avons pu identifier un gène réprimé par *Ezh2* dans l'oeil. Ce gène est régulé par *Ezh2* dans une petite population cellulaire présente parmi une ou plusieurs des couches composant la rétine (cellules ganglionnaires, pléxiforme interne, pléxiforme externe, photo-récepteur et cellules amacrines et bipolaires). En effet, par hybridation *in situ* par fluorescence nous avons mis en évidence qu'*ezh2* est exprimé au niveau de ces couches de la rétine. Ce résultat

montre la spécificité de la régulation génique par Ezh2 et la difficulté à identifier des gènes cibles dérégulés dans l'organisme entier.

Perspectives.

Différenciation cellulaire et apoptose. L'intégrité du tissu intestinal n'est pas maintenue chez les larves *ezh2*^{-/-}. Cela pourrait être dû à une différenciation cellulaire trop importante des cellules souches nécessaires au renouvellement des cryptes puis à leur entrée en apoptose (processus physiologique après différenciation). Cela pourrait être causé par la mort cellulaire induite par la perte d'Ezh2. En effet, Chiacchiera et al. 2016, mettent en évidence le rôle d'Ezh2 dans la balance cellules sécrétrices/ cellules absorbantes. Ezh2 joue un rôle dans le maintien des cellules souches après irradiation via l'inhibition de Cdkn2a et dans le maintien de la prolifération des cellules progénitrices. Pour répondre à ces hypothèses, plusieurs expériences pourraient être conduites.

Tout d'abord, nous pourrions étudier l'expression des marqueurs de différenciation des différents types cellulaires composant l'intestin. Par hybridation *in situ* nous pouvons étudier l'expression de *arg2* (marqueur de cellules caliciformes), *nkx2.2a* (cellules entéro-endocrines), *fabp10a*, *pept1* (entérocytes), *4E8* (cellules absorbantes) et *5F11* (membrane basale) chez les larves entre 9 jpf et 12 jpf (Crosnier et al. 2005). Une coloration au bleu alcian permettrait d'étudier la production de mucus par les cellules caliciformes (sialomucines et sulphomucines) (Chen et al. 2009). Puis nous pourrions étudier l'expression des marqueurs de différenciation des muscles et des neurones au niveau de l'intestin comme *desmin* (muscles lisses) et *nos1* (système nerveux entérique) (Olden et al. 2008).

Dans le but d'étudier la prolifération cellulaire et les cellules souches présentes à la base des plis, nous pourrions réaliser un immunomarquage sur coupe de H3S10P, de P21 et de la CyclineG1. En effet, les protéines P21 et CyclineG1 sont impliquées dans la régulation négative de la prolifération cellulaire de l'intestin, du foie et du pancréas exocrine. Il serait intéressant de connaître l'expression de ces protéines dans notre modèle. Des hybridations *in situ* permettraient de visualiser l'expression

des marqueurs de cellules souches : Oct4, Sox2 et Nanog (Jiang et al. 2008, Chen et al. 2005).

Par la suite, pour étudier le rôle de l'apoptose dans la perte des structures intestinales il serait intéressant de regarder l'expression des récepteurs de la famille *tnfrsf*. Le récepteur TNFRSF10B est régulé par l'ajout de la marque H3K27me3. Son expression cause l'entrée des cellules en apoptose (Benoit et al. 2013). L'absence de régulation par Ezh2 pourrait être impliquée dans une expression anormale de ces récepteurs et l'entrée aberrante en apoptose. D'autres études montrent le rôle anti-apoptotique d'Ezh2 via la répression du miR-31 (Zhang et al. 2014) et favorise l'hypothèse de l'apoptose induite suite à l'absence de répression du miR-31 par Ezh2.

L'absence de maintien du tissu intestinal pourrait aussi être la conséquence d'un changement de forme des entérocytes. Pour examiner cette hypothèse nous pourrions faire un immunomarquage de la E-cadhérine (polarité cellulaire), de Lgl2 (domaine baso-latéral) et de Zo1 (jonctions serrées). En effet, les mutants *goosepimples/myosin Vb* ont une réduction des plis intestinaux corrélée à un changement de forme des entérocytes (Sidhaye et al. 2016).

La voie Wnt. Il serait important d'étudier le rôle de la voie Wnt dans l'absence de maintien du tissu intestinal. L'expression de Wnt et de la β Caténine peut être observée par immunomarquage. Effectivement, l'activation de la voie Wnt est responsable de la formation des tumeurs colorectales (Haramis et al. 2006). Elle est impliquée dans la prolifération des cellules du colon (Gregorieff et al. 2005). La voie Wnt est régulée de façon tissu spécifique via le facteur de transcription Lbx2 qui promeut la transcription des gènes cibles chez l'embryon au moment de la gastrulation (Lu et al. 2014). Le facteur Tcf4 est impliqué dans la transcription des gènes cibles de la voie Wnt (maintien des cellules souches de la crypte intestinale) (Korinek et al. 1998).

Cibles d'Ezh2. San et al. 2016, mettent en place un modèle d'inactivation d'*ezh2* (*MZezh2*) dans la lignée germinale (paternelle et maternelle). Ils montrent l'absence de la marque H3K27me3 chez ces mutants à 24 hpf. Chez ce mutant, les

programmes géniques sont dérégulés : 654 gènes sont sur-exprimés et 627 gènes sont sous-exprimés à 0 hpf. Les gènes sur-exprimés sont associés au développement. La surexpression est directement liée à l'absence Ezh2/H3K27me3 mais la sous-expression provient d'un mécanisme indirect. Cette analyse à grande échelle sur embryons entiers n'a pas permis de mettre en évidence des gènes cibles spécifiques des différents tissus. Nous avons identifié *phox2bb* comme cible d'Ezh2 au niveau de l'oeil par hybridation *in situ*. Cette régulation est tissu spécifique. Une analyse à grande échelle ne nous aurait pas permis de visualiser ce changement d'expression. Les micro-dissections pourraient également permettre de réaliser du chip-seq en collaboration, de façon organe ou tissu spécifique. Les micro-dissections permettent de dissocier de très petits tissus comme l'épithélium pigmenté de la rétine (Zhang et al. 2010b).

Chez l'adulte. Finalement, pour compléter les informations collectées à la fin de ces expériences, il serait intéressant de documenter l'expression d'Ezh2 dans les différentes parties de l'intestin chez le poisson zèbre adulte sauvage. De plus, un mutant inductible (induction par le tamoxifen) pourrait être mis en place afin d'inactiver Ezh2 spécifiquement au niveau de l'intestin chez les adultes et d'étudier l'impact de son absence sur le renouvellement intestinal.

2.4.1 Maintien des tissus.

L'oeil. L'identification de la dérégulation de l'expression de *phox2bb* par hybridation *in situ* nous a amené à étudier la morphologie de l'oeil. La coloration hématoxyline et éosine des yeux chez les sauvages et mutants à 9 jpf ne nous a pas permis d'identifier d'anomalie du développement. De plus, il n'y a pas de différence de taille des yeux entre les sauvages et les mutants à 4 jpf.

Le pancréas. L'inactivation d'*ezh2* cause une anomalie de développement du tube digestif. Nous nous sommes intéressés au développement des autres organes digestifs comme le pancréas. Le marquage de l'insuline et du glucagon à 5 jpf montre

qu'il n'y a pas d'anomalie de développement et de maintien du pancréas endocrine en l'absence d'*ezh2*. Cependant, il y a un défaut de maintien du tissu du pancréas exocrine. En effet, à 3 jpf il n'y a pas de différence entre les embryons sauvages et les mutants mais à 5 jpf le pancréas exocrine est plus petit chez le mutant que chez le sauvage. La quantification du signal nous a permis de mettre en évidence que cette différence est significative. *Ezh2* est impliquée dans le maintien du pancréas exocrine dès 5 jpf.

Le gène *def* (digestive-organ expansion factor) est un facteur spécifique de l'endoderme. Son inactivation cause l'arrêt du cycle cellulaire mais pas l'apoptose (pas de marquage TUNEL). Les embryons se développent normalement jusqu'à 2 jpf, ce qui suggère que *def* n'a pas de rôle dans l'initiation et le développement des organes digestifs. Cependant à 3 jpf, les organes deviennent hypoplasiques. Certains organes sont moins développés chez les sauvages comme l'intestin, le foie, la vesicule biliaire, le pancréas et la vessie natatoire alors que d'autres organes issus du mésoderme ne sont pas atteints (somites, vaisseaux sanguins). Comme chez notre mutant *ezh2*, le mutant *def* a un pancréas exocrine plus petit alors que le pancréas endocrine est identique à celui du sauvage. Les auteurs concluent que *def* est requis pour la croissance du pancréas exocrine mais pas celle du pancréas endocrine. L'hybridation *in situ* de *def* sur coupe montre que celui-ci est exprimé dans le tube digestif et le pancréas exocrine mais pas dans le pancréas endocrine (Chen et al. 2005). Les cellules pancréatiques endocrines et exocrines proviennent des progéniteurs exprimant *pdx1*. Jiang et al. 2008, identifient *exdpf* (exocrine differentiation and proliferation factor) comme marqueur exprimé fortement dans les progéniteurs des cellules exocrines ainsi que dans les cellules différenciées lors du développement. L'inactivation de ce gène cause un arrêt du cycle cellulaire des cellules du pancréas exocrine mais n'affecte pas le pancréas endocrine.

Perspectives. Il serait intéressant de réaliser une hybridation *in situ* d'*ezh2* sur coupe afin d'observer son expression dans les différents organes de façon plus précise que sur embryons entiers. Il serait important de visualiser l'expression de *exdpf* par

hybridation *in situ* et d'observer si son expression est atteinte lors de l'absence d'Ezh2. La voie Wnt est active lors de la croissance du poisson zèbre. Cette voie pourrait contrôler la taille des organes et coordonner la croissance. Il serait utile d'observer l'expression des acteurs de cette voie (Wnt, β Caténine, Tcf, Lef) par hybridation *in situ* ou immunomarquage. Nous pourrions aussi analyser le phénotype des larves traitées avec des inhibiteurs de cette voie comme XAV939 et IWR1, qui causent une baisse d'expression de la β Caténine et de Lef (Shimizu et al. 2012).

2.5 La régénération

Nos résultats mettent en évidence l'expression d'Ezh2 dans la régénération de la nageoire caudale chez l'adulte et son rôle chez la larve. Par hybridation *in situ* j'ai montré qu'Ezh2 est exprimée chez l'adulte 4 jpa et chez la larve 2 jpa. L'inhibition d'Ezh2 par le GSK126 chez la larve cause une régénération anormale. En effet, la cicatrisation a lieu au niveau des tissus mous qui ont régénéré en partie mais la chorde ne semble pas régénérée. Le même résultat est obtenu lorsque la nageoire caudale est amputée chez les mutants *ezh2*^{-/-}. L'amputation uniquement du tissu mou de la nageoire caudale régénère correctement en l'absence d'Ezh2.

Chez le poisson zèbre, la régénération est accompagnée de la re-expression des gènes normalement réprimés au cours du développement (Stewart et al. 2009). Ainsi, l'absence d'Ezh2 doit causer l'incapacité des cellules à modifier leur programme d'expression génique. En effet, les gènes impliqués dans la régénération possèdent au niveau de leur promoteur la présence de marques bivalentes (H3K27me3 et H3K4me3). De plus, l'expression de Jmjd3 est importante lors de la régénération. Ces résultats confirment l'importance de la modulation de H3K27me3 dans ce processus (Katsuyama et al. 2011). Le rôle de l'orthologue d'Ezh2 chez le criquet, E(z), a été mis en évidence dans la régénération de la patte. Son inhibition cause la formation d'un segment supplémentaire. Le contrôle de la marque H3K27me3 est donc crucial lors du processus de régénération (Hamada et al. 2015).

Perspectives. Pour comprendre le rôle d'Ezh2 dans le processus de régénération de la nageoire caudale il serait intéressant d'observer si l'inhibition d'Ezh2 par le GSK126 chez l'adulte cause une absence de régénération. Ensuite nous pourrions observer l'expression par immunomarquage de la marque H3K27me3 sur des coupes de nageoire en régénération chez l'adulte et chez l'embryon sauvages. De cette façon il serait possible d'identifier les populations cellulaires où la marque est ajoutée ou réduite. Finalement, il serait important de mettre en lien la localisation de la marque H3K27me3 et celle d'Ezh2.

2.6 Rôle des ARN maternels.

La mutation d'*Ezh2* à l'état homozygote chez la souris cause la mort des embryons avant la gastrulation (O'Carroll et al. 2001). Cependant, l'inactivation d'*ezh2* chez le poisson n'est mortelle qu'à 12 jpf alors que tous les organes ont correctement été mis en place à 5 jpf. Chez le poisson zèbre, les ARN maternels sont dégradés plus tard que chez la souris et peuvent protéger l'embryon lors des premiers stades de développement (figure 72) (Tadros et al. 2009).

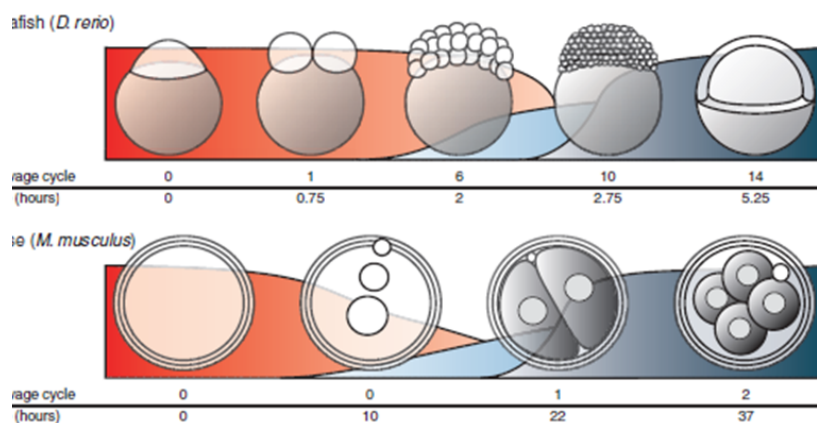


FIGURE 72: **Activation du génome zygotique chez le poisson zèbre et la souris.** Comparaison de l'activation du génome zygotique (ZGA) chez la souris et le poisson zèbre. Les divisions cellulaires sont représentées pour chaque espèce selon l'axe temporel après fécondation. La courbe rouge représente la dégradation des ARN maternels. Les courbes bleues claire et bleues foncé représentent les vagues d'activation du génome zygotique selon des clusters géniques. Figure adaptée de Tadros et al. 2009.

De plus, nous avons montré que la mère dépose l'ARNm *ezh2* sauvage. Afin de savoir si cet ARN maternel protège les embryons d'un phénotype plus précoce nous avons décidé d'inhiber la protéine Ezh2 grâce au GSK126. Le GSK126 est 1000 fois plus spécifique d'EZH2 que d'autres histones méthyltransférases et 150 fois plus spécifique d'EZH2 que d'EZH1 (McCabe et al. 2012). Nous avons choisi d'inhiber les embryons au stade 2 cellules et avant 3 hpf (avant la gastrulation). Après avoir testé des concentrations comprises entre $0,25\mu\text{M}$ à $5\mu\text{M}$ nous avons choisi la concentration de $1\mu\text{M}$ qui permet d'avoir le taux le plus élevé de malformations et une moindre mortalité des embryons. L'utilisation de $1\mu\text{M}$ de GSK126 cause la mort des embryons (23,9% à 24 hpf et 33,4% à 96 hpf) et des anomalies du développement en comparaison au contrôle DMSO. Ces anomalies sont : un retard de développement marqué à 24 hpf, des oedèmes cardiaques, un retard de développement des nageoires caudales et des yeux plus petits à 96 hpf. Ainsi le phénotype observé est différent de celui de notre mutant et les larves survivent au moins jusqu'à 4 jpf en l'absence d'Ezh2 maternel. Ce phénotype est associé à une baisse de la marque H3K27me3 chez les larves à 96 hpf.

Lorsque les embryons sont traités au stade 2 cellules, nous n'observons pas d'augmentation de la mortalité ni de phénotype plus marqué. Ainsi, les embryons peuvent se développer lorsque la protéine Ezh2 issue des ARN maternels est inhibée très tôt dans le développement. Le phénotype que nous observons chez notre mutant est en partie amoindrie par la présence des ARN maternels (pas de retard de développement, oedème cardiaque), mais les embryons de poisson zèbre peuvent se développer en l'absence d'Ezh2 fonctionnel.

Cette absence de phénotype suite à l'inhibition d'Ezh2 pourrait être due au fait qu'avant la ZGA il existe un pré-modelage de la chromatine via l'ajout de H3K27me3 au niveau des gènes impliqués dans le développement, comme les gènes *hox*. Elles sont certainement dictées par la position des marques épigénétiques des gamètes (Lindeman et al. 2011, Wu et al. 2011). L'information portée par la mère et le père est importante pour le développement (Harvey et al. 2013). Cependant, les embryons obtenus d'un croisement de mâle et femelle dont la lignée germinale est homozygote

mutante sont viables jusqu'à 2 jpf (San et al. 2016).

2.7 Compensation par Ezh1

Nous avons mis en évidence que les embryons de poisson zèbre, contrairement à ceux de la souris se développent en l'absence d'Ezh2 et que la marque H3K27me3 n'est pas totalement abolie en l'absence d'Ezh2. Ce phénotype pourrait être atténué par l'expression d'Ezh1. En effet Ezh1 tout comme Ezh2 peut catalyser la marque H3K27me3 pour réprimer l'expression génique. La présence d'Ezh1 peut également expliquer la présence de la marque H3K27me3 résiduelle chez les mutants à 10 jpf. Dans l'objectif d'étudier la compensation possible d'Ezh2 par Ezh1, j'ai utilisé l'UNC1999 qui inhibe ces deux protéines. Nous avons utilisé cet inhibiteur à une concentration de 5 μ M et traité les embryons avant 3 hpf (avant la gastrulation). La mortalité n'est pas plus importante lorsque les deux protéines sont inhibées (29,6% de mort à 96 hpf), les larves qui survivent présentent un phénotype différent de celui associé à l'inhibition d'Ezh2 seule. A 24 hpf, les embryons présentent un retard de développement et à 96 hpf les larves ont des oedèmes cardiaques et sont moins pigmentés. L'abondance de la marque H3K27me3 est atténuée de façon plus drastique avec l'UNC1999 (en comparaison au GSK126), il y a une baisse de 70% de la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3.

Perspectives. Au laboratoire nous avons également inactivé le gène *ezh1* grâce aux TALEN. Les homozygotes mutants sont viables, fertiles et ne présentent pas de phénotype macroscopique. Cette lignée sera croisée avec la lignée hétérozygote mutante *ezh2* afin d'étudier l'impact de l'absence de ces deux protéines lors du développement.

2.8 Perspectives à long terme.

Mise en place de la marque H3K27me3 lors du développement embryonnaire. Ainsi, la mortalité associée à l'inactivation d'Ezh2 chez le poisson zèbre

arrive tardivement en comparaison à celle observée chez la souris (au moment de la gastrulation). En comparaison au modèle murin, le poisson zèbre nous a permis de mettre en évidence le rôle d'Ezh2 dans le maintien des tissus (intestin, pancréas) et son rôle dans la régénération de la nageoire caudale. Cependant, le résultat est étonnant car tous les tissus se mettent correctement en place chez le poisson zèbre en l'absence d'Ezh2. De plus, la mise en place des tissus a lieu également en l'absence d'ARN maternel *ezh2*, comme l'ont montré San et al. 2016. Cela pourrait signifier qu'il existe une mise en place des marques épigénétiques nécessaires au contrôle de l'expression génique, indépendante d'Ezh2 ou compensée en cas d'absence, lors du développement.

Il serait donc intéressant d'étudier plus en détail la mise en place de la marque H3K27me3 lors du développement.

Chez les bovins, l'expression des protéines Polycomb est très forte au stade blastocyste. EZH2 est exprimée très tôt dans le développement, c'est la présence de EED et SUZ12 dans le noyau qui va réguler la catalyse de H3K27me3. L'expression d'EZH2 est très forte avant la fécondation puis est quasi absente au stade 8 cellules. Cette baisse d'expression est associée à la baisse de l'abondance de la marque H3K27me3. Son expression forte est retrouvée au stade blastocyste (Ross et al. 2008). Chez les anamniotes, dont font partie les poissons, il y a une longue période durant le développement où les cellules se divisent en absence de transcription. Chez le poisson zèbre il n'y a pas de transcription durant les 3 premières heures du développement. L'activation du génome zygotique (ZGA) débute au moment de la mi-blastula. Il y a une régulation de l'expression permise par la mise en place de marques provenant des génomes parentaux, des ARN et protéines stockés dans le cytoplasme de l'oeuf. Lors de l'activation du génome zygotique, il y a un remodelage des marques épigénétiques. Les enzymes impliquées dans la catalyse des modifications épigénétiques (dont Ezh2) sont requises ; Aanes et al. 2011 montrent l'importance de leur expression très tôt dans le développement. Lors de la ZGA il y a une forte augmentation du nombre de régions génomiques portant les marques H3K27me3 et H3K4me3. L'abondance de la marque H3K9me3 n'augmente qu'après la ZGA. Après la ZGA le

contrôle de l'expression par les marques épigénétiques se complexifie. Les marques épigénétiques présentes de façon antérieure à la ZGA peuvent provenir des gamètes. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. Les marques épigénétiques sont dictées par celles présentes dans les gamètes ou synthétisées *de novo*. En effet, certains gènes avant la ZGA possèdent les mêmes marques que celles trouvées dans le sperme. Les gènes du sperme portant les marques activatrices de la transcription sont transcrits activement à la ZGA (Wu et al. 2011). Ce système constituerait un mécanisme de transmission des marques au cours des générations. Mais certains gènes marqués dans le sperme ne le sont pas avant la ZGA. Il se peut que la méthylation au moment de la ZGA soit issue d'un marquage épigénétique *de novo* après fécondation (Andersen et al. 2013). Chez le xénope, la marque H3K27me3 est retrouvée au niveau de séquences non méthylées conservées avec l'Homme et le poisson. Ce résultat tend en faveur d'une méthylation des histones *de novo* contrôlée ici par la méthylation de l'ADN (van Heeringen et al. 2014). La méthylation des histones est également *de novo* chez le bovin (Bogliotti et al. 2012). Chez le porc la ZGA a lieu au stade 4 cellules. Gao et al. 2010, mettent en évidence la baisse de la marque H3K27me3 et H3K4me3 entre les stades 1 à 4 cellules. L'abondance de la marque H3K4me3 est retrouvée au stade morula alors que la marque H3K27me3 est retrouvée au stade blastocyste. Leur hypothèse est que la marque H3K4me3 joue un rôle dans l'activation de la transcription tôt dans le développement puis l'expression est régulée afin de déterminer le devenir cellulaire par l'apposition de la marque H3K27me3. Liu et al. 2016, confirment dans le modèle murin que la marque H3K4me3 est rétablie beaucoup plus rapidement que la marque H3K27me3. Serait-il donc possible que l'absence de la marque H3K27me3 ne soit pas indispensable très précocément ? L'absence de la marque H3K27me3 peut-elle être compensée par une autre marque épigénétique jusqu'à un certain seuil de mise en place des tissus qui permettrait aux larves de se développer jusqu'à 12 jpf ?

Etude du rôle d'Ezh2 dans la cancérogénèse. Le rôle d'EZH2 dans la tumorigénèse a été largement mis en évidence (Völkel et al. 2015). Pour comprendre

le rôle d'EZH2 lors du développement cancéreux, nous souhaiterions utiliser le modèle du poisson zèbre. Le miR let-7 réprime EZH2 dans le cancer de la prostate (Kong et al. 2012). Pour approfondir le rôle de ce micro-ARN dans la régulation d'Ezh2, le site de liaison de let-7 pourra être muté grâce aux TALEN. Ce modèle permettra de mettre en place une sur-expression d'Ezh2 proche de la physiologie des cellules cancéreuses. EZH2 est réprimée dans le cancer de la prostate mais peut être, dans d'autres cancers, sur-exprimée suite à des mutations faux-sens. C'est le cas de la mutation de la tyrosine 641. Pour mimer cette surexpression biologique, les TALEN peuvent être utilisés pour muter la tyrosine 655 (analogue à la tyrosine 641 chez l'Homme) en asparagine (Morin et al. 2010). Cette mutation devrait causer chez le poisson une augmentation de la marque H3K27me3 et pourrait être liée au développement de cancers.

2.9 Conclusion générale

En conclusion mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence pour la première fois le rôle de la protéine Pcgf1 chez un modèle vertébré. L'inactivation de la protéine a montré que Pcgf1 joue un rôle dans le développement précoce, elle contrôle le cycle cellulaire. Son absence cause un retard de développement. Chez les adultes, l'inactivation de *pcgf1* cause un vieillissement précoce et semble impliquée dans le recrutement des cellules souches nécessaires au renouvellement des tissus. Ce modèle souligne que la protéine Pcgf1 n'est pas indispensable au développement du poisson zèbre, elle pourrait être compensée par une autre protéine Pcgf.

L'inactivation de la protéine Ezh2 chez la souris a mis en évidence son importance dans le développement mais n'a pas permis de comprendre la cause de la mort des embryons. Pour comprendre le rôle d'Ezh2 dans le développement embryonnaire, nous avons inactivée celle-ci chez le poisson zèbre. A la différence du mutant chez la souris, les embryons de poisson zèbre peuvent se développer normalement. Les larves meurent à 12 jpf mais l'organogénèse est correcte en l'absence d'Ezh2. Ce modèle nous a permis de démontrer le rôle de la protéine Ezh2 dans le maintien des tissus

(intestin, pancréas exocrine). Nous avons également mis en évidence son rôle dans la régénération de la nageoire caudale chez la larve et révélé le rôle d'Ezh2 dans la régulation de l'expression de *phox2bb* dans l'oeil.

Bibliographie

- Aanes, Håvard et al. (2011). « Zebrafish mRNA sequencing deciphers novelties in transcriptome dynamics during maternal to zygotic transition ». *Genome Res.* 21.8, p. 1328–1338. DOI : 10.1101/gr.116012.110.
- Abbas, Leila et Tanya T. Whitfield (2009). « Nkcc1 (Slc12a2) is required for the regulation of endolymph volume in the otic vesicle and swim bladder volume in the zebrafish larva ». *Development* 136.16, p. 2837–2848. DOI : 10.1242/dev.034215.
- Abdelilah, S. et al. (1996). « Mutations affecting neural survival in the zebrafish *Danio rerio* ». *Development* 123, p. 217–227.
- Abdouh, Mohamed, Roy Hanna, Jida El Hajjar, Anthony Flamier et Gilbert Bernier (2016). « The Polycomb Repressive Complex 1 Protein BMI1 Is Required for Constitutive Heterochromatin Formation and Silencing in Mammalian Somatic Cells ». *J. Biol. Chem.* 291.1, p. 182–197. DOI : 10.1074/jbc.M115.662403.
- Akasaka, T., M. van Lohuizen, N. van der Lugt, Y. Mizutani-Koseki, M. Kanno, M. Taniguchi, M. Vidal, M. Alkema, A. Berns et H. Koseki (2001). « Mice doubly deficient for the Polycomb Group genes *Mel18* and *Bmi1* reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression ». *Development* 128.9, p. 1587–1597.
- Alunni, Alessandro, Jean-Michel Hermel, Aurélie Heuzé, Franck Bourrat, Françoise Jamen et Jean-Stéphane Joly (2010). « Evidence for neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones ». *Dev. Neurobiol.* 70.10, p. 693–713. DOI : 10.1002/dneu.20799.
- Amores, A. et al. (1998). « Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution ». *Science* 282.5394, p. 1711–1714.

- An, Min et Paul D. Henion (2012). « The zebrafish sf3b1b460 mutant reveals differential requirements for the sf3b1 pre-mRNA processing gene during neural crest development ». *Int. J. Dev. Biol.* 56.4, p. 223–237. DOI : 10.1387/ijdb.113383ma.
- Andersen, Ingrid S., Leif C. Lindeman, Andrew H. Reiner, Olga Østrup, Håvard Aanes, Peter Aleström et Philippe Collas (2013). « Epigenetic marking of the zebrafish developmental program ». *Curr. Top. Biol.* 104, p. 85–112. DOI : 10.1016/B978-0-12-416027-9.00003-6.
- Andreeva, Viktoria, Michelle H. Connolly, Caitlin Stewart-Swift, Daniel Fraher, Jeffrey Burt, Justin Cardarelli et Pamela C. Yelick (2011). « Identification of adult mineralized tissue zebrafish mutants ». *Genesis* 49.4, p. 360–366. DOI : 10.1002/dvg.20712.
- André, M., S. Ando, C. Ballagny, M. Durliat, G. Poupard, C. Briancçon et P. J. Babin (2000). « Intestinal fatty acid binding protein gene expression reveals the cephalocaudal patterning during zebrafish gut morphogenesis ». *Int. J. Dev. Biol.* 44.2, p. 249–252.
- Arafah, Karim, Rémi Longuespée, Annie Desmons, Olivier Kerdraon, Isabelle Fournier et Michel Salzet (2014). « Lipidomics for clinical diagnosis: Dye-Assisted Laser Desorption/Ionization (DALDI) method for lipids detection in MALDI mass spectrometry imaging ». *OMICs* 18.8, p. 487–498. DOI : 10.1089/omi.2013.0175.
- Arnaout, Rima, Tania Ferrer, Jan Huisken, Kenneth Spitzer, Didier Y. R. Stainier, Martin Tristani-Firouzi et Neil C. Chi (2007). « Zebrafish model for human long QT syndrome ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104.27, p. 11316–11321. DOI : 10.1073/pnas.0702724104.
- Arnold, Phil, Anne Schöler, Mikhail Pachkov, Piotr J. Balwierz, Helle Jørgensen, Michael B. Stadler, Erik van Nimwegen et Dirk Schübeler (2013). « Modeling of epigenome dynamics identifies transcription factors that mediate Polycomb targeting ». *Genome Res.* 23.1, p. 60–73. DOI : 10.1101/gr.142661.112.
- Arrigoni, Rachele, Steven L. Alam, Joseph A. Wamstad, Vivian J. Bardwell, Wesley I. Sundquist et Nicole Schreiber-Agus (2006). « The Polycomb-associated protein Rybp is a ubiquitin binding protein ». *FEBS Lett.* 580.26, p. 6233–6241. DOI : 10.1016/j.febslet.2006.10.027.
- Balasubramanian, Sivaprakasam, Yap Ching Chew et Richard L. Eckert (2011). « Sulforaphane Suppresses Polycomb Group Protein Level via a Proteasome-Dependent

- Mechanism in Skin Cancer Cells ». *Mol. Pharmacol.* 80.5, p. 870–878. DOI : 10.1124/mol.111.072363.
- Bao, Bin et al. (2012). « Curcumin Analogue CDF Inhibits Pancreatic Tumor Growth by Switching on Suppressor microRNAs and Attenuating EZH2 Expression ». *Cancer Res.* 72.1, p. 335–345. DOI : 10.1158/0008-5472.CAN-11-2182.
- Baye, Lisa M. et Brian A. Link (2007). « The disarrayed mutation results in cell cycle and neurogenesis defects during retinal development in zebrafish ». *BMC Developmental Biology* 7, p. 28. DOI : 10.1186/1471-213X-7-28.
- Becker, T. S., S. M. Burgess, A. H. Amsterdam, M. L. Allende et N. Hopkins (1998). « not really finished is crucial for development of the zebrafish outer retina and encodes a transcription factor highly homologous to human Nuclear Respiratory Factor-1 and avian Initiation Binding Repressor ». *Development* 125.22, p. 4369–4378.
- Bedell, Victoria M. et al. (2012). « In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system ». *Nature* 491.7422, p. 114–118. DOI : 10.1038/nature11537.
- Bendig, Garnet, Matthias Grimmmler, Inken G. Huttner, Georgia Wessels, Tillman Dahme, Steffen Just, Nicole Trano, Hugo A. Katus, Mark C. Fishman et Wolfgang Rottbauer (2006). « Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart ». *Genes Dev.* 20.17, p. 2361–2372. DOI : 10.1101/gad.1448306.
- Benoit, Yannick D., Kristian B. Laursen, Mavee S. Witherspoon, Steven M. Lipkin et Lorraine J. Gudas (2013). « Inhibition of PRC2 histone methyltransferase activity increases TRAIL-mediated apoptosis sensitivity in human colon cancer cells ». *J. Cell. Physiol.* 228.4, p. 764–772. DOI : 10.1002/jcp.24224.
- Bentley, G. A., A. Lewit-Bentley, J. T. Finch, A. D. Podjarny et M. Roth (1984). « Crystal structure of the nucleosome core particle at 16 Å resolution ». *J. Mol. Biol.* 176.1, p. 55–75.
- Bernstein, Bradley E. et al. (2006a). « A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells ». *Cell* 125.2, p. 315–326. DOI : 10.1016/j.cell.2006.02.041.
- Bernstein, Emily, Elizabeth M. Duncan, Osamu Masui, Jesus Gil, Edith Heard et C. David Allis (2006b). « Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3

- and RNA and are enriched in facultative heterochromatin ». *Mol. Cell. Biol.* 26.7, p. 2560–2569. DOI : 10.1128/MCB.26.7.2560–2569.2006.
- Berteaux, Nathalie, Séverine Lottin, Didier Monté, Sébastien Pinte, Brigitte Quatanens, Jean Coll, Hubert Hondermarck, Jean-Jacques Curgy, Thierry Dugimont et Eric Adriaenssens (2005). « H19 mRNA-like noncoding RNA promotes breast cancer cell proliferation through positive control by E2F1 ». *J. Biol. Chem.* 280.33, p. 29625–29636. DOI : 10.1074/jbc.M504033200.
- Biemar, F., F. Argenton, R. Schmidtke, S. Epperlein, B. Peers et W. Driever (2001). « Pancreas development in zebrafish: early dispersed appearance of endocrine hormone expressing cells and their convergence to form the definitive islet ». *Dev. Biol.* 230.2, p. 189–203. DOI : 10.1006/dbio.2000.0103.
- Blackledge, Neil P. et al. (2014). « Variant PRC1 Complex-Dependent H2A Ubiquitylation Drives PRC2 Recruitment and Polycomb Domain Formation ». *Cell* 157.6, p. 1445–1459. DOI : 10.1016/j.cell.2014.05.004.
- Blier, P. R., A. J. Griffith, J. Craft et J. A. Hardin (1993). « Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks ». *J. Biol. Chem.* 268.10, p. 7594–7601.
- Bloom, Kristie, Abdullah Ely, Claudio Mussolino, Toni Cathomen et Patrick Arbuthnot (2013). « Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases ». *Mol. Ther.* 21.10, p. 1889–1897. DOI : 10.1038/mt.2013.170.
- Blum, Nicola et Gerrit Begemann (2012). « Retinoic acid signaling controls the formation, proliferation and survival of the blastema during adult zebrafish fin regeneration ». *Development* 139.1, p. 107–116. DOI : 10.1242/dev.065391.
- Boch, Jens, Heidi Scholze, Sebastian Schornack, Angelika Landgraf, Simone Hahn, Sabine Kay, Thomas Lahaye, Anja Nickstadt et Ulla Bonas (2009). « Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors ». *Science* 326.5959, p. 1509–1512. DOI : 10.1126/science.1178811.
- Bodega, Beatrice et al. (2017). « A cytosolic Ezh1 isoform modulates a PRC2-Ezh1 epigenetic adaptive response in postmitotic cells ». *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24.5, p. 444–452. DOI : 10.1038/nsmb.3392.

- Bogliotti, Yanina S. et Pablo J. Ross (2012). « Mechanisms of histone H3 lysine 27 trimethylation remodeling during early mammalian development ». *Epigenetics* 7.9, p. 976–981. DOI : 10.4161/epi.21615.
- Bonetti, Monica, Virginia Rodriguez-Martinez, Jeroen Paardekooper Overman, John Overvoorde, Mark van Eekelen, Chris Jopling et Jeroen den Hertog (2014). « Distinct and Overlapping Functions of ptpn11 Genes in Zebrafish Development ». *PLOS ONE* 9.4, e94884. DOI : 10.1371/journal.pone.0094884.
- Boyer, Laurie A. et al. (2006). « Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells ». *Nature* 441.7091, p. 349–353. DOI : 10.1038/nature04733.
- Bredfeldt, Tiffany G, K Leigh Greathouse, Stephen H Safe, Mien-Chie Hung, Mark T Bedford et Cheryl L Walker (2010). « Xenoestrogen-induced regulation of EZH2 and histone methylation via estrogen receptor signaling to PI3K/AKT ». *Mol. Endocrinol.* 24.5, p. 993–1006. DOI : 10.1210/me.2009-0438.
- Briggs, Adrian W., Xavier Rios, Raj Chari, Luhan Yang, Feng Zhang, Prashant Mali et George M. Church (2012). « Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers ». *Nucleic Acid Res.* 40.15, e117. DOI : 10.1093/nar/gks624.
- Brockdorff, Neil (2017). « Polycomb complexes in X chromosome inactivation ». *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 372.1733. DOI : 10.1098/rstb.2017.0021.
- Brockhoff, S. E., J. B. Hurley, U. Janssen-Bienhold, S. C. Neuhauss, W. Driever et J. E. Dowling (1995). « A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92.23, p. 10545–10549.
- Brogna, Saverio et Jikai Wen (2009). « Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms ». *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16.2, p. 107–113. DOI : 10.1038/nsmb.1550.
- Brombin, Alessandro, Jean-Philippe Grossier, Aurélie Heuzé, Zlatko Radev, Franck Bourrat, Jean-Stéphane Joly et Françoise Jamen (2011). « Genome-wide analysis of the POU genes in medaka, focusing on expression in the optic tectum ». *Dev. Dyn.* 240.10, p. 2354–2363. DOI : 10.1002/dvdy.22727.
- Brown, J. Lesley, Diane Mucci, Mary Whiteley, Marie-Luise Dirksen et Judith A. Kassis (1998). « The Drosophila Polycomb Group Gene pleiohomeotic Encodes a DNA

- Binding Protein with Homology to the Transcription Factor YY1 ». *Mol. Cell.* 1.7, p. 1057–1064. DOI : 10.1016/S1097-2765(00)80106-9.
- Buchwald, Gretel, Petra van der Stoop, Oliver Weichenrieder, Anastassis Perrakis, Maarten van Lohuizen et Titia K. Sixma (2006). « Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b ». *The EMBO J.* 25.11, p. 2465–2474. DOI : 10.1038/sj.emboj.7601144.
- Burma, Sandeep, Benjamin P. C. Chen et David J. Chen (2006). « Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity ». *DNA Repair. Mechanisms of chromosomal translocation* 5.9–10, p. 1042–1048. DOI : 10.1016/j.dnarep.2006.05.026.
- Burns, C. Geoffrey et Calum A. MacRae (2006). « Purification of hearts from zebrafish embryos ». *BioTechniques* 40.3, 274, 276, 278 passim.
- Butterfield, Russell J. et al. (2014). « Congenital lethal motor neuron disease with a novel defect in ribosome biogenesis ». *Neurology* 82.15, p. 1322–1330. DOI : 10.1212/WNL.0000000000000305.
- Cai, Qiang, Longyang Jin, Shouhua Wang, Di Zhou, Jiandong Wang, Zhaohui Tang et Zhiwei Quan (2017). « Long non-coding RNA UCA1 promotes gallbladder cancer progression by epigenetically repressing p21 and E-cadherin expression ». *Oncotarget* 8.29, p. 47957–47968. DOI : 10.18632/oncotarget.18204.
- Camaschella, Clara, Alessandro Campanella, Luigia De Falco, Loredana Boschetto, Roberta Merlini, Laura Silvestri, Sonia Levi et Achille Iolascon (2007). « The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload ». *Blood* 110.4, p. 1353–1358. DOI : 10.1182/blood-2007-02-072520.
- Campbell, Jean S. et al. (2005). « Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102.9, p. 3389–3394. DOI : 10.1073/pnas.0409722102.
- Cao, Ru, Liangjun Wang, Hengbin Wang, Li Xia, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Richard S. Jones et Yi Zhang (2002). « Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing ». *Science* 298.5595, p. 1039–1043. DOI : 10.1126/science.1076997.

- Cao, Ru et Yi Zhang (2004). « SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex ». *Mol. Cell.* 15.1, p. 57–67. DOI : 10.1016/j.molcel.2004.06.020.
- Caretti, Giuseppina, Monica Di Padova, Bruce Micales, Gary E. Lyons et Vittorio Sartorelli (2004). « The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation ». *Genes Dev.* 18.21, p. 2627–2638. DOI : 10.1101/gad.1241904.
- Carlson, Daniel F., Wenfang Tan, Simon G. Lillico, Dana Stverakova, Chris Proudfoot, Michelle Christian, Daniel F. Voytas, Charles R. Long, C. Bruce A. Whitelaw et Scott C. Fahrenkrug (2012). « Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock ». *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 109.43, p. 17382–17387. DOI : 10.1073/pnas.1211446109.
- Cermak, Tomas, Erin L Doyle, Michelle Christian, Li Wang, Yong Zhang, Clarice Schmidt, Joshua A Baller, Nikunj V Somia, Adam J Bogdanove et Daniel F Voytas (2011). « Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting ». *Nucleic Acids Res.* 39.12, e82. DOI : 10.1093/nar/gkr218.
- Cha, Tai-Lung, Binhua P Zhou, Weiya Xia, Yadi Wu, Cheng-Chieh Yang, Chun-Te Chen, Bo Ping, Arie P Otte et Mien-Chie Hung (2005). « Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3 ». *Science* 310.5746, p. 306–310. DOI : 10.1126/science.1118947.
- Chang, Ling-Chu et al. (2014). « YC-1 inhibits proliferation of breast cancer cells by down-regulating EZH2 expression via activation of c-Cbl and ERK ». *Br. J. Pharmacol.* 171.17, p. 4010–4025. DOI : 10.1111/bph.12708.
- Chapman, Anna, Laura Fernandez del Ama, Jennifer Ferguson, Jivko Kamarashev, Claudia Wellbrock et Adam Hurlstone (2014). « Heterogeneous Tumor Subpopulations Cooperate to Drive Invasion ». *Cell Rep* 8.3, p. 688–695. DOI : 10.1016/j.celrep.2014.06.045.
- Chen, J. N. et al. (1996). « Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish ». *Development* 123, p. 293–302.
- Chen, Jian-Fang, Xi Luo, Li-Sha Xiang, Hong-Tao Li, Lin Zha, Ni Li, Jian-Ming He, Gan-Feng Xie, Xiong Xie et Hou-Jie Liang (2016a). « EZH2 promotes colorectal cancer stem-like cell expansion by activating p21cip1-Wnt/ β -catenin signaling ». *Oncotarget* 7.27, p. 41540–41558. DOI : 10.18632/oncotarget.9236.

- Chen, Jian-Hui, Li-Yang Zhou, Suo Xu, Yu-Long Zheng, Yu-Feng Wan et Cheng-Ping Hu (2017a). « Overexpression of lncRNA HOXA11-AS promotes cell epithelial-mesenchymal transition by repressing miR-200b in non-small cell lung cancer ». *Cancer Cell Int.* 17, p. 64. DOI : 10.1186/s12935-017-0433-7.
- Chen, Jun, Hua Ruan, Sok Meng Ng, Chuan Gao, Hui Meng Soo, Wei Wu, Zhenhai Zhang, Zilong Wen, David P. Lane et Jinrong Peng (2005). « Loss of function of def selectively up-regulates δ 113p53 expression to arrest expansion growth of digestive organs in zebrafish ». *Genes Dev.* 19.23, p. 2900–2911. DOI : 10.1101/gad.1366405.
- Chen, L., A. Groenewoud, C. Tulotta, E. Zoni, M. Kruithof-de Julio, G. van der Horst, G. van der Pluijm et B. Ewa Snaar-Jagalska (2017b). « Chapter 17 - A zebrafish xenograft model for studying human cancer stem cells in distant metastasis and therapy response ». *Methods in Cell Biology*. Sous la dir. de Monte Westerfield and Leonard I. Zon H. William Detrich. T. 138. The Zebrafish Disease Models and Chemical Screens. DOI: 10.1016/bs.mcb.2016.10.009. Academic Press, p. 471–496.
- Chen, Qin-nan, Xin Chen, Zhen-yao Chen, Feng-qi Nie, Chen-chen Wei, Hong-wei Ma, Li Wan, Shuai Yan, Sheng-nan Ren et Zhao-xia Wang (2017c). « Long intergenic non-coding RNA 00152 promotes lung adenocarcinoma proliferation via interacting with EZH2 and repressing IL24 expression ». *Mol. Cancer* 16. DOI : 10.1186/s12943-017-0581-3.
- Chen, Wen-ming, Ming-de Huang, Dao-ping Sun, Rong Kong, Tong-peng Xu, Rui Xia, Er-bao Zhang et Yong-qian Shu (2016b). « Long intergenic non-coding RNA 00152 promotes tumor cell cycle progression by binding to EZH2 and repressing p15 and p21 in gastric cancer ». *Oncotarget* 7.9, p. 9773–9787. DOI : 10.18632/oncotarget.6949.
- Chen, Yi-Hua, Yu-Fen Lu, Ting-Yi Ko, Ming-Yuan Tsai, Che Yi Lin, Chia-Chi Lin et Sheng-Ping L. Hwang (2009). « Zebrafish *cdx1b* regulates differentiation of various intestinal cell lineages ». *Dev. Dyn.* 238.5, p. 1021–1032. DOI : 10.1002/dvdy.21908.
- Chiacchiera, Fulvio, Alessandra Rossi, SriGanesh Jammula, Marika Zanotti et Diego Pasini (2016). « PRC2 preserves intestinal progenitors and restricts secretory lineage commitment ». *The EMBO J.* 35.21, p. 2301–2314. DOI : 10.15252/embj.201694550.
- Chou, S.-T., Qixin Leng et A. J. Mixson (2012). « Zinc Finger Nucleases: Tailor-made for Gene Therapy ». *Drugs Future* 37.3, p. 183–196.

- Chu, Chi-Shuen, Pei-Wen Lo, Yi-Hsien Yeh, Pang-Hung Hsu, Shih-Huan Peng, Yu-Ching Teng, Ming-Lun Kang, Chi-Huey Wong et Li-Jung Juan (2014). « O-GlcNAcylation regulates EZH2 protein stability and function ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111.4, p. 1355–1360. DOI : 10.1073/pnas.1323226111.
- Chua, J. S., H. P. Liew, L. Guo et D. P. Lane (2015). « Tumor-specific signaling to p53 is mimicked by Mdm2 inactivation in zebrafish: insights from mdm2 and mdm4 mutant zebrafish ». *Oncogene* 34.48, p. 5933–5941. DOI : 10.1038/onc.2015.57.
- Ciferri, Claudio, Gabriel C Lander, Alessio Maiolica, Franz Herzog, Ruedi Aebersold et Eva Nogales (2012). « Molecular architecture of human polycomb repressive complex 2 ». *eLife* 1. DOI : 10.7554/eLife.00005.
- Cong, Le, Ruhong Zhou, Yu-Chi Kuo, Margaret Cunniff et Feng Zhang (2012). « Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains ». *Nature Commun* 3, p. 968. DOI : 10.1038/ncomms1962.
- Connelly, Katelyn E. et Emily C. Dykhuizen (2017). « Compositional and functional diversity of canonical PRC1 complexes in mammals ». *BBA Gene Regulatory Mechanisms* 1860.2, p. 233–245. DOI : 10.1016/j.bbagr.2016.12.006.
- Costantini, Silvia, Lisa Woodbine, Lucia Andreoli, Penny A. Jeggo et Alessandro Vindigni (2007). « Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK ». *DNA repair* 6.6, p. 712–722. DOI : 10.1016/j.dnarep.2006.12.007.
- Cretekos, Chris J. et David Jonah Grunwald (1999). « alyron, an Insertional Mutation Affecting Early Neural Crest Development in Zebrafish ». *Dev. Biol.* 210.2, p. 322–338. DOI : 10.1006/dbio.1999.9287.
- Crosnier, Cécile, Neil Vargesson, Stephen Gschmeissner, Linda Ariza-McNaughton, Alastair Morrison et Julian Lewis (2005). « Delta-Notch signalling controls commitment to a secretory fate in the zebrafish intestine ». *Development* 132.5, p. 1093–1104. DOI : 10.1242/dev.01644.
- Crow, Karen D., Peter F. Stadler, Vincent J. Lynch, Chris Amemiya et Günter P. Wagner (2006). « The “Fish-Specific” Hox Cluster Duplication Is Coincident with the Origin of Teleosts ». *Mol. Biol. Evol.* 23.1, p. 121–136. DOI : 10.1093/molbev/msj020.
- Daly, F. J. et J. H. Sandell (2000). « Inherited retinal degeneration and apoptosis in mutant zebrafish ». *Anat. Rec.* 258.2, p. 145–155.

- Davuluri, Gangarao, Weilong Gong, Shamila Yusuff, Kristin Lorent, Manimegalai Muthu-
mani, Amy C. Dolan et Michael Pack (2008). « Mutation of the zebrafish nucleoporin
elys sensitizes tissue progenitors to replication stress ». *PLoS Genet.* 4.10, e1000240.
DOI : 10.1371/journal.pgen.1000240.
- de Napoles, Mariana et al. (2004). « Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquityla-
tion of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation ». *Dev. Cell.* 7.5,
p. 663–676. DOI : 10.1016/j.devcel.2004.10.005.
- Dellino, Gaetano I, Yuri B Schwartz, Gabriella Farkas, Donna McCabe, Sarah C R Elgin
et Vincenzo Pirrotta (2004). « Polycomb silencing blocks transcription initiation ». *Molecular cell* 13.6, p. 887–893.
- Deng, Dong et al. (2012a). « Recognition of methylated DNA by TAL effectors ». *Cell*
Res. 22.10, p. 1502–1504. DOI : 10.1038/cr.2012.127.
- Deng, Dong, Chuangye Yan, Xiaojing Pan, Magdy Mahfouz, Jiawei Wang, Jian-Kang Zhu,
Yigong Shi et Nieng Yan (2012b). « Structural basis for sequence-specific recognition
of DNA by TAL effectors ». *Science* 335.6069, p. 720–723. DOI : 10.1126/science.
1215670.
- Deng, Xin, Xiao Fang Zhao, Xing Qiu Liang, Ran Chen, Yi Feng Pan et Jian Liang (2017).
« Linc00152 promotes cancer progression in hepatitis B virus-associated hepatocellular
carcinoma ». *Biomed. Pharmacother.* 90, p. 100–108. DOI : 10.1016/j.biopha.2017.
03.031.
- Diaz, Elsie et al. (2012). « Development and validation of reagents and assays for EZH2
peptide and nucleosome high-throughput screens ». *J Biomol Screen* 17.10, p. 1279–
1292. DOI : 10.1177/1087057112453765.
- Dietrich, Nikolaj, Adrian P. Bracken, Emmanuelle Trinh, Charlotte K. Schjerling, Haru-
hiko Koseki, Juri Rappsilber, Kristian Helin et Klaus H. Hansen (2007). « Bypass of
senescence by the polycomb group protein CBX8 through direct binding to the INK4A-
ARF locus ». *The EMBO J.* 26.6, p. 1637–1648. DOI : 10.1038/sj.emboj.7601632.
- Dietrich, Nikolaj, Mads Lerdrup, Eskild Landt, Shuchi Agrawal-Singh, Mads Bak, Niels
Tommerup, Juri Rappsilber, Erik Södersten et Klaus Hansen (2012). « REST-Mediated
Recruitment of Polycomb Repressor Complexes in Mammalian Cells ». *PloS Genet.*
8.3, e1002494. DOI : 10.1371/journal.pgen.1002494.

- Dimri, Manjari, Prashant V. Bommi, Anagh A. Sahasrabuddhe, Janardan D. Khandekar et Goberdhan P. Dimri (2010). « Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells ». *Carcinogenesis* 31.3, p. 489–495. DOI : 10.1093/carcin/bgp305.
- Ding, J, M Xie, Y Lian, Y Zhu, P Peng, J Wang, L Wang et K Wang (2017). « Long noncoding RNA HOXA-AS2 represses P21 and KLF2 expression transcription by binding with EZH2, LSD1 in colorectal cancer ». *Oncogenesis* 6.1, e288. DOI : 10.1038/oncsis.2016.84.
- Ding, Qiurong, Stephanie N. Regan, Yulei Xia, Leonie A. Ostrom, Chad A. Cowan et Kiran Musunuru (2013). « Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs ». *Cell Stem Cell* 12.4, p. 393–394. DOI : 10.1016/j.stem.2013.03.006.
- Dodd, M. Ernest, Julia Hatzold, Jonathan R. Mathias, Kevin B. Walters, David A. Bennin, Jennifer Rhodes, John P. Kanki, A. Thomas Look, Matthias Hammerschmidt et Anna Huttenlocher (2009). « The ENTH domain protein Clint1 is required for epidermal homeostasis in zebrafish ». *Development* 136.15, p. 2591–2600. DOI : 10.1242/dev.038448.
- Donovan, A. et al. (2000). « Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter ». *Nature* 403.6771, p. 776–781. DOI : 10.1038/35001596.
- Dovey, Michael, E. Elizabeth Patton, Teresa Bowman, Trista North, Wolfram Goessling, Yi Zhou et Leonard I. Zon (2009). « Topoisomerase II α Is Required for Embryonic Development and Liver Regeneration in Zebrafish ». *Mol. Cell. Biol.* 29.13, p. 3746–3753. DOI : 10.1128/MCB.01684-08.
- Doyle, Erin L., Aaron W. Hummel, Zachary L. Demorest, Colby G. Starker, Daniel F. Voytas, Philip Bradley et Adam J. Bogdanove (2013). « TAL Effector Specificity for base 0 of the DNA Target Is Altered in a Complex, Effector- and Assay-Dependent Manner by Substitutions for the Tryptophan in Cryptic Repeat -1 ». *PLoS ONE* 8.12. DOI : 10.1371/journal.pone.0082120.
- Dupret, Barbara et Pierre-Olivier Angrand (2014). « [Targeted genome modifications using TALEN] ». *Med Sci (Paris)* 30.2, p. 186–193. DOI : 10.1051/medsci/20143002017.
- Easter, S. S. et G. N. Nicola (1996). « The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*) ». *Dev. Biol.* 180.2, p. 646–663.

- Easter, S. S. et G. N. Nicola (1997). « The development of eye movements in the zebrafish (*Danio rerio*) ». *Dev Psychobiol* 31.4, p. 267–276.
- Ebert, A. M., G. L. Hume, K. S. Warren, N. P. Cook, C. G. Burns, M. A. Mohideen, G. Siegal, D. Yelon, M. C. Fishman et D. M. Garrity (2005). « Calcium extrusion is critical for cardiac morphogenesis and rhythm in embryonic zebrafish hearts ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102.49, p. 17705–17710. DOI : 10.1073/pnas.0502683102.
- Eckfeldt, Craig E, Eric M Mendenhall, Catherine M Flynn, Tzu-Fei Wang, Michael A Pickett, Suzanne M Grindle, Stephen C Ekker et Catherine M Verfaillie (2005). « Functional Analysis of Human Hematopoietic Stem Cell Gene Expression Using Zebrafish ». *PLoS Bi.* 3.8. DOI : 10.1371/journal.pbio.0030254.
- Eguiara, Arrate, Olaia Holgado, Izaskun Beloqui, Leire Abalde, Yolanda Sanchez, Carles Callol et Angel G. Martin (2011). « Xenografts in zebrafish embryos as a rapid functional assay for breast cancer stem-like cell identification ». *Cell Cycle* 10.21, p. 3751–3757. DOI : 10.4161/cc.10.21.17921.
- Elderkin, Sarah, Goedele N. Maertens, Mitsuhiro Endoh, Donna L. Mallery, Nick Morrice, Haruhiko Koseki, Gordon Peters, Neil Brockdorff et Kevin Hiom (2007). « A phosphorylated form of Mel-18 targets the Ring1B histone H2A ubiquitin ligase to chromatin ». *Mol. Cell.* 28.1, p. 107–120. DOI : 10.1016/j.molcel.2007.08.009.
- Endoh, Mitsuhiro et al. (2017). « PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by regulating germ cell-related genes ». *eLife* 6. DOI : 10.7554/eLife.21064.
- Erhardt, Sylvia, I.-Hsin Su, Robert Schneider, Sheila Barton, Andrew J. Bannister, Laura Perez-Burgos, Thomas Jenuwein, Tony Kouzarides, Alexander Tarakhovsky et M. Azim Surani (2003). « Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development ». *Development* 130.18, p. 4235–4248.
- Eskeland, Ragnhild et al. (2010). « Ring1B Compacts Chromatin Structure and Represses Gene Expression Independent of Histone Ubiquitination ». *Mol. Cell.* 38.3, p. 452–464. DOI : 10.1016/j.molcel.2010.02.032.
- Ezhkova, Elena, H. Amalia Pasolli, Joel S. Parker, Nicole Stokes, I.-hsin Su, Gregory Hannon, Alexander Tarakhovsky et Elaine Fuchs (2009). « Ezh2 orchestrates gene

- expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells ». *Cell* 136.6, p. 1122–1135. DOI : 10.1016/j.cell.2008.12.043.
- Fadool, James M. et John E. Dowling (2008). « Zebrafish: a model system for the study of eye genetics ». *Prog Retin Eye Res* 27.1, p. 89–110. DOI : 10.1016/j.preteyeres.2007.08.002.
- Farcas, Anca M. et al. (2012). « KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands ». *eLife* 1, e00205. DOI : 10.7554/eLife.00205.
- Faust, C., A. Schumacher, B. Holdener et T. Magnuson (1995). « The eed mutation disrupts anterior mesoderm production in mice ». *Development* 121.2, p. 273–285.
- Fevr, Tea, Sylvie Robine, Daniel Louvard et Joerg Huelsken (2007). « Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells ». *Mol. Cell. Biol.* 27.21, p. 7551–7559. DOI : 10.1128/MCB.01034-07.
- Field, Holly A, Elke A Ober, Tobias Roeser et Didier Y. R Stainier (2003a). « Formation of the digestive system in zebrafish. I. liver morphogenesis ». *Dev. Biol.* 253.2, p. 279–290. DOI : 10.1016/S0012-1606(02)00017-9.
- Field, Holly A., P. D. Si Dong, Dimitris Beis et Didier Y. R. Stainier (2003b). « Formation of the digestive system in zebrafish. II. Pancreas morphogenesis ». *Dev. Biol.* 261.1, p. 197–208.
- Fischle, Wolfgang, Yanming Wang, Steven A. Jacobs, Youngchang Kim, C. David Allis et Sepideh Khorasanizadeh (2003). « Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains ». *Genes Dev.* 17.15, p. 1870–1881. DOI : 10.1101/gad.1110503.
- Fraenkel, Paula G., David Traver, Adriana Donovan, David Zahrieh et Leonard I. Zon (2005). « Ferroportin1 is required for normal iron cycling in zebrafish ». *J. Clin. Invest.* 115.6, p. 1532–1541. DOI : 10.1172/JCI23780.
- Francis, Nicole J., Robert E. Kingston et Christopher L. Woodcock (2004). « Chromatin compaction by a polycomb group protein complex ». *Science* 306.5701, p. 1574–1577. DOI : 10.1126/science.1100576.
- Fritsch, C., J. L. Brown, J. A. Kassis et J. Muller (1999). « The DNA-binding polycomb group protein pleiohomeotic mediates silencing of a Drosophila homeotic gene ». *Development* 126.17, p. 3905–3913.

- Frohnhofer, Hans Georg et al. (2016). « Spermidine, but not spermine, is essential for pigment pattern formation in zebrafish ». *Biol Open*, bio.018721. DOI : 10.1242/bio.018721.
- Fu, Yanfang, Jennifer A. Foden, Cyd Khayter, Morgan L. Maeder, Deepak Reyon, J. Keith Joung et Jeffrey D. Sander (2013). « High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells ». *Nat. Biotechnol.* 31.9, p. 822–826. DOI : 10.1038/nbt.2623.
- Fukui, Hajime, Ryuki Hanaoka et Atsuo Kawahara (2009). « Noncanonical activity of seryl-tRNA synthetase is involved in vascular development ». *Circ. Res.* 104.11, p. 1253–1259. DOI : 10.1161/CIRCRESAHA.108.191189.
- Gaj, Thomas, Charles A. Gersbach et Carlos F. Barbas (2013). « ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering ». *Trends biotechnol.* 31.7, p. 397–405. DOI : 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
- Gao, Yu, Poul Hyttel et Vanessa Jane Hall (2010). « Regulation of H3K27me3 and H3K4me3 during early porcine embryonic development ». *MR & D* 77.6, p. 540–549. DOI : 10.1002/mrd.21180.
- Gao, Zhonghua, Jin Zhang, Roberto Bonasio, Francesco Strino, Ayana Sawai, Fabio Parisi, Yuval Kluger et Danny Reinberg (2012). « PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes ». *Mol. Cell.* 45.3, p. 344–356. DOI : 10.1016/j.molcel.2012.01.002.
- Garrity, Deborah M., Sarah Childs et Mark C. Fishman (2002). « The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome ». *Development* 129.19, p. 4635–4645.
- Gasiunas, Giedrius, Rodolphe Barrangou, Philippe Horvath et Virginijus Siksnys (2012). « Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109.39, E2579–2586. DOI : 10.1073/pnas.1208507109.
- Gearhart, Micah D., Connie M. Corcoran, Joseph A. Wamstad et Vivian J. Bardwell (2006). « Polycomb group and SCF ubiquitin ligases are found in a novel BCOR complex that is recruited to BCL6 targets ». *Mol. Cell. Biol.* 26.18, p. 6880–6889. DOI : 10.1128/MCB.00630-06.

- Gerhard, Glenn S., Elizabeth J. Kauffman, Xujun Wang, Richard Stewart, Jessica L. Moore, Claudia J. Kasales, Eugene Demidenko et Keith C. Cheng (2002). « Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*) ». *Exp. Gerontol.* 37.8-9, p. 1055–1068.
- Gerlach, Gabriele (2006). « Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: female suppression and male enhancement ». *Anim Behav* 72.5, p. 1119–1124. DOI : 10.1016/j.anbehav.2006.03.009.
- Gil, Jesús et Ana O’Loghlen (2014). « PRC1 complex diversity: where is it taking us? » *Trends Cell Biol.* 24.11, p. 632–641. DOI : 10.1016/j.tcb.2014.06.005.
- Glazer, R. I., K. D. Hartman, M. C. Knode, M. M. Richard, P. K. Chiang, C. K. Tseng et V. E. Marquez (1986). « 3-Deazaneplanocin: a new and potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and its effects on human promyelocytic leukemia cell line HL-60 ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135.2, p. 688–694.
- Gode, David et Dietrich A. Volmer (2013). « Lipid imaging by mass spectrometry – a review ». *Analyst* 138.5, p. 1289–1315. DOI : 10.1039/C2AN36337B.
- Gong, Yanhua, Jiping Yue, Xudong Wu, Xu Wang, Jianyan Wen, Lifang Lu, Xiaozhong Peng, Boqin Qiang et Jiangang Yuan (2006). « NSPc1 is a cell growth regulator that acts as a transcriptional repressor of p21Waf1/Cip1 via the RARE element ». *Nucleic Acid Res.* 34.21, p. 6158–6169. DOI : 10.1093/nar/gk1834.
- Gorfinkiel, Nicole, Laura Fanti, Teresa Melgar, Emiliano García, Sergio Pimpinelli, Isabel Guerrero et Miguel Vidal (2004). « The *Drosophila* Polycomb group gene *Sex combs extra* encodes the ortholog of mammalian Ring1 proteins ». *Mec. Dev.* 121.5, p. 449–462. DOI : 10.1016/j.mod.2004.03.019.
- Gorman, Kristen F., Stephen J. Tredwell et Felix Breden (2007). « The mutant guppy syndrome curveback as a model for human heritable spinal curvature ». *Spine* 32.7, p. 735–741. DOI : 10.1097/01.brs.0000259081.40354.e2.
- Grabarz, Anastazja, Aurélia Barascu, Josée Guirouilh-Barbat et Bernard S. Lopez (2012). « Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining ». *Am J Cancer Res* 2.3, p. 249–268.
- Gratz, Scott J., Alexander M. Cummings, Jennifer N. Nguyen, Danielle C. Hamm, Laura K. Donohue, Melissa M. Harrison, Jill Wildonger et Kate M. O’Connor-Giles (2013).

- « Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease ». *Genetics* 194.4, p. 1029–1035. DOI : 10.1534/genetics.113.152710.
- Grau, Jan, Jens Boch et Stefan Posch (2013). « TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction ». *Bioinformatics* 29.22, p. 2931–2932. DOI : 10.1093/bioinformatics/btt501.
- Gregorieff, Alex, Daniel Pinto, Harry Begthel, Olivier Destrée, Menno Kielman et Hans Clevers (2005). « Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine ». *Gastroenterology* 129.2, p. 626–638. DOI : 10.1016/j.gastro.2005.06.007.
- Grunwald, D. J., C. B. Kimmel, M. Westerfield, C. Walker et G. Streisinger (1988). « A neural degeneration mutation that spares primary neurons in the zebrafish ». *Dev. Biol.* 126.1, p. 115–128.
- Guemez-Gamboa, Alicia et al. (2015). « Inactivating mutations in MFSD2A, required for omega-3 fatty acid transport in brain, cause a lethal microcephaly syndrome ». *Nat. Genet.* 47.7, p. 809–813. DOI : 10.1038/ng.3311.
- Gupta, Rajnish A. et al. (2010). « Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis ». *Nature* 464.7291, p. 1071–1076. DOI : 10.1038/nature08975.
- Guttman, Mitchell et al. (2009). « Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals ». *Nature* 458.7235, p. 223–227. DOI : 10.1038/nature07672.
- Hamada, Yoshimasa, Tetsuya Bando, Taro Nakamura, Yoshiyasu Ishimaru, Taro Mito, Sumihare Noji, Kenji Tomioka et Hideyo Ohuchi (2015). « Leg regeneration is epigenetically regulated by histone H3K27 methylation in the cricket *Gryllus bimaculatus* ». *Development* 142.17, p. 2916–2927. DOI : 10.1242/dev.122598.
- Hammerschmidt, M. et al. (1996). « dino and mercedes, two genes regulating dorsal development in the zebrafish embryo ». *Development* 123, p. 95–102.
- Hammond, Christina Lindsey et Stefan Schulte-Merker (2009). « Two populations of endochondral osteoblasts with differential sensitivity to Hedgehog signalling ». *Development* 136.23, p. 3991–4000. DOI : 10.1242/dev.042150.
- Hanahan, Douglas et Robert A. Weinberg (2011). « Hallmarks of cancer: the next generation ». *Cell* 144.5, p. 646–674. DOI : 10.1016/j.cell.2011.02.013.

- Hansen, Klaus H., Adrian P. Bracken, Diego Pasini, Nikolaj Dietrich, Simmi S. Gehani, Astrid Monrad, Juri Rappsilber, Mads Lerdrup et Kristian Helin (2008). « A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark ». *Nat. Cell Biol.* 10.11, p. 1291–1300. DOI : 10.1038/ncb1787.
- Haramis, Anna-Pavlina G., Adam Hurlstone, Yme van der Velden, Harry Begthel, Maaïke van den Born, G. Johan A. Offerhaus et Hans C. Clevers (2006). « Adenomatous polyposis coli-deficient zebrafish are susceptible to digestive tract neoplasia ». *EMBO Rep.* 7.4, p. 444–449. DOI : 10.1038/sj.embor.7400638.
- Harvey, Steven A., Ian Sealy, Ross Kettleborough, Fruzsina Fenyés, Richard White, Derek Stemple et James C. Smith (2013). « Identification of the zebrafish maternal and paternal transcriptomes ». *Development* 140.13, p. 2703–2710. DOI : 10.1242/dev.095091.
- He, Jin, Eric M. Kallin, Yu-Ichi Tsukada et Yi Zhang (2008). « The H3K36 demethylase Jhdml1b/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15(Ink4b) ». *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15.11, p. 1169–1175. DOI : 10.1038/nsmb.1499.
- He, Wang, Qingqing Cai, Fenyong Sun, Guangzheng Zhong, Pei Wang, Hongyan Liu, Junhua Luo, Hao Yu, Jian Huang et Tianxin Lin (2013). « linc-UBC1 physically associates with polycomb repressive complex 2 (PRC2) and acts as a negative prognostic factor for lymph node metastasis and survival in bladder cancer ». *BBA* 1832.10, p. 1528–1537. DOI : 10.1016/j.bbadis.2013.05.010.
- He, Yupeng et al. (2017). « The EED protein-protein interaction inhibitor A-395 inactivates the PRC2 complex ». *Nat. Chem. Biol.* 13.4, p. 389–395. DOI : 10.1038/nchembio.2306.
- Heigwer, Florian, Grainne Kerr, Nike Walther, Kathrin Glaeser, Oliver Pelz, Marco Breinig et Michael Boutros (2013). « E-TALEN: a web tool to design TALENs for genome engineering ». *Nucleic Acid Res.* 41.20, e190. DOI : 10.1093/nar/gkt789.
- Her, Guor Mour, Chia-Chang Chiang, Wen-Ya Chen et Jen-Leih Wu (2003). « In vivo studies of liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) gene expression in liver of transgenic zebrafish (*Danio rerio*) ». *FEBS Lett.* 538.1-3, p. 125–133.
- Her, Guor Mour, Yang-Hui Yeh et Jen-Leih Wu (2004). « Functional conserved elements mediate intestinal-type fatty acid binding protein (I-FABP) expression in the gut epithelia of zebrafish larvae ». *Dev. Dyn.* 230.4, p. 734–742. DOI : 10.1002/dvdy.20081.

- Heur, Martin, Shuliang Jiao, Simone Schindler et J. Gage Crump (2013). « Regenerative potential of the zebrafish corneal endothelium ». *Exp. Eye Res.* 106, p. 1–4. DOI : 10.1016/j.exer.2012.10.009.
- Hibi, K., H. Nakamura, A. Hirai, Y. Fujikake, Y. Kasai, S. Akiyama, K. Ito et H. Takagi (1996). « Loss of H19 imprinting in esophageal cancer ». *Cancer Res.* 56.3, p. 480–482.
- Hinits, Yaniv, Daniel P. S. Osborn et Simon M. Hughes (2009). « Differential requirements for myogenic regulatory factors distinguish medial and lateral somitic, cranial and fin muscle fibre populations ». *Development* 136.3, p. 403–414. DOI : 10.1242/dev.028019.
- Hinits, Yaniv, Victoria C. Williams, Dylan Sweetman, Thomas M. Donn, Taylor P. Ma, Cecilia B. Moens et Simon M. Hughes (2011). « Defective cranial skeletal development, larval lethality and haploinsufficiency in Myod mutant zebrafish ». *Dev. Biol.* 358.1, p. 102–112. DOI : 10.1016/j.ydbio.2011.07.015.
- Hisaoka, K. K. et C. F. Firlit (1962). « Ovarian Cycle and Egg Production in the Zebrafish, *Brachydanio rerio* ». *Copeia* 1962.4, p. 788–792. DOI : 10.2307/1440680.
- Hockemeyer, Dirk et al. (2011). « Genetic engineering of human ES and iPS cells using TALE nucleases ». *Nat. Biotechnol.* 29.8, p. 731–734. DOI : 10.1038/nbt.1927.
- Holkers, Maarten, Ignazio Maggio, Jin Liu, Josephine M. Janssen, Francesca Miselli, Claudio Mussolino, Alessandra Recchia, Toni Cathomen et Manuel A. F. V. Gonçalves (2013). « Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells ». *Nucleic Acid Res.* 41.5, e63. DOI : 10.1093/nar/gks1446.
- Howe, Kerstin et al. (2013). « The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome ». *Nature* 496.7446, p. 498–503. DOI : 10.1038/nature12111.
- Hruscha, Alexander, Peter Krawitz, Alexandra Rechenberg, Verena Heinrich, Jochen Hecht, Christian Haass et Bettina Schmid (2013). « Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish ». *Development* 140.24, p. 4982–4987. DOI : 10.1242/dev.099085.
- Hsu, Patrick D. et al. (2013). « DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases ». *Nat. Biotechnol.* 31.9, p. 827–832. DOI : 10.1038/nbt.2647.
- Hu, Guangzhen, Shiv K. Gupta, Tammy P. Troska, Asha Nair et Mamta Gupta (2017a). « Long non-coding RNA profile in mantle cell lymphoma identifies a functional lncRNA

- ROR1-AS1 associated with EZH2/PRC2 complex ». *Oncotarget*. DOI : 10.18632/oncotarget.17956.
- Hu, Jiao-Jiao et al. (2016). « HBx-upregulated lncRNA UCA1 promotes cell growth and tumorigenesis by recruiting EZH2 and repressing p27Kip1/CDK2 signaling ». *Sci Rep* 6, p. 23521. DOI : 10.1038/srep23521.
- Hu, P.-S. et al. (2017b). « NSPc1 promotes cancer stem cell self-renewal by repressing the synthesis of all-trans retinoic acid via targeting RDH16 in malignant glioma ». *Oncogene*. DOI : 10.1038/onc.2017.34.
- Hua, Wen-Feng, Yong-Shui Fu, Yi-Ji Liao, Wen-Jie Xia, Yang-Chao Chen, Yi-Xin Zeng, Hsiang-Fu Kung et Dan Xie (2010). « Curcumin induces down-regulation of EZH2 expression through the MAPK pathway in MDA-MB-435 human breast cancer cells ». *Eur. J. Pharmacol.* 637.1-3, p. 16–21. DOI : 10.1016/j.ejphar.2010.03.051.
- Huang, Cheng-chen, Nathan D. Lawson, Brant M. Weinstein et Stephen L. Johnson (2003). « reg6 is required for branching morphogenesis during blood vessel regeneration in zebrafish caudal fins ». *Dev. Biol.* 264.1, p. 263–274.
- Huang, H., S. S. Vogel, N. Liu, D. A. Melton et S. Lin (2001). « Analysis of pancreatic development in living transgenic zebrafish embryos ». *Mol. Cell. Endocrinol.* 177.1-2, p. 117–124.
- Huang, Mingde, Jiakai Hou, Yunfei Wang, Min Xie, Chenchen Wei, Fengqi Nie, Zhaoxia Wang et Ming Sun (2017). « Long Noncoding RNA LINC00673 Is Activated by SP1 and Exerts Oncogenic Properties by Interacting with LSD1 and EZH2 in Gastric Cancer ». *Mol. Ther.* 25.4, p. 1014–1026. DOI : 10.1016/j.ymthe.2017.01.017.
- Hug, Nele, Dasa Longman et Javier F. Cáceres (2016). « Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway ». *Nucleic Acid Res.* 44.4, p. 1483–1495. DOI : 10.1093/nar/gkw010.
- Hwang, Woong Y., Yanfang Fu, Deepak Reyon, Morgan L. Maeder, Shengdar Q. Tsai, Jeffry D. Sander, Randall T. Peterson, J.-R. Joanna Yeh et J. Keith Joung (2013). « Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system ». *Nat. Biotechnol.* 31.3, p. 227–229. DOI : 10.1038/nbt.2501.
- Isono, Kyo-ichi, Yu-ichi Fujimura, Jun Shinga, Makoto Yamaki, Jiyang O-Wang, Yoshihiro Takihara, Yasuaki Murahashi, Yuki Takada, Yoko Mizutani-Koseki et Haruhiko Koseki (2005). « Mammalian Polyhomeotic Homologues Phc2 and Phc1 Act in Synergy To

- Mediate Polycomb Repression of Hox Genes ». *Mol. Cell. Biol.* 25.15, p. 6694–6706. DOI : 10.1128/MCB.25.15.6694–6706.2005.
- Iwama, Atsushi et al. (2004). « Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1 ». *Immunity* 21.6, p. 843–851. DOI : 10.1016/j.immuni.2004.11.004.
- Iwanami, Norimasa et al. (2008). « WDR55 is a nucleolar modulator of ribosomal RNA synthesis, cell cycle progression, and teleost organ development ». *PLoS Genet.* 4.8, e1000171. DOI : 10.1371/journal.pgen.1000171.
- Jacobs, J. J., K. Kieboom, S. Marino, R. A. DePinho et M. van Lohuizen (1999). « The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus ». *Nature* 397.6715, p. 164–168. DOI : 10.1038/16476.
- Jao, Li-En, Susan R. Wente et Wenbiao Chen (2013). « Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110.34, p. 13904–13909. DOI : 10.1073/pnas.1308335110.
- Jensen, Lasse D., Masaki Nakamura, Lars Bräutigam, Xuri Li, Yizhi Liu, Nilesch J. Samani et Yihai Cao (2015). « VEGF-B-Neuropilin-1 signaling is spatiotemporally indispensable for vascular and neuronal development in zebrafish ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112.44, E5944–5953. DOI : 10.1073/pnas.1510245112.
- Ji, Yongchang, Sharleen M. Buel et Jeffrey D. Amack (2016). « Mutations in zebrafish pitx2 model congenital malformations in Axenfeld-Rieger syndrome but do not disrupt left-right placement of visceral organs ». *Dev. Biol.* 416.1, p. 69–81. DOI : 10.1016/j.ydbio.2016.06.010.
- Jia, Jing, Feng Li, Xiao-Shuang Tang, Shan Xu, Yang Gao, Qi Shi, Wenhuan Guo, Xinyang Wang, Dalin He et Peng Guo (2016). « Long noncoding RNA DANCR promotes invasion of prostate cancer through epigenetically silencing expression of TIMP2/3 ». *Oncotarget* 7.25, p. 37868–37881. DOI : 10.18632/oncotarget.9350.
- Jia, Xiao-E. et al. (2015). « Mutation of kri11 causes definitive hematopoiesis failure via PERK-dependent excessive autophagy induction ». *Cell Res.* 25.8, p. 946–962. DOI : 10.1038/cr.2015.81.
- Jiang, Zhi, Jianbo Song, Fei Qi, An Xiao, Xizhou An, Ning-ai Liu, Zuoyang Zhu, Bo Zhang et Shuo Lin (2008). « Exdpf is a key regulator of exocrine pancreas development

- controlled by retinoic acid and ptf1a in zebrafish ». *PLoS Biol.* 6.11, e293. DOI : 10.1371/journal.pbio.0060293.
- Jiao, Lianying et Xin Liu (2015). « Structural basis of histone H3K27 trimethylation by an active polycomb repressive complex 2 ». *Science* 350.6258, aac4383. DOI : 10.1126/science.aac4383.
- Jinek, Martin, Alexandra East, Aaron Cheng, Steven Lin, Enbo Ma et Jennifer Doudna (2013). « RNA-programmed genome editing in human cells ». *eLife* 2, e00471. DOI : 10.7554/eLife.00471.
- Joshi, Preeti, Elizabeth A. Carrington, Liangjun Wang, Carrie S. Ketel, Ellen L. Miller, Richard S. Jones et Jeffrey A. Simon (2008). « Dominant Alleles Identify SET Domain Residues Required for Histone Methyltransferase of Polycomb Repressive Complex 2 ». *J. Biol. Chem.* 283.41, p. 27757–27766. DOI : 10.1074/jbc.M804442200.
- Jung, Hae-Yun, Sohee Jun, Moon-sup Lee, Han-Cheon Kim, Xin Wang, Hong Ji, Pierre D. McCrean et Jae-Il Park (2013). « PAF and EZH2 induce Wnt/ β -catenin signaling hyperactivation ». *Mol. Cell.* 52.2, p. 193–205. DOI : 10.1016/j.molcel.2013.08.028.
- Justin, Neil et al. (2016). « Structural basis of oncogenic histone H3K27M inhibition of human polycomb repressive complex 2 ». *Nature Commun.* 7, p. 11316. DOI : 10.1038/ncomms11316.
- Kahn, Tatyana G., Eshagh Dorafshan, Dorothea Schultheis, Aman Zare, Per Stenberg, Ingolf Reim, Vincenzo Pirrotta et Yuri B. Schwartz (2016). « Interdependence of PRC1 and PRC2 for recruitment to Polycomb Response Elements ». *Nucleic Acid Res.* 44.21, p. 10132–10149. DOI : 10.1093/nar/gkw701.
- Kane, Donald A., Karen N. McFarland et Rachel M. Warga (2005). « Mutations in half baked/E-cadherin block cell behaviors that are necessary for teleost epiboly ». *Development* 132.5, p. 1105–1116. DOI : 10.1242/dev.01668.
- Kang, Xunlei, Yitao Qi, Yong Zuo, Qi Wang, Yanqiong Zou, Robert J. Schwartz, Jinke Cheng et Edward T.H. Yeh (2010). « SUMO-Specific Protease 2 Is Essential for Suppression of Polycomb Group Proteins Mediated Gene Silencing During Embryonic Development ». *Mol. Cell* 38.2, p. 191–201. DOI : 10.1016/j.molcel.2010.03.005.
- Karlstrom, R. O. et al. (1996). « Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding ». *Development* 123, p. 427–438.

- Katoh-Fukui, Yuko et al. (2012). « Cbx2, a polycomb group gene, is required for Sry gene expression in mice ». *Endocrinology* 153.2, p. 913–924. DOI : 10.1210/en.2011-1055.
- Katsuyama, Tomonori et Renato Paro (2011). « Epigenetic reprogramming during tissue regeneration ». *FEBS Lett.* 585.11, p. 1617–1624. DOI : 10.1016/j.febslet.2011.05.010.
- Kaustov, Lilia et al. (2011). « Recognition and specificity determinants of the human cbx chromodomains ». *J. Biol. Chem.* 286.1, p. 521–529. DOI : 10.1074/jbc.M110.191411.
- Keightley, Maria-Cristina, Meredith O. Crowhurst, Judith E. Layton, Traude Beilharz, Sebastian Markmiller, Sony Varma, Benjamin M. Hogan, Tanya A. de Jong-Curtain, Joan K. Heath et Graham J. Lieschke (2013). « In vivo mutation of pre-mRNA processing factor 8 (Prpf8) affects transcript splicing, cell survival and myeloid differentiation ». *FEBS Lett.* 587.14, p. 2150–2157. DOI : 10.1016/j.febslet.2013.05.030.
- Ketel, Carrie S., Erica F. Andersen, Marcus L. Vargas, Jinky Suh, Susan Strome et Jeffrey A. Simon (2005). « Subunit contributions to histone methyltransferase activities of fly and worm polycomb group complexes ». *Mol. Cell. Biol.* 25.16, p. 6857–6868. DOI : 10.1128/MCB.25.16.6857-6868.2005.
- Khalil, Ahmad M. et al. (2009). « Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression ». *Proc. Nat. Acad. Sci.* 106.28, p. 11667–11672. DOI : 10.1073/pnas.0904715106.
- Kim, Hyongbum et Jin-Soo Kim (2014). « A guide to genome engineering with programmable nucleases ». *Nat. Rev. Genet.* 15.5, p. 321–334. DOI : 10.1038/nrg3686.
- Kim, Seok-Hyung, Christina K. Speirs, Lilianna Solnica-Krezel et Kevin C. Ess (2011). « Zebrafish model of tuberous sclerosis complex reveals cell-autonomous and non-cell-autonomous functions of mutant tuberin ». *Dis. Model Mech.* 4.2, p. 255–267. DOI : 10.1242/dmm.005587.
- Kim, Woojin, Gregory H. Bird, Tobias Neff, Guoji Guo, Marc A. Kerenyi, Loren D. Walensky et Stuart H. Orkin (2013). « Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer ». *Nat. Chem. Biol.* 9.10, p. 643–650. DOI : 10.1038/nchembio.1331.
- Kimmel, C. B., D. A. Kane, C. Walker, R. M. Warga et M. B. Rothman (1989). « A mutation that changes cell movement and cell fate in the zebrafish embryo ». *Nature* 337.6205, p. 358–362. DOI : 10.1038/337358a0.

- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann et T. F. Schilling (1995). « Stages of embryonic development of the zebrafish ». *Dev. Dyn.* 203.3, p. 253–310. DOI : 10.1002/aja.1002030302.
- Kirmizis, Antonis, Stephanie M. Bartley, Andrei Kuzmichev, Raphael Margueron, Danny Reinberg, Roland Green et Peggy J. Farnham (2004). « Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27 ». *Genes Dev.* 18.13, p. 1592–1605. DOI : 10.1101/gad.1200204.
- Kishi, Shuji et al. (2008). « The Identification of Zebrafish Mutants Showing Alterations in Senescence-Associated Biomarkers ». *PLoS Genet.* 4.8, e1000152. DOI : 10.1371/journal.pgen.1000152.
- Klauke, Karin et al. (2013). « Polycomb Cbx family members mediate the balance between haematopoietic stem cell self-renewal and differentiation ». *Nat. Cell Biol.* 15.4, p. 353–362. DOI : 10.1038/ncb2701.
- Kleer, Celina G et al. (2003). « EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100.20, p. 11606–11611. DOI : 10.1073/pnas.1933744100.
- Knopf, Franziska et al. (2011). « Bone Regenerates via Dedifferentiation of Osteoblasts in the Zebrafish Fin ». *Dev. Cell.* 20.5, p. 713–724. DOI : 10.1016/j.devcel.2011.04.014.
- Knutson, Sarah K. et al. (2012). « A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells ». *Nat. Chem. Biol.* 8.11, p. 890–896. DOI : 10.1038/nchembio.1084.
- Kogo, Ryunosuke et al. (2011). « Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers ». *Cancer Res.* 71.20, p. 6320–6326. DOI : 10.1158/0008-5472.CAN-11-1021.
- Kok, Fatma O., Emma Oster, Laura Mentzer, Jen-Chih Hsieh, Clarissa A. Henry et Howard I. Sirotkin (2007). « The role of the SPT6 chromatin remodeling factor in zebrafish embryogenesis ». *Dev. Biol.* 307.2, p. 214–226. DOI : 10.1016/j.ydbio.2007.04.039.
- Kong, Dejuan et al. (2012). « Loss of let-7 up-regulates EZH2 in prostate cancer consistent with the acquisition of cancer stem cell signatures that are attenuated by BR-DIM ». *PLoS one* 7.3, e33729. DOI : 10.1371/journal.pone.0033729.

- Konze, Kyle D. et al. (2013). « An orally bioavailable chemical probe of the Lysine Methyltransferases EZH2 and EZH1 ». *ACS Chem. Biol.* 8.6, p. 1324–1334. DOI : 10.1021/cb400133j.
- Korinek, V., N. Barker, P. Moerer, E. van Donselaar, G. Huls, P. J. Peters et H. Clevers (1998). « Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4 ». *Nat. Genet.* 19.4, p. 379–383. DOI : 10.1038/1270.
- Kotake, Y, T Nakagawa, K Kitagawa, S Suzuki, N Liu, M Kitagawa et Y Xiong (2011). « Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15INK4B tumor suppressor gene ». *Oncogene* 30.16, p. 1956–1962. DOI : 10.1038/onc.2010.568.
- Krausova, Michaela et Vladimir Korinek (2014). « Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer ». *Cell. Signal.* 26.3, p. 570–579. DOI : 10.1016/j.cellsig.2013.11.032.
- Kretz, Markus et Gunter Meister (2014). « RNA binding of PRC2: promiscuous or well ordered? ». *Mol. Cell.* 55.2, p. 157–158. DOI : 10.1016/j.molcel.2014.07.002.
- Kuzmichev, Andrei, Kenichi Nishioka, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst et Danny Reinberg (2002). « Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein ». *Genes Dev.* 16.22, p. 2893–2905. DOI : 10.1101/gad.1035902.
- Kuzmichev, Andrei, Thomas Jenuwein, Paul Tempst et Danny Reinberg (2004). « Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3 ». *Mol. Cell.* 14.2, p. 183–193.
- Lam, S. H., H. L. Chua, Z. Gong, T. J. Lam et Y. M. Sin (2004). « Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study ». *Dev. Comp. Immunol.* 28.1, p. 9–28.
- Landeira, David 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.* 12.6, p. 618–624. DOI : 10.1038/ncb2065.
- Langenau, David M. et al. (2003). « Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish ». *Science* 299.5608, p. 887–890. DOI : 10.1126/science.1080280.

- Langenau, David M., Hui Feng, Stephane Berghmans, John P. Kanki, Jeffery L. Kutok et A. Thomas Look (2005). « Cre/lox-regulated transgenic zebrafish model with conditional myc-induced T cell acute lymphoblastic leukemia ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102.17, p. 6068–6073. DOI : 10.1073/pnas.0408708102.
- Langheinrich, Ulrike (2003). « Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk ». *BioEssays* 25.9, p. 904–912. DOI : 10.1002/bies.10326.
- LaPak, Kyle M. et Christin E. Burd (2014). « The molecular balancing act of p16(INK4a) in cancer and aging ». *Mol. Cancer Res.* 12.2, p. 167–183. DOI : 10.1158/1541-7786.MCR-13-0350.
- Laugesen, Anne, Jonas Westergaard Højfeldt et Kristian Helin (2016). « Role of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) in Transcriptional Regulation and Cancer ». *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6.9. DOI : 10.1101/cshperspect.a026575.
- Lavigne, Marc, Nicole J. Francis, Ian F. G. King et Robert E. Kingston (2004). « Propagation of silencing; recruitment and repression of naive chromatin in trans by polycomb repressed chromatin ». *Mol. Cell.* 13.3, p. 415–425.
- Le Faou, Perrine, Pamela Völkel et Pierre-Olivier Angrand (2011a). « The zebrafish genes encoding the Polycomb repressive complex (PRC) 1 ». *Gene* 475.1, p. 10–21. DOI : 10.1016/j.gene.2010.12.012.
- (2011b). « The zebrafish genes encoding the Polycomb repressive complex (PRC) 1 ». *Gene* 475.1, p. 10–21. DOI : 10.1016/j.gene.2010.12.012.
- Lee, Min Gyu, Raffaella Villa, Patrick Trojer, Jessica Norman, Kai-Ping Yan, Danny Reinberg, Luciano Di Croce et Ramin Shiekhattar (2007). « Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination ». *Science* 318.5849, p. 447–450. DOI : 10.1126/science.1149042.
- Lee, Tong Ihn et al. (2006). « Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells ». *Cell* 125.2, p. 301–313. DOI : 10.1016/j.cell.2006.02.043.
- Leeb, Martin, Diego Pasini, Maria Novatchkova, Markus Jaritz, Kristian Helin et Anton Wutz (2010). « Polycomb complexes act redundantly to repress genomic repeats and genes ». *Genes Dev.* 24.3, p. 265–276. DOI : 10.1101/gad.544410.
- Levine, Stuart S, Alona Weiss, Hediye Erdjument-Bromage, Zhaohui Shao, Paul Tempst et Robert E Kingston (2002). « The core of the polycomb repressive complex is com-

- positionally and functionally conserved in flies and humans ». *Mol. Cell. Biol.* 22.17, p. 6070–6078.
- Levinger, L. et A. Varshavsky (1982). « Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the Drosophila genome ». *Cell* 28.2, p. 375–385.
- Li, H, R Fan, M Sun, T Jiang et Y Gong (2013a). « Nspc1 regulates the key pluripotent Oct4-Nanog-Sox2 axis in P19 embryonal carcinoma cells via directly activating Oct4. » *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440.4, p. 527–532. DOI : 10.1016/j.bbrc.2013.09.095.
- Li, Jiali, Ronald P. Hart, Elyse M. Mallimo, Mavis R. Swerdel, Alexander W. Kusnecov et Karl Herrup (2013b). « EZH2-mediated H3K27 trimethylation mediates neurodegeneration in ataxia-telangiectasia ». *Nat. Neurosci* 16.12, p. 1745–1753. DOI : 10.1038/nn.3564.
- Li, Lixin, Marek J. Piatek, Ahmed Atef, Agnieszka Piatek, Anjar Wibowo, Xiaoyun Fang, J. S. M. Sabir, Jian-Kang Zhu et Magdy M. Mahfouz (2012). « Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification ». *Plant Mol. Biol.* 78.4-5, p. 407–416. DOI : 10.1007/s11103-012-9875-4.
- Li, Ting, Sheng Huang, Xuefeng Zhao, David A. Wright, Susan Carpenter, Martin H. Spalding, Donald P. Weeks et Bing Yang (2011). « Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes ». *Nucleic Acid Res.* 39.14, p. 6315–6325. DOI : 10.1093/nar/gkr188.
- Li, Xin, Maria E. Gonzalez, Katherine Toy, Tracey Filzen, Sofia D. Merajver et Celina G. Kleer (2009). « Targeted Overexpression of EZH2 in the Mammary Gland Disrupts Ductal Morphogenesis and Causes Epithelial Hyperplasia ». *Am. J. Pathol.* 175.3, p. 1246–1254. DOI : 10.2353/ajpath.2009.090042.
- Li, Zhizhong, Ru Cao, Ming Wang, Michael P. Myers, Yi Zhang et Rui-Ming Xu (2006). « Structure of a Bmi-1-Ring1B polycomb group ubiquitin ligase complex ». *J. Biol. Chem.* 281.29, p. 20643–20649. DOI : 10.1074/jbc.M602461200.
- Lieber, Michael R. (2008). « The mechanism of human nonhomologous DNA end joining ». *J. Biol. Chem.* 283.1, p. 1–5. DOI : 10.1074/jbc.R700039200.
- Lin, Pei-Chin, Hsien-Da Huang, Chun-Chi Chang, Ya-Sian Chang, Ju-Chen Yen, Chien-Chih Lee, Wen-Hsin Chang, Ta-Chih Liu et Jan-Gowth Chang (2016). « Long non-

- coding RNA TUG1 is downregulated in non-small cell lung cancer and can regulate CELF1 on binding to PRC2 ». *BMC cancer* 16, p. 583. DOI : 10.1186/s12885-016-2569-6.
- Lin, Shih-Ching, Yu-Yun Chang et Chih-Chiang Chan (2014). « Strategies for gene disruption in *Drosophila* ». *Cell & Bioscience* 4.1, p. 63. DOI : 10.1186/2045-3701-4-63.
- Lindeman, Leif C. et al. (2011). « Prepatterning of developmental gene expression by modified histones before zygotic genome activation ». *Dev. Cell.* 21.6, p. 993–1004. DOI : 10.1016/j.devcel.2011.10.008.
- Linder, Bastian, Anja Hirmer, Andreas Gal, Klaus Rütger, Hanno Jörn Bolz, Christoph Winkler, Bernhard Laggerbauer et Utz Fischer (2014). « Identification of a PRPF4 Loss-of-Function Variant That Abrogates U4/U6.U5 Tri-snRNP Integration and Is Associated with Retinitis Pigmentosa ». *PLOS ONE* 9.11, e111754. DOI : 10.1371/journal.pone.0111754.
- Liu, Bo et al. (2013). « Cbx4 regulates the proliferation of thymic epithelial cells and thymus function ». *Development* 140.4, p. 780–788. DOI : 10.1242/dev.085035.
- Liu, Can et al. (2017a). « MicroRNA-141 suppresses prostate cancer stem cells and metastasis by targeting a cohort of pro-metastasis genes ». *Nature Commun* 8, p. 14270. DOI : 10.1038/ncomms14270.
- Liu, Jinxia, Cuihua Lu, Mingbing Xiao, Feng Jiang, Lishuai Qu et Runzhou Ni (2017b). « Long non-coding RNA SNHG20 predicts a poor prognosis for HCC and promotes cell invasion by regulating the epithelial-to-mesenchymal transition ». *Biomed Pharmacother*, p. 857–863. DOI : 10.1016/j.biopha.2017.01.011.
- Liu, Jiyong et al. (2012). « Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy ». *J Genet Genomics* 39.5, p. 209–215. DOI : 10.1016/j.jgg.2012.04.003.
- Liu, Shu et Steven D. Leach (2011). « Screening pancreatic oncogenes in zebrafish using the Gal4/UAS system ». *Methods Cell Biol.* 105, p. 367–381. DOI : 10.1016/B978-0-12-381320-6.00015-1.
- Liu, Xiaoyu et al. (2016). « Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos ». *Nature* 537.7621, p. 558–562. DOI : 10.1038/nature19362.

- Loosli, Felix, Wendy Staub, Karin C. Finger-Baier, Elke A. Ober, Heather Verkade, Joachim Wittbrodt et Herwig Baier (2003). « Loss of eyes in zebrafish caused by mutation of *chokh/rx3* ». *EMBO Reports* 4.9, p. 894–899. DOI : 10.1038/sj.embor.embor919.
- Lu, Fu-I., Yong-Hua Sun, Chang-Yong Wei, Christine Thisse et Bernard Thisse (2014). « Tissue-specific derepression of TCF/LEF controls the activity of the Wnt/ β -catenin pathway ». *Nature Commun* 5, p. 5368. DOI : 10.1038/ncomms6368.
- Lu, Zhipeng, Ava C. Carter et Howard Y. Chang (2017). « Mechanistic insights in X-chromosome inactivation ». *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 372.1733. DOI : 10.1098/rstb.2016.0356.
- Luis, Nuno Miguel et al. (2011). « Regulation of human epidermal stem cell proliferation and senescence requires polycomb- dependent and -independent functions of Cbx4 ». *Cell Stem Cell* 9.3, p. 233–246. DOI : 10.1016/j.stem.2011.07.013.
- Luis, Nuno Miguel, Lluís Morey, Luciano Di Croce et Salvador Aznar Benitah (2012). « Polycomb in stem cells: PRC1 branches out ». *Cell Stem Cell* 11.1, p. 16–21. DOI : 10.1016/j.stem.2012.06.005.
- Luo, Ming, Zuwei Li, Wei Wang, Yigang Zeng, Zhihong Liu et Jianxin Qiu (2013). « Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression ». *Cancer Lett.* 333.2, p. 213–221. DOI : 10.1016/j.canlet.2013.01.033.
- Ma, Chenchao, Kate Nong, Hongda Zhu, Weiwei Wang, Xinyu Huang, Zhou Yuan et Kaixing Ai (2014). « H19 promotes pancreatic cancer metastasis by derepressing let-7's suppression on its target HMGA2-mediated EMT ». *Tumor Biol* 35.9, p. 9163–9169. DOI : 10.1007/s13277-014-2185-5.
- Ma, Chenhui, Guannan Wu, Qingqing Zhu, Hongbing Liu, Yanwen Yao, Dongmei Yuan, Yafang Liu, Tangfeng Lv et Yong Song (2017). « Long intergenic noncoding RNA 00673 promotes non-small-cell lung cancer metastasis by binding with EZH2 and causing epigenetic silencing of HOXA5 ». *Oncotarget* 8.20, p. 32696–32705. DOI : 10.18632/oncotarget.16158.
- Ma, Hong-Wei et al. (2016). « The pseudogene derived long noncoding RNA DUXAP8 promotes gastric cancer cell proliferation and migration via epigenetically silencing PLEKHO1 expression ». *Oncotarget*. DOI : 10.18632/oncotarget.11075.

- Ma, Yanlei, Peng Zhang, Feng Wang, Jianjun Yang, Zhe Yang et Huanlong Qin (2010). « The relationship between early embryo development and tumourigenesis ». *J. Cell. Mol. Med.* 14.12, p. 2697–2701. DOI : 10.1111/j.1582-4934.2010.01191.x.
- Maack, G. et H. Segner (2003). « Morphological development of the gonads in zebrafish ». *J. Fish Biol.* 62.4, p. 895–906. DOI : 10.1046/j.1095-8649.2003.00074.x.
- Maaswinkel, Hans, Jason Q. Ren et Lei Li (2003). « Slow-progressing photoreceptor cell degeneration in night blindness c mutant zebrafish ». *J. Neurocytol.* 32.9, p. 1107–1116. DOI : 10.1023/B:NEUR.0000021905.33091.f1.
- MacDonald, Bryan T., Keiko Tamai et Xi He (2009). « Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases ». *Dev. Cell.* 17.1, p. 9–26. DOI : 10.1016/j.devcel.2009.06.016.
- Madsen, Eriko (2010). *Mechanisms of Copper Deficiency in the Zebrafish Embryo - view-content.cgi*.
- Maenner, Sylvain et al. (2010). « 2-D Structure of the A Region of Xist RNA and Its Implication for PRC2 Association ». *PLoS Biol.* 8.1, e1000276. DOI : 10.1371/journal.pbio.1000276.
- Maertens, Goedele N., Selma El Messaoudi-Aubert, Tomas Racek, Julie K. Stock, James Nicholls, Marc Rodriguez-Niedenführ, Jesus Gil et Gordon Peters (2009). « Several Distinct Polycomb Complexes Regulate and Co-Localize on the INK4a Tumor Suppressor Locus ». *PLOS ONE* 4.7, e6380. DOI : 10.1371/journal.pone.0006380.
- Mak, Amanda Nga-Sze, Philip Bradley, Raul A Cernadas, Adam J Bogdanove et Barry L Stoddard (2012). « The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target ». *Science* 335.6069, p. 716–719. DOI : 10.1126/science.1216211.
- Mali, Prashant, Luhan Yang, Kevin M. Esvelt, John Aach, Marc Guell, James E. DiCarlo, Julie E. Norville et George M. Church (2013). « RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9 ». *Science* 339.6121, p. 823–826. DOI : 10.1126/science.1232033.
- Maresca, Marcello, Victor Guosheng Lin, Ning Guo et Yi Yang (2013). « Obligate ligation-gated recombination (ObLiGaRe): custom-designed nuclease-mediated targeted integration through nonhomologous end joining ». *Genome Res.* 23.3, p. 539–546. DOI : 10.1101/gr.145441.112.
- Margueron, Raphael, Guohong Li, Kavitha Sarma, Alexandre Blais, Jiri Zavadil, Christopher L. Woodcock, Brian D. Dynlacht et Danny Reinberg (2008). « Ezh1 and Ezh2

- maintain repressive chromatin through different mechanisms ». *Mol. Cell.* 32.4, p. 503–518. DOI : 10.1016/j.molcel.2008.11.004.
- Margueron, Raphael et al. (2009). « Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks ». *Nature* 461.7265, p. 762–767. DOI : 10.1038/nature08398.
- Margueron, Raphaël et Danny Reinberg (2011). « The Polycomb complex PRC2 and its mark in life ». *Nature* 469.7330, p. 343–349. DOI : 10.1038/nature09784.
- Mari, Pierre-Olivier et al. (2006). « Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4 ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103.49, p. 18597–18602. DOI : 10.1073/pnas.0609061103.
- Markmiller, Sebastian et al. (2014). « Minor class splicing shapes the zebrafish transcriptome during development ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111.8, p. 3062–3067. DOI : 10.1073/pnas.1305536111.
- Mathew, Lijoy K., Sumitra Sengupta, Atsushi Kawakami, Eric A. Andreasen, Christiane V. Löhr, Catherine A. Loynes, Stephen A. Renshaw, Randall T. Peterson et Robert L. Tanguay (2007). « Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics ». *J. Biol. Chem.* 282.48, p. 35202–35210. DOI : 10.1074/jbc.M706640200.
- Matsukawa, Yasuko, Shuho Semba, Hirotaka Kato, Akihiko Ito, Kazuyoshi Yanagihara et Hiroshi Yokozaki (2006). « Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer ». *Cancer Sci.* 97.6, p. 484–491. DOI : 10.1111/j.1349-7006.2006.00203.x.
- McCabe, Michael T et al. (2012). « EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations ». *Nature* 492.7427, p. 108–112. DOI : 10.1038/nature11606.
- Miao, Liyun, Zhen Huang, Zhang Zengli, Hui Li, Qiufang Chen, Chenyun Yao, Hourong Cai, Yonglong Xiao, Hongping Xia et Yongsheng Wang (2016). « Loss of long non-coding RNA FOXF1-AS1 regulates epithelial-mesenchymal transition, stemness and metastasis of non-small cell lung cancer cells ». *Oncotarget* 7.42, p. 68339–68349. DOI : 10.18632/oncotarget.11630.
- Michailidou, Christina, Mary Jones, Paul Walker, Jivko Kamarashev, Amanda Kelly et Adam F. L. Hurlstone (2009). « Dissecting the roles of Raf- and PI3K-signalling path-

- ways in melanoma formation and progression in a zebrafish model ». *Dis. Model Mech.* 2.7-8, p. 399–411. DOI : 10.1242/dmm.001149.
- Mihaly, J., R. K. Mishra et F. Karch (1998). « A conserved sequence motif in Polycomb-response elements ». *Mol. Cell.* 1.7, p. 1065–1066.
- Miller, J., A. D. McLachlan et A. Klug (1985). « Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes ». *EMBO J.* 4.6, p. 1609–1614.
- Miller, Jeffrey C. et al. (2007). « An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing ». *Nat. Biotechnol.* 25.7, p. 778–785. DOI : 10.1038/nbt1319.
- Miller, Jeffrey C et al. (2011). « A TALE nuclease architecture for efficient genome editing ». *Nat. Biotechnol.* 29.2, p. 143–148. DOI : 10.1038/nbt.1755.
- Min, Jinrong, Yi Zhang et Rui-Ming Xu (2003). « Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27 ». *Genes Dev.* 17.15, p. 1823–1828. DOI : 10.1101/gad.269603.
- Minnebo, Nikki et al. (2013). « NIPP1 maintains EZH2 phosphorylation and promoter occupancy at proliferation-related target genes ». *Nucleic Acid Res.* 41.2, p. 842–854. DOI : 10.1093/nar/gks1255.
- Mione, Marina C. et Nikolaus S. Trede (2010). « The zebrafish as a model for cancer ». *Dis Model Mech* 3.9-10, p. 517–523. DOI : 10.1242/dmm.004747.
- Miranda, Tina Branscombe, Connie C. Cortez, Christine B. Yoo, Gangning Liang, Masanobu Abe, Theresa K. Kelly, Victor E. Marquez et Peter A. Jones (2009). « DZNep Is a Global Histone Methylation Inhibitor that Reactivates Developmental Genes Not Silenced by DNA Methylation ». *Mol. Cancer Ther.* 8.6, p. 1579–1588. DOI : 10.1158/1535-7163.MCT-09-0013.
- Meyer, Axel et Yves Van de Peer (2005). « From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD) ». *BioEssays* 27.9, p. 937–945. DOI : 10.1002/bies.20293.
- Moazed, D. et P. H. O’Farrell (1992). « Maintenance of the engrailed expression pattern by Polycomb group genes in *Drosophila* ». *Development* 116.3, p. 805–810.
- Mochida, Ganeshwaran H. et al. (2012). « CHMP1A encodes an essential regulator of BMI1-INK4A in cerebellar development ». *Na. Gent.* 44.11, p. 1260–1264. DOI : 10.1038/ng.2425.

- Mohn, Fabio, Michael Weber, Michael Rebhan, Tim C. Roloff, Jens Richter, Michael B. Stadler, Miriam Bibel et Dirk Schübeler (2008). « Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors ». *Mol. Cell*. 30.6, p. 755–766. DOI : 10.1016/j.molcel.2008.05.007.
- Montgomery, Nathan D., Della Yee, Andrew Chen, Sundeep Kalantry, Stormy J. Chamberlain, Arie P. Otte et Terry Magnuson (2005). « The murine polycomb group protein Eed is required for global histone H3 lysine-27 methylation ». *Curr. Biol*. 15.10, p. 942–947. DOI : 10.1016/j.cub.2005.04.051.
- Morbitzer, Robert, Janett Elsaesser, Jens Hausner et Thomas Lahaye (2011). « Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning ». *Nucleic Acid Res*. 39.13, p. 5790–5799. DOI : 10.1093/nar/gkr151.
- Morey, Lluís, Gloria Pascual, Luca Cozzuto, Guglielmo Roma, Anton Wutz, Salvador Aznar Benitah et Luciano Di Croce (2012). « Nonoverlapping functions of the Polycomb group Cbx family of proteins in embryonic stem cells ». *Cell Stem Cell* 10.1, p. 47–62. DOI : 10.1016/j.stem.2011.12.006.
- Morey, Lluís, Alexandra Santanach, Enrique Blanco, Luigi Aloia, Elphège P. Nora, Benoit G. Bruneau et Luciano Di Croce (2015). « Polycomb Regulates Mesoderm Cell Fate-Specification in Embryonic Stem Cells through Activation and Repression Mechanisms ». *Cell Stem Cell* 17.3, p. 300–315. DOI : 10.1016/j.stem.2015.08.009.
- Morin, Ryan D et al. (2010). « Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin ». *Nat. Genet*. 42.2, p. 181–185. DOI : 10.1038/ng.518.
- Mullins, M. C. et al. (1996). « Genes establishing dorsoventral pattern formation in the zebrafish embryo: the ventral specifying genes ». *Development* 123, p. 81–93.
- Musselman, Catherine A., Marie-Eve Lalonde, Jacques Côté et Tatiana G. Kutateladze (2012). « Perceiving the epigenetic landscape through histone readers ». *Nat. Struct. Mol. Biol*. 19.12, p. 1218–1227. DOI : 10.1038/nsmb.2436.
- Mussolino, Claudio, Robert Morbitzer, Fabienne Lütge, Nadine Dannemann, Thomas Lahaye et Toni Cathomen (2011). « A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity ». *Nucleic Acid Res*. 39.21, p. 9283–9293. DOI : 10.1093/nar/gkr597.

- Müller, Jürg, Craig M Hart, Nicole J Francis, Marcus L Vargas, Aditya Sengupta, Brigitte Wild, Ellen L Miller, Michael B O'Connor, Robert E Kingston et Jeffrey A Simon (2002). « Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex ». *Cell* 111.2, p. 197–208.
- NCT01611675*.
- Nechiporuk, Alex et Mark T. Keating (2002). « A proliferation gradient between proximal and msxb-expressing distal blastema directs zebrafish fin regeneration ». *Development* 129.11, p. 2607–2617.
- Neira, José L., Mónica Román-Trufero, Lellys M. Contreras, Jesús Prieto, Gagandeep Singh, Francisco N. Barrera, M. Lourdes Renart et Miguel Vidal (2009). « The transcriptional repressor RYBP is a natively unfolded protein which folds upon binding to DNA ». *Biochemistry* 48.6, p. 1348–1360. DOI : 10.1021/bi801933c.
- Nekrasov, Maxim, Tetyana Klymenko, Sven Fraterman, Bernadett Papp, Katarzyna Oktaba, Thomas Köcher, Adrian Cohen, Hendrik G Stunnenberg, Matthias Wilm et Jürg Müller (2007). « Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes ». *The EMBO J.* 26.18, p. 4078–4088. DOI : 10.1038/sj.emboj.7601837.
- Ng, Annie N. Y., Tanya A. de Jong-Curtain, David J. Mawdsley, Sara J. White, Jimann Shin, Bruce Appel, P. Duc Si Dong, Didier Y. R. Stainier et Joan K. Heath (2005). « Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis ». *Dev. Biol.* 286.1, p. 114–135. DOI : 10.1016/j.ydbio.2005.07.013.
- Nguyen, V., K. Deschet, T. Henrich, E. Godet, J. S. Joly, J. Wittbrodt, D. Chourrout et F. Bourrat (1999). « Morphogenesis of the optic tectum in the medaka (*Oryzias latipes*): a morphological and molecular study, with special emphasis on cell proliferation ». *J. Comp. Neurol.* 413.3, p. 385–404.
- Nick McElhinny, Stephanie A., Carey M. Snowden, Joseph McCarville et Dale A. Ramsden (2000). « Ku Recruits the XRCC4-Ligase IV Complex to DNA Ends ». *Mol. Cell. Biol.* 20.9, p. 2996–3003.
- Nissen, Robert M., Jizhou Yan, Adam Amsterdam, Nancy Hopkins et Shawn M. Burgess (2003). « Zebrafish foxi one modulates cellular responses to Fgf signaling required for the integrity of ear and jaw patterning ». *Development* 130.11, p. 2543–2554.

- Niu, Yuchun, Feng Ma, Weimei Huang, Shun Fang, Man Li, Ting Wei et Linlang Guo (2017). « Long non-coding RNA TUG1 is involved in cell growth and chemoresistance of small cell lung cancer by regulating LIMK2b via EZH2 ». *Mol. Cancer* 16. DOI : 10.1186/s12943-016-0575-6.
- Nyholm, Molly K., Shan-Fu Wu, Richard I. Dorsky et Yevgenya Grinblat (2007). « The zebrafish *zic2a-zic5* gene pair acts downstream of canonical Wnt signaling to control cell proliferation in the developing tectum ». *Development* 134.4, p. 735–746. DOI : 10.1242/dev.02756.
- Nüsslein-Volhard, Christiane (2012). « The zebrafish issue of *Development* ». *Development* 139.22, p. 4099–4103. DOI : 10.1242/dev.085217.
- O'Carroll, D, S Erhardt, M Pagani, S C Barton, M A Surani et T Jenuwein (2001). « The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development ». *Mol. Cell. Biol.* 21.13, p. 4330–4336. DOI : 10.1128/MCB.21.13.4330-4336.2001.
- Ogawa, Hidesato, Kei-ichiro Ishiguro, Stefan Gaubatz, David M. Livingston et Yoshihiro Nakatani (2002). « A Complex with Chromatin Modifiers That Occupies E2F- and Myc-Responsive Genes in G0 Cells ». *Science* 296.5570, p. 1132–1136. DOI : 10.1126/science.1069861.
- Oh, Juhyun, Yang David Lee et Amy J Wagers (2014). « Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities ». *Nat. Med.* 20.8, p. 870–880. DOI : 10.1038/nm.3651.
- Olden, Tasha, Tanveer Akhtar, Sarah A. Beckman et Kenneth N. Wallace (2008). « Differentiation of the zebrafish enteric nervous system and intestinal smooth muscle ». *Genesis* 46.9, p. 484–498. DOI : 10.1002/dvg.20429.
- O'Loghlen, Ana et al. (2012). « MicroRNA regulation of *Cbx7* mediates a switch of Polycomb orthologs during ESC differentiation ». *Cell Stem Cell* 10.1, p. 33–46. DOI : 10.1016/j.stem.2011.12.004.
- Palacios, Daniela et al. (2010). « TNF/p38 α /polycomb signaling to *Pax7* locus in satellite cells links inflammation to the epigenetic control of muscle regeneration ». *Cell stem cell* 7.4, p. 455–469. DOI : 10.1016/j.stem.2010.08.013.
- Pan, Fan, Naishun Liao, Youshi Zheng, Yingchao Wang, Yunzhen Gao, Sen Wang, Yi Jiang et Xiaolong Liu (2015). « Intrahepatic transplantation of adipose-derived stem

- cells attenuates the progression of non-alcoholic fatty liver disease in rats ». *Mol Med Rep* 12.3, p. 3725–3733. DOI : 10.3892/mmr.2015.3847.
- Pandey, Radha Raman, Tanmoy Mondal, Faizaan Mohammad, Stefan Enroth, Lisa Redrup, Jan Komorowski, Takashi Nagano, Debora Mancini-Dinardo et Chandrasekhar Kanduri (2008). « Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation ». *Mol. Cell.* 32.2, p. 232–246. DOI : 10.1016/j.molcel.2008.08.022.
- Papp, Bernadett et Jürg Müller (2006). « Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins ». *Genes Dev.* 20.15, p. 2041–2054. DOI : 10.1101/gad.388706.
- Parichy, D. M. (2006). « Evolution of danio pigment pattern development ». *Heredity* 97.3, p. 200–210. DOI : 10.1038/sj.hdy.6800867.
- Park, J. T. et al. (2015). « Differential in vivo tumorigenicity of diverse KRAS mutations in vertebrate pancreas: A comprehensive survey ». *Oncogene* 34.21, p. 2801–2806. DOI : 10.1038/onc.2014.223.
- Parmentier, Caroline (2009). « POURQUOI LE POISSON ZEBRE? » *Revue française d'histotechnologie* 22.1, p. 49–62.
- Pasini, Diego, Adrian P Bracken, Michael R Jensen, Eros Lazzerini Denchi et Kristian Helin (2004). « Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity ». *EMBO J.* 23.20, p. 4061–4071. DOI : 10.1038/sj.emboj.7600402.
- Pasmant, Eric et al. (2011). « Role of noncoding RNA ANRIL in genesis of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1 ». *J. Natl. Cancer Inst.* 103.22, p. 1713–1722. DOI : 10.1093/jnci/djr416.
- Patel, Trushar R., Denise Nikodemus, Tabot M. D. Besong, Raphael Reuten, Markus Meier, Stephen E. Harding, Donald J. Winzor, Manuel Koch et Jörg Stetefeld (2016). « Biophysical analysis of a lethal laminin alpha-1 mutation reveals altered self-interaction ». *Matrix Biol.* 49, p. 93–105. DOI : 10.1016/j.matbio.2015.06.005.
- Pathania, Mallika, Elena V. Semina et Melinda K. Duncan (2014). « Lens Extrusion from Laminin Alpha 1 Mutant Zebrafish ». *Sci. Worldl J.* 2014, e524929. DOI : 10.1155/2014/524929.

- Pattanayak, Vikram, Steven Lin, John P. Guilinger, Enbo Ma, Jennifer A. Doudna et David R. Liu (2013). « High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity ». *Nat. Biotechnol.* 31.9, p. 839–843. DOI : 10.1038/nbt.2673.
- Patton, E. Elizabeth et al. (2005). « BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma ». *Curr. Biol.* 15.3, p. 249–254. DOI : 10.1016/j.cub.2005.01.031.
- Pauli, Andrea et al. (2012). « Systematic identification of long noncoding RNAs expressed during zebrafish embryogenesis ». *Genome Res.* 22.3, p. 577–591. DOI : 10.1101/gr.133009.111.
- Pemberton, Helen et al. (2014). « Genome-wide co-localization of Polycomb orthologs and their effects on gene expression in human fibroblasts ». *Genome Biol.* 15, R23. DOI : 10.1186/gb-2014-15-2-r23.
- Pengelly, Ana Raquel, Reinhard Kalb, Katja Finkl et Jürg Müller (2015). « Transcriptional repression by PRC1 in the absence of H2A monoubiquitylation ». *Genes Dev.* 29.14, p. 1487–1492. DOI : 10.1101/gad.265439.115.
- Percival, Stefanie M., Holly R. Thomas, Adam Amsterdam, Andrew J. Carroll, Jacqueline A. Lees, H. Joseph Yost et John M. Parant (2015). « Variations in dysfunction of sister chromatid cohesion in *esco2* mutant zebrafish reflect the phenotypic diversity of Roberts syndrome ». *Dis. Model Mech.* 8.8, p. 941–955. DOI : 10.1242/dmm.019059.
- Perez, Elena E. et al. (2008). « Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases ». *Nat. Biotechnol.* 26.7, p. 808–816. DOI : 10.1038/nbt1410.
- Pfaff, Kathleen L., Christian T. Straub, Ken Chiang, Daniel M. Bear, Yi Zhou et Leonard I. Zon (2007). « The zebra fish *cassiopeia* mutant reveals that SIL is required for mitotic spindle organization ». *Mol. Cell. Biol.* 27.16, p. 5887–5897. DOI : 10.1128/MCB.00175-07.
- Pfefferli, Catherine et Anna Jaźwińska (2015). « The art of fin regeneration in zebrafish ». *Regeneration* 2.2, p. 72–83. DOI : 10.1002/reg2.33.
- Picker, Alexander, Daniela Roellig, Olivier Pourquié, Andrew C. Oates et Michael Brand (2009). « Tissue micromanipulation in zebrafish embryos ». *Methods Mol. Biol.* 546, p. 153–172. DOI : 10.1007/978-1-60327-977-2_11.

- Piotrowski, T. et al. (1996). « Jaw and branchial arch mutants in zebrafish II: anterior arches and cartilage differentiation ». *Development* 123, p. 345–356.
- Popovic, Doris, Domagoj Vucic et Ivan Dikic (2014). « Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment ». *Nat. Med.* 20.11, p. 1242–1253. DOI : 10.1038/nm.3739.
- Portoso, Manuela, Roberta Ragazzini, Živa Brenčič, Arianna Moiani, Audrey Michaud, Ivaylo Vassilev, Michel Wassef, Nicolas Servant, Bruno Sargueil et Raphaël Margueron (2017). « PRC2 is dispensable for HOTAIR-mediated transcriptional repression ». *EMBO J.* e201695335. DOI : 10.15252/embj.201695335.
- Puppe, Julian et al. (2009). « BRCA1-deficient mammary tumor cells are dependent on EZH2 expression and sensitive to Polycomb Repressive Complex 2-inhibitor 3-deazaneplanocin A ». *Breast Cancer Res.* 11.4, R63. DOI : 10.1186/bcr2354.
- Puvvula, Pavan Kumar, Rohini Devi Desetty, Pascal Pineau, Agnès Marchio, Anne Moon, Anne Dejean et Oliver Bischof (2014). « Long noncoding RNA PANDA and scaffold-attachment-factor SAFA control senescence entry and exit ». *Nature Commun.* 5, p. 5323. DOI : 10.1038/ncomms6323.
- Qasim, Waseem et al. (2015). « First clinical application of Talen engineered universal CAR19 T cells in B-ALL ». *Blood* 126.
- Qi, Fuzhen, Xianghua Liu, Hao Wu, Xiang Yu, Chenchen Wei, Xiaodan Huang, Guozhong Ji, Fengqi Nie et Keming Wang (2017a). « Long noncoding AGAP2-AS1 is activated by SP1 and promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer ». *J Hematol Oncol* 10.1, p. 48. DOI : 10.1186/s13045-017-0420-4.
- Qi, Wei et al. (2012). « Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109.52, p. 21360–21365. DOI : 10.1073/pnas.1210371110.
- Qi, Wei et al. (2017b). « An allosteric PRC2 inhibitor targeting the H3K27me3 binding pocket of EED ». *Nat. Chem. Biol.* 13.4, p. 381–388. DOI : 10.1038/nchembio.2304.
- Qi, Ying et al. (2016). « MALAT1 long ncRNA promotes gastric cancer metastasis by suppressing PCDH10 ». *Oncotarget* 7.11, p. 12693–12703. DOI : 10.18632/oncotarget.7281.
- Qin, Jinzhong et al. (2012). « The polycomb group protein L3mbtl2 assembles an atypical PRC1-family complex that is essential in pluripotent stem cells and early development ». *Cell Stem Cell* 11.3, p. 319–332. DOI : 10.1016/j.stem.2012.06.002.

- Quach, Helen Ngoc Bao et al. (2015). « A Multifunctional Mutagenesis System for Analysis of Gene Function in Zebrafish ». *G3* 5.6, p. 1283–1299. DOI : 10.1534/g3.114.015842.
- Ran, F. Ann et al. (2013). « Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity ». *Cell* 154.6, p. 1380–1389. DOI : 10.1016/j.cell.2013.08.021.
- Ransom, D. G. et al. (1996). « Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis ». *Development* 123, p. 311–319.
- Recher, Gaëlle et al. (2013). « Zebrafish midbrain slow-amplifying progenitors exhibit high levels of transcripts for nucleotide and ribosome biogenesis ». *Development* 140.24, p. 4860–4869. DOI : 10.1242/dev.099010.
- « Regulation of Human Breast Cancer by the Long Non-Coding RNA H19 ». 18.
- Reischauer, Sven, Mitchell P. Levesque, Christiane Nüsslein-Volhard et Mahendra Sonawane (2009). « Lgl2 Executes Its Function as a Tumor Suppressor by Regulating ErbB Signaling in the Zebrafish Epidermis ». *PLoS Genet.* 5.11, e1000720. DOI : 10.1371/journal.pgen.1000720.
- Ren, Xiaojun et Tom K. Kerppola (2011). « REST Interacts with Cbx Proteins and Regulates Polycomb Repressive Complex 1 Occupancy at RE1 Elements ». *Mol. Cell. Biol.* 31.10, p. 2100–2110. DOI : 10.1128/MCB.05088-11.
- Reyon, Deepak, Shengdar Q. Tsai, Cyd Khayter, Jennifer A. Foden, Jeffrey D. Sander et J. Keith Joung (2012). « FLASH Assembly of TALENs Enables High-Throughput Genome Editing ». *Nat. Biotechnol.* 30.5, p. 460–465. DOI : 10.1038/nbt.2170.
- Richon, Victoria M., Danielle Johnston, Christopher J. Sneeringer, Lei Jin, Christina R. Majer, Keith Elliston, L. Fred Jerva, Margaret Porter Scott et Robert A. Copeland (2011). « Chemogenetic analysis of human protein methyltransferases ». *Chem Biol Drug Des* 78.2, p. 199–210. DOI : 10.1111/j.1747-0285.2011.01135.x.
- Riising, Eva Madi, Roberto Boggio, Susanna Chiocca, Kristian Helin et Diego Pasini (2008). « The Polycomb Repressive Complex 2 Is a Potential Target of SUMO Modifications ». *PLoS ONE* 3.7. DOI : 10.1371/journal.pone.0002704.
- Riley, B. B. et S. J. Moorman (2000). « Development of utricular otoliths, but not saccular otoliths, is necessary for vestibular function and survival in zebrafish ». *J. Neurobiol.* 43.4, p. 329–337.

- Robinson, Tamara (2010). *Zebrafish mutant ninjaos5 (nij) is required for enteric neuron and craniofacial cartilage development and Zebrafish mutant hatchbackos20 (hbk) is required for trunk neural crest development*.
- Rodino-Klapac, Louise R. et Christine E. Beattie (2004). « Zebrafish topped is required for ventral motor axon guidance ». *Dev. Biol.* 273.2, p. 308–320. DOI : 10.1016/j.ydbio.2004.06.007.
- Rose, Nathan R., Hamish W. King, Neil P. Blackledge, Nadezda A. Fursova, Katherine JI Ember, Roman Fischer, Benedikt M. Kessler et Robert J. Klose (2016). « RYBP stimulates PRC1 to shape chromatin-based communication between Polycomb repressive complexes ». *eLife* 5, e18591. DOI : 10.7554/eLife.18591.
- Ross, Pablo J., Neli P. Ragina, Ramon M. Rodriguez, Amy E. Iager, Kannika Siripattaraprat, Nestor Lopez-Corrales et Jose B. Cibelli (2008). « Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development ». *Reproduction* 136.6, p. 777–785. DOI : 10.1530/REP-08-0045.
- Rudeck, Steven, Christelle Etard, Muzamil M. Khan, Wolfgang Rottbauer, Rüdiger Rudolf, Uwe Strähle et Steffen Just (2016). « A compact unc45b-promoter drives muscle-specific expression in zebrafish and mouse ». *Genesis* 54.8, p. 431–438. DOI : 10.1002/dvg.22953.
- Rösel, Tanja Dorothe, Lee-Hsueh Hung, Jan Medenbach, Katrin Donde, Stefan Starke, Vladimir Benes, Gunnar Rättsch et Albrecht Bindereif (2011). « RNA-Seq analysis in mutant zebrafish reveals role of U1C protein in alternative splicing regulation ». *EMBO J.* 30.10, p. 1965–1976. DOI : 10.1038/emboj.2011.106.
- Sahasrabudde, A. A., X. Chen, F. Chung, T. Velusamy, M. S. Lim et K. S. J. Elenitoba-Johnson (2015). « Oncogenic Y641 mutations in EZH2 prevent Jak2/ β -TrCP-mediated degradation ». *Oncogene* 34.4, p. 445–454. DOI : 10.1038/onc.2013.571.
- San, Bilge, Naomi D. Chrispijn, Nadine Wittkopp, Simon J. van Heeringen, Anne K. Legendijk, Marco Aben, Jeroen Bakkers, René F. Ketting et Leonie M. Kamminga (2016). « Normal formation of a vertebrate body plan and loss of tissue maintenance in the absence of ezh2 ». *Sci Rep* 6, p. 24658. DOI : 10.1038/srep24658.
- San Filippo, Joseph, Patrick Sung et Hannah Klein (2008). « Mechanism of eukaryotic homologous recombination ». *Annu. Rev. Biochem.* 77, p. 229–257. DOI : 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255.

- Sander, Sandrine, Lars Bullinger, Kay Klapproth, Katja Fiedler, Hans A. Kestler, Thomas F. E. Barth, Peter Möller, Stephan Stilgenbauer, Jonathan R. Pollack et Thomas Wirth (2008). « MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a ». *Blood* 112.10, p. 4202–4212. DOI : 10.1182/blood-2008-03-147645.
- Sarma, Kavitha, Raphael Margueron, Alexey Ivanov, Vincenzo Pirrotta et Danny Reinberg (2008). « Ezh2 Requires PHF1 To Efficiently Catalyze H3 Lysine 27 Trimethylation In Vivo ». *Mol. Cell. Biol.* 28.8, p. 2718–2731. DOI : 10.1128/MCB.02017-07.
- Schmid-Burgk, Jonathan L., Tobias Schmidt, Vera Kaiser, Klara Höning et Veit Hornung (2013). « A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes ». *Nat. Biotechnol.* 31.1, p. 76–81. DOI : 10.1038/nbt.2460.
- Schmitges, Frank W. et al. (2011). « Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks ». *Mol. Cell.* 42.3, p. 330–341. DOI : 10.1016/j.molcel.2011.03.025.
- Schoeftner, Stefan, Aditya K. Sengupta, Stefan Kubicek, Karl Mechtler, Laura Spahn, Haruhiko Koseki, Thomas Jenuwein et Anton Wutz (2006). « Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing ». *The EMBO J.* 25.13, p. 3110–3122. DOI : 10.1038/sj.emboj.7601187.
- Schoorlemmer, J., C. Marcos-Gutiérrez, F. Were, R. Martínez, E. García, D. P. Satijn, A. P. Otte et M. Vidal (1997). « Ring1A is a transcriptional repressor that interacts with the Polycomb-M33 protein and is expressed at rhombomere boundaries in the mouse hindbrain ». *The EMBO J.* 16.19, p. 5930–5942. DOI : 10.1093/emboj/16.19.5930.
- Schuettengruber, Bernd, Mythily Ganapathi, Benjamin Leblanc, Manuela Portoso, Rami Jaschek, Bas Tolhuis, Maarten van Lohuizen, Amos Tanay et Giacomo Cavalli (2009). « Functional Anatomy of Polycomb and Trithorax Chromatin Landscapes in Drosophila Embryos ». *PLoS Biol.* 7.1, e1000013. DOI : 10.1371/journal.pbio.1000013.
- Schwartz, Yuri B., Tatyana G. Kahn, David A. Nix, Xiao-Yong Li, Richard Bourgon, Mark Biggin et Vincenzo Pirrotta (2006). « Genome-wide analysis of Polycomb targets in Drosophila melanogaster ». *Nat. Genet.* 38.6, p. 700–705. DOI : 10.1038/ng1817.
- Semina, Elena V., Dmitry V. Bosenko, Natalya C. Zinkevich, Kelly A. Soules, David R. Hyde, Thomas S. Vihtelic, Gregory B. Willer, Ronald G. Gregg et Brian A. Link (2006).

- « Mutations in laminin alpha 1 result in complex, lens-independent ocular phenotypes in zebrafish ». *Dev. Biol.* 299.1, p. 63–77. DOI : 10.1016/j.ydbio.2006.07.005.
- Senthilkumar, Ramamoorthy et Rakesh K. Mishra (2009). « Novel motifs distinguish multiple homologues of Polycomb in vertebrates: expansion and diversification of the epigenetic toolkit ». *BMC genomics* 10, p. 549. DOI : 10.1186/1471-2164-10-549.
- Seytanoglu, A., N. I. Alsomali, C. F. Valori, A. McGown, H. R. Kim, K. Ning, T. Ramesh, B. Sharrack, J. D. Wood et M. Azzouz (2016). « Deficiency in the mRNA export mediator Gle1 impairs Schwann cell development in the zebrafish embryo ». *Neuroscience* 322, p. 287–297. DOI : 10.1016/j.neuroscience.2016.02.039.
- Shao, Mingjing, Guangdong Chen, Fengli Lv, Yanyan Liu, Hongjun Tian, Ran Tao, Ronghuan Jiang, Wei Zhang et Chuanjun Zhuo (2017). « LncRNA TINCR attenuates cardiac hypertrophy by epigenetically silencing CaMKII ». *Oncotarget* 8.29, p. 47565–47573. DOI : 10.18632/oncotarget.17735.
- Shao, Z., F. Raible, R. Mollaaghababa, J. R. Guyon, C. T. Wu, W. Bender et R. E. Kingston (1999). « Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex ». *Cell* 98.1, p. 37–46. DOI : 10.1016/S0092-8674(00)80604-2.
- Sharma, Vikas et al. (2016). « Analysis of EZH2: micro-RNA network in low and high grade astrocytic tumors ». *Brain Tumor Pathol* 33.2, p. 117–128. DOI : 10.1007/s10014-015-0245-1.
- Shaver, Scott, J. Armando Casas-Mollano, Ronald L. Cerny et Heriberto Cerutti (2010). « Origin of the polycomb repressive complex 2 and gene silencing by an E(z) homolog in the unicellular alga *Chlamydomonas* ». *Epigenetics* 5.4, p. 301–312.
- Shen, Bin, Jun Zhang, Hongya Wu, Jianying Wang, Ke Ma, Zheng Li, Xueguang Zhang, Pumin Zhang et Xingxu Huang (2013). « Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting ». *Cell Res.* 23.5, p. 720–723. DOI : 10.1038/cr.2013.46.
- Shen, Xiaohua, Yingchun Liu, Yu-Jung Hsu, Yuko Fujiwara, Jonghwan Kim, Xiaohong Mao, Guo-Cheng Yuan et Stuart H. Orkin (2008). « EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency ». *Mol. Cell.* 32.4, p. 491–502. DOI : 10.1016/j.molcel.2008.10.016.
- Shepard, Jennifer L., Howard M. Stern, Kathleen L. Pfaff et James F. Amatruda (2004). « Analysis of the Cell Cycle in Zebrafish Embryos ». *Methods Cell Biol.* The Zebrafish:

- Cellular and Developmental Biology 76, p. 109–125. DOI : 10.1016/S0091-679X(04)76007-0.
- Shepard, Jennifer L. et al. (2005). « A zebrafish bmyb mutation causes genome instability and increased cancer susceptibility ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102.37, p. 13194–13199. DOI : 10.1073/pnas.0506583102.
- Shi, Bin et al. (2007). « Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells ». *Mol. Cell. Biol.* 27.14, p. 5105–5119. DOI : 10.1128/MCB.00162-07.
- Shi, Bingjie, Juan Li, Xuanling Shi, Wenxu Jia, Yi Wen, Xiongbing Hu, Fengfeng Zhuang, Jianzhong Xi et Linqi Zhang (2017). « TALEN-Mediated Knockout of CCR5 Confers Protection Against Infection of Human Immunodeficiency Virus ». *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 74.2, p. 229–241. DOI : 10.1097/QAI.0000000000001190.
- Shieh, Yun-Sheng, Yin-Shan Chang, Jiann-Ruey Hong, Li-Je Chen, Luen-Kuang Jou, Chia-Chun Hsu et Guor Mour Her (2010). « Increase of hepatic fat accumulation by liver specific expression of Hepatitis B virus X protein in zebrafish ». *BBA* 1801.7, p. 721–730. DOI : 10.1016/j.bbailip.2010.04.008.
- Shimizu, Nobuyuki, Koichi Kawakami et Tohru Ishitani (2012). « Visualization and exploration of Tcf/Lef function using a highly responsive Wnt/ β -catenin signaling-reporter transgenic zebrafish ». *Dev. Biol.* 370.1, p. 71–85. DOI : 10.1016/j.ydbio.2012.07.016.
- Shkumatava, Alena, Sabine Fischer, Ferenc Müller, Uwe Strahle et Carl J. Neumann (2004). « Sonic hedgehog, secreted by amacrine cells, acts as a short-range signal to direct differentiation and lamination in the zebrafish retina ». *Development* 131.16, p. 3849–3858. DOI : 10.1242/dev.01247.
- Si, Sha, Yaeko Nakajima-Takagi, Kazumasa Aoyama, Motohiko Oshima, Atsunori Saraya, Hiroki Sugishita, Manabu Nakayama, Tomoyuki Ishikura, Haruhiko Koseki et Atsushi Iwama (2016a). « Loss of Pcgf5 Affects Global H2A Monoubiquitination but Not the Function of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells ». *PLOS ONE* 11.5, e0154561. DOI : 10.1371/journal.pone.0154561.
- Si, Xinxin et al. (2016b). « LncRNA H19 confers chemoresistance in ER α -positive breast cancer through epigenetic silencing of the pro-apoptotic gene BIK ». *Oncotarget* 7.49, p. 81452–81462. DOI : 10.18632/oncotarget.13263.

- Sidhaye, Jaydeep, Clyde Savio Pinto, Shweta Dharap, Tressa Jacob, Shobha Bhargava et Mahendra Sonawane (2016). « The zebrafish goosepimples/myosin Vb mutant exhibits cellular attributes of human microvillus inclusion disease ». *Mech. Dev.* 142, p. 62–74. DOI : 10.1016/j.mod.2016.08.001.
- Simon, Camille et al. (2012). « A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia ». *Genes Dev.* 26.7, p. 651–656. DOI : 10.1101/gad.186411.111.
- Singh, Sumeet Pal, Jennifer E. Holdway et Kenneth D. Poss (2012). « Regeneration of amputated zebrafish fin rays from de novo osteoblasts ». *Dev. Cell.* 22.4, p. 879–886. DOI : 10.1016/j.devcel.2012.03.006.
- Solin, Staci L., Heather R. Shive, Kevin D. Woolard, Jeffrey J. Essner et Maura McGrail (2015). « Rapid tumor induction in zebrafish by TALEN-mediated somatic inactivation of the retinoblastoma1 tumor suppressor rb1 ». *Sci Rep* 5, p. 13745. DOI : 10.1038/srep13745.
- Solnica-Krezel, L. et W. Driever (2001). « The role of the homeodomain protein Bozozok in zebrafish axis formation ». *Int. J. Dev. Biol.* 45.1, p. 299–310.
- Son, Jinsook, Steven S. Shen, Raphael Margueron et Danny Reinberg (2013). « Nucleosome-binding activities within JARID2 and EZH1 regulate the function of PRC2 on chromatin ». *Genes Dev.* 27.24, p. 2663–2677. DOI : 10.1101/gad.225888.113.
- Sonawane, Mahendra, Yamila Carpio, Robert Geisler, Heinz Schwarz, Hans-Martin Maischein et Christiane Nuesslein-Volhard (2005). « Zebrafish penner/lethal giant larvae 2 functions in hemidesmosome formation, maintenance of cellular morphology and growth regulation in the developing basal epidermis ». *Development* 132.14, p. 3255–3265. DOI : 10.1242/dev.01904.
- Soules, Kelly A. et Brian A. Link (2005). « Morphogenesis of the anterior segment in the zebrafish eye ». *BMC Dev. Biol.* 5, p. 12. DOI : 10.1186/1471-213X-5-12.
- Sparmann, Anke et Maarten van Lohuizen (2006). « Polycomb silencers control cell fate, development and cancer ». *Nat. Rev. Cancer* 6.11, p. 846–856. DOI : 10.1038/nrc1991.
- Spence, Rowena, Gabriele Gerlach, Christian Lawrence et Carl Smith (2008). « The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio* ». *Biol Rev Cam Philo Soc* 83.1, p. 13–34. DOI : 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.

- Steffen, Leta S., Jeffrey R. Guyon, Emily D. Vogel, Melanie H. Howell, Yi Zhou, Gerhard J. Weber, Leonard I. Zon et Louis M. Kunkel (2007). « The zebrafish runzel muscular dystrophy is linked to the titin gene ». *Dev. Biol.* 309.2, p. 180–192. DOI : 10.1016/j.ydbio.2007.06.015.
- Stenkamp, Deborah L. (2015). « Chapter Twenty-Three - Development of the Vertebrate Eye and Retina ». *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Sous la dir. de J. Fielding Hejtmancik and John M. Nickerson. T. 134. Molecular Biology of Eye Disease. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2015.06.006. Academic Press, p. 397–414.
- Stewart, Scott, Zhi-Yang Tsun et Juan Carlos Izpisua Belmonte (2009). « A histone demethylase is necessary for regeneration in zebrafish ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106.47, p. 19889–19894. DOI : 10.1073/pnas.0904132106.
- Stewart, Scott, Alan W. Gomez, Benjamin E. Armstrong, Astra Henner et Kryn Stankunas (2014). « Sequential and opposing activities of Wnt and BMP coordinate zebrafish bone regeneration ». *Cell Rep* 6.3, p. 482–498. DOI : 10.1016/j.celrep.2014.01.010.
- Stojic, Lovorka et al. (2011). « Chromatin regulated interchange between polycomb repressive complex 2 (PRC2)-Ezh2 and PRC2-Ezh1 complexes controls myogenin activation in skeletal muscle cells ». *Epigenetics Chromatin* 4, p. 16. DOI : 10.1186/1756-8935-4-16.
- Stoletov, Konstantin, Hisashi Kato, Erin Zardouzian, Jonathan Kelber, Jing Yang, Sanford Shattil et Richard Klemke (2010). « Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells ». *J Cell Sci* 123.13, p. 2332–2341. DOI : 10.1242/jcs.069443.
- Streubel, Jana, Christina Blücher, Angelika Landgraf et Jens Boch (2012). « TAL effector RVD specificities and efficiencies ». *Nat. Biotechnol.* 30.7, p. 593–595. DOI : 10.1038/nbt.2304.
- Stumpf, Miriam, Suma Choorapoikayil et Jeroen den Hertog (2015). « Pten function in zebrafish: anything but a fish story ». *Methods* 77-78, p. 191–196. DOI : 10.1016/j.ymeth.2014.11.002.
- Su, I.-Hsin, Ashwin Basavaraj, Andrew N. Krutchinsky, Oliver Hobert, Axel Ullrich, Brian T. Chait et Alexander Tarakhovsky (2003). « Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement ». *Nat. Immunol.* 4.2, p. 124–131. DOI : 10.1038/ni876.

- Su, Jun et al. (2017). « Long noncoding RNA BLACAT1 indicates a poor prognosis of colorectal cancer and affects cell proliferation by epigenetically silencing of p15 ». *Cell Death Dis.* 8.3, e2665. DOI : 10.1038/cddis.2017.83.
- Sui, Cheng-Jun, Yan-Ming Zhou, Wei-Feng Shen, Bing-Hua Dai, Jiong-Jiong Lu, Min-Feng Zhang et Jia-Mei Yang (2016). « Long noncoding RNA GIHCG promotes hepatocellular carcinoma progression through epigenetically regulating miR-200b/a/429 ». *J. Mol. Med.* 94.11, p. 1281–1296. DOI : 10.1007/s00109-016-1442-z.
- Sun, Cheng-Cao, Shu-Jun Li, Guang Li, Rui-Xi Hua, Xu-Hong Zhou et De-Jia Li (2016). « Long Intergenic Noncoding RNA 00511 Acts as an Oncogene in Non-small-cell Lung Cancer by Binding to EZH2 and Suppressing p57 ». *Mol Ther Nucleic Acids* 5.11, e385. DOI : 10.1038/mtna.2016.94.
- Sung, Young Hoon, In-Jeoung Baek, Duk Hyoung Kim, Jisun Jeon, Jaehoon Lee, Kyunghee Lee, Daewon Jeong, Jin-Soo Kim et Han-Woong Lee (2013). « Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting ». *Nat. Biotechnol.* 31.1, p. 23–24. DOI : 10.1038/nbt.2477.
- Surface, Lauren E., Seraphim R. Thornton et Laurie A. Boyer (2010). « Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment ». *Cell Stem Cell* 7.3, p. 288–298. DOI : 10.1016/j.stem.2010.08.004.
- Suzuki, Maki et al. (2002). « Involvement of the Polycomb-group gene Ring1B in the specification of the anterior-posterior axis in mice ». *Development* 129.18, p. 4171–4183.
- Sánchez, Carmen, Inés Sánchez, Jeroen A. A. Demmers, Patrick Rodriguez, John Strouboulis et Miguel Vidal (2007). « Proteomics analysis of Ring1B/Rnf2 interactors identifies a novel complex with the Fbxl10/Jhdm1B histone demethylase and the Bcl6 interacting corepressor ». *MCP* 6.5, p. 820–834. DOI : 10.1074/mcp.M600275-MCP200.
- Tadros, Wael et Howard D. Lipshitz (2009). « The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts ». *Development* 136.18, p. 3033–3042. DOI : 10.1242/dev.033183.
- Takamiya, Masanari et al. (2015). « Molecular description of eye defects in the zebrafish Pax6b mutant, sunrise, reveals a Pax6b-dependent genetic network in the developing anterior chamber ». *PloS One* 10.2, e0117645. DOI : 10.1371/journal.pone.0117645.
- Tao, Ting et Jinrong Peng (2009). « Liver development in zebrafish (*Danio rerio*) ». *J Genet Genomics* 36.6, p. 325–334. DOI : 10.1016/S1673-8527(08)60121-6.

- Tardat, Mathieu, Mareike Albert, Rico Kunzmann, Zichuan Liu, Lilia Kaustov, Raphael Thierry, Shili Duan, Urszula Brykczynska, Cheryl H. Arrowsmith et Antoine H. F. M. Peters (2015). « Cbx2 targets PRC1 to constitutive heterochromatin in mouse zygotes in a parent-of-origin-dependent manner ». *Mol. Cell.* 58.1, p. 157–171. DOI : 10.1016/j.molcel.2015.02.013.
- Tatton-Brown, Katrina et al. (2013). « Weaver syndrome and EZH2 mutations: Clarifying the clinical phenotype ». *Am. J. Med. Genet. A* 161A.12, p. 2972–2980. DOI : 10.1002/ajmg.a.36229.
- Tavares, Lígia et al. (2012). « RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3 ». *Cell* 148.4, p. 664–678. DOI : 10.1016/j.cell.2011.12.029.
- Tawk, Marcel et Sophie Vríz (2003). « [Regeneration of vertebrate appendage: an old experimental model to study stem cells in the adult] ». *Med Sci (Paris)* 19.4, p. 465–471. DOI : 10.1051/medsci/2003194465.
- Taylor, Alison M., Jessica M. Humphries, Richard M. White, Ryan D. Murphey, Caroline E. Burns et Leonard I. Zon (2012). « Hematopoietic defects in rps29 mutant zebrafish depend upon p53 activation ». *Exp. Hematol.* 40.3, 228–237.e5. DOI : 10.1016/j.exphem.2011.11.007.
- Taylor, Michael R., James B. Hurley, Heather A. Van Epps et Susan E. Bockerhoff (2004). « A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101.13, p. 4584–4589. DOI : 10.1073/pnas.0307074101.
- Terashima, Minoru, Shoichiro Tange, Akihiko Ishimura et Takeshi Suzuki (2017). « MEG3 Long Noncoding RNA Contributes to the Epigenetic Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cell Lines ». eng. *J. Biol. Chem.* 292.1, p. 82–99. DOI : 10.1074/jbc.M116.750950.
- Theodosiou, Nicole A. et Clifford J. Tabin (2003). « Wnt signaling during development of the gastrointestinal tract ». *Dev. Biol.* 259.2, p. 258–271.
- Thomas, M. J. et E. Seto (1999). « Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? » *Gene* 236.2, p. 197–208.
- Tiso, Natascia, Enrico Moro et Francesco Argenton (2009). « Zebrafish pancreas development ». *Mol. Cell. Endocrinol.* 312.1-2, p. 24–30. DOI : 10.1016/j.mce.2009.04.018.

- Tokunaga, Akinori, Hirofumi Anai et Katsuhiko Hanada (2016). « Mechanisms of gene targeting in higher eukaryotes ». *Cell. Mol. life Sci.* 73.3, p. 523–533. DOI : 10.1007/s00018-015-2073-1.
- Tonkin, Emma, Donna-Marie Hagan, Weiping Li et Tom Strachan (2002). « Identification and characterisation of novel mammalian homologues of *Drosophila* polyhomeotic permits new insights into relationships between members of the polyhomeotic family ». *Human Genet.* 111.4-5, p. 435–442. DOI : 10.1007/s00439-002-0814-3.
- Traver, David, Barry H. Paw, Kenneth D. Poss, W. Todd Penberthy, Shuo Lin et Leonard I. Zon (2003). « Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants ». *Nat. Immunol.* 4.12, p. 1238–1246. DOI : 10.1038/ni1007.
- Trede, Nikolaus S. et al. (2007). « Network of coregulated spliceosome components revealed by zebrafish mutant in recycling factor p110 ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104.16, p. 6608–6613. DOI : 10.1073/pnas.0701919104.
- Trojer, Patrick et al. (2011). « L3MBTL2 protein acts in concert with PcG protein-mediated monoubiquitination of H2A to establish a repressive chromatin structure ». *Mol. Cell.* 42.4, p. 438–450. DOI : 10.1016/j.molcel.2011.04.004.
- Trowe, T. et al. (1996). « Mutations disrupting the ordering and topographic mapping of axons in the retinotectal projection of the zebrafish, *Danio rerio* ». *Development* 123, p. 439–450.
- Tu, Shiqi, Guo-Cheng Yuan et Zhen Shao (2017). « The PRC2-binding long non-coding RNAs in human and mouse genomes are associated with predictive sequence features ». *Sci Rep* 7, p. 41669. DOI : 10.1038/srep41669.
- Tzatsos, Alexandros, Raymond Pfau, Sotirios C. Kampranis et Philip N. Tsichlis (2009). « Ndy1/KDM2B immortalizes mouse embryonic fibroblasts by repressing the Ink4a/Arf locus ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106.8, p. 2641–2646. DOI : 10.1073/pnas.0813139106.
- Ulrich, Florian et al. (2016). « Reck enables cerebrovascular development by promoting canonical Wnt signaling ». *Development* 143.1, p. 147–159. DOI : 10.1242/dev.123059.
- Urnov, Fyodor D., Edward J. Rebar, Michael C. Holmes, H. Steve Zhang et Philip D. Gregory (2010). « Genome editing with engineered zinc finger nucleases ». *Nat. Rev. Genet.* 11.9, p. 636–646. DOI : 10.1038/nrg2842.

- Valk-Lingbeek, Merel E., Sophia W. M. Bruggeman et Maarten van Lohuizen (2004). « Stem cells and cancer; the polycomb connection ». *Cell* 118.4, p. 409–418. DOI : 10.1016/j.cell.2004.08.005.
- Valton, Julien, Aurélie Dupuy, Fayza Daboussi, Séverine Thomas, Alan Maréchal, Rachel Macmaster, Kevin Melliand, Alexandre Juillerat et Philippe Duchateau (2012). « Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation ». *J. Biol. Chem.* 287.46, p. 38427–38432. DOI : 10.1074/jbc.C112.408864.
- van den Hurk, R., W. G. Schoonen, G. A. van Zoelen et J. G. Lambert (1987). « The biosynthesis of steroid glucuronides in the testis of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, and their pheromonal function as ovulation inducers ». *Gen. Comp. Endocrinol.* 68.2, p. 179–188.
- van der Lugt, N. M., J. Domen, K. Linders, M. van Roon, E. Robanus-Maandag, H. te Riele, M. van der Valk, J. Deschamps, M. Sofroniew et M. van Lohuizen (1994). « Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the *bmi-1* proto-oncogene ». *Genes Dev.* 8.7, p. 757–769.
- van der Velden, Yu, Liqin Wang, Maarten van Lohuizen et Anna-Pavlina G. Haramis (2012). « The Polycomb group protein *Ring1b* is essential for pectoral fin development ». *Development* 139.12, p. 2210–2220. DOI : 10.1242/dev.077156.
- van der Velden, Yu, Liqin Wang, Laia Querol Cano et Anna-Pavlina G. Haramis (2013). « The Polycomb Group Protein *Ring1b/Rnf2* Is Specifically Required for Craniofacial Development ». *PLOS ONE* 8.9, e73997. DOI : 10.1371/journal.pone.0073997.
- van Heeringen, Simon J., Robert C. Akkers, Ila van Kruijsbergen, M. Asif Arif, Lars L.P. Hanssen, Nilofar Sharifi et Gert Jan C. Veenstra (2014). « Principles of nucleation of H3K27 methylation during embryonic development ». *Genome Res.* 24.3, p. 401–410. DOI : 10.1101/gr.159608.113.
- Vandamme, Julien, Pamela Völkel, Claire Rosnoblet, Perrine Le Faou et Pierre-Olivier Angrand (2011). « Interaction proteomics analysis of polycomb proteins defines distinct PRC1 complexes in mammalian cells ». *MCP* 10.4, p. M110.002642. DOI : 10.1074/mcp.M110.002642.

- Vanoevelen, Jo, Annelies Janssens, Leonie F. A. Huitema, Christina L. Hammond, Juriaan R. Metz, Gert Flik, Thomas Voets et Stefan Schulte-Merker (2011). « Trpv5/6 is vital for epithelial calcium uptake and bone formation ». *FASEB J.* 25.9, p. 3197–3207. DOI : 10.1096/fj.11-183145.
- Varambally, Sooryanarayana et al. (2002). « The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer ». *Nature* 419.6907, p. 624–629. DOI : 10.1038/nature01075.
- Vascotto, S. G., Y. Beckham et G. M. Kelly (1997). « The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology ». *Biochem. Cell Biol.* 75.5, p. 479–485.
- Verduzco, Daniel et James F. Amatruda (2011). « Analysis of cell proliferation, senescence, and cell death in zebrafish embryos ». *Methods Cell Biol.* 101, p. 19–38. DOI : 10.1016/B978-0-12-387036-0.00002-5.
- Vicente-Crespo, Marta et Isabel M. Palacios (2010). « Nonsense-mediated mRNA decay and development: shoot the messenger to survive? » *Biochem. Soc. Trans.* 38.6, p. 1500–1505. DOI : 10.1042/BST0381500.
- Voncken, Jan Willem, Bernard A. J. Roelen, Mieke Roefs, Stijn de Vries, Els Verhoeven, Silvia Marino, Jacqueline Deschamps et Maarten van Lohuizen (2003). « Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100.5, p. 2468–2473. DOI : 10.1073/pnas.0434312100.
- Voncken, Jan Willem, Hanneke Niessen, Bernd Neufeld, Ulrike Rennefahrt, Vivian Dahlmans, Nard Kubben, Barbara Holzer, Stephan Ludwig et Ulf R. Rapp (2005). « MAP-KAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1 ». *J. Biol. Chem.* 280.7, p. 5178–5187. DOI : 10.1074/jbc.M407155200.
- Völkel, Pamela, Barbara Dupret, Xuefen Le Bourhis et Pierre-Olivier Angrand (2015). « Diverse involvement of EZH2 in cancer epigenetics ». *Am J Transl Res* 7.2, p. 175–193.
- Wallace, Kenneth N. et Michael Pack (2003). « Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish ». *Dev. Biol.* 255.1, p. 12–29.
- Wallace, Kenneth N., Shafinaz Akhter, Erin M. Smith, Kristin Lorent et Michael Pack (2005). « Intestinal growth and differentiation in zebrafish ». *Mech. Dev.* 122.2, p. 157–173. DOI : 10.1016/j.mod.2004.10.009.

- Wan, Junhu et al. (2015). « PCAF-primed EZH2 acetylation regulates its stability and promotes lung adenocarcinoma progression ». *Nucleic Acid Res.* 43.7, p. 3591–3604. DOI : 10.1093/nar/gkv238.
- Wan, Li, Ming Sun, Guo-Jian Liu, Chen-Chen Wei, Er-Bao Zhang, Rong Kong, Tong-Peng Xu, Ming-De Huang et Zhao-Xia Wang (2016). « Long Noncoding RNA PVT1 Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Cell Proliferation through Epigenetically Regulating LATS2 Expression ». *Mol. Cancer Ther.* 15.5, p. 1082–1094. DOI : 10.1158/1535-7163.MCT-15-0707.
- Wang, Cong, Lin Mou, Hai-Xia Chai, Feng Wang, Yun-Zhi Yin et Xiao-Yu Zhang (2017a). « Long non-coding RNA HNF1A-AS1 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation by repressing NKD1 and P21 expression ». *Biomed Pharmacother* 89, p. 926–932. DOI : 10.1016/j.biopha.2017.01.031.
- Wang, Haoyi, Hui Yang, Chikdu S. Shivalila, Meelad M. Dawlaty, Albert W. Cheng, Feng Zhang et Rudolf Jaenisch (2013). « One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering ». *Cell* 153.4, p. 910–918. DOI : 10.1016/j.cell.2013.04.025.
- Wang, Hengbin, Liangjun Wang, Hediye Erdjument-Bromage, Miguel Vidal, Paul Tempst, Richard S. Jones et Yi Zhang (2004a). « Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing ». *Nature* 431.7010, p. 873–878. DOI : 10.1038/nature02985.
- Wang, Liangjun, J. Lesley Brown, Ru Cao, Yi Zhang, Judith A. Kassis et Richard S. Jones (2004b). « Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes ». *Mol. Cell.* 14.5, p. 637–646. DOI : 10.1016/j.molcel.2004.05.009.
- Wang, Liangjun, Neal Jahren, Marcus L. Vargas, Erica F. Andersen, Judith Benes, Junyu Zhang, Ellen L. Miller, Richard S. Jones et Jeffrey A. Simon (2006). « Alternative ESC and ESC-Like Subunits of a Polycomb Group Histone Methyltransferase Complex Are Differentially Deployed during Drosophila Development ». *Mol. Cell. Biol.* 26.7, p. 2637–2647. DOI : 10.1128/MCB.26.7.2637-2647.2006.
- Wang, Lifeng, Qihuang Jin, Ji-Eun Lee, I.-hsin Su et Kai Ge (2010a). « Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107.16, p. 7317–7322. DOI : 10.1073/pnas.1000031107.

- Wang, Renjing et al. (2010b). « Polycomb Group Targeting through Different Binding Partners of RING1B C-Terminal Domain ». *Structure* 18.8, p. 966–975. DOI : 10.1016/j.str.2010.04.013.
- Wang, Rui-Hong, Cuiling Li et Chu-Xia Deng (2010c). « Liver steatosis and increased ChREBP expression in mice carrying a liver specific SIRT1 null mutation under a normal feeding condition ». *Int. J. Biol. Sci.* 6.7, p. 682–690.
- Wang, Xin, Lalit Sehgal, Neeraj Jain, Tamer Khashab, Rohit Mathur et Felipe Samaniego (2016a). « LncRNA MALAT1 promotes development of mantle cell lymphoma by associating with EZH2 ». *J Transl Med* 14.1, p. 346. DOI : 10.1186/s12967-016-1100-9.
- Wang, Yong-Jun, Jian-Zhen Liu, Pei Lv, Yi Dang, Jiang-Yan Gao et Yong Wang (2016b). « Long non-coding RNA CCAT2 promotes gastric cancer proliferation and invasion by regulating the E-cadherin and LATS2 ». *eng. Am J Cancer Res* 6.11, p. 2651–2660.
- Wang, Yongjun, Jianzhen Liu, Hongzhong Bai, Yi Dang, Pei Lv et Shucaï Wu (2017b). « Long intergenic non-coding RNA 00152 promotes renal cell carcinoma progression by epigenetically suppressing P16 and negatively regulates miR-205 ». *Am J Cancer Res* 7.2, p. 312–322.
- Wang, Zhen-Qiang, Qiang Cai, Lei Hu, Chang-Yu He, Jian-Fang Li, Zhi-Wei Quan, Bing-Ya Liu, Chen Li et Zheng-Gang Zhu (2017c). « Long noncoding RNA UCA1 induced by SP1 promotes cell proliferation via recruiting EZH2 and activating AKT pathway in gastric cancer ». *Cell Death Dis* 8.6, e2839. DOI : 10.1038/cddis.2017.143.
- Ward, Andrea B., Rachel M. Warga et Victoria E. Prince (2007). « Origin of the zebrafish endocrine and exocrine pancreas ». *Dev. Dyn.* 236.6, p. 1558–1569. DOI : 10.1002/dvdy.21168.
- Wassef, Michel et al. (2015). « Impaired PRC2 activity promotes transcriptional instability and favors breast tumorigenesis ». *Genes Dev.* 29.24, p. 2547–2562. DOI : 10.1101/gad.269522.115.
- Wefers, Benedikt, Melanie Meyer, Oskar Ortiz, Martin Hrabé de Angelis, Jens Hansen, Wolfgang Wurst et Ralf Kühn (2013). « Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides ». *Proc. Nat. Acad. Sci.* 110.10, p. 3782–3787. DOI : 10.1073/pnas.1218721110.

- Wei, Jianhua, Ling Zhai, Jun Xu et Hengbin Wang (2006). « Role of Bmi1 in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing ». *J. Biol. Chem.* 281.32, p. 22537–22544. DOI : 10.1074/jbc.M600826200.
- Westerfield, M., D. W. Liu, C. B. Kimmel et C. Walker (1990). « Pathfinding and synapse formation in a zebrafish mutant lacking functional acetylcholine receptors ». *Neuron* 4.6, p. 867–874.
- What Is Cornea & Eye Donation?*
- Whitcomb, Sarah J., Amrita Basu, C. David Allis et Emily Bernstein (2007). « Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective ». *Trends Genet.* 23.10, p. 494–502. DOI : 10.1016/j.tig.2007.08.006.
- White, Richard, Kristin Rose et Leonard Zon (2013). « Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward ». *Nat. Rev. Cancer* 13.9, p. 624–636. DOI : 10.1038/nrc3589.
- White, Richard Mark et al. (2008). « Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis ». *Cell Stem Cell* 2.2, p. 183–189. DOI : 10.1016/j.stem.2007.11.002.
- White, Richard Mark et al. (2011). « DHODH modulates transcriptional elongation in the neural crest and melanoma ». *Nature* 471.7339, p. 518–522. DOI : 10.1038/nature09882.
- Whitfield, T. T. et al. (1996). « Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line ». *Development* 123, p. 241–254.
- Wilkinson, Frank H., Kyoungsook Park et Michael L. Atchison (2006). « Polycomb recruitment to DNA in vivo by the YY1 REPO domain ». *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103.51, p. 19296–19301. DOI : 10.1073/pnas.0603564103.
- Wilkinson, Robert N., Stone Elworthy, Philip W. Ingham et Fredericus J. M. van Eeden (2013). « A method for high-throughput PCR-based genotyping of larval zebrafish tail biopsies ». *BioTechniques* 55.6, p. 314–316. DOI : 10.2144/000114116.
- Woo, Caroline J., Peter V. Kharchenko, Laurence Daheron, Peter J. Park et Robert E. Kingston (2010). « A Region of the Human HOXD Cluster that Confers Polycomb-Group Responsiveness ». *Cell* 140.1, p. 99–110. DOI : 10.1016/j.cell.2009.12.022.
- Woods, Ian G., David A. Lyons, Matthew G. Voas, Hans-Martin Pogoda et William S. Talbot (2006). « nsf is essential for organization of myelinated axons in zebrafish ». *Curr. Biol.* 16.7, p. 636–648. DOI : 10.1016/j.cub.2006.02.067.

- Wu, Gang et al. (2012). « Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas ». *Nat. Genet.* 44.3, p. 251–253. DOI : 10.1038/ng.1102.
- Wu, Pei-Yu et al. (2009). « Structural and functional interaction between the human DNA repair proteins DNA ligase IV and XRCC4 ». *Mol. Cell. Biol.* 29.11, p. 3163–3172. DOI : 10.1128/MCB.01895–08.
- Wu, Shan-Fu, Haiying Zhang et Bradley R. Cairns (2011). « Genes for embryo development are packaged in blocks of multivalent chromatin in zebrafish sperm ». *Genome Res.* 21.4, p. 578–589. DOI : 10.1101/gr.113167.110.
- Wu, Susan C., Eric M. Kallin et Yi Zhang (2010). « Role of H3K27 methylation in the regulation of lncRNA expression ». *Cell Res.* 20.10, p. 1109–1116. DOI : 10.1038/cr.2010.114.
- Wu, Xudong, Yanhua Gong, Jiping Yue, Boqin Qiang, Jiangang Yuan et Xiaozhong Peng (2008). « Cooperation between EZH2, NSPc1-mediated histone H2A ubiquitination and Dnmt1 in HOX gene silencing ». *Nucleic Acid Res.* 36.11, p. 3590–3599. DOI : 10.1093/nar/gkn243.
- Wu, Xudong, Jens Vilstrup Johansen et Kristian Helin (2013). « Fbx110/Kdm2b recruits polycomb repressive complex 1 to CpG islands and regulates H2A ubiquitylation ». *Mol. Cell.* 49.6, p. 1134–1146. DOI : 10.1016/j.molcel.2013.01.016.
- Xi, Hualin, Yong Yu, Yutao Fu, Jonathan Foley, Anason Halees et Zhiping Weng (2007). « Analysis of overrepresented motifs in human core promoters reveals dual regulatory roles of YY1 ». *Genome Res.* 17.6, p. 798–806. DOI : 10.1101/gr.5754707.
- Xiao, An et al. (2013). « Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish ». *Nucleic Acid Res.* 41.14, e141. DOI : 10.1093/nar/gkt464.
- Xu, Xiaolei, Steffen E. Meiler, Tao P. Zhong, Manzoor Mohideen, Dane A. Crossley, Warren W. Burggren et Mark C. Fishman (2002). « Cardiomyopathy in zebrafish due to mutation in an alternatively spliced exon of titin ». *Nat. Genet.* 30.2, p. 205–209. DOI : 10.1038/ng816.
- Yabe, Taijiro, Xiaoyan Ge, Robin Lindeman, Sreelaja Nair, Greg Runke, Mary C. Mullins et Francisco Pelegri (2009). « The maternal-effect gene cellular island encodes aurora B kinase and is essential for furrow formation in the early zebrafish embryo ». *PLoS Genet.* 5.6, e1000518. DOI : 10.1371/journal.pgen.1000518.

- Yan, Yun, Wukui Zhao, Yikai Huang, Huan Tong, Yin Xia, Qing Jiang et Jinzhong Qin (2017). « Loss of Polycomb Group Protein Pcgf1 Severely Compromises Proper Differentiation of Embryonic Stem Cells ». *Sci Rep* 7, p. 46276. DOI : 10.1038/srep46276.
- Yang, Zhao-Yang, Fang Yang, Ying-Li Zhang, Bao Liu, Meng Wang, Xuan Hong, Yan Yu, Yao-Hui Zhou et Hai Zeng (2017). « LncRNA-ANCR down-regulation suppresses invasion and migration of colorectal cancer cells by regulating EZH2 expression ». *Cancer Biomark* 18.1, p. 95–104. DOI : 10.3233/CBM-161715.
- Yano, Ken-ichi, Keiko Morotomi-Yano, Shih-Ya Wang, Naoya Uematsu, Kyung-Jong Lee, Aroumougame Asaithamby, Eric Weterings et David J Chen (2008). « Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks ». *EMBO Reports* 9.1, p. 91–96. DOI : 10.1038/sj.embor.7401137.
- Yano, Ken-ichi, Keiko Morotomi-Yano, Noritaka Adachi et Hidenori Akiyama (2009). « Molecular mechanism of protein assembly on DNA double-strand breaks in the non-homologous end-joining pathway ». *J. Radiat. Res.* 50.2, p. 97–108.
- Yap, Kyoko L., Side Li, Ana M. Muñoz-Cabello, Selina Raguz, Lei Zeng, Shiraz Mujtaba, Jesús Gil, Martin J. Walsh et Ming-Ming Zhou (2010). « Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a ». *Mol. Cell.* 38.5, p. 662–674. DOI : 10.1016/j.molcel.2010.03.021.
- Ye, Zhao, Juan Xu, Shukui Li, Cheng Cai, Tiejun Li et Lishan Sun (2017). « Lnc-IL7R promotes the growth of fibroblast-like synoviocytes through interaction with enhancer of zeste homolog 2 in rheumatoid arthritis ». *Mol Med Rep* 15.3, p. 1412–1418. DOI : 10.3892/mmr.2017.6150.
- Yee, Nelson S., Kristin Lorent et Michael Pack (2005). « Exocrine pancreas development in zebrafish ». *Dev. Biol.* 284.1, p. 84–101. DOI : 10.1016/j.ydbio.2005.04.035.
- Yoshimura, Hisashi, Yoko Matsuda, Masami Yamamoto, Shinji Kamiya et Toshiyuki Ishiwata (2018). « Expression and role of long non-coding RNA H19 in carcinogenesis ». *Front. Biosci.* 23, p. 614–625.
- You, Jueng Soo et Peter A. Jones (2012). « Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? » *Cancer Cell* 22.1, p. 9–20. DOI : 10.1016/j.ccr.2012.06.008.
- Young, Rodrigo M., Scott Marty, Yoshiro Nakano, Han Wang, Daisuke Yamamoto, Shuo Lin et Miguel L. Allende (2002). « Zebrafish yolk-specific not really started (nrs) gene

- is a vertebrate homolog of the *Drosophila* spinster gene and is essential for embryogenesis ». *Dev. Dyn.* 223.2, p. 298–305. DOI : 10.1002/dvdy.10060.
- Yu, Ming et al. (2012). « Direct Recruitment of Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to Chromatin by Core Binding Transcription Factors ». *Mol. Cell.* 45.3, p. 330–343. DOI : 10.1016/j.molcel.2011.11.032.
- Yu, Yung-Luen et al. (2013). « Smurf2-mediated degradation of EZH2 enhances neuron differentiation and improves functional recovery after ischaemic stroke ». *EMBO Mol Med* 5.4, p. 531–547. DOI : 10.1002/emmm.201201783.
- Zang, Chongshuang, Feng-Qi Nie, Qian Wang, Ming Sun, Wei Li, Jing He, Meiling Zhang et Kai-Hua Lu (2016). « Long non-coding RNA LINC01133 represses KLF2, P21 and E-cadherin transcription through binding with EZH2, LSD1 in non small cell lung cancer ». *Oncotarget* 7.10, p. 11696–11707. DOI : 10.18632/oncotarget.7077.
- Zdzieblo, D., X. Li, Q. Lin, M. Zenke, D. J. Illich, M. Becker et A. M. Müller (2014). « Pcgf6, a Polycomb Group Protein, Regulates Mesodermal Lineage Differentiation in Murine ESCs and Functions in iPS Reprogramming ». *STEM CELLS* 32.12, p. 3112–3125. DOI : 10.1002/stem.1826.
- Zhang, Jing, Purva Wagh, Danielle Guay, Luis Sanchez-Pulido, Bhaja K. Padhi, Vladimir Korzh, Miguel A. Andrade-Navarro et Marie-Andrée Akimenko (2010a). « Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition ». *Nature* 466.7303, p. 234–237. DOI : 10.1038/nature09137.
- Zhang, Jingfang, Zhenni Sun, Yafei Han, Ruyong Yao, Lu Yue, Yan Xu et Jisheng Zhang (2017a). « Rnf2 knockdown reduces cell viability and promotes cell cycle arrest in gastric cancer cells ». *Oncol Lett* 13.5, p. 3817–3822. DOI : 10.3892/ol.2017.5868.
- Zhang, Liyun et Yuk Fai Leung (2010b). « Microdissection of zebrafish embryonic eye tissues ». *JoVE* 40. DOI : 10.3791/2028.
- Zhang, Ming, Change Gao, Yi Yang, Gaofeng Li, Jian Dong, Yiqin Ai, Nan Chen et Wenhui Li (2017b). « Long Noncoding RNA CRNDE/PRC2 Participated in the Radiotherapy Resistance of Human Lung Adenocarcinoma Through Targeting p21 Expression ». *Oncol. Res.* DOI : 10.3727/096504017X14944585873668.
- Zhang, Q., S. K. R. Padi, D. J. Tindall et B. Guo (2014). « Polycomb protein EZH2 suppresses apoptosis by silencing the proapoptotic miR-31 ». *Cell Death Dis* 5, e1486. DOI : 10.1038/cddis.2014.454.

- Zhang, Shaorong, Guanli Zhang et Jingying Liu (2016a). « Long noncoding RNA PVT1 promotes cervical cancer progression through epigenetically silencing miR-200b ». *AP-MIS* 124.8, p. 649–658. DOI : 10.1111/apm.12555.
- Zhang, Y. et D. Reinberg (2001). « Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails ». *Genes Dev.* 15.18, p. 2343–2360. DOI : 10.1101/gad.927301.
- Zhang, Zi-Zhen et al. (2016b). « Long non-coding RNA LINC00628 functions as a gastric cancer suppressor via long-range modulating the expression of cell cycle related genes ». *Sci Rep* 6, p. 27435. DOI : 10.1038/srep27435.
- Zhao, Chengjian, Xiaofei Wang, Yuwei Zhao, Zhimian Li, Shuo Lin, Yuquan Wei et Hانشuo Yang (2011). « A Novel Xenograft Model in Zebrafish for High-Resolution Investigating Dynamics of Neovascularization in Tumors ». *PLOS ONE* 6.7, e21768. DOI : 10.1371/journal.pone.0021768.
- Zhao, Xinping C., Richard W. Yee, Evan Norcom, Heather Burgess, Andrei S. Avanesov, Jim P. Barrish et Jarema Malicki (2006). « The zebrafish cornea: structure and development ». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47.10, p. 4341–4348. DOI : 10.1167/iovs.05-1611.
- Zhou, Meng, Xiao-Yu Zhang et Xi Yu (2017). « Overexpression of the long non-coding RNA SPRY4-IT1 promotes tumor cell proliferation and invasion by activating EZH2 in hepatocellular carcinoma ». *eng. Biomed Pharmacother* 85, p. 348–354. DOI : 10.1016/j.biopha.2016.11.035.
- Zhou, Wenlai, Ping Zhu, Jianxun Wang, Gabriel Pascual, Kenneth A. Ohgi, Jean Lozach, Christopher K. Glass et Michael G. Rosenfeld (2008). « Histone H2A Monoubiquitination Represses Transcription by Inhibiting RNA Polymerase II Transcriptional Elongation ». *Molecular cell* 29.1, p. 69–80. DOI : 10.1016/j.molcel.2007.11.002.
- Zhu, Xin-Xing, Ya-Wei Yan, Demeng Chen, Chun-Zhi Ai, Xifeng Lu, Shan-Shan Xu, Shan Jiang, Gen-Shen Zhong, Dong-Bao Chen et Yi-Zhou Jiang (2016a). « Long non-coding RNA HoxA-AS3 interacts with EZH2 to regulate lineage commitment of mesenchymal stem cells ». *Oncotarget* 7.39, p. 63561–63570. DOI : 10.18632/oncotarget.11538.
- Zhu, Ziqiang, Jinshan Tang, Jianqiang Wang, Gang Duan, Lei Zhou et Xiaoqing Zhou (2016b). « MiR-138 Acts as a Tumor Suppressor by Targeting EZH2 and Enhances

Cisplatin-Induced Apoptosis in Osteosarcoma Cells ». *PLOS ONE* 11.3, e0150026.
DOI : 10.1371/journal.pone.0150026.

Zhuo, Chuanjun, Ronghuan Jiang, Xiaodong Lin, Mingjing Shao, Chuanjun Zhuo, Ronghuan Jiang, Xiaodong Lin et Mingjing Shao (2016). « LncRNA H19 inhibits autophagy by epigenetically silencing of DIRAS3 in diabetic cardiomyopathy ». *Oncotarget* 8.1, p. 1429–1437. DOI : 10.18632/oncotarget.13637.

Zoabi, Muhammad, Ronen Sadeh, Prim de Bie, Victor E. Marquez et Aaron Ciechanover (2011). « PRAJA1 is a ubiquitin ligase for the polycomb repressive complex 2 proteins ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408.3, p. 393–398. DOI : 10.1016/j.bbrc.2011.04.025.

Cinquième partie

Annexes

RESEARCH ARTICLE

The Polycomb Group Protein Pcgf1 Is Dispensable in Zebrafish but Involved in Early Growth and Aging

Barbara Dupret¹, Pamela Völkel^{1,2}, Xuefen Le Bourhis¹, Pierre-Olivier Angrand^{1*}

¹ Cell Plasticity & Cancer, Inserm U908 / University of Lille, Lille, France, ² CNRS, Lille, France

☞ These authors contributed equally to this work.

* pierre-olivier.angrand@univ-lille1.fr



OPEN ACCESS

Citation: Dupret B, Völkel P, Le Bourhis X, Angrand P-O (2016) The Polycomb Group Protein Pcgf1 Is Dispensable in Zebrafish but Involved in Early Growth and Aging. PLoS ONE 11(7): e0158700. doi:10.1371/journal.pone.0158700

Editor: Henry H Roehl, University of Sheffield, UNITED KINGDOM

Received: February 17, 2016

Accepted: May 19, 2016

Published: July 21, 2016

Copyright: © 2016 Dupret et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Institut national de la santé et de la recherche médicale (www.inserm.fr), the University of Lille 1 (<http://www.univ-lille1.fr>), and grants from le Comité du Nord de la Ligue Contre le Cancer (<https://www.ligue-cancer.net/>) and l'ITMO Biologie Cellulaire, Développement et Evolution (<http://www.aviesan.fr/aviesan/accueil/menu-header/instituts-thematiques-multi-organismes/biologie-cellulaire-developpement-et-evolution>). BD is supported by a fellowship from the Région Nord-Pas de Calais and the University of Lille. The funders had

Abstract

Polycomb Repressive Complex (PRC) 1 regulates the control of gene expression programs via chromatin structure reorganization. Through mutual exclusion, different PCGF members generate a variety of PRC1 complexes with potentially distinct cellular functions. In this context, the molecular function of each of the PCGF family members remains elusive. The study of PCGF family member expression in zebrafish development and during caudal fin regeneration reveals that the zebrafish *pcgf* genes are subjected to different regulations and that all PRC1 complexes in terms of Pcgf subunit composition are not always present in the same tissues. To unveil the function of Pcgf1 in zebrafish, a mutant line was generated using the TALEN technology. Mutant *pcgf1*^{-/-} fish are viable and fertile, but the growth rate at early developmental stages is reduced in absence of *pcgf1* gene function and a significant number of *pcgf1*^{-/-} fish show signs of premature aging. This first vertebrate model lacking Pcgf1 function shows that this Polycomb Group protein is involved in cell proliferation during early embryogenesis and establishes a link between epigenetics and aging.

Introduction

In eukaryotes post-translational modifications of histone proteins play a crucial role in chromatin organization and in the control of gene expression programs. Polycomb Group (PcG) proteins are part of the enzymatic machineries involved in these histone modifications [1]. PcG proteins interact to form two major multiprotein complexes, Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) and PRC2 which catalyze two post-translational histone modifications involved in chromatin compaction and gene silencing. PRC1 is responsible for the monoubiquitinylation of histone H2A at lysine 119 (H2AK119ub1) whereas PRC2 trimethylates lysine 27 of histone H3 (H3K27me3) allowing the recruitment of PRC1 [2–5].

In *Drosophila*, core PRC1 is composed of Polycomb (Pc), a chromodomain-containing protein binding to H3K27me3 marks [6, 7], Sex combs extra (Sce) which is responsible for H2A ubiquitinylation [5], Posterior sex combs (Psc) able to compact chromatin *in vitro* [8], and the poorly characterized protein Polyhomeotic (Ph). In contrast, vertebrate PRC1 complexes are

no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

very heterogeneous since each of the *Drosophila* subunits is encoded by several orthologs that can associate in a combinatorial fashion. Mammalian genomes contain five orthologs for Pc (CBX2, 4, 6, 7 and 8), two orthologs for Sce (RING1 and RNF2), five Psc genes (BMI1, PCGF1, 2, 3, 5 and 6) and three Ph orthologs (PHC1, 2 and 3). A number of reports have shown that multiple PRC1 complexes, distinct in their subunits composition due to combinatorial permutations, exist in human cells [9–16]. To complicate matters further, several PRC1 subunits could also associate to form non-canonical PRC1 complexes [13, 14, 17, 18]. In addition, mice deficient for individual PRC1 components show distinct phenotypes suggesting that different PRC1 complexes might have at least some non-redundant functions [19–26]. Thus, understanding the individual role of the distinct isoforms of the PRC1 protein complexes remains an objective towards the deciphering of the Polycomb-mediated repression in vertebrates.

The zebrafish (*Danio rerio*) is a widely used vertebrate model for studying development and morphogenesis. Owing to external fertilization and optical transparency of the embryos, early development of zebrafish can be easily followed. Furthermore, the recent emergence of powerful genome-editing technologies, such as the Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs) and the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated System (CRISPR/Cas9) applied to zebrafish, allows rapid gene function studies in this organism [27–32].

Here, we report on the expression of the Psc family members during zebrafish development and during caudal fin regeneration. We provide evidences that the different genes are differentially expressed suggesting that distinct PRC1 variations occur during zebrafish development and caudal fin regeneration. Using the TALEN technology, we generated a *pcgf1* loss-of-function zebrafish line. This line is viable and fertile indicating that Pcgf1 is dispensable in zebrafish. However, we show that zebrafish growth at early developmental stages is reduced in the absence of *pcgf1* gene function and about 35% of *pcgf1*^{-/-} fish show signs of premature aging.

Materials and Methods

Ethical Statement

The zebrafish experiments described in this study were conducted according to the French and European Union guidelines for the handling of laboratory animals. The experimental procedures carried out on zebrafish were reviewed and approved by the local Ethics Committee from the Animal Care Facility of the University of Lille. None of the animals utilized in this work became ill or died before the experimental endpoint. At the end of the experiment, fish older than 8 dpf were humanely euthanized by immersion in an overdose of tricaine methane sulfonate (MS-222, 300 mg/L) for at least 10 minutes, whereas younger fish were immobilized by submersion in ice water (5 parts ice/1 part water, 0–4°C) for at least 20 minutes to ensure death by hypoxia.

Zebrafish maintenance and embryo preparation

Zebrafish (TU strain) were maintained at 27.5°C in a 14/10h light/dark cycle. The evening before spawning, males and females were separated into individual tanks. Spontaneous spawning occurred when the light turned on and embryos or larvae were collected and staged according to Kimmel et al. [33]. The chorions were removed from embryos by the action of 1% pronase (Sigma) for 1 min, and embryos or larvae were fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PBS (phosphate-buffered saline, Invitrogen), dehydrated in 100% methanol and kept at -20°C.

For caudal fin amputation, 3 to 6 month-old zebrafish were anaesthetized with MS-222 (tricaine, ethyl 3-aminobenzoate methanesulphonate, 0.168 mg/mL; Sigma-Aldrich) and

approximately two-thirds of the fin was cut with a blade. After fin amputation, the fishes were allowed to regenerate their fin in the aquarium until 4 days at 27.5°C. The blastema starts to form at approximately 24-hours post amputation (hpa) and the amputated fins have been fully restored at around 14-days post amputation (dpa).

Genotype analyses

Three day-old embryos or pieces of caudal fin were incubated in 10 μ L of PCR extraction buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 2 mM EDTA, 0.2% Triton X-100, 100 μ g/mL Proteinase K) and placed at 50°C for 4 hours prior proteinase K inactivation at 95°C for 5 min. Genotype analysis was performed by PCR on 2.5 μ L of samples using the primer set TAL_pcgf1_5' (5'-GAACA CAATGAACACAATGGC-3') and TAL_pcgf1_3' (5'-GGACAATACTTGCTGGTCTGG-3') followed by PCR product digestion with the ClaI restriction enzyme. Sequence determination (GATC-Biotech, Germany) was performed after cloning of the PCR products into the vector pCR-XL-TOPO (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

In situ hybridization

Antisense RNA probes were synthesized with the DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche, 11175025910), according to the manufacturer's instructions from 1 μ g of linearized plasmid DNA. The following IMAGE cDNA clones purchased at imaGenes GmbH (Berlin), were used: *pcgf1*, cDNA clone MGC:162519 IMAGE:7165875; *bmi1a*, cDNA clone MGC:56403 IMAGE:5605189; *bmi1b*, cDNA clone MGC:63927 IMAGE:6790897; *pcgf5a*, cDNA clone MGC:136815 IMAGE:7258679; *pcgf5b*, cDNA clone MGC:194668 IMAGE:9039003; *pcgf6*, cDNA clone MGC:162242 IMAGE:8745325. *In situ* hybridization was performed as described by Thisse and Thisse [34]. Briefly, the fixed embryos were rehydrated and permeabilized with 10 μ g/mL proteinase K for 30 sec (0.75 to 8 hpf embryos), 1 min (12 and 16 hpf embryos) or 10 min (24 hpf embryos) at room temperature. Ten to 15 embryos from each time points were hybridized with digoxigenin-labeled antisense RNA probes at 70°C. After extensive washing, the probes were detected with anti-digoxigenin-AP Fab fragment (Roche Diagnostics, 1093274, diluted at 1:10,000), followed by staining with BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium) alkaline phosphate substrate.

The embryos were imaged using a Leica MZ10F stereomicroscope equipped with a Leica DFC295 digital camera.

Regenerating fins were fixed in 4% paraformaldehyde overnight, embedded in paraffin, and cut into 7- μ m-thick sections. These were mounted on sylanated glass slides, deparaffinated and rehydrated before performing *in situ* hybridization on slides.

TALEN design and assembly

The *pcgf1* TALEN target site was selected using the online TAL Effector-Nucleotide Targeter tool (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>; [35]) in exon 2 with the following parameters: (i) spacer length of 14–17 bp, (ii) repeat array length of 16–18 bp, (iii) each binding site was anchored by a preceding T base in position “0” as has been shown to be optimal for naturally occurring TAL proteins [36, 37], (iv) presence of a restriction site (ClaI) within the spacer sequence for screening and genotyping purposes.

Pcgl1-specific TALEN constructs were engineered using the TALEN Golden Gate assembly system described by Cermak et al., [38]. The TALEN expression backbones, pCS2TAL3DD and pCS2TAL3RR [27], and the plasmids providing repeat variable diresidues (RVD) [38] for Golden Gate Cloning were obtained from Addgene.

mRNA injection into zebrafish embryos

Capped mRNAs were synthesized using the SP6 mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion) from linearized plasmid templates. mRNAs (50–100 pg) were injected into 1-cell zebrafish embryos using a FemtoJet microinjector (Eppendorf).

Histone extraction and western blot analysis

Histone extracts were prepared by lysis of 5 embryos per tube in PBS containing 0.5% Triton X-100, 2 mM phenyl-methylsulfonyl fluorid (PMSF), 0.02% NaN_3 , 10 min on ice. After centrifugation, the pellet was resuspended in 0.2 N HCl and core histones extracted overnight at 4°C while rocking. Samples were centrifuged and the supernatant containing the histones was stored at -20°C.

For Western blotting, protein samples in SDS loading buffer were electrophoresed on 4–12% Bis-Tris gels (NuPAGE, Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membranes using the iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen). Efficiency of the transfer is verified by immersing the blotted membrane into a Ponceau S staining Solution (0.1% Ponceau S in 5% acetic acid, Sigma). The membranes were then destained and blocked in 5% milk powder in PBS-T (1x PBS with 0.1% Tween20) for 1 hour at room temperature, incubated for the same time with the primary antibody in 5% milk in PBS-T, and washed three times 10 min in PBS-T. The membranes were then incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibody in 5% milk in PBS-T for 1 hour and afterward washed three times 10 min in PBS-T. Signal was detected using a chemiluminescence substrate (Western Lightning Ultra, PerkinElmer) with a Luminescent Image Analyzer (LAS-4000, Fujifilm).

Primary antibodies used were rabbit anti-H2AK119ub1 (1:500; ABE569, Millipore) and anti-H4 (1:500; ab7311, Abcam). The secondary antibody was a peroxidase conjugated AFFini-Pure donkey anti-rabbit antibody (1:10,000; 711-035-152, Jackson ImmunoResearch).

Whole mount immunohistochemistry

Zebrafish embryos were fixed 2 hours at room temperature in 4% paraformaldehyde, followed by dehydration and storage overnight in methanol at -20°C. Embryos were then digested in PBS containing 0.1% Tween20 and 10 µg/mL proteinase K and blocked in PBS containing 0.1% Tween20 and 2% sheep serum.

The primary antibodies used were mouse anti-MF20 (1:20; Developmental Studies Hybridoma Bank, developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242) and rabbit anti-H3S10p (used at 1.33 µg/mL; sc-8656-R, Santa Cruz). The secondary antibodies were a peroxidase conjugated Affini-Pure goat anti-mouse (1:500; 115-035-003, Jackson ImmunoResearch) and an Alexa fluor goat anti-rabbit 546 (1:5,000; A-11010, Life Technologies).

Acridine orange staining

Live dechorionated zebrafish embryos were incubated for 30 minutes at 28°C in E2 medium (15 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 0.5 mM MgSO_4 , 0.15 mM KH_2PO_4 , 0.04 mM Na_2HPO_4 , 1.3 mM CaCl_2 , 0.7 mM NaHCO_3) containing 2 µg/mL Acridine Orange (Chroma). Following extensive washes in E2 medium, embryos were anaesthetized with 0.01 mg/mL tricaine (Sigma Aldrich) and imaged with a Leica MZ10F stereomicroscope equipped with a Leica DFC295 digital camera.

Alcian blue–Alizarin red staining

Zebrafish embryos and larvae were fixed 2 hours at room temperature in 4% paraformaldehyde and dehydrated 10 min in 50% ethanol. Cartilages were stained in 0.02% Alcian blue (Sigma Aldrich), 60 mM MgCl₂, 70% ethanol, overnight at room temperature. Bones were then stained in 0.1% Alizarin red (Sigma Aldrich) 24 hours at room temperature. Pigments were bleached by a 2-hours incubation in water containing 1% KOH, 3% H₂O₂. Embryos and larvae were digested with 0.05% trypsin (Sigma Aldrich) until tissue disappeared (1 to 4 hours depending on the developmental stage) and fixed in 95% ethanol before storage in 70% glycerol.

Senescence-associated β -galactosidase assay

Adult zebrafish were anaesthetized in MS-222 (0.168 mg/mL) and placed into ice-cold fish water. The fish were washed twice in PBS pH7.4, and fixed for 3 days in 4% paraformaldehyde with PBS at 4°C. After fixation, fish were washed 3 times in PBS pH7.4, and 1 time 1 hour in PBS pH6.0 at 4°C before incubation in the SA- β -gal staining solution (5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 2 mM MgCl₂, 1 mg/mL X-gal in PBS pH6.0) overnight at 37°C. The same procedure was used for embryos fixed for 2 hours in 4% paraformaldehyde with PBS at room temperature. For adult zebrafish analyses, the trunk area for colorimetric quantification was chosen by selection of the area between the operculum and the dorsal and anal fins as described by Kishi et al. [39].

Quantification of spinal curvature in zebrafish

Adult zebrafish were anaesthetized with MS-222 (0.168 mg/mL) and photographed with a digital camera. Using Image-J (NIH Image), a body midline was drawn and measured on digital images between the tip of the caudal peduncle and the center of the occipital orbit (“b” in [S1 Fig](#)). A perpendicular line was then drawn from the midline to the apex of the fish body (“a” in [S1 Fig](#)). The spinal curvature score was defined as the ratio of the length of the perpendicular line relative to the length of the fish (caudal peduncle to occipital orbit).

Results

The zebrafish genome encodes six Psc family members [40]. These genes include *pcgf1* and *pcgf6* the orthologs of the *PCGF1* and *PCGF6* genes, respectively. In addition, following the whole-genome duplication that occurred in the teleost lineage after it splits from the tetrapod lineage, two duplicated ohnologs have been retained in the zebrafish genome for *BMI1* (*bmi1a* and *bmi1b*) and for *PCGF5* (*pcgf5a* and *pcgf5b*). Finally, *PCGF2* and *PCGF3* do not have corresponding homologs in zebrafish [40].

Pcgf family member expression during zebrafish development

Zygotic transcription in zebrafish starts at about cell cycle 10–13 (3–4 hpf) termed midblastula transition (MBT). Before this stage, all developmental processes depend on maternally deposited gene products [41, 42]. We examined the expression patterns of the six Psc family members before the MBT (0.75 and 2.25 hpf), as well as at later zebrafish developmental stages (4, 8, 12, 16 and 24 hpf) ([Fig 1](#)). Whole-mount *in situ* hybridization revealed that most of the *pcgf* family gene members are ubiquitously expressed during zebrafish development. However, the retained ohnologs in the zebrafish genome showed distinct expression patterns. In contrast to the *bmi1b* transcripts, maternally deposited *bmi1a* transcripts significantly decrease at developmental stages around 4 hpf. Indeed, at 8 hpf, *bmi1a* transcripts are not detected by whole-mount *in situ* hybridization while *bmi1b* mRNAs are still present. Using GFP sensors [43–45]

that contain the coding sequence of GFP and the *bmi1a* 3'UTR or *bmi1b* 3'UTR, we propose that determinants responsible for this maternal *bmi1a* mRNA decay may be encoded by the 3'UTR (S2 Fig). Interestingly, the *bmi1a* 3'UTR contains a putative binding site for the micro-RNA-430c (miR-430c) which has been shown to be involved in maternal mRNA decay during zygotic stages [43, 44]. There are also two orthologs for *pcgf5*; the *pcgf5a* transcript is present at all developmental stages, whereas *pcgf5b* expression starts only after the MBT. Notably, *pcgf5b* is the only *pcgf* family member which is not maternally expressed.

Pcgf family member expression during zebrafish fin regeneration

The zebrafish caudal fin provides a powerful model to study complex tissue regeneration and bone repair because it is easily accessible and not essential for survival [46, 47]. Upon

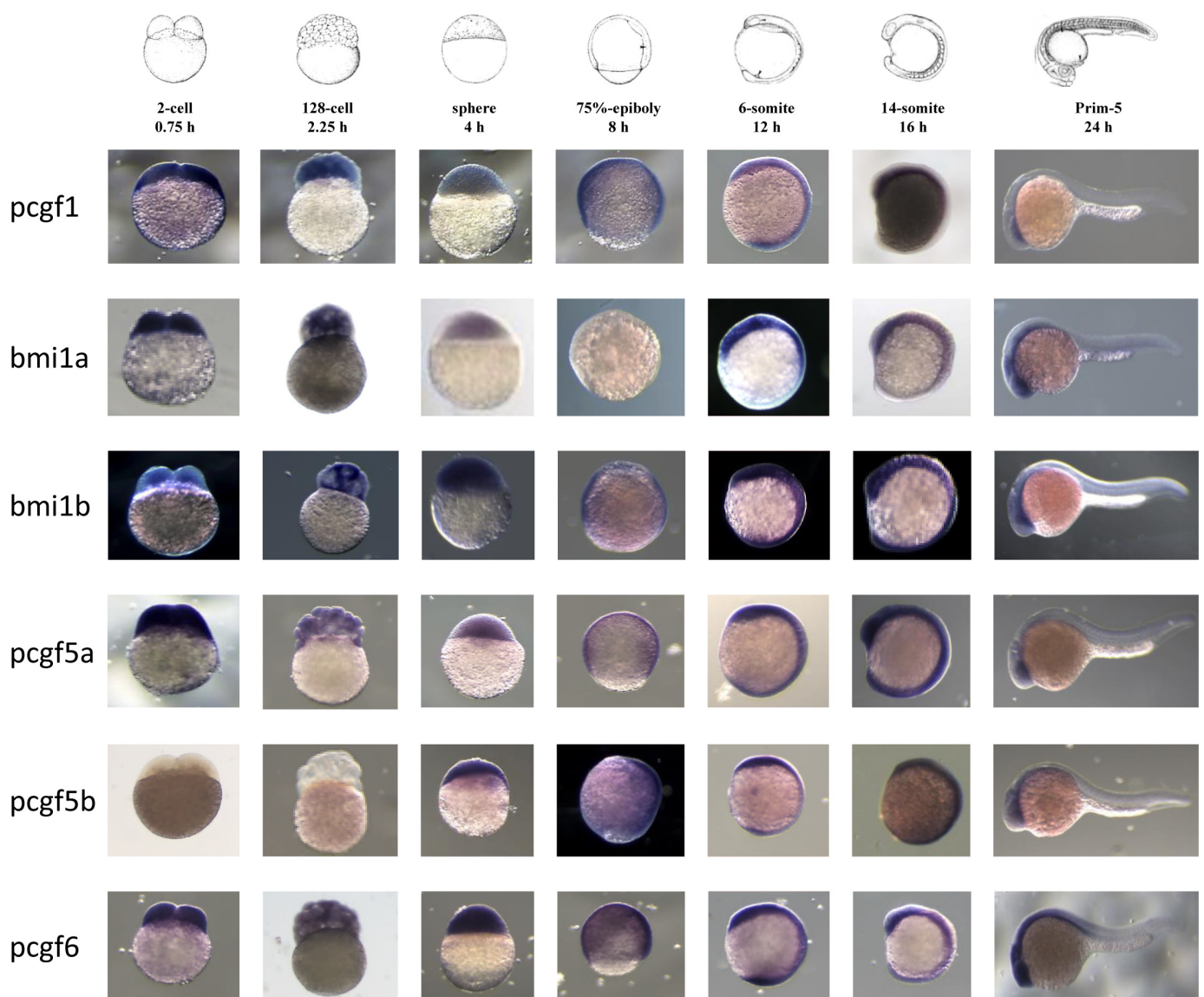


Fig 1. Expression of Psc orthologs during zebrafish development. Whole-mount *in situ* analyses of *pcgf1*, *bmi1a*, *bmi1b*, *pcgf5a*, *pcgf5b* and *pcgf6* zebrafish genes at 0.75, 2.25, 4, 8, 12, 16 and 24 hpf were representatively shown.

doi:10.1371/journal.pone.0158700.g001

amputation, the caudal fin is fully restored after approximately 2 weeks. This type of regeneration, called epimorphic regeneration, involves the formation of a blastema, a population of proliferating progenitor cells that arise from dedifferentiation of mesenchymal cells in the stump. Continuous proliferation in the blastema causes structure outgrowth by providing new cells that differentiate into the different mesenchymal cell types needed to rebuild the lost fin part. This regeneration process requires a precise coordination of cell proliferation, cell differentiation, morphogenesis, and patterning. A number of reports demonstrated that epigenetic factors are involved and modulated in zebrafish caudal fin regeneration [48–50].

We then examined the expression of all Pcgf family members in regenerating caudal fin at 4 days post-amputation (dpa) by *in situ* hybridization on regenerating caudal fin sections (Fig 2). No *pcgf1* signal was detected in injured or regenerating fins at 4 dpa. Similarly, *pcgf5a* is not expressed in the regenerating tissues whereas a signal is observed in the stump. A strong *bmi1b* signal is observed in the medial region of the growing structures while *bmi1a* expression is restricted to the epidermis. A robust *pcgf5b* signal is also found in the growing lepidotrichia and in the blastema. Finally, *pcgf6* is expressed in the blastema of the regenerating fins. Thus, it appears that *pcgf* family members are diversely expressed in the regenerating caudal fin suggesting that they might contribute differently to the regeneration process by differential cellular distribution.

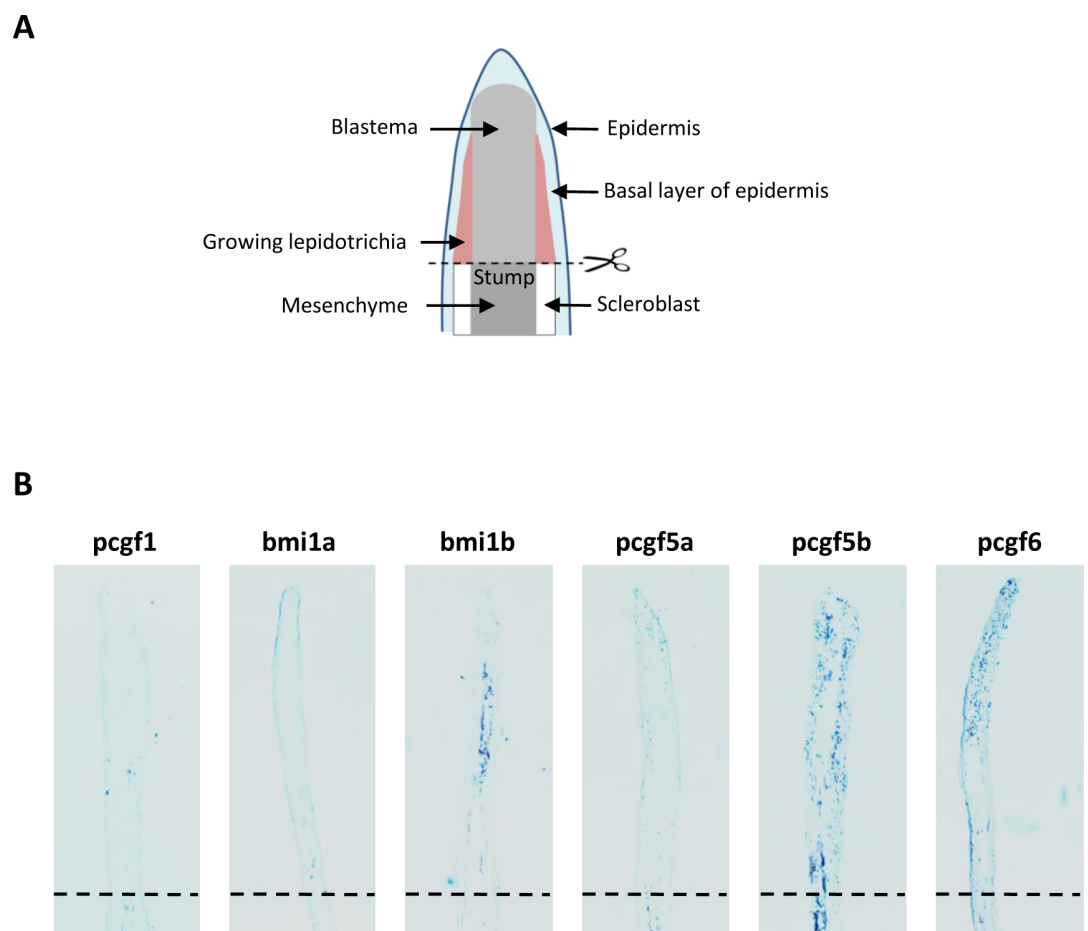


Fig 2. Expression of the Pcgf family member during caudal fin regeneration (A) Schematic representation of the regenerating caudal fin structures. (B) *In situ* hybridization with *pcgf1*, *bmi1a*, *bmi1b*, *pcgf5a*, *pcgf5b* and *pcgf6* RNA anti-sense probes on sections of regenerating caudal fins from 6 month-old zebrafish at 4 days post-amputation (dpa). Dashed lines indicate the amputation plane.

doi:10.1371/journal.pone.0158700.g002

TALEN-mediated *pcgf1* inactivation in zebrafish

To gain further insights into the role of *pcgf1* in zebrafish, we generated *pcgf1* loss of function mutants using transcription activator-like effector (TALE) nucleases (TALENs). TALENs consist in the fusion of the endonuclease domain of FokI to engineered sequence-specific DNA-binding domains from TALEs in order to target the nuclease activity to defined genomic sequences. Once activated through dimerization, the FokI nuclease introduces a double strand DNA break that is repaired through the non-homologous end joining (NHEJ) repair pathway. This repairing process is error prone and will introduce mutations. Among the resulting mutations, several will lead to shifts in the open reading frame, impairing the protein function. TALENs were designed to target a region within the second exon of *pcgf1* in order to introduce a frame shift upstream of known functional domains, particularly the RING finger motif. Furthermore, the targeted region was chosen to contain a ClaI restriction site that could be used to screen for mutations and for genotyping purposes (Fig 3A). TALENs were assembled using the Golden Gate Cloning methodology [38] and *in vitro* transcribed mRNAs encoding each TALEN pair were injected into one-cell stage embryos. Genomic DNA was extracted from single embryos collected at 3 days after TALEN mRNA injection. PCR amplification of the targeted region, followed by ClaI digestion revealed the efficacy of the designed TALENs and of the use of the diagnostic restriction site as a genotyping strategy (Fig 3B).

When analyzed by restriction of genomic DNA at 3 days after TALEN mRNA injection, the mutation rate was about 93% (14 of 15 injected embryos tested). Then, we raised TALENs-injected embryos to establish an adult F0 founder population. To evaluate the efficiency of germ line transmission of the mutations, individual F0 fish carrying mutations were crossed to wild-type TU partners to obtain F1 offspring. Genomic DNA was isolated from individual F1 embryos from each F0 fish and analyzed by ClaI restriction. Embryos from 4 of 6 individual F0 fish were heterozygous mutants, demonstrating successful germ line transmission of the mutations. One mutation causes a deletion of 11 bp ($\Delta 11$) leading to a frame shifting of the coding sequence and appearance of a premature stop codon (Fig 3C). The *pcgf1* ^{$\Delta 11$} allele codes for a predicted protein of 79 amino acids lacking all conserved protein domains (S3A Fig) and was selected to raise the mutant zebrafish line used for further phenotypic studies after outcross to wild-type TU fish.

Among siblings from heterozygous *pcgf1*^{+/-} crosses, we successfully identified males and females carrying the homozygous $\Delta 11$ mutation (*pcgf1*^{-/-}) (Fig 3D). The homozygous mutants are viable and fertile allowing us to generate a *pcgf1*^{-/-} line and thus, to demonstrate that both maternal and zygotic *pcgf1* products are dispensable to zebrafish development. Since the absence of *pcgf1* products does not affect viability and fertility of zebrafish, all the experiments done on *pcgf1*^{-/-} mutants were then performed on zebrafish *pcgf1*^{-/-} homozygous lines in order to exclude any *pcgf1* maternal contribution. Whole-mount *in situ* hybridization showed *pcgf1* expression in the anterior part of the wild-type embryos at 24 hpf. By contrast, *pcgf1* mRNA was not detectable in homozygous *pcgf1*^{-/-} mutants (S3B Fig), suggesting that the *pcgf1* mutant mRNA is degraded via nonsense-mediated decay. Since PCGF1 has been shown to promote monoubiquitylation of histone H2A *in vitro* and in cells in culture [51], we next evaluated the monoubiquitylation status of histone H2A in our *pcgf1*^{-/-} line. Total histones were extracted from mutant and wild-type embryos at 7 dpf and monoubiquitylation of histone H2A was analyzed by western blot using a specific anti-H2AK119ub1 antibody. Fig 3E reveals that global levels of monoubiquitylated histone H2A are similar in *pcgf1*^{-/-} and *pcgf1*^{+/+} total embryos.

Normal but retarded craniofacial development in *pcgf1* mutants

Rnf2, the single E3 ubiquitin ligase of the zebrafish PRC1 complex, has been shown to be involved in zebrafish craniofacial development. Indeed, zebrafish *rnf2*^{-/-} mutants display a

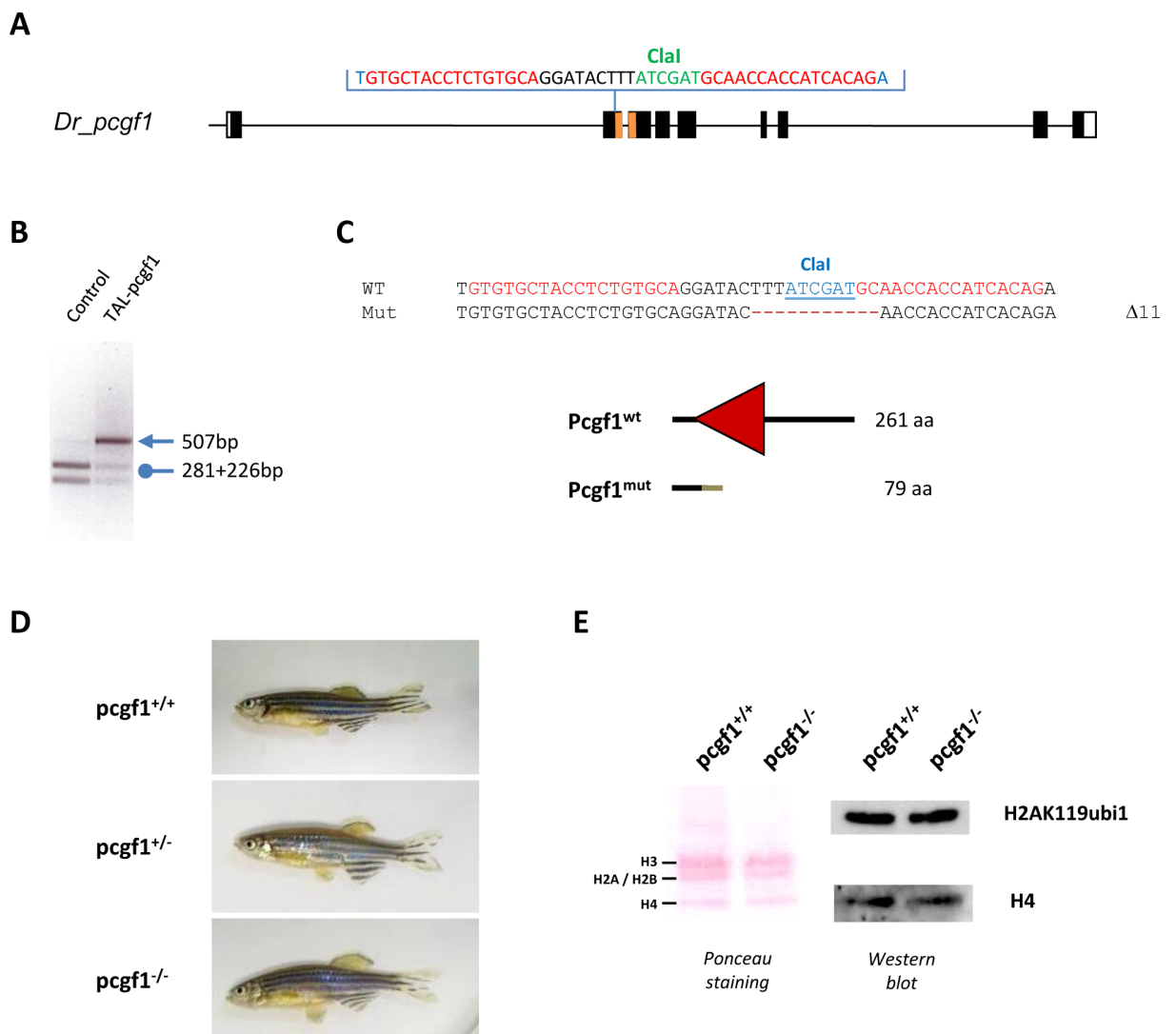


Fig 3. Generation of a *pcgf1* mutant line using the TALEN technology. (A) Schematic representation of the genomic structure of the *pcgf1* gene, with coding and untranslated exon depicted as solid and open boxes, respectively. The exonic regions coding for the conserved RING finger motif are shown in orange. The location of the *pcgf1* TALEN in exon 2 is indicated. The *pcgf1* TALEN target sequence with Left and Right TALEN binding sites in red is shown. The *Clal* restriction site is indicated in green. (B) Identification of mutant embryos using a diagnostic restriction. Genomic DNA was prepared from an uninjected (Control) and a *pcgf1* TALEN injected (TAL-*pcgf1*) embryo. The TALEN targeted DNA region is amplified by PCR and subjected to *Clal* digestion. The TAL-*pcgf1* injected embryo contains undigested material (arrow at 507 bp), indicating that the *Clal* diagnostic restriction site has been disrupted. (C) Sequence of the mutant allele compared to its wild-type counterpart. Dashes indicate deleted nucleotides. For the peptide sequence, the gray line indicates residues read out of frame prior to encountering a premature stop codon and the red triangle corresponds to the RING finger motif in the wild-type protein. Size of the predicted proteins is indicated. (D) Pictures of siblings from a *pcgf1*^{+/-} × *pcgf1*^{+/-} cross at 7 months. The genotype of the fish was established using the *Clal* diagnostic restriction on genomic DNA obtained by fin clipping. (E) Global monoubiquitinylation of histone H2A is not affected in *pcgf1*^{-/-} mutants. Total histone from pools of 5 embryos at 7 dpf were extracted and analyzed by western blotting. The efficiency of the transfer on the membrane is verified by Ponceau staining (Left) before incubation with anti-H2AK119ub1 and anti-H4 antibodies (Right).

doi:10.1371/journal.pone.0158700.g003

severe craniofacial phenotype, including an almost complete loss of all cranial cartilage, bone and musculature [52]. To investigate whether Pcgf1 function could also contribute to craniofacial development, *pcgf1*^{-/-} developing mutants were stained with Alcian blue and Alizarin red to visualize cartilage and bone formation, respectively [53] (Fig 4). At 2 dpf, Alcian blue stains the

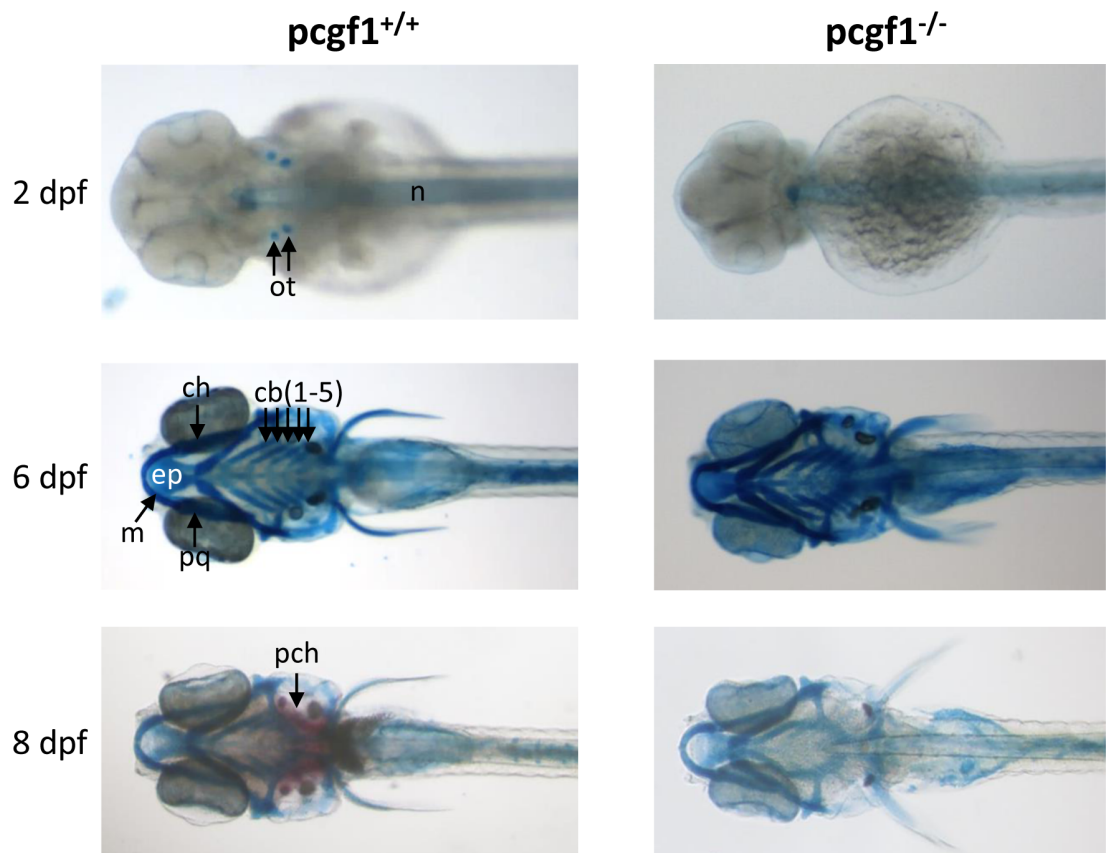


Fig 4. Development of cartilages and bones in *pcgf1*^{-/-} mutants. Alcian blue stained head cartilages and Alizarin red stained head bones of *pcgf1*^{+/+} (Left) and *pcgf1*^{-/-} mutant lines (Right) at the indicated developmental points. Note that ossification is visible at 8 dpf in the wild-type but not in the mutant. cb: ceratobranchials; ch: ceratohyal; ep: ethmoid plate; m: Meckel's cartilage; n: notochord; ot: otoliths; pch: parachordal plate; pq: palatoquadrate.

doi:10.1371/journal.pone.0158700.g004

otoliths of wild-type fish, whereas these structures are not yet apparent in *pcgf1*^{-/-} mutant. At 6 dpf, cranial cartilages appear to be similar in wild-type and mutant fish. Ossification of the parachordal plate starts to be visible by Alizarin red staining in wild-type larvae at 8 dpf, but not in *pcgf1*^{-/-} larvae. This lack of Alizarin red staining in mutants reflects a delay, but not a defect, in the ossification process, since bones look normal at later developmental stages (S4 Fig).

An antibody that recognizes the myosin heavy chain of vertebrate striated muscle was used to analyze muscle development in *pcgf1*^{-/-} mutants (Fig 5). At 3 dpf, *pcgf1*^{-/-} larvae present a retarded cranial musculature. However, craniofacial musculature appears normal in *pcgf1*^{-/-} mutants at 6 dpf.

Taken together, our results indicate that in contrast to *rnf2* mutants, *pcgf1* mutants present a normal but delayed craniofacial development.

Reduced growth of *pcgf1* mutants at early developmental stages

We observed that cranial cartilage and muscle development was retarded in *pcgf1*^{-/-} mutants. To investigate whether development was also delayed at early stages, we measured zebrafish growth during the first 6 days post-fertilization (Fig 6). Comparison of *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} embryo development during the cleavage period revealed that mutant embryos develop at slightly lower rates (Fig 6A). During the blastula period, *pcgf1*^{-/-} mutants are also retarded



Fig 5. Cranial musculature in *pcgf1*^{-/-} mutants. Cranial musculature revealed by immunocytochemistry using the anti-myosin MF20 antibody shows that muscle development is delayed at 3 dpf but normal at 6 dpf in *pcgf1*^{-/-} larvae. adm: adductor mandibulae; ah: adductor hyomandibulae; ao: adductor operculi; bm: branchial musculatur; do: dilatator operculi; h: heart; hh:hyohyoideus; ih: interhyoideus; ima: intermandibularis anterior; imp: intermandibularis posterior; lap: levator arcus palatini; lo: levator operculi; om: ocular muscle; pf: pectoral fin; sh: sternohyoideus.

doi:10.1371/journal.pone.0158700.g005

compared to wild-type embryos (Fig 6B). At 4.5 hpf, *pcgf1*^{-/-} mutants are at the transition between the high and oblong stages, whereas *pcgf1*^{+/+} embryos reach the dome stage. Similarly, at 6 hpf during the gastrula period, the epiboly is more advanced in wild-type embryos in comparison to their *pcgf1*^{-/-} counterparts. Altogether, these results indicate that the delayed developmental growth observed in *pcgf1*^{-/-} embryos takes place at the very early developmental stages. At larval stages between 2 and 3 dpf, *pcgf1*^{-/-} mutants are still significantly smaller than

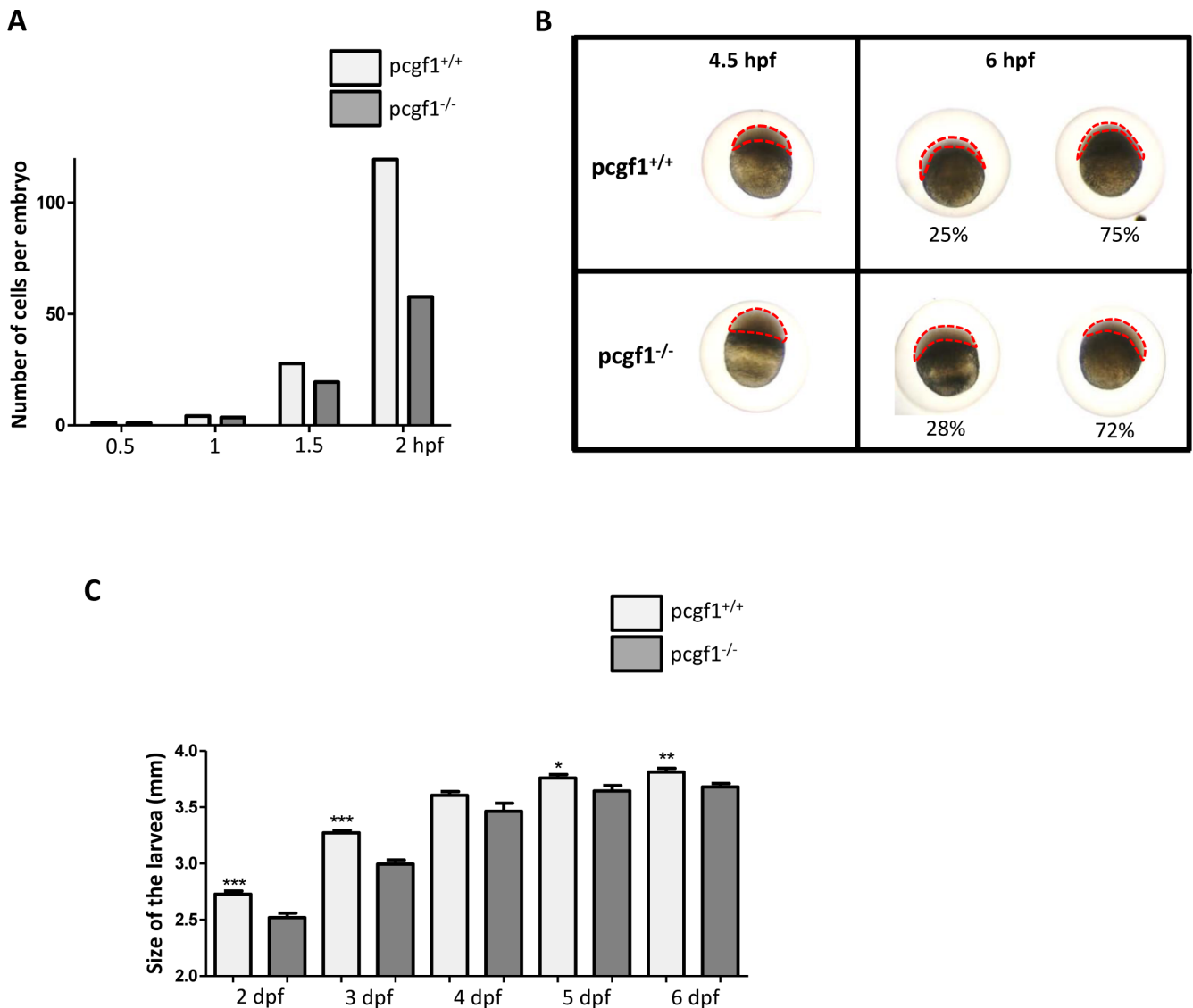


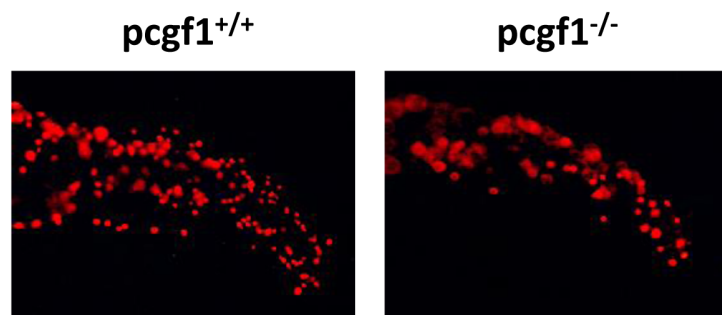
Fig 6. Growth of *pcgf1*^{-/-} mutants at early developmental stages. (A) Comparison of *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} embryo development during the cleavage period. Embryos from wild-type and mutant lines were fixed at 0.5, 1, 1.5 and 2 hpf, then 1-, 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 128- and 256-cell embryos were then counted, and results are expressed as the number of cells per embryo; n > 100 embryos per time point for each genotype. (B) Comparison of *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} embryo development at blastula and gastrula periods. Embryos were fixed at 4.5 and 6 hpf and representative embryos are shown. At 6 hpf embryos can be classified into 2 classes and the proportion of embryos of each group is indicated; n > 100 embryos. (C) Comparison of the size from head to tail, of fixed *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} larvae at 2, 3, 4, 5 and 6 dpf; Error bars indicate ± SD. Statistical significance was assessed by Student t-test analysis and significance expressed as the value of p (*, p < 0.1; **, p < 0.01, ***, p < 0.001). Measurements on embryos and larvae were done on 3 independent experiments using materials from different (3 to 6) layings.

doi:10.1371/journal.pone.0158700.g006

wild-type larvae. Then, the difference in size between wild-type and mutant larvae progressively decreases till 6 dpf (Fig 6C). Later, once exogenous feeding begins, variability in size increases between larvae with the same genotype and *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} larvae cannot be distinguished based on their respective size.

In order to investigate whether the retarded growth of *pcgf1*^{-/-} mutants at early developmental stages could be due to reduced cell proliferation, we applied whole-mount immunohistochemistry with the mitotic marker phosphohistone H3 since phosphorylation of histone H3

A



B

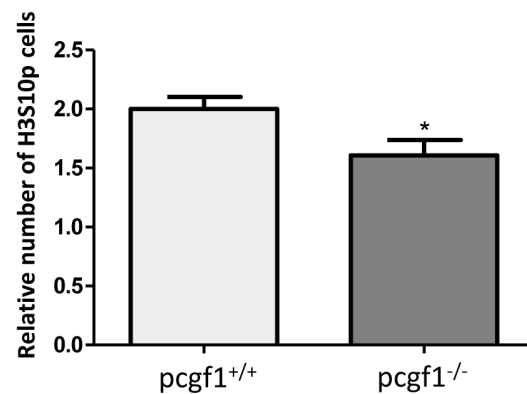


Fig 7. Cell proliferation measured by whole-mount immunohistochemistry using an anti-phosphohistone H3 antibody. (A) Antibody staining against phosphorylated histone H3 (anti-H3S10p) in *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} 24 hpf embryos. The caudal fin fold region of representative embryos is shown. (B) Quantification of H3S10p spots in the caudal fin fold expressed per unit of surface since *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} embryos have different sizes at this developmental stage. Error bars indicate \pm SD. Statistical significance was assessed by Student t-test analysis and significance expressed as the value of p and * indicates $p < 0.01$.

doi:10.1371/journal.pone.0158700.g007

at serine 10 constitutes a good marker for cell proliferation in zebrafish embryos [54, 55]. Fig 7 shows that *pcgf1*^{-/-} embryos harbor less mitotic cells than wild-type embryos at 24 hpf. Moreover apoptosis studies by Acridine orange staining and analysis of cellular senescence by senescence-associated β -galactosidase assays were not able to detect significant differences between *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} embryos at this stage (S5 Fig). Taken together, these results indicate that the reduced growth of *pcgf1*^{-/-} embryos is mainly due to reduced cell proliferation, but not to an increase in apoptosis or senescence.

pcgf1 mutants display an early aging phenotype

Although *pcgf1*^{-/-} zebrafish are viable and fertile, we observed that approximately 35% of mutant exhibit a spinal curvature at the age of 12 months (Fig 8A and 8B). This spinal curvature phenotype is a common morphological aging manifestation in zebrafish [56, 57]. Such a morphological alteration has not been observed in our wild-type fish collection at this age, but was also found in some heterozygous *pcgf1*^{+/-} zebrafish as well as in *pcgf1*^{-/-} mutants at the age

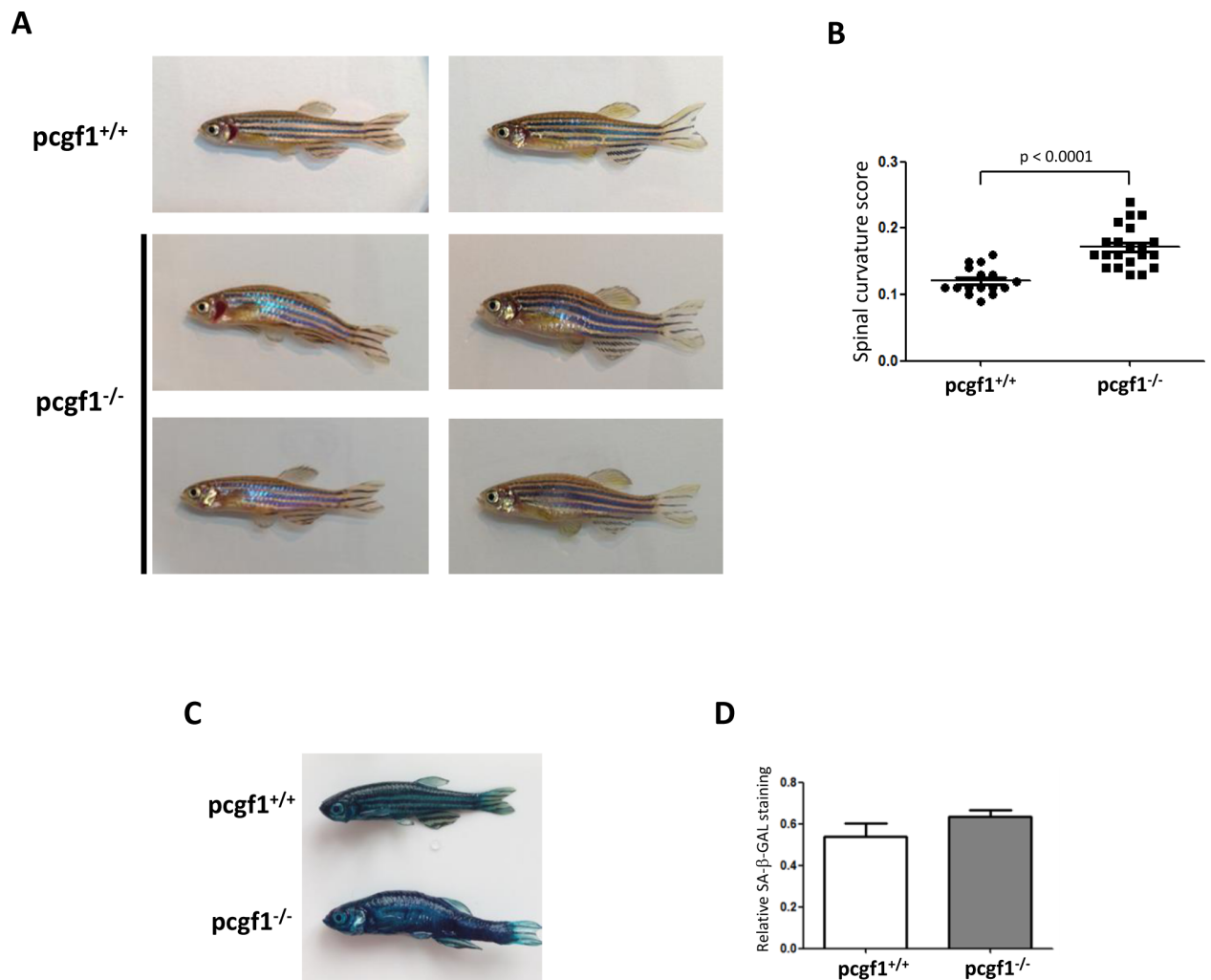


Fig 8. Phenotype of 12 month-old *pcgf1*^{-/-} mutants. (A) Pictures of 12 month-old *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} fish. Note that both male and female *pcgf1*^{-/-} fish exhibit mild spinal curvature. (B) Measurements of the spinal curvature score in 12 month-old fish from the *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} populations. Statistical significance was assessed by Student t-test analysis and significance expressed as the value of p. (C) Senescence-associated β-galactosidase (SA-β-Gal) activity in 12 month-old zebrafish. Whole body staining of SA-β-Gal activity in *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} fish harboring a spinal curvature are compared. (D) Quantification of SA-β-Gal activity in *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} fish. Blue pixels obtained by whole body staining of SA-β-Gal activity were quantified in the trunk area between the operculum and the dorsal and anal fins by Adobe Photoshop and plotted using Prism (GraphPad). Error bars indicate ± SD.

doi:10.1371/journal.pone.0158700.g008

of 6 months (S6 Fig). Since, we could not find abnormalities in the skeleton development in *pcgf1*^{-/-} fish (data not shown and S4 Fig), we assume that the spinal curvature observed in mutant fish reflect a premature aging phenotype. In addition, 12 month-old *pcgf1*^{-/-} zebrafish exhibit a stronger senescence-associated β-galactosidase (SA-β-Gal) activity when compared to control individuals (Fig 8C and 8D). Then, these results suggest that loss of *pcgf1* function may favor accelerated aging in zebrafish.

Discussion

Polycomb Group (PcG) protein complexes regulate gene expression by silencing target genes through chromatin structure modulation. Among these complexes, canonical PRC1 core complex is formed by a combination of 4 proteins, CBX, PCGF, PHC, and E3-ligase protein that

catalyzes the monoubiquitinylation of histone H2A at lysine 119 (H2AK119ub1). In mammals, these proteins have multiple orthologs, including five CBX (CBX2, 4, 6, 7 and 8), six PCGF (BMI1, PCGF1, 2, 3, 5 and 6), three PHC (PHC1, 2 and 3) and two E3-ligases (RING1 and RNF2). Different associations of these various family members generate multiple PRC1 variant complexes with potentially distinct biological functions.

Here, we address the question of the redundancy of PCGF family members in zebrafish. Like in mammals, the zebrafish genome encodes five PCGF family members. These members are *Pcgf1*, the ortholog of human PCGF1, two orthologs for BMI1, named *Bmi1a* and *Bmi1b*, two PCGF5 orthologs, *Pcgf5a* and *Pcgf5b*, and *Pcgf6*, the ortholog of PCGF6 [40].

Whole-mount *in situ* hybridization showed that expression of the zebrafish *pcgf* genes is not spatially restricted and all genes but not *pcgf5b*, are maternally expressed. It is also remarkable that the couples of orthologs which appeared after the genome duplication that occurred in the teleost lineage are characterized by distinct developmental expression profiles. In this regard, *pcgf5b* is not maternally expressed whereas *pcgf5a* is. Similarly, maternal *bmi1a* transcript levels decrease at about 4 hpf and are not detected anymore by whole-mount *in situ* hybridization at 8 hpf, whereas *bmi1b* transcripts remain abundant at all developmental stages. Zebrafish microRNA-430 (miR-430) family is highly expressed during early development. It targets hundreds of mRNAs and is required for clearance of hundred maternal transcripts during zygotic stages [43, 44]. Interestingly, we identified a putative miR-430-binding site within the *bmi1a* 3'UTR and showed that this *bmi1a* 3'UTR, but not the *bmi1b* 3'UTR, contains determinants responsible for the reduction of the GFP activity using a GFP sensor assay. Thus, this differential post-transcriptional regulation of the two *bmi1* orthologs potentially by the micro RNA miR-430, illustrates that various zebrafish *pcgf* genes are subjected to distinct expression controls during development. A differential expression of the *pcgf* genes is also found during the caudal fin regeneration. *pcgf1* and *pcgf5a* transcripts are not detected in regenerating caudal fin sections at 4 dpa by *in situ* hybridization, but *bmi1a* expression is found in the epidermis, *bmi1b* in medial structures, whereas *pcgf5b* and *pcgf6* are expressed in larger regions of regenerating fins. The fact that all the *pcgf* genes are not expressed in the same regenerating fin regions indicates that distinct PRC1 complexes, in terms of Pcgf subunit composition, do not necessarily co-exist in the same cells. Pcgf1- and Pcgf5a-containing PRC1 complexes are for instance absent from the regenerating tissues after amputation of the caudal fin. Our observations show that expression of all *pcgf* gene members and concomitant presence of all PRC1 complex combinations is not required for viability of all cell types.

To investigate the function of Pcgf1, we generate a *pcgf1*-loss of function zebrafish line using the TALEN technology. Homozygous *pcgf1*^{-/-} fish are viable and fertile indicating that both maternal and zygotic *pcgf1* products are dispensable to zebrafish development.

As part of the PRC1 complex, PCGF1 has been shown to enhance monoubiquitinylation of H2A both *in vitro* and in cells in culture [51]. Indeed, knock down of PCGF1 by siRNAs reduces H2A ubiquitinylation levels in HeLa cells [51]. In contrast, we show here that *pcgf1* inactivation in zebrafish does not affect global levels of monoubiquitinylation of histone H2A in embryos at 7 dpf, suggesting that Pcgf1-containing PRC1 complexes might contribute to a minor part of total H2A ubiquitinylation. In *pcgf1*^{-/-} zebrafish, the absence of Pcgf1-containing PRC1 complex activity could be compensated by the presence of other PRC1 complexes. The normal H2A ubiquitinylation levels in *pcgf1*^{-/-} fish might also explain why these mutants do not recapitulate the phenotypes observed in zebrafish harboring a mutation in the *rnf2* gene coding for the E3-ligase activity of the PRC1 complex [52, 58]. However, we cannot exclude a possible contribution of Pcgf1 to PRC1 activity in a rare subpopulation such as certain progenitors or stem cells. In such a case, even if Pcgf1 is specifically required for PRC1 function, it is likely that inactivation of *pcgf1* function could not affect global changes in H2A ubiquitinylation due to the limitation in cell number.

The analysis of embryonic growth at the cleavage, blastula and gastrula periods revealed that *pcgf1*^{-/-} mutants grow at slightly lower rates. We showed that this reduced growth correlates with cell proliferation decrease, but not with an increase in cell senescence or apoptosis. Also, at larval stages, *pcgf1*^{-/-} mutants are still significantly smaller than wild-type fish till 6 dpf. After exogenous feeding starts, *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} larvae cannot be distinguished based on their size, but mutants still show a retarded but normal, cranial cartilage, bone and musculature development.

In addition to a reduced growth rate and developmental delays at early stages, we observed an unusual number of *pcgf1*^{-/-} homozygous fish exhibiting a spinal curvature before the age of 12 months. This curvature is one common morphological aging manifestation in zebrafish [56, 57], suggesting that Pcgf1 function may prevent premature aging. However, the spinal curvature phenotype is not fully penetrant and found in about 35% of mutant fish at 12 months, indicating that additional factors contribute together with Pcgf1 to aging. Such a link between epigenetics and aging has also been reported for other PCGF family members. In particular, *Bmi1*-deficient mice exhibit postnatal defects in the self-renewal of adult stem cells and the aging-associated dysregulation of the *Bmi1/p16*^{Ink4a} pathway may account for failures in tissue repair in aging [59–62]. Interestingly, a genome-wide gain-of-function genetic screen in mouse embryonic stem (ES) cells also identifies Pcgf1 as a factor able to promote the expression of the ES cell pluripotency markers and able to partially rescue ES cell growth in the absence of leukemia inhibitory factor (LIF) [63]. Thus, we could speculate that reduced proliferation growth of certain progenitors and stem cells in *pcgf1*-deficient fish could impair both the growth at early developmental stages and later the tissue repair thus accelerating the aging phenotype appearance.

Conclusions

In this work, we show that *pcgf* family gene members are differentially regulated during zebrafish development and during the process of caudal fin regeneration. Then, the different PRC1 complexes in terms of Pcgf subunit composition are not always present in the same tissues during development and caudal fin regeneration. We also offer the first vertebrate model lacking Pcgf1 function and reveal that this Polycomb Group protein is involved in cell proliferation during early zebrafish embryogenesis. Finally our zebrafish model may also highlight a link between epigenetics and aging.

Supporting Information

S1 Fig. Method of measurement of the spinal curvature score in zebrafish. A body midline is drawn and measured between the tip of the caudal peduncle and the center of the occipital orbit (b). A perpendicular line is then drawn from the midline to the apex of the fish body (a). The spinal curvature score is defined as the ratio of the length of the perpendicular line relative to the length of the fish (a/b).

(PDF)

S2 Fig. The *bmi1a* 3'UTR reduces GFP expression levels in zebrafish embryos. (A) Comparison of *bmi1a* and *bmi1b* expression levels during zebrafish development analyzed by whole-mount *in situ* hybridization. Note that *bmi1a* transcripts are not detected at 8 hpf while *bmi1b* transcripts are present. (B) Organization of the *bmi1a* and *bmi1b* transcripts. A predicted base pairing between miR-430c and the *bmi1a* 3'UTR is shown. (C) Experimental set-up to test the effect of the *bmi1a* 3'UTR on GFP expression levels. A GFP reporter mRNA containing no 3'UTR (control), the *bmi1a* 3'UTR or the *bmi1b* 3'UTR is co-injected with control dsRed

(RFP) mRNA into 1-cell stage embryos. (D) GFP reporter expression (green) and control dsRed expression (red) at 4–5 hpf monitor mRNA injection (left panels). GFP reporter expression and control dsRed expression at 28 hpf reveals that *bmi1a* 3'UTR reduces GFP expression levels (right panels). (E) Quantification of relative GFP expression levels. Error bars indicate \pm SD; $n > 15$ embryos per experiment; Statistical significance was assessed by Student t-test analysis and significance expressed as the indicated p values. (PDF)

S3 Fig. Products of the *pcgf1*^{Δ11} allele. (A) Predicted protein encoded by the *pcgf1*^{Δ11} allele (Pcgf1^{mut}) compared to the wild-type Pcgf1 protein. Peptides coding for the RING finger and the PCGF conserved motif are indicated in red and green, respectively [40]. (B) Whole-mount *in situ* analysis of *pcgf1* expression on *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} embryos at the prim-5 stage (about 24 hpf). (PDF)

S4 Fig. Skeletal development of *pcgf1*^{-/-} zebrafish mutants using Alcian blue-Alizarin red double staining. Details of the cartilage and bone structures at the caudal (A), dorsal and anal fins (B) show that skeletal structures are formed, calcified and normal at 21 dpf. ep, epural; hspu: haemal spine of preural; hy: hypural; nspu: neural spine of preural; opstc: opisthural cartilage; phy: parhypural; adr: anal distal radial; apr: anal proximal radial; ddr: dorsal distal radials; dpr: dorsal proximal radial. (PDF)

S5 Fig. Analysis of apoptosis and senescence in *pcgf1*^{-/-} mutants at 24 hpf. (A) Apoptosis detection by Acridine orange staining of live embryos at 24 hpf. The caudal fin fold region of representative embryos is shown. (B) Senescence-associated β -galactosidase detection in 24 hpf embryos. Representative *pcgf1*^{+/+} and *pcgf1*^{-/-} embryos are shown. (PDF)

S6 Fig. Phenotype of 6 month-old *pcgf1*^{-/-} zebrafish. Example of 6 month-old *pcgf1*^{-/-} zebrafish harboring no (top), weak (middle) or more pronounced (bottom) spinal curvatures. (PDF)

Acknowledgments

We are grateful to Perrine Le Faou for whole-mount *in situ* hybridization experiments and to Justine Bailleul who took the pictures of adult fish.

This work was supported by the Inserm, the University of Lille, and grants from le Comité du Nord de la Ligue Contre le Cancer and l'ITMO Biologie Cellulaire, Développement et Evolution (BCDE). BD is supported by a fellowship from the Région Nord-Pas de Calais and the University of Lille.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: POA. Performed the experiments: BD PV POA. Analyzed the data: BD PV XLB POA. Wrote the paper: POA. Provided critical resources and support: XLB.

References

1. Völkel P, Angrand PO. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* 2007, 89:1–20. PMID: [16919862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16919862/)

2. Müller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, et al. Histone methyltransferase activity of the Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* 2002, 111:197–208. PMID: [12408864](#)
3. Nekrasov M, Klymenko T, Fraterman S, Papp B, Oktaba K, Köcher T, et al. Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *EMBO J* 2007, 26:4078–88. PMID: [17762866](#)
4. de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Apanah R, et al. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* 2004, 7:663–76. PMID: [15525528](#)
5. Wang H, Wang LJ, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, et al. Role of histone H2A ubiquitination in polycomb silencing. *Nature* 2004, 431:873–978. PMID: [15386022](#)
6. Fichle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* 2003, 17:1870–81. PMID: [12897054](#)
7. Min J, Zhang Y, Xu RM. Structural basis for specific binding of polycomb chromodomain to histone H3 methylated at lys 27. *Genes Dev* 2003, 17:1823–8. PMID: [12897052](#)
8. Francis NJ, Kingston RE, Woodcock CL. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science*. 2004; 306: 1574–7. PMID: [15567868](#)
9. Maertens GN, El Messaoudi-Aubert S, Racek T, Stock JK, Nicholls J, Rodriguez-Niedenführ M, et al. Several distinct Polycomb complexes regulate and co-localize on the INK4a tumor suppressor locus. *PLoS One* 2009, 4:e630.
10. Vandamme J, Völkel P, Rosnoblet C, Le Faou P, Angrand PO. Interaction proteomics analysis of Polycomb proteins defines distinct PRC1 complexes in mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 2011, doi: 10.1093/mcp/m110.002642
11. Ren X, Kerppola TK. REST interacts with Cbx proteins and regulates polycomb repressive complex 1 occupancy at RE1 elements. *Mol Cell Biol* 2011, 31:2100–10. doi: [10.1128/MCB.05088-11](#) PMID: [21402785](#)
12. Trojer P, Cao AR, Gao Z, Li Y, Zhang J, Xu X, et al. L3MBTL2 protein acts in concert with PcG protein-mediated monoubiquitination of H2A to establish a repressive chromatin structure. *Mol Cell* 2011 42:438–50. doi: [10.1016/j.molcel.2011.04.004](#) PMID: [21596310](#)
13. Gao Z, Zhang J, Bonasio R, Strino F, Sawai A, Parisi F, et al. PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol Cell* 2012, 45:344–56. doi: [10.1016/j.molcel.2012.01.002](#) PMID: [22325352](#)
14. Tavares L, Dimitrova E, Oxley D, Webster J, Poot R, Demmers J, et al. RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell* 2012, 148:664–78. doi: [10.1016/j.cell.2011.12.029](#) PMID: [22325148](#)
15. Blackledge NP, Farcas AM, Kondo T, King HW, McGouran JF, Hanssen LL, et al. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell* 2014, 157: 1445–59. doi: [10.1016/j.cell.2014.05.004](#) PMID: [24856970](#)
16. O'Loughlen A, Muñoz-Cabello AM, Gaspar-Maia A, Wu HA, Banito A, Kunowska N, et al. MicroRNA regulation of Cbx7 mediates a switch of Polycomb orthologs during ESC differentiation. *Cell Stem Cell* 2012, 10:33–46. doi: [10.1016/j.stem.2011.12.004](#) PMID: [22226354](#)
17. Völkel P, Le Faou P, Vandamme J, Pira D, Angrand PO. A human Polycomb isoform lacking the Pc box does not participate to PRC1 complexes but forms protein assemblies and represses transcription. *Epigenetics* 2012, 7:482–91. doi: [10.4161/epi.19741](#) PMID: [22419124](#)
18. Gil J, O'Loughlen A. PRC1 complex diversity: where is it taking us? *Trends Cell Biol* 2014, 24:632–41. doi: [10.1016/j.tcb.2014.06.005](#) PMID: [25065329](#)
19. van der Lugt NM, Domen J, Linders K, van Roon M, Robanus-Maadag E, te Riele H, et al. Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev* 1994, 8:757–69. PMID: [7926765](#)
20. Akasaka T, Kanno M, Balling R, Mieza MA, Taniguchi M, Koseki H. A role for mel-18, a Polycomb group-related vertebrate gene, during the anteroposterior specification of the axial skeleton. *Development* 1996, 122:1513–22. PMID: [8625838](#)
21. Coré N, Bel S, Gaunt SJ, Aurrand-Lions M, Pearce J, et al. Altered cellular proliferation and mesoderm patterning in Polycomb-M33-deficient mice. *Development* 1997, 124:721–9. PMID: [9043087](#)
22. Takihara Y, Tomotsune D, Shirai M, Katoh-Fukui Y, Nishii K, Motaleb MA, et al. Targeted disruption of the mouse homologue of the Drosophila polyhomeotic gene leads to altered anteroposterior patterning and neural crest defects. *Development* 1997, 124:3673–82. PMID: [9367423](#)

23. del Mar Lorente M, Marcos-Gutierrez C, Perez C, Schoorlemmer J, Ramirez A, et al. Loss- and gain-of-function mutations show a Polycomb group function for Ring1A in mice. *Development* 2000, 127:5093–100. PMID: [11060235](#)
24. Suzuki M, Mizutani-Koseki Y, Fujimura Y, Miyagishima H, Kaneko T, Takada Y, et al. Involvement of the Polycomb-group gene Ring1B in the specification of the anterior-posterior axis in mice. *Development* 2002, 129:4171–83. PMID: [12183370](#)
25. Voncken JW, Roelen BA, Roefs M, de Vries S, Verhoeven E, Marino S, et al. Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:2468–73. PMID: [12589020](#)
26. Isono K, Fujimura Y, Shinga J, Yamaki M, O-Wang J, Takihara Y, et al. Mammalian polyhomeotic homologues Phc2 and Phc1 act in synergy to mediate Polycomb repression of Hox genes. *Mol Cell Biol* 2005, 25:6694–706. PMID: [16024804](#)
27. Dahlem TJ, Hoshijima K, Jurynek MJ, Gunther D, Starker CG, Locke AS, et al. Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. *PLoS Genet* 2012, 8:e1002861. doi: [10.1371/journal.pgen.1002861](#) PMID: [22916025](#)
28. Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug RG 2nd, et al. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* 2012, 491:114–8. doi: [10.1038/nature11537](#) PMID: [23000899](#)
29. Moore FE, Reyon D, Sander JD, Martinez SA, Blackburn JS, Khayter C, et al. Improved somatic mutagenesis in zebrafish using transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *PLoS One* 2012, 7:e37877. doi: [10.1371/journal.pone.0037877](#) PMID: [22655075](#)
30. Chang N, Sun C, Gao L, Zhu D, Xu X, Zhu X, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res* 2013, 23:465–72. doi: [10.1038/cr.2013.45](#) PMID: [23528705](#)
31. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013, 31:227–9.
32. Xiao A, Wang Z, Hu Y, Wu Y, Luo Z, Yang Z, et al. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res* 2013, 41:e141. doi: [10.1093/nar/gkt464](#) PMID: [23748566](#)
33. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 1995, 203:253–310. PMID: [8589427](#)
34. Thisse C, Thisse B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc* 2008, 3:59–69. doi: [10.1038/nprot.2007.514](#) PMID: [18193022](#)
35. Doyle EL, Booher NJ, Standage DS, Voytas DF, Brendel VP, et al. TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Res* 2012, 40:W117–22. doi: [10.1093/nar/gks608](#) PMID: [22693217](#)
36. Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 2009, 326:1501. doi: [10.1126/science.1178817](#) PMID: [19933106](#)
37. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 2009, 326:1509–12. doi: [10.1126/science.1178811](#) PMID: [19933107](#)
38. Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 2011, 39:e82. doi: [10.1093/nar/gkr218](#) PMID: [21493687](#)
39. Kishi S, Bayliss PE, Uchiyama J, Koshimizu E, Qi J, Nanjappa P, et al. The identification of zebrafish mutants showing alterations in senescence-associated biomarkers. *PLoS Genet* 2008, 4:e1000152. doi: [10.1371/journal.pgen.1000152](#) PMID: [18704191](#)
40. Le Faou P, Völkel P, Angrand PO. The zebrafish genes encoding the Polycomb repressive complex (PRC) 1. *Gene* 2011, 475:10–21. doi: [10.1016/j.gene.2010.12.012](#) PMID: [21195142](#)
41. Pelegri F. Maternal factors in zebrafish development. *Dev Dyn* 2003, 228:535–54. PMID: [14579391](#)
42. Dosch R, Wagner DS, Mintzer KA, Runke G, Wiemelt AP, Mullins MC. Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition: mutants from the zebrafish I. *Dev Cell* 2004, 6:771–80. PMID: [15177026](#)
43. Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S, et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 2005, 308:833–8. PMID: [15774722](#)
44. Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, et al. Zebrafish miR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 2006, 312:75–9. PMID: [16484454](#)
45. Mishima Y, Giraldez AJ, Takeda Y, Fujiwara T, Sakamoto H, et al. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr Biol* 2006, 16:2135–42. PMID: [17084698](#)

46. Akimenko MA, Mari-Beffa M, Becerra J, Geraudie J. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Dev Dyn* 2003, 226:190–201. PMID: [12557198](#)
47. Poss KD, Keating M T, Nechiporuk A. Tales of regeneration in zebrafish. *Dev Dyn* 2003, 226:202–10. PMID: [12557199](#)
48. Stewart S, Tsun ZY, Izpisua Belmonte JC. A histone demethylase is necessary for regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106:19889–94. doi: [10.1073/pnas.0904132106](#) PMID: [19897725](#)
49. Takayama K, Shimoda N, Takanaga S, Hozumi S, Kikuchi Y. Expression patterns of *dnmt3aa*, *dnmt3ab*, and *dnmt4* during development and fin regeneration in zebrafish. *Gene Expr Patterns* 2014, 14:105–10. doi: [10.1016/j.gep.2014.01.005](#) PMID: [24509247](#)
50. Pfefferli C, Müller F, Jaźwińska A, Wicky C. Specific NuRD components are required for fin regeneration in zebrafish. *BMC Biol* 2014, 12:30.
51. Wu X, Gong Y, Yue J, Qiang B, Yuan J, Peng X. Cooperation between EZH2, NSPC1-mediated histone H2A ubiquitination and Dnmt1 in HOX gene silencing. *Nucleic Acids Res* 2008, 36:3590–9. doi: [10.1093/nar/gkn243](#) PMID: [18460542](#)
52. van der Velden YU, Wang L, Querol Cano L, Haramis AP. The polycomb group protein ring1b/mf2 is specifically required for craniofacial development. *PLoS One* 2013, 8:e73997. doi: [10.1371/journal.pone.0073997](#) PMID: [24040141](#)
53. Javidan Y, Schilling TF. Development of cartilage and bone. *Methods Cell Biol* 2004, 76:415–36. PMID: [15602885](#)
54. Shepard JL, Amatruda JF, Stern HM, Subramanian A, Finkelstein D, Ziai J, et al. A zebrafish *bmyb* mutation causes genome instability and increased cancer susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:13194–9. PMID: [16150706](#)
55. Verduzco D, Amatruda JF. Analysis of cell proliferation, senescence, and cell death in zebrafish embryos. *Methods Cell Biol* 2011, 101: 19–38. doi: [10.1016/B978-0-12-387036-0.00002-5](#) PMID: [21550438](#)
56. Gerhard GS, Kauffman EJ, Wang X, Stewart R, Moore JL, Kasales CJ, et al. Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp Gerontol* 2002, 37:1055–68. PMID: [12213556](#)
57. Hayes AJ, Reynolds S, Nowell MA, Meakin LB, Habicher J, Ledin J, et al. Spinal deformity in aged zebrafish is accompanied by degenerative changes to their vertebrae that resemble osteoarthritis. *PLoS One* 2013, 8:e75787. doi: [10.1371/journal.pone.0075787](#) PMID: [24086633](#)
58. van der Velden YU, Wang L, van Lohuizen M, Haramis AP. The Polycomb group protein Ring1b is essential for pectoral fin development. *Development* 2012, 139:2210–20. doi: [10.1242/dev.077156](#) PMID: [22619390](#)
59. Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 2003, 425:962–7. PMID: [14574365](#)
60. Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 2003, 423:302–5. PMID: [12714971](#)
61. Robson LG, Di Foggia V, Radunovic A, Bird K, Zhang X, Marino S. Bmi1 is expressed in postnatal myogenic satellite cells, controls their maintenance and plays an essential role in repeated muscle regeneration. *PLoS One* 2011, 6:e27116. doi: [10.1371/journal.pone.0027116](#) PMID: [22096526](#)
62. Yamakoshi K, Katano S, Iida M, Kimura H, Okuma A, Ikemoto-Uezumi M, et al. Dysregulation of the Bmi-1/p16^{ink4a} pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function. *Aging Cell* 2015, 14:616–24. doi: [10.1111/acer.12337](#) PMID: [25832744](#)
63. Pritsker M, Ford NR, Jenq HT, Lemischka IR. Genomewide gain-of-function genetic screen identifies functionally active genes in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:6946–51. PMID: [16621925](#)

The histone lysine methyltransferase Ezh2 is required for maintenance of the intestine integrity and for caudal fin regeneration in zebrafish

Barbara Dupret^{1¶}, Pamela Völkel^{1,2¶}, Constance Vennin^{1,3}, Robert-Alain Toillon¹, Xuefen Le Bourhis¹ and Pierre-Olivier Angrand^{1*}

¹ Cell Plasticity & Cancer, Inserm U908 / University of Lille, Lille, France

² CNRS, Lille, France

³ SIRIC ONCOLille, Lille, France

* Corresponding author

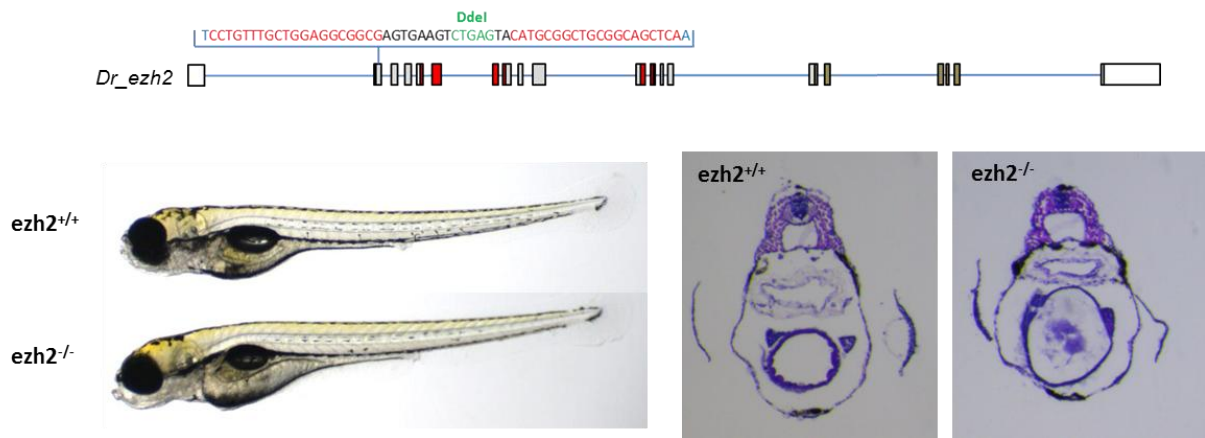
Cell Plasticity & Cancer, Inserm U908 / University of Lille, Bâtiment SN3, Cité Scientifique, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.

Tel.: + 33 3 20 33 62 22

E-mail: pierre-olivier.angrand@univ-lille1.fr

¶ These authors contributed equally to this work

GRAPHICAL ABSTRACT



HIGHLIGHTS

- Zebrafish *ezh2*^{-/-} mutants gastrulate properly and present a normal body plan.
- Zebrafish *ezh2*^{-/-} mutants die at 12 dpf with defects of the intestine wall.
- Ezh2 function is required for intestine and exocrine pancreas maintenance.
- Loss of Ezh2 function is responsible for a strong increase in apoptosis.
- Ezh2 is required for regeneration of the larval caudal spinal cord after transection.

ABSTRACT

The histone lysine methyltransferase EZH2, as part of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), mediates H3K27me3 methylation which is involved in gene expression program repression. Through its action, EZH2 controls cell-fate decisions during the development and the differentiation processes. Here, we report the generation and the characterization of an *ezh2*-deficient zebrafish line. In contrast to its essential role in mouse early development, loss of *ezh2* function does not affect zebrafish gastrulation. *Ezh2* zebrafish mutants present a normal body plan but die at around 12 dpf with defects in the intestine wall, due to enhanced cell death. Thus, *ezh2*-deficient zebrafish can initiate differentiation toward the different developmental lineages but fail to maintain the intestinal homeostasis. Expression studies revealed that *ezh2* mRNAs are maternally deposited. Then, *ezh2* is ubiquitously expressed in the anterior part of the embryos at 24 hpf, but its expression becomes restricted to specific regions at later developmental stages. Pharmacological inhibition of Ezh2 showed that maternal Ezh2 products contribute to early development but are dispensable to body plan formation. In addition, *ezh2*-deficient mutants fail to properly regenerate their spinal cord after caudal fin transection suggesting that Ezh2 and H3K27me3 methylation might also be involved in the process of regeneration in zebrafish.

KEYWORDS: Zebrafish - TALEN - Polycomb repression – Ezh2 – GSK126.

LIST OF ABBREVIATIONS: bp: base pair; dpf: days post fertilization; dpa: days post amputation; *ezh2*: enhancer of zeste homolog 2 (polycomb repressive complex 2 subunit); hpf: hours post fertilization; *gcga*, glucagon a; *ins*: insulin; NMD: nonsense-mediated decay; nt: nucleotide; *phox2bb*: paired-like homeobox 2bb; PRC: Polycomb Repressive Complex; *rnf2*: ring finger protein 2; TALEN: transcription activator-like effector nuclease; try: trypsin.

1. INTRODUCTION

Polycomb-group (PcG) proteins are epigenetic repressors of transcriptional programs involved in the maintenance of cellular identity during development and differentiation [1-3]. PcG proteins assemble into at least two well-characterized and biochemically distinct chromatin-modifying protein complexes that are termed Polycomb Repressive Complex 1 and 2 (PRC1 and PRC2). In the canonical pathway, PRC2 composed of the core proteins EZH2, EED and SUZ12 together with RBAP46/48 and other accessory subunits, initiates gene silencing by catalyzing di- and trimethylation of lysine 27 of histone H3 (H3K27me_{2/3}) [4-8]. PRC1 is then recruited to the target regions by binding to H3K27me₃ marks through the CBX component of PRC1 [9], and subsequently catalyzes the monoubiquitinylation of H2AK119 (H2AK119ub1) to maintain gene silencing [10-12].

Within the PRC2, EZH2 is a SET domain-containing protein harboring the histone methyltransferase activity, whereas EED and SUZ12 are involved in PRC2 stability and are necessary for EZH2 catalytic activity [13-15]. Genome-wide studies in mouse and human embryonic stem cells revealed that PRC2 and H3K27me₃ marks are deposited at the promoters of numerous genes involved in cell differentiation, lineage specification and development, leading to the idea that EZH2 may be involved in the maintenance of the pluripotency of stem cells by keeping developmental genes repressed [9, 16-22]. Differentiation would then be associated with a relocation of PRC2, in turn responsible for the repression of the stem cell genes and enabling activation of gene expression programs specific to given developmental lineages. Indeed, the PRC2 components are essential for early mouse development and knock-out mutants for *Ezh2*, *Eed* and *Suz12* initiate but fail to complete gastrulation and die at around embryonic days 7 to 9 [14, 23, 24]. This death correlates with the alteration of lineage-specifying gene expression, a decrease in cell proliferation and an increase of apoptosis [14].

In human, recent cancer genome sequencing and expression studies reported that several genes encoding PRC2 subunits are mutated or have their expression altered in different cancer types [25, 26]. Furthermore, mutations in EZH2 were shown to cause the Weaver syndrome (OMIM:277590), a syndrome characterized by skeletal overgrowth, tall stature, a dysmorphic craniofacial appearance and variable intellectual disability [27-30].

The zebrafish model provides a unique tool to investigate gene function during development. The zebrafish (*Danio rerio*) is a widely used vertebrate model for studying development and morphogenesis. Owing to external fertilization and optical transparency of the embryos, early development of zebrafish can be easily monitored. Furthermore, the recent emergence of powerful genome-editing technologies, such as the Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated System (CRISPR/Cas9) applied to zebrafish allows rapid gene function studies in this organism [31-36]. Using the TALEN technology, we generated here a heterozygous zebrafish line harboring an *ezh2* loss-of-function allele to investigate its role in development. We show that in contrast to what is observed in mice, *ezh2* zygotic expression is not required for gastrulation and tissue specification in zebrafish. However, homozygous mutants die at about 12 dpf with defects in the intestine wall, suggesting that zygotic *ezh2* expression is necessary for the maintenance of the integrity of the intestine at later developmental time points. Furthermore, we show that the ability of spinal cord regeneration at the caudal fin is also affected in homozygous mutant larvae.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Zebrafish maintenance, embryo preparation and treatment. Zebrafish (TU strain) were maintained at 27.5°C in a 14/10h light/dark cycle. The evening before spawning, males and females were separated into individual tanks. Spontaneous spawning occurred when the light turned on and embryos or larvae were collected and staged according to Kimmel et al. [37]. The feeding of zebrafish larvae starts at 6 dpf for all experiments. The chorions were removed from embryos by the action of 1% pronase (Sigma) for 1 min. Zebrafish embryos or larvae were fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PBS (phosphate-buffered saline, Invitrogen), dehydrated gradually to 100% methanol and kept at -20°C.

For caudal fin amputation, 6-month-old adult zebrafish were anesthetized with MS-222 (tricaine, ethyl 3-aminobenzoate methanesulphonate, 250 mg/L; Sigma-Aldrich) and approximately two-thirds of the fin was cut with a blade. After amputation, fish were placed in the aquarium at 27.5°C for fin regeneration. The blastema starts to form at approximately 24 hours post amputation (hpa) and the amputated fins have been fully restored at around 20 days post amputation (dpa). Larval caudal fin transections were performed at 3 dpf within the pigment gap distal to the circulating blood after anesthesia, as described by Wilkinson et al. [38].

To inhibit Ezh2 activity, dechorionated embryos were exposed to 1 µM GSK126 (A11757, Adooq Bioscience) dissolved in DMSO or to an equivalent concentration of DMSO (0.01%, control) at the 1-2 cell stage, at 3 hpf or after larval caudal fin amputation.

2.2. Animal ethics statement. The zebrafish experiments described in this study were conducted according to the French and European Union guidelines for the handling of laboratory animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes). The experimental procedures carried out on zebrafish were reviewed and approved by the local Ethics Committee of the Animal Care Facility of the University of Lille. At the end of the experiment, fish older than 8 dpf were humanely euthanized by immersion in an overdose of tricaine methane sulfonate (MS-222, 300 mg/L) for at least 10 minutes, whereas younger fish were immobilized by submersion in ice water (5 parts ice/1 part water, 0-4°C) for at least 1 hour to ensure death by hypoxia.

2.3. TALEN design and assembly. The *ezh2*

TALEN target site was selected using the online TAL Effector-Nucleotide Targeter tool (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>; [39]) in exon 2 with the following parameters: (i) spacer length of 14–17 bp, (ii) repeat array length of 16–18 bp, (iii) each binding site was anchored by a preceding T base in position “0” as has been shown to be optimal for naturally occurring TAL proteins [40, 41], (iv) presence of a restriction site (DdeI) within the spacer sequence for screening and genotyping purposes.

Ezh2-specific TALEN constructs were engineered using the TALEN Golden Gate assembly system described by Cermak et al., [42]. The TALEN expression backbones, pCS2TAL3DD and pCS2TAL3RR [31], and the plasmids providing repeat variable diresidues (RVD) [42] for Golden Gate Cloning were obtained from Addgene.

2.4. mRNA injection into zebrafish embryos. Capped mRNAs were synthesized using the SP6 mMACHINE kit (Ambion) from linearized plasmid templates. mRNAs (50-100 µg) were injected into 1-cell zebrafish embryos using a FemtoJet microinjector (Eppendorf).

2.5 Genotype analyses. Three-days-old embryos or pieces of caudal fin were incubated in 20 µL PCR extraction buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 2 mM EDTA, 0.2% Triton X-100, 100 µg/mL Proteinase K) and placed at 50°C for 4 hours prior proteinase K inactivation at 95°C for 5 min. Genotype analysis was performed by PCR on 2.5 µL of samples using the primer set TAL_*ezh2*_5'_S21Ac (GGTATGGTTGTTGCAGTTCACAGAC) and TAL_*ezh2*_3'_S21Ac (AACACCAAACCTACACAAGCAGCA) followed by PCR product digestion with the DdeI restriction enzyme. Sequence determination (GATC-Biotech, Germany) was performed after cloning of the PCR products into pCR-XL-TOPO (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

To achieve genotyping on paraformaldehyde-fixed embryos and larvae, DNA was extracted using sodium hydroxide and Tris [43]. Briefly, single embryos were placed into microcentrifuge tubes containing 20 µL 50 mM NaOH and heated 20 min at 95°C. The tubes were then cooled to 4°C and 2 µL of 1 M Tris-HCl, pH7.4 was added to neutralize the basic

solution. Genotype analysis was performed on 2.5 μ L of samples by PCR-Ddel digestion, as described above.

2.6. Alcian blue staining. Alcian blue staining was performed as previously described [44]. Zebrafish larvae were fixed 2 hours at room temperature in 4% paraformaldehyde and dehydrated 10 min in 50% ethanol. Cartilages were stained in 0.02% Alcian blue (Sigma Aldrich), 60 mM MgCl₂, 70% ethanol, overnight at room temperature. Pigments were bleached by a 2-hours incubation in water containing 1% KOH, 3% H₂O₂. Larvae were then digested with 0.05% trypsin (Sigma Aldrich) until tissue disappeared (around 4 hours) before storage in 70% glycerol. After imaging with a Leica MZ125 stereomicroscope equipped with a Leica DFC295 digital camera, DNA was extracted using sodium hydroxide and Tris for genotyping purposes.

2.7. Whole-mount immunohistochemistry. Zebrafish embryos were fixed 2 hours at room temperature in 4% paraformaldehyde, followed by dehydration and storage overnight in methanol at -20°C. Embryos were then permeabilized in PBS containing 0.1% Tween20, 10 μ g/mL proteinase K and blocked in PBS containing 0.1% Tween20 and 2% sheep serum. For muscle development studies, the primary antibody used was a mouse anti-MF20 (1:20; Developmental Studies Hybridoma Bank, developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242) and the secondary antibody was a peroxidase conjugated AffiniPure goat anti-mouse (1:500; 115-035-003, Jackson ImmunoResearch). The embryos were imaged using a Leica MZ125 stereomicroscope equipped with a Leica DFC295 digital camera. For H3K27me3 analyses, the primary antibody used was a rabbit anti-H3K27me3 (1:750; 07-449, Millipore) and the secondary antibody was an Alexafluor 546 conjugated goat anti-rabbit antibody (1:5,000; A11035, Invitrogen). The embryos were then imaged using a Leica MZ10F stereomicroscope equipped with a Leica DFC3000G digital camera. After imaging, DNA was extracted using sodium hydroxide and Tris and embryos were genotyped.

2.8. Oil red-O staining. Zebrafish larvae were fixed in 4 % paraformaldehyde overnight at 4°C and their pigments bleached by 2-hours incubation in a solution containing 1% KOH and 3% H₂O₂. Larvae were washed five times in PBS and stained with oil red-O (Hamiya Biomedical

Company) for 15 min. Stained larvae were washed with PBS, stored in 70% glycerol and imaged on a bright-field dissecting microscope (Leica MZ125) equipped with a Leica DFC295 digital camera. After imaging, DNA was extracted using sodium hydroxide and Tris for genotyping analyses.

2.9. Histological analyses. For histological analyses, tail biopsies were used for genotyping before paraformaldehyde fixation of the larvae. Larvae were embedded in paraffin and cut into 5 μm -thick sections. These were mounted on sylanated glass slides, deparaffinated, rehydrated and stained with hematoxylin and eosin for histological analysis.

Immunostainings on zebrafish sections were done to visualize actin using a rabbit anti-actin primary antibody (1:50; A2066, Sigma) and a horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1:500; 711-035-152, Jackson ImmunoResearch) and counterstained with hematoxylin (RAL Diagnostic) for nuclear staining. F-actin was visualized by Alexa fluor 594 conjugated phalloidin (1:100; A12381, Thermofisher) staining and nuclear counterstaining done with 1 mM Hoechst 33258 (861405, Sigma). Image acquisition was performed using a Nikon Eclipse Ti microscope equipped with a Nikon DXM1200C digital camera.

2.10. TUNEL assay. TUNEL assays were performed using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, 11 684 817 910), according to the manufacturer's instructions. Briefly, larvae were embedded in paraffin and cut into 5 μm -thick sections. These were mounted on sylanated glass slides, deparaffinated, rehydrated and digested 10 min at room temperature with 3 U/mL DNase I in 50 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM MgCl_2 , 1 mg/mL BSA. The TUNEL Reaction Mixture was added to slides, incubated 1 hour at 37°C, rinsed 3 times with PBS before addition of the Converter-POD for 30 min at 37°C. Samples were rinsed 3 times with PBS, incubated 45 min at room temperature in presence of the DAB substrate, washed 3 times with PBS, dehydrated and mounted under glass coverslips. The images were acquired using a Nikon Eclipse Ti microscope equipped with a Nikon DXM1200C digital camera.

2.11. Whole-mount in situ hybridization. For *ezh2*, *ins* and *gcga*, antisense RNA probes were synthesized with the DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche, 11175025910), following the manufacturer's instructions from 1 μg of linearized plasmid DNA. The cDNA clone

MGC:152758 IMAGE:2639510 purchased at imaGenes GmbH (Berlin) was used for *ezh2* probes, whereas *ins* and *gcga* cDNA containing vectors were a gift from Dr Julien Bricambert and Pr Amar Abderrahmani (CNRS UMR 8099, EGID). *try* and *phox2bb* probes were generated using RT-PCR from total mRNA extracted from zebrafish larvae at 5 dpf using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), following the manufacturer's protocol. After Reverse Transcription (Superscript III, Invitrogen), cDNAs were amplified by PCR using the probe specific primers, coupled to the T7 sequence for forward primers and the SP6 sequence for reverse primers. DIG labelled Antisense-RNA probes have been synthesized using the DIG RNA Labeling Kit (SP6) (Roche), following the manufacturer's instructions.

The primers used for probe generation were:

ISH_try_F:	TAATACGACTCACTATAGGGTGCTCACTGCTACAAGTCCCGT
ISH_try_R:	GATTTAGGTGACACTATAGCCCGAGCTTAGTTGGAGTTCATGGT
ISH_phox2bb_F:	TAATACGACTCACTATAGGGGGGCCTAACCCGAACCCTACCTC
ISH_phox2bb_R:	GATTTAGGTGACACTATAGGAGCGCACATCGCAGTCTATCGG

In situ hybridization was performed as described by Thisse and Thisse [45]. Briefly, the fixed embryos were rehydrated and permeabilized with 10 µg/mL proteinase K for 30 sec (1 to 2-cell embryos), 10 min (24 hpf embryos) or 30 min (48 to 120 hpf embryos) at room temperature. Ten to 50 embryos from each time point were hybridized with digoxigenin-labeled antisense RNA probes at 70°C. After extensive washing, the probes were detected with anti-digoxigenin-AP Fab fragment (Roche Diagnostics, 1093274, diluted at 1:10,000), followed by staining with BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium) alkaline phosphate substrate. The embryos were imaged using a Leica MZ125 stereomicroscope equipped with a Leica DFC295 digital camera.

Regenerating fins from adult fish or fin amputated larvae were fixed in 4% paraformaldehyde overnight, then rehydrated and permeabilized with 10 µg/mL proteinase K for 10 min (5 dpf larvae) or 40 min (adult fish) before whole-mount *in situ* hybridization and imaging.

To visualize *ezh2* mRNA signals in the eye, the digoxigenin-labeled and hybridized antisense RNA probes were detected using tyramide signal amplification (TSA)-Cy5 reagent (Roche) according to Brend and Holley [46]. Larvae were then embedded in paraffin, cut into 5-µm-thick sections and the eye sections were imaged using a Nikon Eclipse Ti microscope equipped with a Nikon DXM1200C digital camera.

2.12. Histone extraction and western blot analysis. Histone extracts were prepared by lysis of 5 to 10 embryos per tube in PBS containing 0.5% Triton X-100, 2mM phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), 0.02% NaN₃, 10 min on ice. After centrifugation, the pellet was resuspended in 0.2 N HCl and core histones extracted overnight at 4°C while rocking. Samples were centrifuged and the supernatant containing the histones was stored at -20°C. For Western blotting, protein samples in SDS loading buffer were electrophoresed on 4-12% Bis-Tris gels (NuPAGE, Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membranes using the iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen). Efficiency of the transfer is verified by immersing the blotted membrane into a Ponceau S staining Solution (0.1% Ponceau S in 5% acetic acid, Sigma). The membranes were then destained and blocked in 5% milk powder in PBS-T (1x PBS with 0.1% Tween20) for 1 hour at room temperature, incubated for the same time with the primary antibody in PBS-T, and washed three times 10 min in PBS-T. The membranes were then incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibody in PBS-T for 1 hour and afterward washed three times 10 min in PBS-T. The signal was detected using a chemiluminescence substrate (Western Lightning Ultra, PerkinElmer) with a Luminescent Image Analyzer (LAS-4000, Fujifilm).

Primary antibodies used were mouse anti-H3K27me3 (1:1,000; ab6002, Abcam) and rabbit anti-H3 (1:5,000; ab1791, Abcam). The secondary antibodies were peroxidase conjugated anti-mouse antibody (1:10,000; 115-035-003, Jackson ImmunoResearch) and peroxidase conjugated anti-rabbit antibody (1:10,000; 711-035-152, Jackson ImmunoResearch).

2.13. RNA extraction and RT-PCR. Total RNA was isolated from 2 hpf, 3 dpf, 5 dpf and 9 dpf wild-type and mutant embryos or larvae using Trizol. cDNA was synthesized using Superscript III (18080-044, Invitrogen). To recover *ezh2* transcripts, a forward primer in Exon 1 (GAGGTGAAAGGACCCTCTACC) and a reverse primer in Exon 3 (CTCAGTTTCCATTCTGATTTAAG) were used, whereas *β-actin* primers were already published (b-actinF: CGTGACATCAAGGAGAAGCT and b-actinR: ATCCACATCTGCTGGAAGGT) [47].

3. RESULTS

3.1. TALEN-mediated *ezh2* inactivation in zebrafish. To gain insights into the function of *ezh2* in zebrafish development, we generated *ezh2* loss-of-function mutants using the transcription activator-like effector (TALE) nuclease (TALEN)-based technology. TALENs consist in the fusion of the endonuclease domain of the restriction enzyme FokI to engineered sequence-specific DNA-binding domains from TALEs in order to target the nuclease activity to chosen genomic sequences. Once activated through dimerization, the FokI catalytic domain introduces a double strand DNA break which is repaired through the non-homologous end joining (NHEJ) pathway. This repairing process is error prone and may introduce insertion and/or deletion (*indel*) mutations. Among the resulting mutations, several will lead to shifts in the open reading frame, impairing the resulting protein sequence. TALENs were designed to target a region within the second exon of *ezh2* in order to introduce a frame shift upstream of all known Ezh2 conserved domains, including two SANT domains and the catalytic SET domain. In addition, the targeted region was chosen to contain a DdeI restriction site that could be used to screen for mutations and for genotyping purposes (**Figure 1A**). TALENs were assembled using the Golden Gate Cloning methodology [42] and *in vitro* transcribed mRNAs encoding each TALEN pair were injected into one-cell stage embryos. Genomic DNA was extracted from single embryos collected at 3 days after TALEN mRNA injection. PCR amplification of the targeted region, followed by DdeI digestion revealed the efficacy of the designed TALENs and the convenience of the diagnostic restriction site as a genotyping strategy (**Figure 1B**).

When analyzed by restriction of genomic DNA at 3 days after TALEN mRNA injection, the mutation rate at the *ezh2* locus was about 94% (17 of 18 injected embryos tested). Then, we raised TALENs-injected embryos to establish an adult F0 founder population. To evaluate the efficiency of germ line transmission of the mutations, individual F0 fish carrying mutations were crossed to wild-type TU partners to obtain F1 offspring. Genomic DNA was isolated from individual F1 embryos from each F0 fish and analyzed by DdeI restriction. Embryos from 3 of 14 individual F0 fish were heterozygous mutants, demonstrating successful germ line transmission of the mutations. One mutation causes a 22 bp net insertion (insertion of 27 nucleotides together with a deletion of 5 bp) leading to a frame shifting of the coding sequence and appearance of a premature stop codon (**Figure 1C**). This *ezh2*⁺²² allele codes

for a predicted protein of 60 amino acids, lacking all conserved protein domains (**Figure 1D**, **Supplementary Figure S1**) and was selected to raise the mutant *ezh2*^{+/-} zebrafish line used for further phenotypic studies after outcross to wild-type TU fish. Heterozygous *ezh2*^{+/-} fish are viable, fertile and do not show any phenotype. Surprisingly, among siblings from heterozygous *ezh2*^{+/-} crosses, homozygous *ezh2*^{-/-} fish were identified till 12 dpf indicating that *ezh2* zygotic function is not required for zebrafish early development. Furthermore *ezh2*^{-/-} mutant fish do not present gross morphological alterations (**Figure 2A**) and show a normal craniofacial cartilage and muscle development (**Figure 2B-C**). However, we could not identify *ezh2*^{-/-} fish after 12 dpf suggesting that zygotic *ezh2* function is required for zebrafish development at this time point.

3.2. Ezh2 expression during zebrafish development. In order to study *ezh2* mRNA expression, embryos from heterozygous *ezh2*^{+/-} crosses were subjected to whole-mount *in situ* hybridization (**Figure 3**). At the 2-cell stage, maternal *ezh2* mRNAs are detected in the embryo (**Figure 3A**). To investigate whether the maternally provided transcripts correspond to wild type and/or mutant products, RNAs were extracted, amplified by RT-PCR and the PCR products were subjected to Ddel digestion. **Figure 3B** shows that these maternal transcripts are mainly derived from the wild-type allele, but not from the mutant allele, suggesting that mutant *ezh2* transcripts are subjected to nonsense-mediated decay (NMD) in the zebrafish female germline. *In situ* hybridization experiments revealed that *ezh2* is ubiquitously expressed in the anterior part of wild-type embryos at 24 hpf, but its expression becomes restricted to specific regions such as the pectoral fin buds, the optic tectum, the mid-hindbrain region, the branchial arches, the eyes and the intestine, at later developmental stages (**Figure 3C-D**, **Supplementary Figure S2A**). This restricted *ezh2* expression correlates with a decrease of total *ezh2* mRNA abundance assessed by RT-PCR (**Supplementary Figure S2B**).

In mutant embryos, only a weak hybridization signal could be detected by *in situ* hybridization (**Figure 3C-D**). This residual *ezh2* expression is found in the same restricted regions as found in wild-type embryos, suggesting that these transcripts do not derive from maternally deposited products. Indeed, studies of *ezh2* mRNAs found in mutant embryos by RT-PCR, followed by Ddel cleavage and sequencing, show that these transcripts contain the +22 nt net insertion and consequently arise from the transcription of the mutant allele

(**Supplementary Figure S2C-D**). This also indicates that mutant *ezh2* mRNAs escape, at least in part, to NMD regulation in *ezh2*^{-/-} embryos. Altogether, our results demonstrate that maternal wild-type transcripts are present at very early developmental stages, but are not maintained at later stages. Furthermore, *ezh2* zygotic expression is ubiquitous and relatively high at 24 hpf, but becomes restricted to a limited number of tissues at later developmental stages.

3.3. Ezh2 mutant fish die at around 12 dpf with intestine defects. To investigate in more details why *ezh2*^{-/-} embryos die at 12 dpf, zebrafish larvae from *ezh2*^{+/-} crosses were stained with the neutral lipid dye oil red-O in order to better visualize the digestive organs. At 9 dpf, this lipid staining reveals marked differences between *ezh2*^{-/-} and their *ezh2*^{+/+} counterparts (**Figure 4A**). In particular, the liver shows a stronger coloration in mutant fish, suggesting that the lipid composition might change in absence of *ezh2* function. More strikingly, oil red-O staining points out differences in the structure of the intestine. In mutant *ezh2*^{-/-} fish, the intestine epithelium looks finer than in wild-type fish. This observation was confirmed by the analysis of histological sections of larvae at 9 dpf (**Figure 4B**). The intestine wall of *ezh2*^{-/-} mutants is strongly reduced and lacks folds in the intestine bulb. In contrast, the architecture of more proximal and distal parts of the digestive tract does not present such defects in the mutants at 9 dpf and 11 dpf (**Supplementary Figure S3A**). Interestingly, at 5 dpf, when the digestive tract achieves its formation and compartmentalization [48], the structure of the intestine wall in all regions is similar in both *ezh2*^{-/-} and *ezh2*^{+/+} siblings (**Figure 4B, Supplementary Figure S3B**). This indicates that the development of the intestine is normal, but its structure cannot be maintained in *ezh2*^{-/-} mutant fish, then leading to their death at 12 dpf. To determine whether the absence of maintenance of the intestine structure results from an enhanced cell death, we performed a terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay for detecting DNA fragmentation generated during apoptosis, on intestine sections at 9 dpf. As shown on Figure 4C, the altered intestine structures in *ezh2*^{-/-} mutant are strongly stained by the TUNEL assay, indicating that the absence of maintenance of the intestine integrity is due to a massive increase in apoptosis.

3.4. Ectopic expression of *phox2bb* in *ezh2* mutants. Since the development of the enteric nervous system is critical for normal functioning of the digestive system, we performed *in*

situ hybridizations to detect *phox2bb* expression. Phox2bb is a transcription factor required for the specification of enteric neural crest fate [49] and its expression is used to monitor the localization of the enteric progenitors. Our study reveals that the organization of the enteric neural crest cells along the rostral-caudal axis of the gut tube is similar in wild-type and *ezh2* mutant fish at 5 dpf (**Figure 5A**). However, we could detect striking differences in *phox2bb* expression in the eyes (**Figure 5B-C**). *Phox2bb* expression is not detected by *in situ* hybridization in the eyes of wild-type larvae whereas *ezh2* positive cells can be visualized in the retina. In contrast, *ezh2*^{-/-} siblings which do not express the *ezh2* transcripts, ectopically express *phox2bb* in the eye. This observation suggests that Ezh2 may negatively control *phox2bb* expression in the eye.

To further investigate the expression of *ezh2* in the eye, *in situ* hybridization experiments on wild-type larvae at 9 dpf using digoxigenin-labeled *ezh2* riboprobes and tyramide signal amplification (TSA)-Cy5 reagent [50] were performed prior sections of the eyes. This approach revealed that *ezh2* is expressed in the cornea and in all the layers of the retina, but not in the inner plexiform, the outer plexiform, and the retinal pigmented epithelium (**Figure 5D**). However, in spite of the loss of the Ezh2 product and ectopic expression of *phox2bb*, observed at 5 dpf, we could not identify histological alteration in the eyes of *ezh2*^{-/-} fish, later at 9 dpf, when compared to wild-type siblings (**Figure 5E**).

3.5 Loss of *ezh2* function affects the development of the exocrine pancreas. Because *ezh2*^{-/-} mutants show defects in digestive organs including the intestine and the liver, we investigated the development of the pancreas (**Figure 6**). *In situ* hybridization experiments at 5 dpf with probes for the markers of the endocrine pancreas *ins* and *gcga*, revealing β - and α -cells respectively, do not highlight differences between *ezh2*^{-/-} and *ezh2*^{+/+} siblings. In contrast, *in situ* hybridization for *try*, a terminal differentiation marker for the exocrine pancreas, revealed that this organ is less developed in the *ezh2*^{-/-} mutant fish (**Figure 6A**, **Supplementary Figure S4**).

To determine whether the reduced size of the exocrine pancreas is an early or late event, we assayed for *try* expression at 3 dpf. **Figure 6B** shows that at this stage, the exocrine pancreas development is similar in *ezh2*^{-/-} and *ezh2*^{+/+} siblings. This indicates that, as for the intestine development, the development of the exocrine pancreas in fish lacking embryonic *ezh2*

expression is normally formed at early stages but its proper maintenance is affected at later developmental stages.

3.6. Impaired H3K27me3 methylation in *ezh2* mutant zebrafish. Since Ezh2 trimethylates lysine 27 of histone H3 (H3K27), we evaluated the trimethylation status of histone H3 at lysine 27 in *ezh2*^{-/-} mutant fish. Total histones were extracted from mutant and wild-type siblings at 9 and 12 dpf and trimethylation of lysine 27 of histone H3 was analyzed by western blot using a specific anti-H3K27me3 antibody. **Figure 7A** shows that global levels of trimethylated lysine 27 of histone H3 are severely decreased but not abolished, in *ezh2*^{-/-} mutants at both developmental time points. Interestingly, heterozygous *ezh2*^{+/-} fish show intermediated levels of global H3K27me3 methylation (**Figure 7B**), indicating that *ezh2* haploinsufficiency is responsible for a decrease in H3K27me3 methylation without affecting the phenotype, whereas homozygous loss of *ezh2* does not fully abolish H3K27me3 levels but leads to cell death and loss of maintenance of the intestine structures. Whole-mount *in situ* immunodetection of H3K27me3 at 24 hpf does not show staining differences between *ezh2*^{+/+} and *ezh2*^{-/-} siblings suggesting that Ezh2 maternal products and/or Ezh1 are the main factors involved in H3K27me3 methylation at this stage (**Figure 7C**). In contrast, *in situ* immunostaining for H3K27me3 at 4 dpf reveals a reduction of global levels of this epigenetic mark in *ezh2*^{-/-} mutants. Moreover, this decrease affects all tissues of the organism, rather than specific tissues (**Figure 7C**).

3.7. Pharmacological inhibition of Ezh2 alters zebrafish development. Maternal *ezh2* transcripts are detected at the embryonic 1-2 cell stage. In order to investigate the role of maternally deposited Ezh2 products in early zebrafish development, we used a pharmacological approach to inhibit Ezh2 activity at early developmental stages. Dechorionated embryos were exposed to the EZH2 specific inhibitor GSK126 [51] at 3 hpf. The GSK126 was chosen to inhibit Ezh2 activity because this drug acts *in vivo* and is 150-fold selective for EZH2 over EZH1 and more than 1,000-fold selective for EZH2 over a range of other methyltransferases [52]. Since zebrafish embryo and larvae rapidly absorb low molecular weight compounds, diluted in the surrounding media, through skin and gills the treatment concentrations used were the same as described for applications in cells in culture [51]. Morphological abnormalities were first detected at 24 hpf with 1 μ M GSK126 (**Figure**

8A-B). At 96 hpf, phenotypic aberrations include cardiac edemas, absence of pectoral fins (**Figure 8B**), as well as a decrease in eye size (**Figure 8C**). Further investigations revealed that the loss of pectoral fins, as well as the reduced size of the eyes of the treated embryos reflects a developmental delay rather than a developmental alteration, since pectoral fins appear later. None of these phenotypes, such as the appearance of cardiac edemas and developmental delays, were observed in *ezh2*^{-/-} mutants indicating that the inhibition of Ezh2 activity at 3hpf more severely affects zebrafish development. To determine whether GSK126 exposure affected total H3K27me3 methylation levels, dechorionated embryos cultured from 3 hpf to 96 hpf in presence of 1 μ M GSK126, were analyzed by Western blotting using a specific anti-H3K27me3 antibody. We show that H3K27me3 relative levels were decreased by about 60% in treated embryos (**Figure 8D**). The whole-mount *in situ* immunodetection of H3K27me3 methylation shows that the decrease in H3K27me3 levels is rather global than limited to specific organs (**Figure 8E**). The remaining H3K27me3 levels are probably due to the fact that GSK126 blocks *de novo* Ezh2-mediated methylation, but do not affect H3K27me3 marks implemented before the drug exposure at 3 hpf. A similar experiment was conducted by applying 1 μ M GSK126 on embryos at the 1-2 cell stage. In these conditions, gastrulation and the establishment of the body plan is seemingly normal, but the GSK126 treatment also induces cardiac edemas and developmental delays (**Supplementary Figure S5A**), as observed when the treatment is applied at 3 hpf, but not found in *ezh2*^{-/-} mutants. H3K27me3 relative levels were decreased by about 35% in treated embryos (**Supplementary Figure S5B**).

Although the loss of H3K27me3 is not complete, inhibiting Ezh2 activity at the 1-2 cell stage or at 3 hpf elicits stronger developmental defects than the loss of zygotic Ezh2 activity underlying a role of the maternal Ezh2 products at early developmental stages. However, loss of maternal Ezh2 activity does not dramatically affect the establishment of the zebrafish body plan.

3.8. Ezh2 function is involved in caudal fin regeneration. Upon amputation, the zebrafish caudal fin fully regenerates in about 20 days. This regeneration process involves various cellular events such as wound closure, dedifferentiation, mesenchymal proliferation, blastema formation and outgrowth, actinotrichia formation, apical blastema maintenance, progressive redifferentiation and morphogenesis [53]. Moreover, a role of H3K27

methylation in caudal fin regeneration has been demonstrated [54]. *In situ* hybridization revealed that *ezh2* is expressed in the growing blastema of regenerating fins at 4 days post-amputation in adult zebrafish whereas the sense probe lacked any discernable signal (**Supplementary Figure S6**).

Since caudal fins of larvae also regenerate after amputation by a mechanism highly similar to that used by adult fish [55, 56], and because *ezh2*^{-/-} adult fish are not viable preventing the study of the role of *ezh2* in caudal fin regeneration at this stage, we focused our attention on larval caudal fin regeneration. The tip of the caudal fin was transected at 3 dpf within the pigment gap distal to the circulating blood. This fin clip procedure induces blastema formation at the site of amputation followed by caudal fin regeneration and normal development of the embryo ([38]; **Figure 9**). Using *in situ* hybridization, we showed that *ezh2* expression is detected in larval caudal fin after amputation (**Figure 9A**). To investigate whether Ezh2 function is required for caudal spinal cord regeneration, larvae were subjected to caudal fin amputation at 3 dpf and the regeneration process was studied in presence of the Ezh2-specific inhibitor GSK126 (**Figure 9B**). In presence of 1 μM GSK126, regeneration of the fin fold and of the spinal cord is severely impaired, compared to control DMSO treated embryos. Similarly, the spinal cord of *ezh2*^{-/-} larvae also fails to regenerate properly after transection, when compared to wild-type siblings (**Figure 9C**). Altogether, our results indicate that *ezh2* is expressed in the regenerating caudal fin after amputation and suggest that Ezh2 function is required for larval caudal spinal cord regeneration.

4. DISCUSSION

In the past decade, an increasing amount of data underlined the fundamental role of epigenetic modifications in controlling the activity of regulatory genes involved in development, lineage specification, differentiation and tissue renewal. In the present study, we examine the role of Ezh2 in zebrafish development. Ezh2 catalyzes the trimethylation of lysine 27 of histone H3 (H3K27me3), a post-translational modification that has been widely implicated in epigenetic suppression of gene expression.

To address the question of the function of Ezh2, we generated an *ezh2* loss-of-function allele in zebrafish using the TALEN technology. A zebrafish line harboring a 22 bp net insertion (insertion of 27 nucleotides associated with a deletion of 5 bp) within the *ezh2* gene, leading to a frame shift in the coding sequence and encoding a predicted protein of 60 amino acids, lacking all of the essential conserved protein domains, has been generated. The heterozygous *ezh2*^{+/-} fish are viable, fertile, and do not show any obvious phenotype.

Surprisingly, and in total contrast to what was observed in mice where *Ezh2* loss-of-function results in lethality at gastrulation [24], homozygous *ezh2*^{-/-} zebrafish mutants gastrulate properly and develop normally. However, at 9 dpf, the *ezh2*^{-/-} mutant presents a striking alteration of the intestine wall, presumably responsible for the death of the *ezh2*^{-/-} fish. Interestingly, at 5 dpf the intestine of *ezh2*^{-/-} mutants is normal, indicating that this organ develops properly in absence of zygotic Ezh2 function, but that the maintenance of its structure requires Ezh2 action. The defects in the maintenance of the integrity of the intestine are due to enhanced cell death rather than to an arrest of development, as a TUNEL assay shows a massive increase of apoptosis in *ezh2* loss-of-function mutants. Remarkably, the structure of the intestine bulb is severely impaired in *ezh2* mutants at 9 dpf whereas the wall of the mid-intestine of *ezh2*^{-/-} and wild-type siblings remains similar. Since the cell proliferation rate is higher in the intestine bulb than in the mid-intestine [57], our data also establish a link between Ezh2 function and intestinal cell renewal.

Zebrafish *ezh2*^{-/-} mutants present alterations of the intestine and this phenotype differs to what has been found in mice. Indeed, using a Cre-mediated conditional knock-out approach, Koppens et al. [58] generated mice lacking Ezh2 activity in the intestine. These mutants present a reduction of H3K27me3 marks in the intestine but this does not result in an overt adverse phenotype, since the intestines lacking Ezh2 function are morphologically similar to

controls and cell proliferation and differentiation are not affected. Moreover, no difference can be observed between mice lacking Ezh2 function in the intestines and control mice [58]. This may suggest that Ezh2 contributes differently to the maintenance of the structure of the intestine in mice and in zebrafish.

Different mutations, including *sst*^{m311} (*straight shot*), *nor*^{m264} (*no relief*), *pie*^{m497} (*piebold*) or *polr3b*^{m74} (*polr3b*, *slim jim*), have been reported to be responsible for the intestine degeneration in zebrafish [59]. Moreover, it has also been shown that these mutations are responsible for alterations in the exocrine pancreas development [59]. Similarly, *ezh2*^{-/-} mutants present defects in the development of the exocrine pancreas in addition to a striking intestinal phenotype. Indeed, the development of the exocrine pancreas, as judged by the expression of the terminal differentiation marker *try*, is impaired in *ezh2* deficient fish at 5 dpf. However, as for the intestine, the development of the exocrine pancreas in *ezh2*^{-/-} mutants is normally formed at early stages (3 dpf). This indicates that zygotic *ezh2* expression is not required for exocrine pancreas implementation whereas Ezh2 is necessary to properly maintain the development of this organ at later stages.

The analyses of mRNA expression profile of *ezh2* in zebrafish showed that maternal transcripts are detected in the embryo at the 2-cell stage. At 24 hpf, the *ezh2* mRNA is ubiquitously expressed, whereas its expression becomes restricted to defined regions such as the pectoral fin buds, the optic tectum, the mid-hindbrain region, the branchial arches, the eyes and the intestine during later development, as recently shown by San et al. [60]. This observation parallels the experiments performed in mouse showing that murine *Ezh2* is ubiquitously expressed throughout early embryogenesis, while in later embryonic development, *Ezh2* expression tends to be restricted to specific sites within the central and peripheral nervous system and to the major sites of fetal hematopoiesis, as well as in the intestine, the testis, the placenta and the muscles [61, 62].

The presence of *ezh2* mRNAs in the early zebrafish embryo suggests that maternally deposited *ezh2* products may be involved in early development. Since maternal contribution takes place till the 2-cell stage in mice whereas in zebrafish maternal contribution could be maintained until at least the 1,000-cell stage (3 hpf) [63, 64], this difference could explain in part, why *ezh2*-deficient zebrafish mutants develop normally. To investigate the potential contribution of *ezh2* from maternal origin in early development, we used a pharmacological approach to inhibit Ezh2 activity before zygotic genome activation. In our approach,

dechorionated embryos were exposed at the 1-2 cell stage or at 3 hpf to GSK126, a specific inhibitor of EZH2 [51]. In both cases, GSK126-mediated inhibition of maternal Ezh2 activity elicits developmental aberrations, including appearance of cardiac edemas as well as a developmental delay. Because these phenotypes were not observed in the *ezh2*-deficient zygotic mutants, we speculate that maternal Ezh2 activity contributes to zebrafish development and at least in the proper development of the heart. However, embryos exposed to GSK126 at the 1-2 cell stage gastrulate and show a normal body organization, indicating that maternal Ezh2 contributes to development but is not required for the set up of the body plan. In another study, Ostrup et al. [65] used 3-deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the S-adenosyl homocysteine hydrolase to impair Ezh2 function and H3K27me3 methylation. Zebrafish embryos treated with DZNep at the 1-2 cell stage present defects in somites, notochord and tail, resulting in abnormal body shape, as well as observed cardiac edema. Head development is also severely affected and insufficient brain segmentation, brain underdevelopment and edema are observed together with severe defects in the ear, the eye and/or in the jaw [65]. The stronger effect of DZNep, when compared to GSK126 action is probably due to the fact that DZNep may be responsible for the inhibition of other S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases in addition to Ezh2 [66]. However, as DZNep treated and non-treated embryos develop with comparable survival rates, even upon gastrulation, this study reinforces the idea that maternal Ezh2 is not required for early development and global implementation of the body plan. Both, the role of *ezh2* in zebrafish tissue maintenance and the absence of *ezh2* requirement in the establishment of the body plan have also been demonstrated in the recent work from San et al. [60]. This study describes the generation of maternal zygotic (MZ) *ezh2* mutant embryos through germ cell transplantation. *MZezh2* mutant embryos gastrulate and form a normal body organization, but die at around 2 dpf with defects including the loss of myocardial integrity and the alteration of liver and pancreas terminal differentiation. Altogether, these data indicate that maternal *ezh2* function contributes to zebrafish development, but the loss of its activity does not block gastrulation and body plan formation.

After fertilization, the zebrafish embryonic genome is inactive till transcription is initiated during the maternal-zygotic transition, which starts around the mid-blastula transition (3.3 hpf) [64]. This transition is accompanied by the formation of pluripotent cells, the degradation of maternal transcripts and changes in epigenetic marks. In particular,

H3K27me3 methylation levels, which were low before the maternal-zygotic transition, gradually increase and numerous genes appear to be marked with H3K27me3 after this time point [67-70]. This indicates that the deposition of H3K27me3 epigenetic marks may be important after the zygotic genome activation for embryonic development. In this regard, we observed a reduction, but not the abolition of H3K27me3 methylation both in *ezh2*^{-/-} mutants and in GSK126 treated embryos. This raises the possibility that Ezh1 may be able to compensate for loss of Ezh2 function, since Ezh1 also trimethylates H3K27 [71, 72]. The remaining H3K27me3 marks in *ezh2*^{-/-} larvae may allow the recruitment and the action of the PRC1 complex and may explain why PRC1-deficient fish present a phenotype with more severe alterations. Indeed, *rnf2* mutant zebrafish embryos lacking PRC1 function, die at around 4-5 dpf with a normal body plan, but displaying craniofacial alterations and defects in pectoral fin development [73, 74].

During the course of our experiments, we observed the ectopic expression of *phox2bb* in the eyes of *ezh2*^{-/-} mutants. *Phox2bb* is a homeobox-containing transcription factor often used to monitor the localization of enteric progenitors. At 5 dpf, *phox2bb* is mainly expressed in the enteric nervous system and in the hindbrain of wild-type larvae. However, additional *phox2bb* positive cells are also observed in the eyes of *ezh2*^{-/-} siblings. The fact that *phox2bb* is ectopically expressed in *ezh2*-deficient larvae suggests that this gene is repressed directly or indirectly, by Ezh2. This control of *phox2bb* expression by Ezh2 appears to be also cell-specific because *phox2bb* is not ectopically expressed in all the cells and regions lacking *ezh2* expression in the mutant fish. The role of *ezh2* in *phox2bb* regulation in the eye remains unclear since *ezh2*^{-/-} mutants losing the expression of *ezh2* and ectopically expressing *phox2bb* do not present histological defects in the eye. However, it is interesting to notice that this *phox2bb* ectopic expression affects limited areas in the eye, indicating that Ezh2 is not the only element controlling the expression of *phox2bb*. Furthermore, the restricted ectopic expression explains why *phox2bb* was not identified as an Ezh2 target in large scale gene expression analyses using microarrays on *MZezh2* mutants [60].

The capacities of zebrafish to regenerate some of its organs and in particular its caudal fin rely on the zebrafish ability to maintain access to a number of developmental programs and may correlate with a certain plasticity of the epigenome. In this context, it has been shown that DNA demethylation correlates with the early phase of zebrafish fin regeneration [75]. Several epigenetic factors, including components of nucleosome remodeling and

deacetylase (NuRD) complex such as *hdac1*, *mta2*, *rbb4* and *chd4a*, are also upregulated in the proliferative compartment of the blastema and required for the redifferentiation of skeletal precursors and for actinotricha formation [76]. Similarly, Stewart et al. [54] demonstrated that H3K27me3 demethylation at specific loci might be crucial to reactivate the regeneration gene expression programs and to initiate the regeneration process in response to caudal fin amputation. Here, we show that *ezh2* is expressed in regenerating caudal fin tissues after amputation both in adult and larval zebrafish. Furthermore, *ezh2*-deficient as well as wild-type larvae treated with the Ezh2 specific inhibitor GSK126, fail to properly regenerate their caudal spinal cord after transection. These results suggest that Ezh2 and H3K27me3 methylation might also be involved in processes of regeneration in zebrafish.

5. CONCLUSIONS.

In this work, we generated a zebrafish *ezh2* mutant allele using the TALEN technology. Heterozygous mutant fish are viable, fertile and do not show any obvious phenotype. In contrast to what was found in mice, homozygous *ezh2*^{-/-} mutant zebrafish gastrulate properly, present a normal body plan but die at 12 dpf with defects of the intestine wall. Analysis of the intestine revealed that at 5 dpf its development is normal, but its integrity is not maintained at later developmental stages, due to enhanced cell death in *ezh2* loss-of-function mutants. Similarly, terminal differentiation of the exocrine pancreas is determined but not fully maintained in absence of zygotic *ezh2* expression. Studies of *ezh2* expression showed that maternal *ezh2* transcripts are loaded in the embryo. At 24 hpf *ezh2* is ubiquitously expressed, whereas its expression becomes restricted to defined regions at later stages. Treatment of zebrafish embryos with the EZH2-specific inhibitor GSK126 revealed that maternal *ezh2* products contribute to early development but are not required for normal body plan formation. Our results parallel and supplement those of San et al. [60] using maternal-zygotic *MZeh2* mutants. But in addition, we show that *ezh2* might play a role in the regeneration processes. Indeed, a GSK126 treatment, as well as the *ezh2* loss-of-function mutation, alters the regeneration of the chord after transection. Altogether, our work sheds light on the complex role of Ezh2 in cell fate decisions and demonstrates that

zebrafish provides a remarkable model system to study Ezh2 function and H3K27me3 methylation in tissue maintenance.

ACKNOWLEDGEMENTS. We are grateful to Dr Julien Bricambert and Pr Amar Abderrahmani (CNRS UMR 8099, EGID) for providing the *ins* and *gcgα* plasmids and for helpful discussions. We thank Pauline Follet for technical assistance and excellent animal care.

FUNDING. This work was supported by the Inserm, the University of Lille, the SIRIC ONCOLille, and grants from le Comité du Nord de la Ligue Contre le Cancer and l'ITMO Biologie Cellulaire, Développement et Evolution (BCDE). BD is supported by a fellowship from the Région Hauts de France Nord-Pas de Calais-Picardie and the University of Lille.

AVAILABILITY OF DATA AND METERIAL. All data generated and analyzed in this study are included in this published article and its supplementary information files.

COMPETING INTERESTS. The authors declare no competing interests.

SUPPLEMENTARY MATERIAL. Supplementary data include six figures.

REFERENCES

1. Di Croce L, Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat. Struct. Mol Biol.* 2013; 20: 1147–1155.
2. Schuettengruber B, Cavalli G. (2009). Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development.* 2009; 136: 3531–3542.
3. Surface LE, Thornton SR, Boyer LA. Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment. *Cell Stem Cell.* 2010; 7: 288–298.
4. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science.* 2002; 298: 1039–1043.
5. Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V. Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell.* 2002; 111: 185–196.
6. Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* 2002; 16: 2893–2905.
7. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 2011; 469: 343–349.
8. Müller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA. Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell.* 2002; 111: 197–208.
9. Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 2006; 441: 349–353.
10. Francis NJ, Kingston RE, Woodcock CL. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science.* 2004; 306: 1574–1577.
11. Müller J, Verrijzer P. (2009). Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Curr Opin Genet Dev.* 2009; 19: 150–158.
12. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature.* 2004; 431: 873–878.

13. Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell*. 2004; 15: 57–67.
14. Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzerini Denchi E, Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J*. 2004; 23: 4061–4071.
15. Tie F, Stratton CA, Kurzhals RL, Harte PJ. The N terminus of Drosophila ESC binds directly to histone H3 and is required for E(Z)-dependent trimethylation of H3 lysine 27. *Mol Cell Biol*. 2007; 27: 2014–2026.
16. Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jorgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merkenschlager M, Fisher AG. Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol*. 2006; 8: 532–538.
17. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. 2006; 125: 315–326.
18. Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH, Helin K. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev*. 2006; 20: 1123–1136.
19. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray HL, Zucker JP, Yuan B, Bell GW, Herbolsheimer E, Hannett NM, Sun K, Odom DT, Otte AP, Volkert TL, Bartel DP, Melton DA, Gifford DK, Jaenisch R, Young RA. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*. 2006; 125: 301–313.
20. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. 2007; 448: 553–560.
21. Pan G, Tian S, Nie J, Yang C, Ruotti V, Wei H, Jonsdottir GA, Stewart R, Thomson JA. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007; 1: 299–312.

22. Zhao XD, Han X, Chew JL, Liu J, Chiu KP, Choo A, Orlov YL, Sung WK, Shahab A, Kuznetsov VA, Bourque G, Oh S, Ruan Y, Ng HH, Wei CL. Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007; 1: 286–298.
23. Faust C, Schumacher A, Holdener B, Magnuson T. The eed mutation disrupts anterior mesoderm production in mice. *Development*. 1995; 121: 273–285.
24. O’Carroll D, Erhardt S, Pagani M, Barton SC, Surani MA, Jenuwein T. The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol Cell Biol*. 2001; 21: 4330–4336.
25. Völkel P, Dupret B, Le Bourhis X, Angrand PO. Diverse involvement of EZH2 in cancer epigenetics. *Am J Transl Res*. 2015; 7: 175-193.
26. Wassef M, Margueron R. The multiple facets of PRC2 alterations in cancers. *J Mol Biol*. 2016; pii: S0022-2836(16)30427-2.
27. Gibson WT, Hood RL, Zhan SH, Bulman DE, Fejes AP, Moore R, Mungall AJ, Eydoux P, Babul-Hirji R, An J, Marra MA; FORGE Canada Consortium, Chitayat D, Boycott KM, Weaver DD, Jones SJ. Mutations in *EZH2* cause Weaver syndrome. *Am J Hum Genet*. 2012; 90: 110-118.
28. Tatton-Brown K, Hanks S, Ruark E, Zachariou A, Duarte Sdel V, Ramsay E, Snape K, Murray A, Perdeaux ER, Seal S, Loveday C, Banka S, Clericuzio C, Flinter F, Magee A, McConnell V, Patton M, Raith W, Rankin J, Splitt M, Strenger V, Taylor C, Wheeler P, Temple KI, Cole T; Childhood Overgrowth Collaboration, Douglas J, Rahman N. Germline mutations in the oncogene *EZH2* cause Weaver syndrome and increased human height. *Oncotarget*. 2011; 2: 1127-1133.
29. Tatton-Brown K, Murray A, Hanks S, Douglas J, Armstrong R, Banka S, Bird LM, Clericuzio CL, Cormier-Daire V, Cushing T, Flinter F, Jacquemont ML, Joss S, Kinning E, Lynch SA, Magee A, McConnell V, Medeira A, Ozono K, Patton M, Rankin J, Shears D, Simon M, Splitt M, Strenger V, Stuurman K, Taylor C, Titheradge H, Van Maldergem L, Temple IK, Cole T, Seal S; Childhood Overgrowth Consortium, Rahman N. Weaver syndrome and *EZH2* mutations: Clarifying the clinical phenotype. *Am J Med Genet A*. 2013; 161A: 2972-2980.
30. Cohen AS, Yap DB,, Lewis ME, Chijiwa C, Ramos-Arroyo MA, Tkachenko N, Milano V, Fradin M, McKinnon ML, Townsend KN, Xu J, Van Allen MI, Ross CJ, Dobyns WB, Weaver DD, Gibson WT. Weaver Syndrome-Associated *EZH2* Protein Variants Show Impaired Histone Methyltransferase Function In Vitro. *Hum Mutat*. 2016; 37: 301-307.

31. Dahlem TJ, Hoshijima K, Juryneec MJ, Gunther D, Starker CG, Locke AS, Weis AM, Voytas DF, Grunwald DJ. Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. *PLoS Genet.* 2012; 8: e1002861.
32. Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug RG 2nd, Tan W, Penheiter SG, Ma AC, Leung AY, Fahrenkrug SC, Carlson DF, Voytas DF, Clark KJ, Essner JJ, Ekker SC. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature.* 2012; 491: 114–118.
33. Moore FE, Reyon D, Sander JD, Martinez SA, Blackburn JS, Khayter C, Ramirez CL, Joung JK, Langenau DM. Improved somatic mutagenesis in zebrafish using transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *PLoS One.* 2012; 7: e37877.
34. Chang N, Sun C, Gao L, Zhu D, Xu X, Zhu X, Xiong JW, Xi JJ. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res.* 2013; 23: 465–472.
35. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* 2013; 31: 227–229.
36. Xiao A, Wang Z, Hu Y, Wu Y, Luo Z, Yang Z, Zu Y, Li W, Huang P, Tong X, Zhu Z, Lin S, Zhang B. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: e141.
37. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 1995; 203: 253-310.
38. Wilkinson RN, Elworthy S, Ingham PW, van Eeden FJ. A method for high-throughput PCR-based genotyping of larval zebrafish tail biopsies. *Biotechniques.* 2013; 55: 314-316.
39. Doyle EL, Booher NJ, Standage DS, Voytas DF, Brendel VP, Vandyk JK, Bogdanove AJ. TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: W117-122.
40. Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science.* 2009; 326: 1501.
41. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* 2009; 326: 1509-1512.

42. Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: e82.
43. Meeker ND, Hutchinson SA, Ho L, Trede NS. Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *Biotechniques.* 2007; 43: 610, 612, 614.
44. Dupret B, Völkel P, Le Bourhis X, Angrand PO. The Polycomb Group Protein Pcgf1 is dispensable in zebrafish but involved in early growth and aging. *PLoS One.* 2016; 11: e0158700.
45. Thisse C, Thisse B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc.* 2008; 3: 59-69.
46. Brend T, Holley SA. Zebrafish whole mount high-resolution double fluorescent in situ hybridization. *J Vis Exp.* 2009; (25). pii: 1229.
47. Verri T, Kottra G, Romano A, Tiso N, Peric M, Maffia M, Boll M, Argenton F, Daniel H, Storelli C. Molecular and functional characterisation of the zebrafish (*Danio rerio*) PEPT1-type peptide transporter. *FEBS Lett.* 2003; 549: 115-122.
48. Ng AN, de Jong-Curtain TA, Mawdsley DJ, White SJ, Shin J, Appel B, Dong PD, Stainier DY, Heath JK. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Dev Biol.* 2005; 286: 114-135.
49. Elworthy S, Pinto JP, Pettifer A, Cancela ML, Kelsh RN. Phox2b function in the enteric nervous system is conserved in zebrafish and is sox10-dependent. *Mech Dev.* 2005; 122: 659–669.
50. Jülich D, Hwee Lim C, Round J, Nicolaije C, Schroeder J, Davies A, Geisler R, Lewis J, Jiang YJ, Holley SA; Tübingen 2000 Screen Consortium. beamter/deltaC and the role of Notch ligands in the zebrafish somite segmentation, hindbrain neurogenesis and hypochord differentiation. *Dev Biol.* 2005; 286: 391-404.
51. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Della Pietra A 3rd, Diaz E, LaFrance LV, Mellinger M, Duquenne C, Tian X, Kruger RG, McHugh CF, Brandt M, Miller WH, Dhanak D, Verma SK, Tummino PJ, Creasy CL. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature.* 2012; 492: 108-112.
52. Xu B, Konze KD, Jin J, Wang GG. Targeting EZH2 and PRC2 dependence as novel anticancer therapy. *Exp Hematol.* 2015; 43: 698-712.

53. Pfefferli C, Jaźwińska A. The art of fin regeneration in zebrafish. *Regeneration (Oxf)*. 2015; 2: 72-83.
54. Stewart S, Tsun ZY, Izpisua Belmonte JC. A histone demethylase is necessary for regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 19889-19894.
55. Kawakami A, Fukazawa T, Takeda H. Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar growth control mechanism with adult regeneration. *Dev Dyn*. 2004; 231: 693-699.
56. Yoshinari N, Ishida T, Kudo A, Kawakami A. Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. *Dev Biol*. 2009; 325: 71-81.
57. Wallace KN, Akhter S, Smith EM, Lorent K, Pack M. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech Dev*. 2005; 122: 157-173.
58. Koppens MA, Bounova G, Gargiulo G, Tanger E, Janssen H, Cornelissen-Steijger P, Blom M, Song JY, Wessels LF, van Lohuizen M. Deletion of Polycomb Repressive Complex 2 From Mouse Intestine Causes Loss of Stem Cells. *Gastroenterology*. 2016; 151: 684-697.
59. Pack M, Solnica-Krezel L, Malicki J, Neuhauss SC, Schier AF, Stemple DL, Driever W, Fishman MC. Mutations affecting development of zebrafish digestive organs. *Development*. 1996; 123: 321-328.
60. San B, Chrispijn ND, Wittkopp N, van Heeringen SJ, Lagendijk AK, Aben M, Bakkers J, Ketting RF, Kamminga LM. Normal formation of a vertebrate body plan and loss of tissue maintenance in the absence of ezh2. *Sci Rep*. 2016; 6: 24658.
61. Hobert O, Sures I, Ciossek T, Fuchs M, Ullrich A. Isolation and developmental expression analysis of Enx-1, a novel mouse Polycomb group gene. *Mech Dev*. 1996; 55: 171-184.
62. Ningxia Z, Shuyan L, Zhongjing S, Ling C, Tianzhong M, Lifeng W, Yan Y, Leili L, Xiancai C, Haibin C. The expression pattern of polycomb group protein Ezh2 during mouse embryogenesis. *Anat Rec (Hoboken)*. 2011; 294: 1150-1157.
63. Mathavan S, Lee SG, Mak A, Miller LD, Murthy KR, Govindarajan KR, Tong Y, Wu YL, Lam SH, Yang, Ruan Y, Korzh V, Gong Z, Liu ET, Lufkin T. Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays. *PLoS Genet*. 2005; 1: 260-276.
64. Tadros W, Lipshitz HD. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*. 2009; 136: 3033-3042.

65. Ostrup O, Reiner AH, Aleström P, Collas P. The specific alteration of histone methylation profiles by DZNep during early zebrafish development. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1839: 1307-1315.
66. Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK, Marquez VE, Jones PA. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther*. 2009; 8: 1579–1588.
67. Vastenhouw NL, Zhang Y, Woods IG, Imam F, Regev A, Liu XS, Rinn J, Schier AF. Chromatin signature of embryonic pluripotency is established during genome activation. *Nature*. 2010; 464: 922-926.
68. Lindeman LC, Andersen IS, Reiner AH, Li N, Aanes H, Østrup O, Winata C, Mathavan S, Müller F, Aleström P, Collas P. Prepatterning of developmental gene expression by modified histones before zygotic genome activation. *Dev Cell*. 2011; 21: 993-1004.
69. Andersen IS, Lindeman LC, Reiner AH, Østrup O, Aanes H, Aleström P, Collas P. Epigenetic marking of the zebrafish developmental program. *Curr Top Dev Biol*. 2013; 104: 85-112.
70. Andersen IS, Ostrup O, Lindeman LC, Aanes H, Reiner AH, Mathavan S, Aleström P, Collas P. Epigenetic complexity during the zebrafish mid-blastula transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 417: 1139-1144.
71. Shen X, Liu Y, Hsu YJ, Fujiwara Y, Kim J, Mao X, Yuan GC, Orkin SH. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell*. 2008; 32: 491-502.
72. Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell*. 2008; 32: 503-518.
73. van der Velden YU, Wang L, van Lohuizen M, Haramis AP. The Polycomb group protein Ring1b is essential for pectoral fin development. *Development*. 2012; 139: 2210-2220.
74. van der Velden YU, Wang L, Querol Cano L, Haramis AP. The polycomb group protein ring1b/rnf2 is specifically required for craniofacial development. *PLoS One*. 2013; 8: e73997.
75. Hirose K, Shimoda N, Kikuchi Y. Transient reduction of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine is associated with active DNA demethylation during regeneration of zebrafish fin. *Epigenetics*. 2013; 8: 899-906.

76. Pfefferli C, Müller F, Jazwinska A, Wicky C. Specific NuRD components are required for fin regeneration in zebrafish. *BMC Biology*. 2014; 12: 1-17.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Generation of *ezh2* mutant zebrafish using the TALEN technology. (A) Schematic representation of the genomic structure of the *ezh2* gene, with coding and untranslated exons depicted as solid and open boxes, respectively. The exonic regions coding for the conserved SANT and SET domains are shown in red and brown, respectively. The location of the *ezh2* TALEN in exon 2 is indicated. The *ezh2* TALEN target sequence with Left and Right TALEN binding sites in red is shown. The DdeI restriction site is indicated in green. (B) Identification of mutant embryos using a diagnostic restriction. Genomic DNA was prepared from an uninjected (Control) and an *ezh2* TALEN injected (TAL-*ezh2*) embryo. The TALEN targeted DNA region is amplified by PCR and subjected to DdeI digestion. The TAL-*ezh2* injected embryo contains undigested material (arrow at 466 bp), indicating that the DdeI diagnostic restriction site has been disrupted. (C) Sequence of the mutant allele compared to its wild-type counterpart. Small letters indicate inserted nucleotides. The mutated *ezh2* allele (Mut) contains a 22 bp net insertion resulting from a deletion of 5 nucleotides (underlined in the wild-type sequence) and an insertion of 27 nucleotides (small letters). (D) Schematic representation of the wild-type ($Ezh2^{wt}$) and mutant ($Ezh2^{mut}$) proteins. The gray line in the predicted mutant protein indicates residues read out of frame prior to encountering a premature stop codon, whereas the red and brown motifs in the wild-type protein correspond to SANT (SMART: SM00717) and SET (SMART: SM00317) domains, respectively. Size of the predicted proteins is indicated.

Figure 2. Loss of *Ezh2* function does not affect early zebrafish development. (A) At 5 dpf, *ezh2*^{-/-} mutants from *ezh2*^{+/-} crosses are phenotypically indistinguishable from heterozygous and wild-type siblings. (B) Alcian blue stained head cartilages of *ezh2*^{+/+} (up) and *ezh2*^{-/-} (down) siblings at 6 dpf reveal that craniofacial cartilage development is not affected in *ezh2*^{-/-} mutants. cb: ceratobranchials; ch: ceratohyal; ep: ethmoid plate; m: Meckel's cartilage; n: notochord; ot: otoliths; pq: palatoquadrate. (C) Cranial musculature revealed by immunocytochemistry using the anti-myosin MF20 antibody shows that muscle development is normal in *ezh2*^{-/-} fish at 6 dpf. adm: adductor mandibulae; ao: adductor operculi; bm: branchial musculatur; do: dilatator operculi; hi: hyoideus inferior; hs: hyoideus

superior; ima: intermandibularis anterior; imp: intermandibularis posterior; lo: levator operculi; pf: pectoral fin; sh: sternohyoideus.

Figure 3. *ezh2* expression in *ezh2*^{+/+} and *ezh2*^{-/-} siblings at different developmental time points. (A) *In situ* hybridization at the 1- and 2-cell stages showing that *ezh2* mRNA is maternally provided in zebrafish embryos. (B) The analysis of *ezh2* transcripts by RT-PCR at 2 hpf shows that wild-type, but not mutant transcripts are delivered into the embryos from *ezh2*^{-/-} crosses (♂x♀ *ezh2*^{-/-}). *Ezh2* transcripts from *ezh2*^{+/+} crosses are shown on the left part (WT). By RT-PCR, wild-type *ezh2* mRNA is expected to give a band at 328 bp, whereas the size of the mutant transcript should be at 350 bp. After DdeI digestion, the predicted restriction fragments from the wild-type cDNA will be at 171, 122, 31 and 4 bp, while those from the mutant will be at 315, 31 and 4 bp. Relative mRNA abundance is shown by RT-PCR amplification of the *β-actin* mRNAs (act) (C) *In situ* hybridization to detect *ezh2* transcripts in *ezh2*^{+/+} (left) and *ezh2*^{-/-} (right) siblings from *ezh2*^{-/-} crosses at the indicated time points. (D) Lateral view of 96 hpf *ezh2*^{+/+} (left) and *ezh2*^{-/-} (right) siblings showing *ezh2* expression detected by *in situ* hybridization in the intestine of wild-type larvae (arrow). Scale bar is 500 μm.

Figure 4. *Ezh2* is required for maintenance of the intestine integrity in zebrafish. (A) Representative images of lateral views of *ezh2*^{+/+} and *ezh2*^{-/-} larvae as indicated, stained with oil Red-O at 9 dpf. On the enlarged picture, the liver is indicated by an asterisk. The intestine wall appears well defined and finer in *ezh2*^{-/-} mutants (arrow). Scale bar is 500 μm, or 200 μm on the enlargement panels. (B) Intestinal sections from *ezh2*^{+/+} and *ezh2*^{-/-} larvae immunostained for actin and counterstained with hematoxylin, at 5 dpf (left) and 9 dpf (right). Scale bar is 100 μm. (C) TUNEL assay on sections from the intestinal bulb of *ezh2*^{+/+} (left) and *ezh2*^{-/-} (right) larvae at 9 dpf, showing an increase of apoptosis levels in the intestine and the pancreas (asterisk) in *ezh2*^{-/-} mutants. Scale bar is 100 μm.

Figure 5. Ectopic expression of *phox2bb* in the eyes of *ezh2* mutants. (A) *In situ* hybridization showing that the localization of *phox2bb* expressing neural crest cells along the gut (arrow) is not altered by loss of *Ezh2* function at 5 dpf. (B) Expression of *ezh2* (up) and *phox2bb* (down) in the anterior region of *ezh2*^{+/+} (left) and *ezh2*^{-/-} (right) siblings at 5 dpf, as

shown by *in situ* hybridization. Expression of *ezh2* in *ezh2*^{+/+} and *phox2bb* in *ezh2*^{-/-} larvae respectively, is outlined by arrows. (C) Lateral view of *ezh2* expression in *ezh2*^{+/+} larvae (up) and *phox2bb* expression in *ezh2*^{-/-} larvae (down) at 5 dpf in the eye. (D) Detection of the *ezh2* mRNA by *in situ* hybridization using a digoxigenin-labeled riboprobe and tyramide signal amplification-Cy5 reagent before eye section on wild-type larvae at 9 dpf. abc: amacrine and bipolar cells; c: cornea; gc: ganglion cells; ip: Inner plexiform; l: lens; op: outer plexiform; pr: photoreceptors; rpe: retinal pigmented epithelium. Scale bar is 100 μ m. (E) Hematoxylin-eosin staining of eye sections of *ezh2*^{+/+} (left) and *ezh2*^{-/-} (right) siblings at 9 dpf. abc: amacrine and bipolar cells; c: cornea; gc: ganglion cells; ip: Inner plexiform; l: lens; op: outer plexiform; rpe: retinal pigmented epithelium. Scale bar is 100 μ m.

Figure 6. The exocrine pancreas development is affected in *ezh2*^{-/-} mutants. (A) *In situ* hybridization for different markers of the pancreas in *ezh2*^{+/+} (left) and *ezh2*^{-/-} (right) siblings from *ezh2*^{+/+} crosses, performed at 5 dpf. No difference is found for markers of the endocrine pancreas (*ins* and *gcga*, arrow), whereas *try*, a marker for terminal differentiation of the exocrine pancreas reveals a reduced signal area in *ezh2*^{-/-} larvae. Representative fish of each genotype are shown. Scale bar is 500 μ m. (B) *In situ* hybridization at 3 dpf showing that the *try* signal is similar in *ezh2*^{+/+} (left) and *ezh2*^{-/-} (right) siblings. Scale bar is 500 μ m.

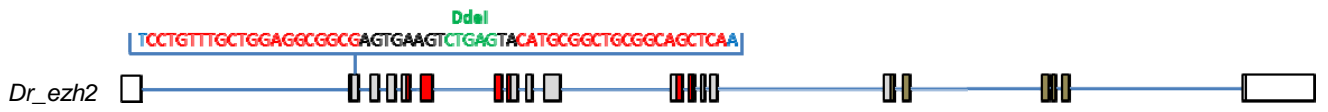
Figure 7. Global trimethylation of lysine 27 of histone H3 is reduced in *ezh2*^{-/-} mutants. After genotyping of the caudal region of the larvae, total histones from pools of 5 larvae of *ezh2*^{+/+} and *ezh2*^{-/-} genotypes at 9 and 12 dpf (A) or from *ezh2*^{+/+}, *ezh2*^{+/-} and *ezh2*^{-/-} genotypes at 9 dpf (B) as indicated, were extracted and analyzed by western blotting using a specific anti-H3K27me3 antibody and an anti-H3 antibody as a control. (C) Immunostaining for H3K27me3 in wildtype and *ezh2*^{-/-} embryos as indicated at 24 hpf (left) and 4 dpf (right). Scale bars are 500 μ m and 1 mm for 24 hpf embryos and 4 dpf larvae, respectively.

Figure 8. GSK126 elicits developmental aberrations in zebrafish. (A) Scoring of abnormal and dead embryos at 24 and 96 hpf. Embryos were exposed to 1 μ M GSK126 (n=397) or to 0.01% DMSO (n=114) at 3 hpf. (B) Representative phenotype of embryos and larvae without treatment (DMSO 0.01%) or treated with 1 μ M GSK126 at the indicated time points. Notice cardiac edemas (arrows) and absence of pectoral fins at 96 hpf. Scale bar is 500 μ m. (C)

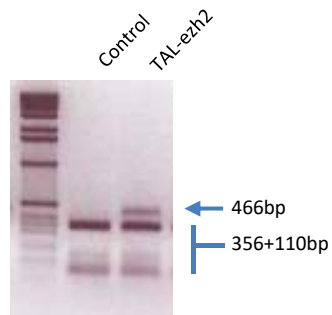
Measurement of the size of the eye in 96 hpf larvae without treatment (DMSO 0.01%) or treated with 1 μ M GSK126. Statistical significance was assessed by a Student t-test analysis and the significance is expressed as the indicated p value. **(D)** Global trimethylation of lysine 27 of histone H3 assayed by western blotting using a specific anti-H3K27me3 antibody and an anti-H3 antibody as control. Quantified relative H3K27me3 levels normalized to levels of histone H3 are indicated. **(E)** Whole mount immunostaining for H3K27me3 in wildtype embryos treated with 1 μ M GSK126 or control (DMSO 0.01%) as indicated, at 4 dpf. Scale bar is 1 mm.

Figure 9. Ezh2 and larval caudal fin regeneration. **(A)** *In situ* hybridization to visualize *ezh2* expression on a representative control untransected zebrafish larvae at 5 dpf (top) and on a representative larval fin at 5 dpf, 2 days post-amputation (bottom). *Ezh2* expression is detected in regenerating tissues (arrow head). **(B)** The *Ezh2* specific inhibitor GSK126 affects larval caudal fin regeneration. At 3 dpf (a, a'), the tip of the caudal fin of wild-type larvae is sectioned within the pigment gap distal to the circulating blood (b, b') and embryos were subsequently treated with 1 μ M GSK126 or with 0.01 % DMSO (control). At 2 days post-amputation the spinal cord regeneration is inhibited in the treated larvae (c'), but not in the controls (c). The dotted line indicates the transection site. **(C)** *Ezh2* function is required for spinal cord regeneration. At 3 dpf (a, a'), the tip of the caudal fin of wild-type (*ezh2*^{+/+}) or *Ezh2*-deficient (*ezh2*^{-/-}) siblings is sectioned within the pigment gap distal to the circulating blood (b, b'). Two days after the transection, spinal cord regeneration is reduced in mutant larvae (c') compared to wild-type (c). The dotted line indicates the transection site.

A



B



C

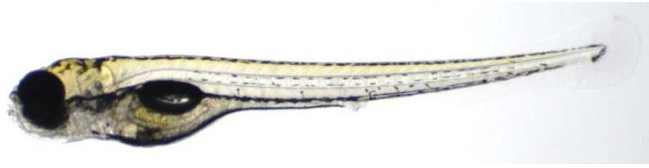
WT TCCTGTTTGCTGGAGGCGGCGAGTGAAGTCTGAGTACATGCCGGCTCGGCAGCTCAACACGCTTCAGGAGGGCAG
Mut TCCTGTTTGCTGGAGGCGGCGAGTGAcatgcgaaaaacatgcgaaagacatgcGAGTACATGCCGGCTCGGCAGCTCAA +22 ($\Delta 5$, +27)

D

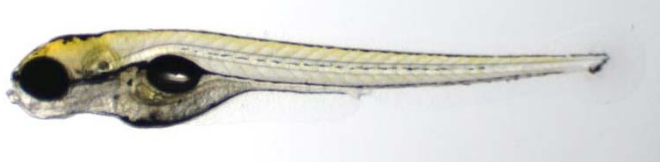


A

ezh2^{+/+}



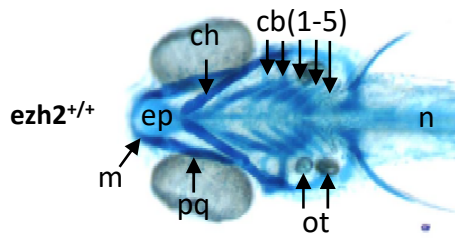
ezh2^{+/-}



ezh2^{-/-}



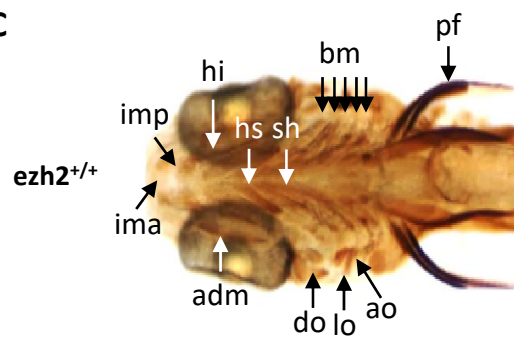
B



ezh2^{-/-}



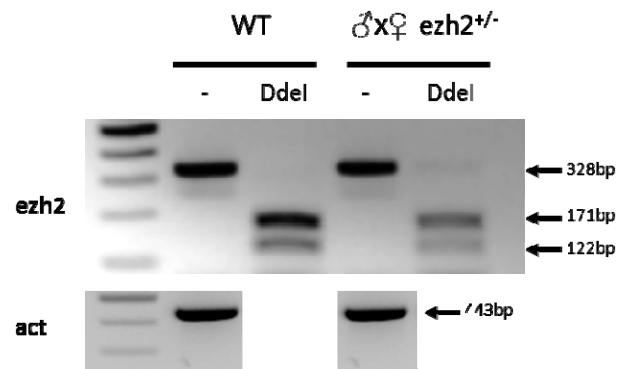
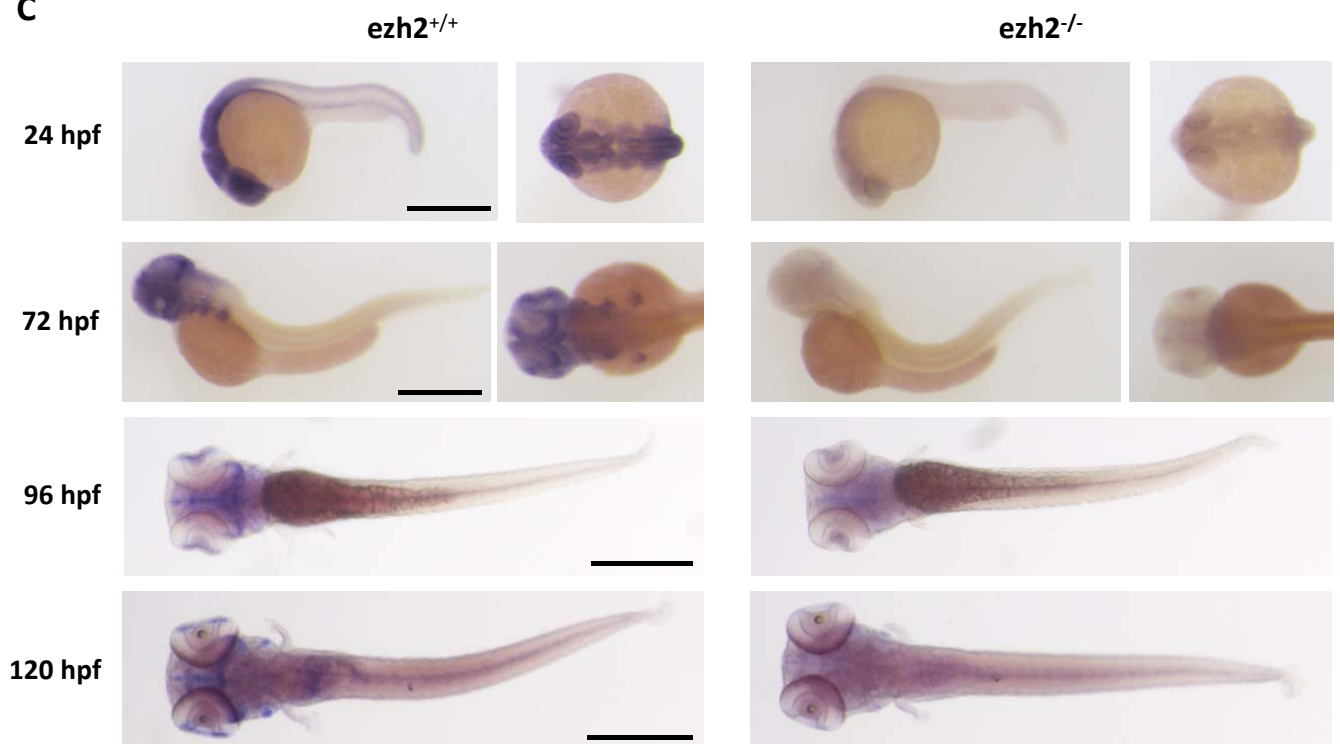
C

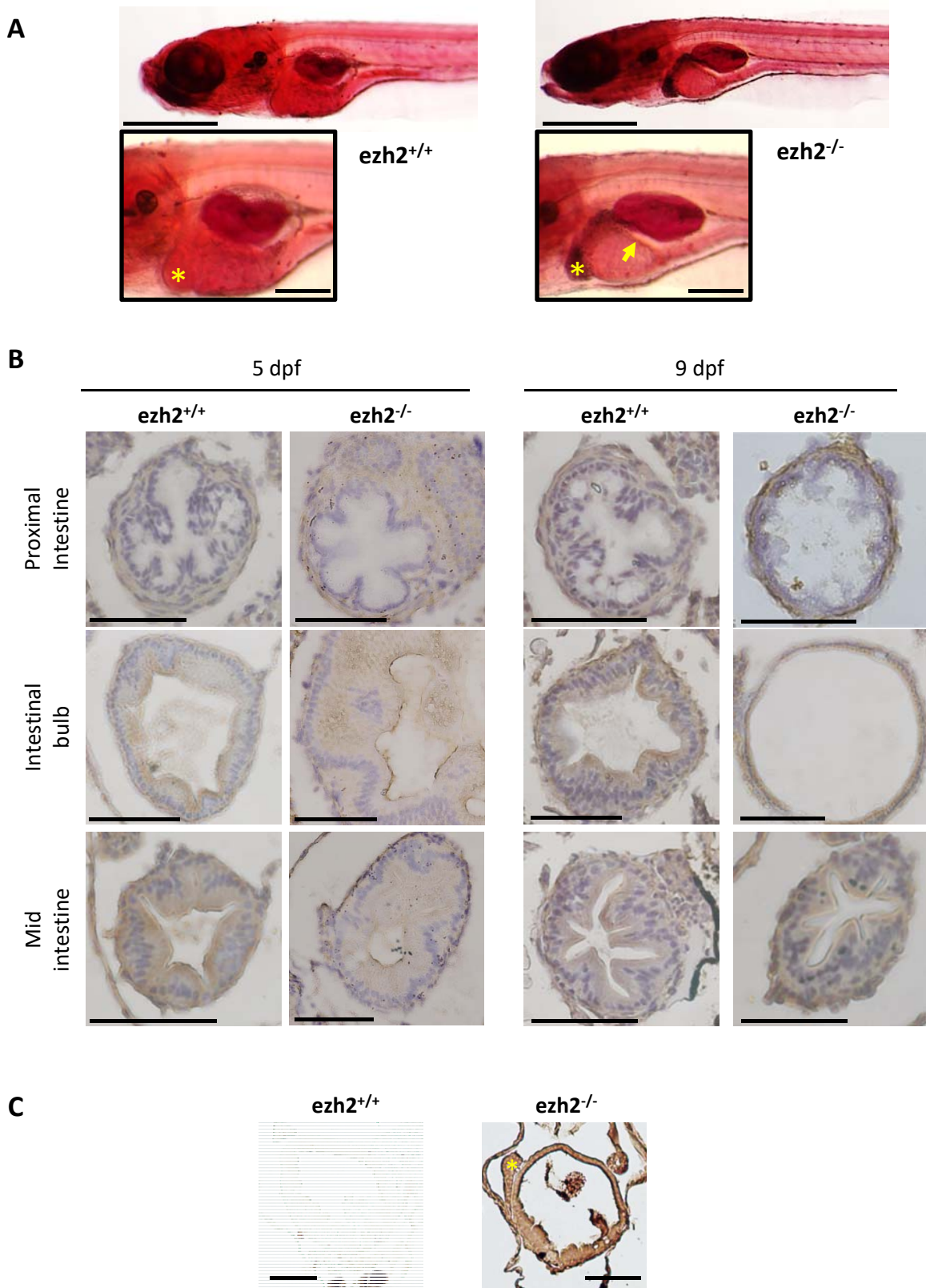


ezh2^{-/-}

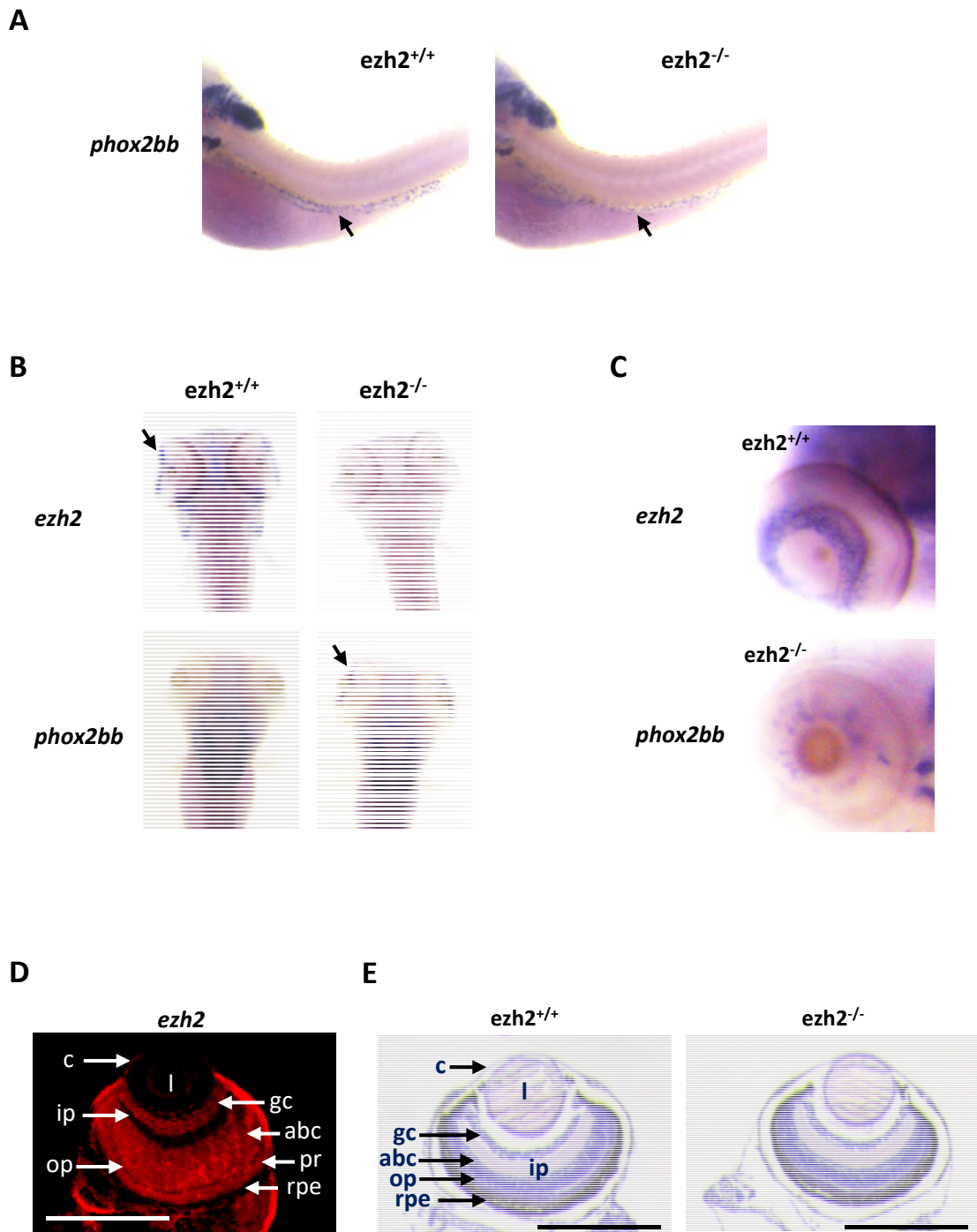


Dupret et al. – Figure 2

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

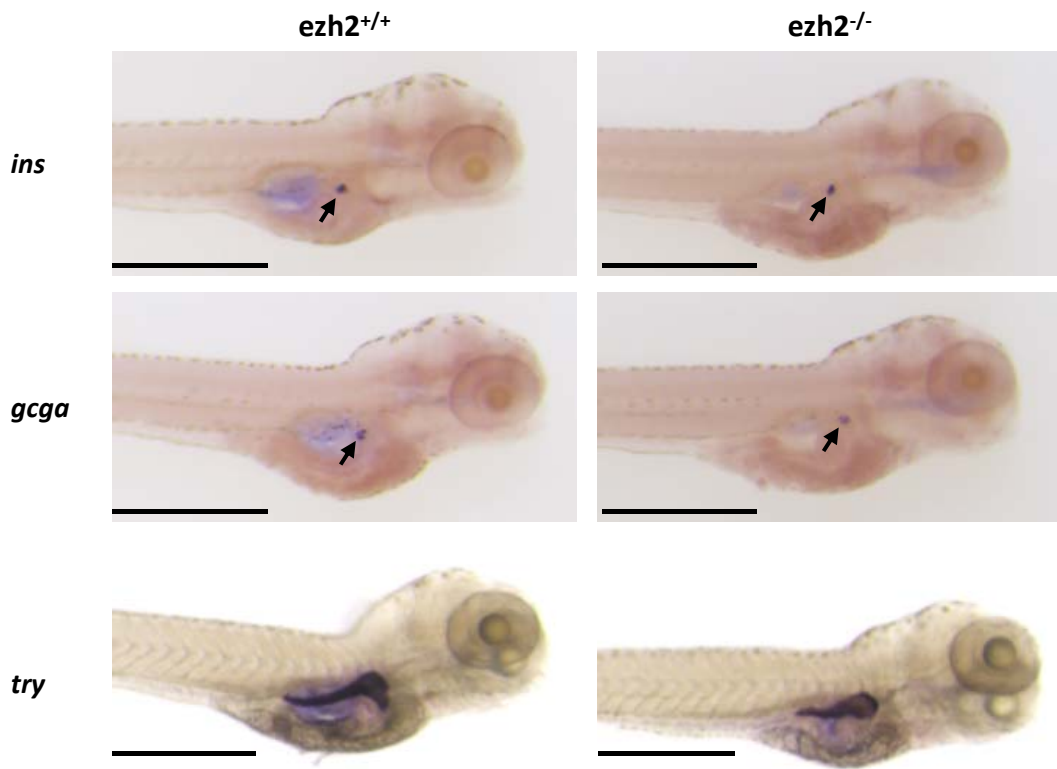


Dupret et al. – Figure 4

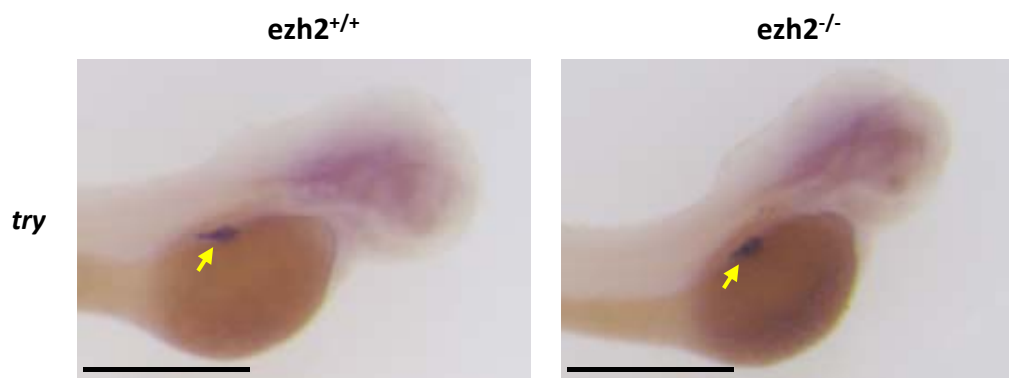


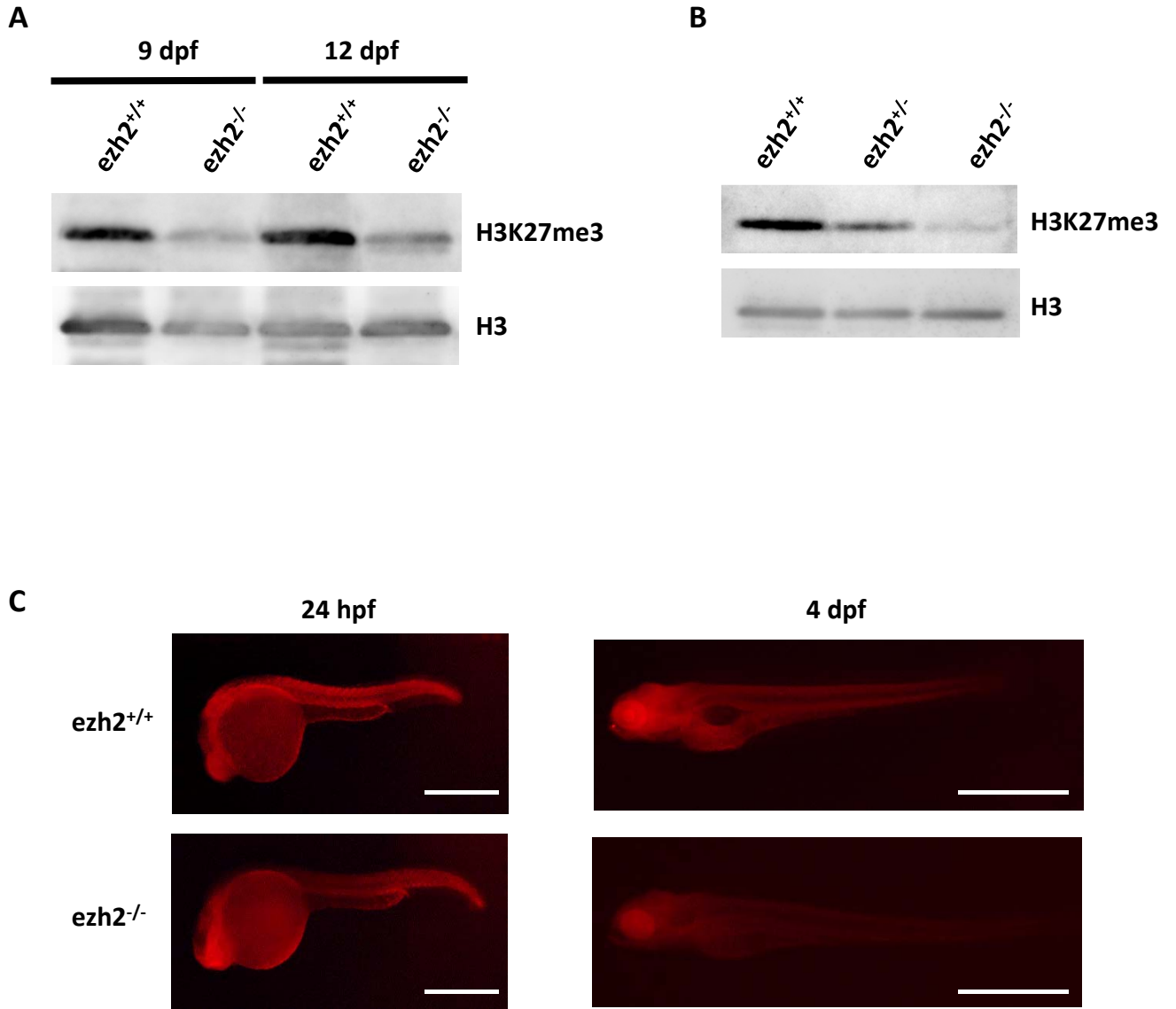
Dupret et al. – Figure 5

A

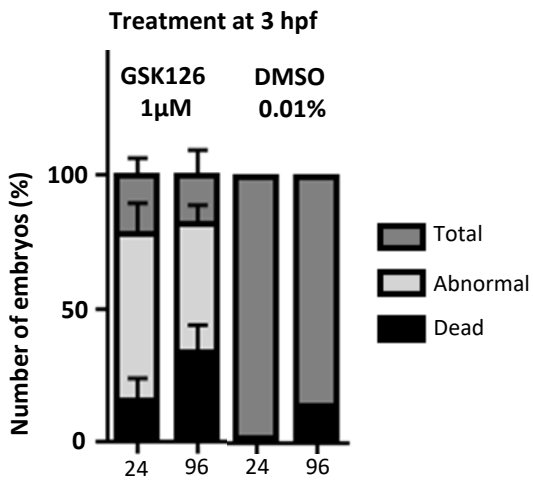
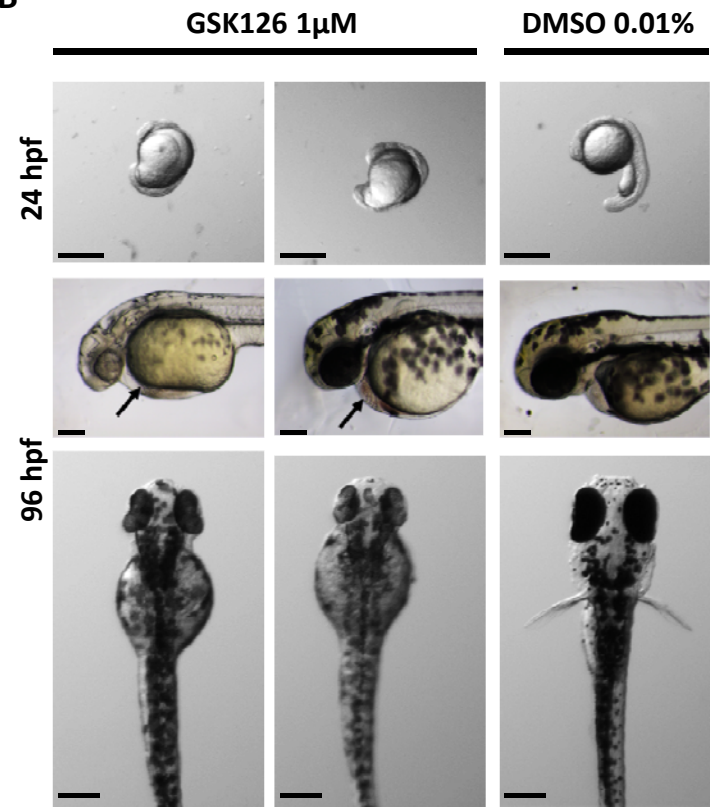
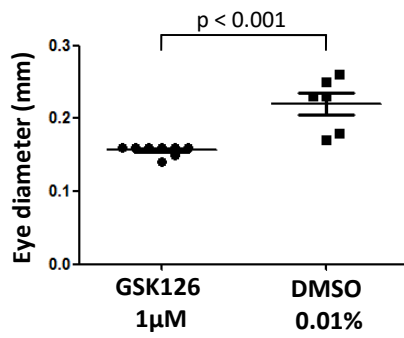
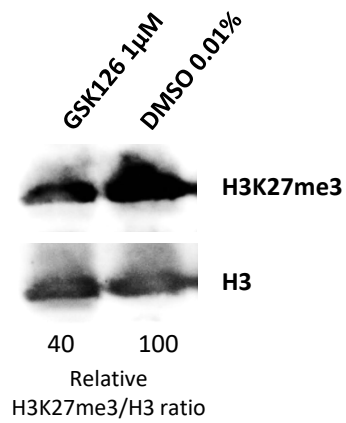
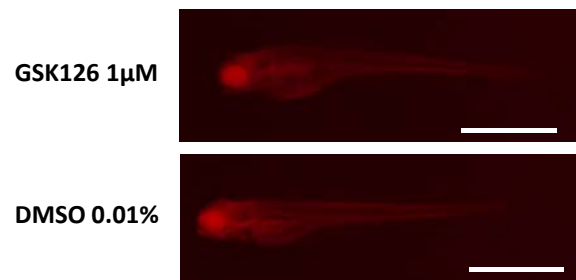


B

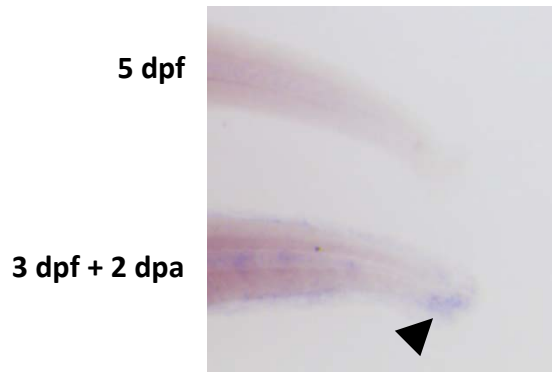




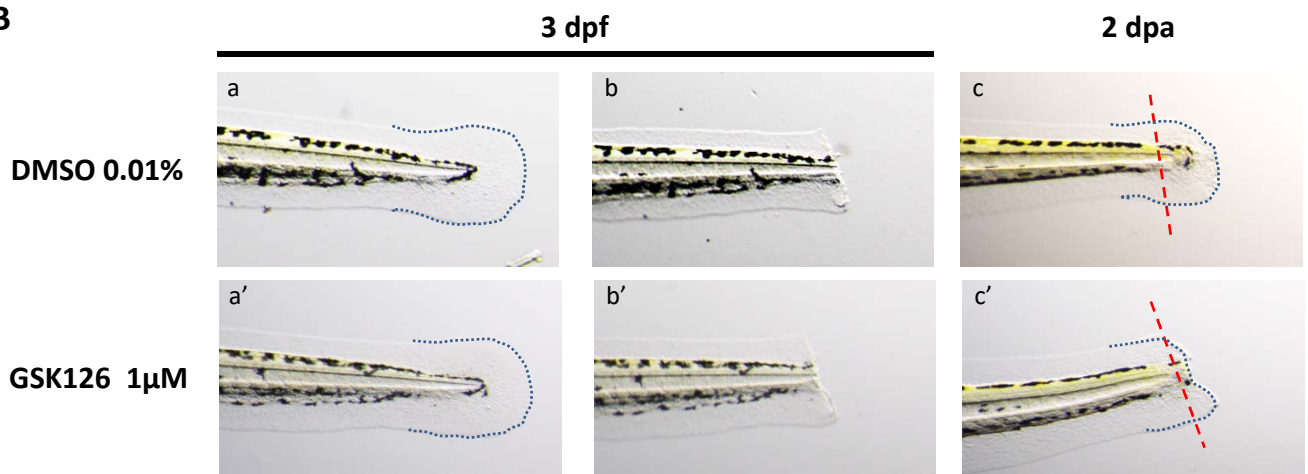
Dupret et al. – Figure 7

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

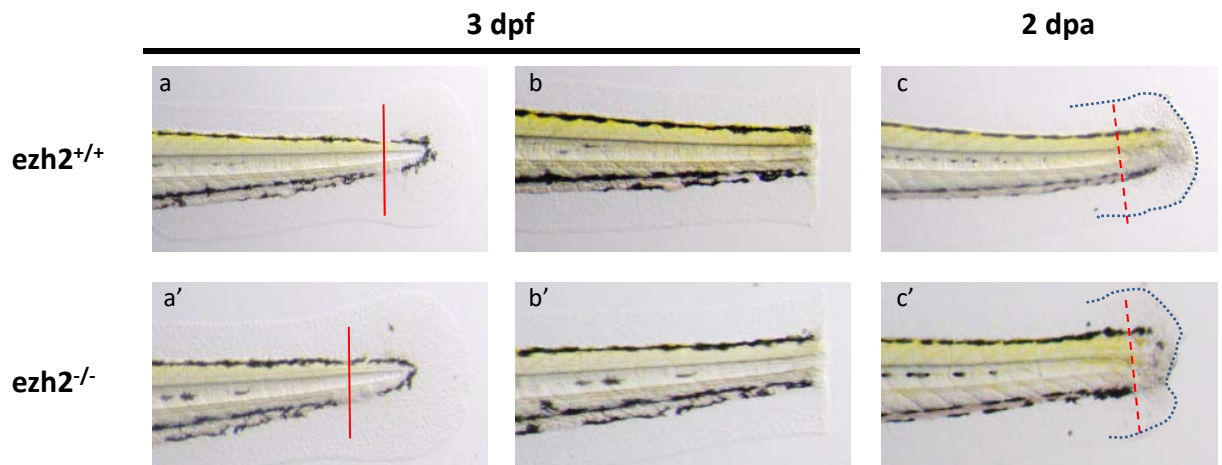
A



B



C



Dupret et al. – Figure 9

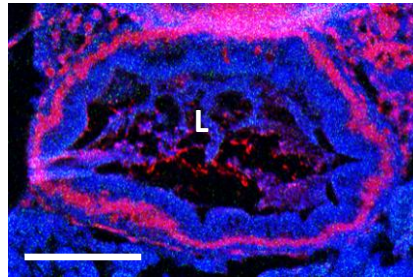
Ezh2^{wt}

MGLTGRKSEKGPVCWRRRVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSS
NRQKILERTDILNQEWKLRRIQPVHIMTPVSSLRGTRECTVDSG
FSEFSRQVIPLKTLNAVASVPVMYSWSPLQQNFMVEDETVLHNI
PYMGDEILDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELV
NALNQYSDNEEDDEEDDHHDYKFEKMDLCDGKDDAEDHKEQLSS
ESHNNDGSKKFPKDKIFEAISSMFPDKGSTEELKEKYKELTEQQ
LPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCF
LHPFQATPNTYKRKNMENLVDSKPCGIYCYMYMVQDGMVREYPA
GVVPERAKTPSKRSTGRRRGRLPNSNSRPSTPTVNSETKDTDS
REGGADGNDSDKDDDDKKDETTSSSEANSRCQTPVKLKLSS
PENVDWSGAEASLFRVLIGTYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEF
VKESSIIARAPAVDENTPQRKKKRKHLWATHCRKIQLKKGSS
NHVYNYQPCDHPRQPCDSSPCVTAQNFCEKFCQCSSECQNRFP
GCRCKAQCNKQPCYLAVERCDPLCLTCGAAEHWDKSNVSK
NCSIQRGAKKHLLAPSDVAGWGIFIKEPVQKNEFISEYCGEII
SQDEADRRGKVYDKYMC SFLFNLNDFVVDATRKGKIRFANHS
VNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQADAL
KYVGIEREMEIP*

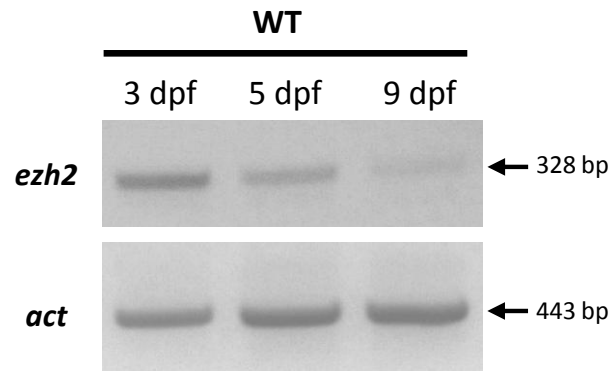
Ezh2^{mut}

MGLTGRKSEKGPVCWRRRV ↓ TCEKHAKDMRVHAAAAAQTLQEGR
RGQEHVQLQQTKN TGAY*

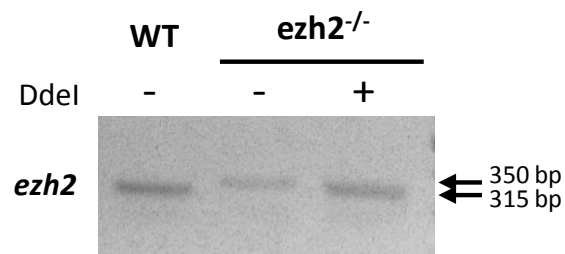
A



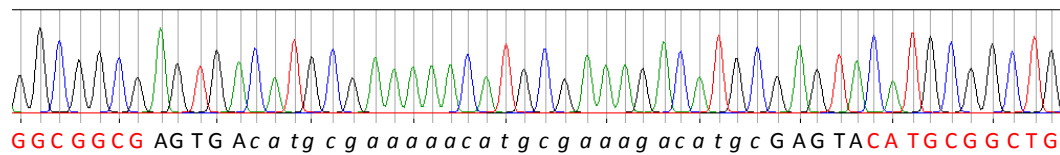
B

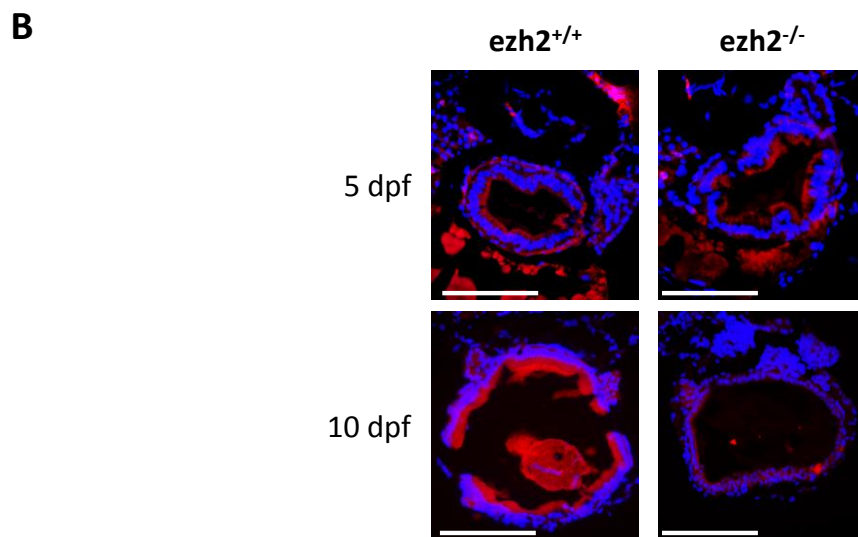
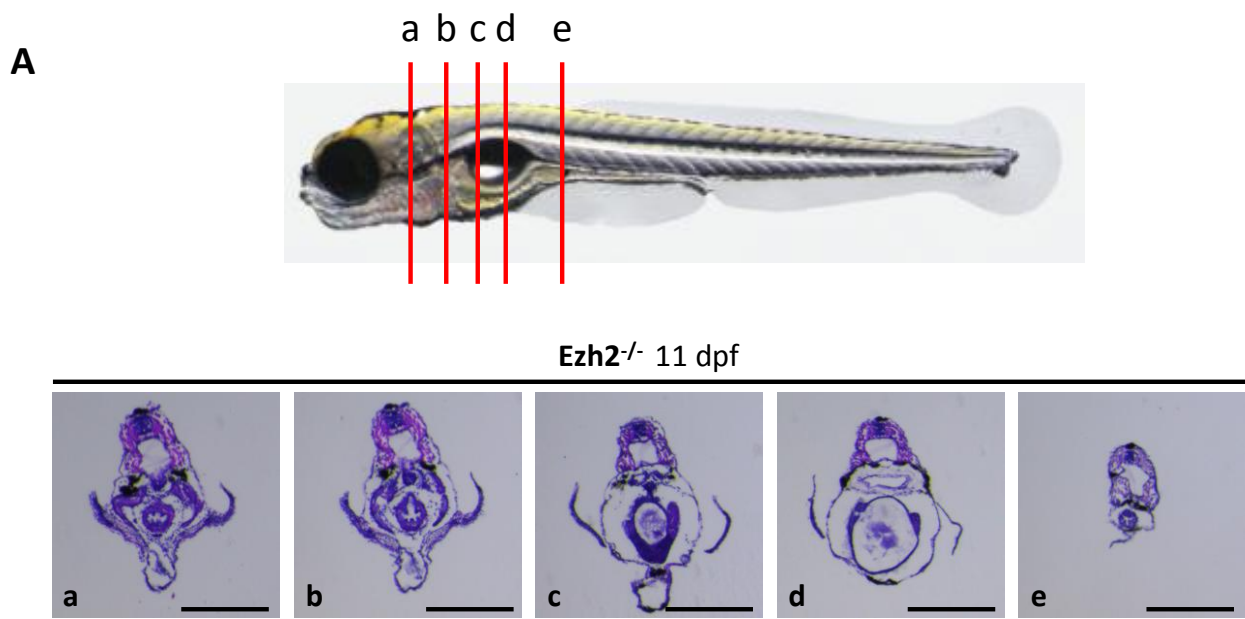


C

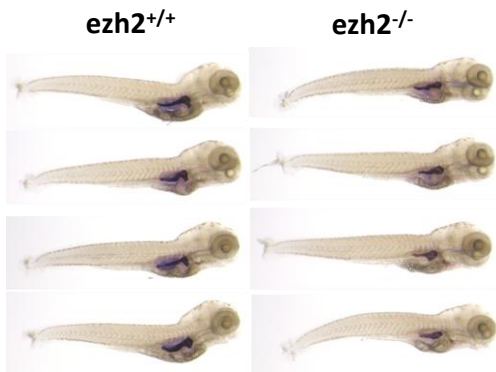


D

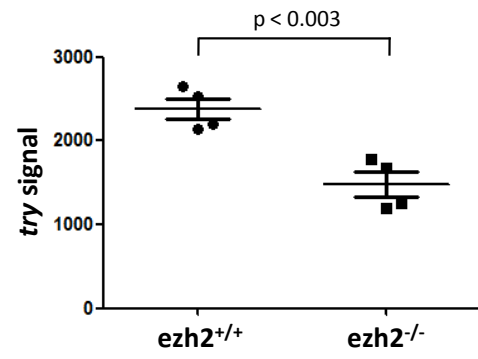


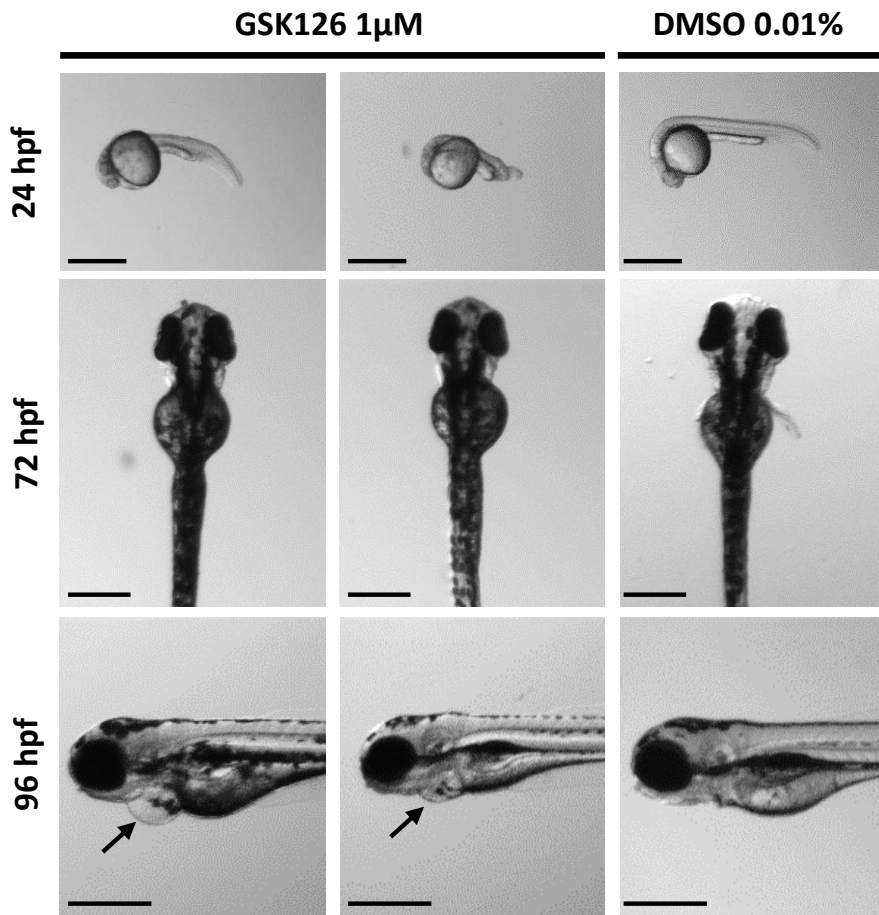
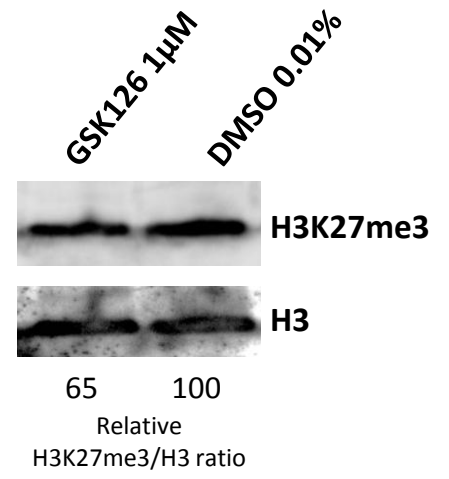


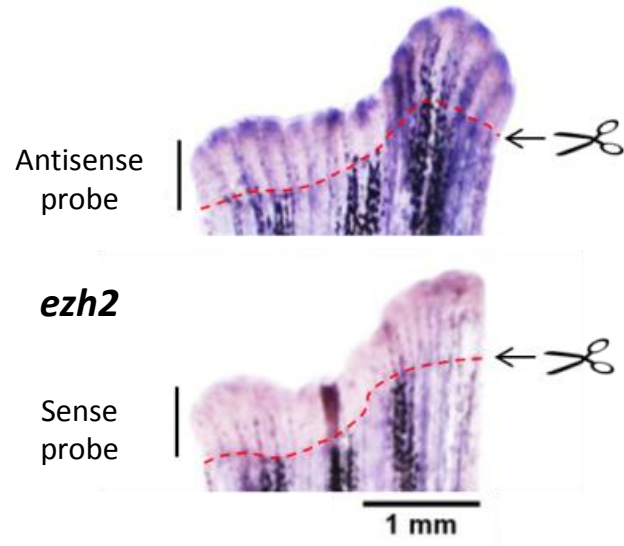
A



B



A**B**



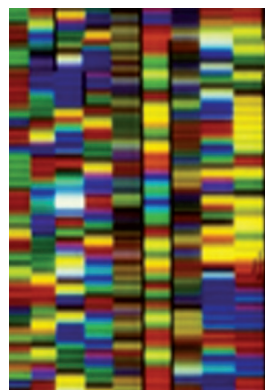
> La modification précise des génomes est un des enjeux majeurs des biotechnologies et de la recherche biomédicale. La découverte des TALE (*transcription activator-like effector*) et le développement récent des TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*) artificiels offrent la possibilité d'éditer les génomes de nombreux organismes modèles de manière rapide, spécifique et efficace. Les TALEN sont des ciseaux moléculaires qui permettent d'induire différentes modifications génétiques en un site choisi du génome, et il est probable qu'ils deviennent, au cours des prochaines années, un des outils incontournables de la génétique inverse appliquée à la médecine. <

Depuis le début de la biologie expérimentale, les animaux sont utilisés afin d'étudier divers phénomènes physiologiques, et il est admis que l'expérimentation animale a considérablement accéléré notre compréhension de la fonction des gènes. Pendant de nombreuses années, l'obtention de mutants se basait sur des méthodes de génétique classique, telles que la mutagenèse chimique ou insertionnelle. Cependant, ces approches ne permettent pas une étude ou une « édition » ciblée du génome. De plus, le séquençage complet ou partiel du génome des organismes modèles a ouvert de nouvelles perspectives pour l'étude fonctionnelle des gènes. Parallèlement, la génération, au cours des dernières décennies, de modèles murins génétiquement modifiés a permis de reproduire et d'étudier un grand nombre de maladies humaines [1]. Toutefois, l'obtention de ces modèles par l'inactivation classique de gènes nécessite l'utilisation de cellules souches embryonnaires (ES, *embryonic stem*) et reste un processus onéreux, long et réservé aux modèles murins (souris) et rat. Récemment, l'émergence de nouvelles technologies a révolutionné l'ère de la génétique inverse en permettant l'introduction de modifications génétiques précises, de manière efficace et rapide, chez

Vignette (Photo © Inserm-Bertrand Jordan).

L'ingénierie des génomes par les TALEN

Barbara Dupret¹, Pierre-Olivier Angrand^{1,2}



¹ Inserm U908, université de Lille 1, bâtiment SN3, Cité scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France ;
² Institut de recherche interdisciplinaire, CNRS USR 3078, parc scientifique de la Haute Borne, 50, avenue Halley, 59658 Villeneuve d'Ascq, France.
pierre-olivier.angrand@univ-lille1.fr

de nombreux génomes modèles [51]. Les méthodes qui utilisent les TALEN sont actuellement parmi les plus prometteuses. Les TALEN sont des protéines chimériques, constituées d'un domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine endonucléasique, qui vont induire une cassure double-brin d'ADN en un site spécifique du génome. La réparation de la cassure peut alors s'accompagner de mutations. De cette façon, les TALEN peuvent être utilisées pour cibler des mutations au niveau de sites choisis du génome.

Cassures double-brin d'ADN et modifications génomiques

Les méthodes de modification des génomes nécessitent des cassures double-brin d'ADN et dépendent des systèmes cellulaires de réparation de ces cassures [52]. Chez les eucaryotes, il existe deux mécanismes de réparation des cassures double-brin d'ADN : la réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ, *non-homologous end joining*) et la réparation par recombinaison homologue (HDR, *homology directed repair*) [2, 3]. La jonction d'extrémités non homologues lie les extrémités cassées et peut s'accompagner de la perte ou du gain de quelques nucléotides, résultant d'événements de mutagenèse différents au niveau du site de clivage de l'ADN [4]. En revanche, la réparation par recombinaison homologue utilise une séquence d'ADN homologue comme modèle pour la restauration de l'intégrité de l'ADN génomique. Aussi, la réparation peut être précise et contrôlée, identique à la séquence de l'ADN qui sert de source pour la recombinaison. Toutefois, la réparation des cassures double-brin d'ADN par recombinaison homologue reste, en général, beaucoup moins efficace que la réparation par jonction d'extrémités non homologues.

TALEN et ingénierie génomique

Les TALEN combinent les propriétés de liaison à l'ADN des TALE (*transcription activator-like effector*) et de clivage de l'ADN par

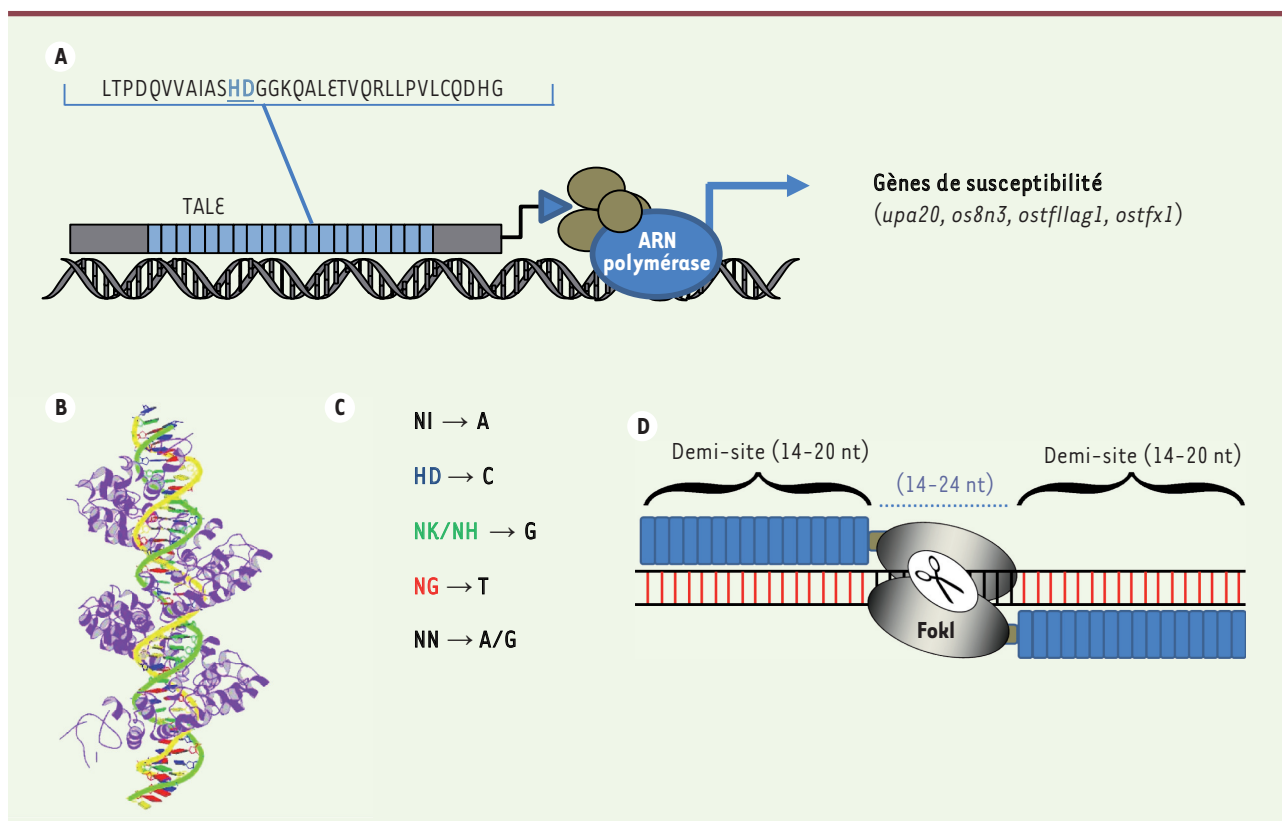


Figure 1. Organisation des TALE et TALEN. **A.** Les TALE (*transcription activator-like effector*) sont des facteurs de transcription produits par les bactéries pathogènes du genre *Xanthomonas*. Injectés dans les plantes par le système de sécrétion de type III, ils sont importés dans le noyau, se lient aux boîtes UTP et activent les gènes de susceptibilité, tels *upa20*, *os8n3*, *ostflag1* ou *ostfx1* de la plante hôte. Les TALE sont constitués de répétition d'un motif de 34 acides aminés. Au sein de ces répétitions, les acides aminés 12 et 13 (en bleu) reconnaissent un nucléotide spécifique. **B.** Les TALE se lient à leurs cibles en formant une hélice qui s'enroule autour de l'ADN. Chaque répétition du TALE reconnaît un nucléotide adjacent (d'après [7]). Source : *protein data bank* (PDB ID 3UGM) <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. **C.** Il existe un code de reconnaissance précis entre les acides aminés 12-13 et les nucléotides cibles : N, Asp ; I, Ile ; H, His ; D, Asp ; K, Lys. **D.** Association d'une paire de TALEN et structure de son site d'ADN cible. Nt : nucléotide.

l'endonucléase FokI (*Flavobacterium okeanoikoites endonuclease I*). Les TALE sont des facteurs de transcription identifiés chez certains phytopathogènes du genre *Xanthomonas*, qui entrent dans le noyau et activent la transcription de gènes cibles chez l'hôte (Figure 1A) [5, 6]. La région centrale des TALE est composée d'un nombre variable de répétitions (7 à 30). Chaque répétition est constituée de 34 acides aminés et se lie à un nucléotide cible unique. Les TALE s'associent alors à l'ADN en formant une hélice qui s'enroule autour de l'ADN où chaque répétition reconnaît un nucléotide de la séquence cible (Figure 1B) [7, 8]. Au sein des répétitions, ce sont les acides aminés 12 et 13 qui déterminent la spécificité de liaison aux nucléotides de chacun de ces domaines répétés [9-11] (Figure 1C). Ainsi, parmi les di-résidus variables 12 et 13 les plus utilisés, NI (Asn-Ile), HD (His-Asp), NK (Asn-Lys)/NH (Asn-His) et NG (Asn-Gly) reconnaissent respectivement les nucléotides A, C, G et T. Les di-résidus NN (Asn-Asn), quant à eux, reconnaissent préférentiellement les nucléotides G et, dans une moindre mesure, les nucléotides A. En dépit d'une plus faible spécificité des di-résidus NN pour les nucléotides G, ces der-

niers sont souvent préférés aux di-résidus NK et NH en raison d'une plus forte affinité pour leur cible [12, 13]. La région de liaison à l'ADN des TALE se termine par la dernière répétition (LR, *last repeat*) qui n'est composée que de 20 résidus, mais possède toutefois les di-résidus variables qui assurent la spécificité de liaison à un nucléotide particulier. La région amino-terminale adjacente aux répétitions se lie au nucléotide T et est également importante pour la reconnaissance de l'ADN. La séquence cible des TALE doit donc posséder un T en 5'. L'assemblage modulaire de répétitions choisies permet donc de développer des TALE artificiels capables de reconnaître théoriquement n'importe quelle séquence d'ADN génomique. En outre, la présence éventuelle de séquences génomiques hors cibles (*off-targets*) pour ces TALE artificiels est facilement prédictible [14]. Cependant, malgré l'existence d'algorithmes de recherche de ces séquences hors cibles et de la haute

Organismes	Description	Références
Levure (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Insertion de mutations de type <i>indel</i> dans les gènes <i>ura3</i> , <i>lys2</i> , <i>ade2</i> et remplacement du gène <i>ura3</i> par recombinaison homologue induite par les TALEN	[20]
Poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>)	Première utilisation des TALEN chez un vertébré modèle : insertion de mutations de type <i>indel</i> dans les gènes <i>tnikb</i> , <i>hey2</i> et <i>gria3a</i> chez le poisson zèbre	[23, 24]
Drosophile (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Première utilisation des TALEN chez la drosophile : insertion de mutations de type <i>indel</i> dans le gène <i>yellow</i>	[25]
Nématode (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	Première utilisation des TALEN chez <i>C. elegans</i> : insertion de mutations de type <i>indel</i> dans le gène <i>ben-1</i>	[36]
Souris	Première utilisation des TALEN chez la souris : génération de souris porteuses de mutations de type <i>indel</i> dans les gènes <i>Pibf1</i> et <i>Sepw1</i>	[37]
Rat	Première utilisation des TALEN chez le rat : génération de rats porteurs de mutations de type <i>indel</i> dans le gène <i>Igm</i>	[17]
Lapin	Première utilisation des TALEN chez le lapin : génération de lapins porteurs de mutations de type <i>indel</i> dans les gènes <i>Rag1</i> et <i>Rag2</i>	[38]
Xénope (<i>Xenopus tropicalis</i>)	Génération de xénopes porteurs de mutations de type <i>indel</i> dans le gène <i>tyr</i>	[30]
Poisson médaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Génération de mutations de type <i>indel</i> dans le gène <i>Dj-1</i> chez le médaka	[35]
Vache	Génération de mutations de type <i>indel</i> dans les gènes <i>Acan12</i> et <i>GDF83.1</i>	[39]
Cochon	Génération de mutations de type <i>indel</i> dans les gènes <i>Rela</i> et <i>Ldlr</i>	[39]
Riz (<i>Oryza sativa</i>)	Génération de mutations de type <i>indel</i> dans le promoteur du gène <i>Os11n3</i> responsable de la résistance des plantes aux souches pathogènes de <i>Xanthomonas</i> (<i>X. oryzae</i>)	[29]
Poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>)	Insertion d'un site EcoRV dans le gène <i>ponzr1</i> et d'un site <i>loxP</i> dans le gène <i>crhr2</i> par réparation des cassures double-brin d'ADN induites par les TALEN, en utilisant une matrice d'ADN simple-brin	[33]
Poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>)	Introduction de la GFP dans le gène <i>th</i> par réparation par recombinaison homologue des cassures double-brin d'ADN induites par les TALEN	[34]
Cochon	Génération de larges délétions et inversions (environ 7-kpb) dans le gène <i>Dmd</i> à l'aide de deux paires de TALEN dans des fibroblastes de cochon	[39]
Ver à soie (<i>Bombyx mori</i>)	Génération de larges délétions (environ 800-pb) dans le gène <i>Bmblos2</i> à l'aide de deux paires de TALEN	[42]
Cellules humaines (Jurkat et RPE-1)	Génération d'une translocation entre les gènes <i>NPM1</i> (<i>nucleolar phosphoprotein B23, numatrin</i>) et <i>ALK</i> (<i>anaplastic lymphoma kinase</i>), respectivement situés sur les chromosomes 5 et 2, à l'aide de deux paires de TALEN afin d'induire la translocation t(2;5) (p23;q35) trouvée chez les patients atteints de lymphomes de type ALCL (anaplasique à grandes cellules)	[43]
Cellules humaines (iPS)	Restauration du gène $\alpha 1$ -antitrypsine fonctionnel par réparation par recombinaison homologue des cassures double-brin d'ADN induites par les TALEN dans des cellules iPS (<i>induced pluripotent stem cells</i>) provenant de patients	[44]

Tableau 1. Exemples d'utilisation des TALEN.

spécificité de liaison des TALE à leur séquence, la recherche expérimentale d'éventuels sites hors cible, dont le ciblage peut conduire à des effets non désirés, reste nécessaire [15-17]. En fusionnant le

domaine de clivage de la nucléase FokI à un TALE artificiel, il devient possible d'induire une cassure de l'ADN en un site spécifique et, en conséquence, d'éditer le



génomique par réparation de la cassure double-brin [13, 18]. La dimérisation du domaine nucléasique de FokI est nécessaire au clivage de l'ADN. Aussi, il faut une paire de TALEN pour induire une cassure double-brin d'ADN en un point donné du génome (Figure 1D).

Le site de reconnaissance par les TALEN consiste en deux séquences de 14-20 paires de bases (pb) reconnues par chaque monomère de la paire de TALEN, séparées par une séquence de 14-24 pb qui facilite la dimérisation de FokI (Figure 1D). La taille de la séquence d'espace entre les sites de liaison de la paire de TALEN dépend, notamment, de la nature de la région carboxy-terminale adjacente aux répétitions [16, 18]. C'est au sein de cette séquence d'espacement que la cassure double-brin d'ADN se produit.

Assemblage des TALEN

Afin d'atteindre une bonne spécificité dans la reconnaissance de l'ADN cible, les TALEN doivent se lier à des séquences de 14 à 20 pb. L'utilisation des TALEN repose donc sur un assemblage rapide et efficace des répétitions du TALE artificiel. Cependant, la construction des TALEN peut s'avérer difficile en raison du grand nombre de modules répétitifs qui constituent les TALE. Aussi, plusieurs méthodes d'ingénierie ont été mises au point afin d'assembler efficacement les TALEN (Figure 2). Certaines méthodes sont basées sur le clonage modulaire *Golden gate* qui utilise des enzymes de restriction de type IIS. Cette stratégie permet d'assembler jusqu'à 10 répétitions en une seule réaction de ligation, et la réalisation de TALEN en cinq jours [19-22]. Une deuxième stratégie, l'assemblage d'unités par ligations successives (UA, *unit assembly*; REAL, *restriction enzyme and ligation*), utilise des enzymes de restriction compatibles qui produisent des extrémités cohésives complémentaires (par exemple les isocaudamères NheI et SpeI). À partir de quatre plasmides qui contiennent les répétitions se liant spécifiquement aux nucléotides A, C, G et T, une infinité de TALE artificiels peuvent être facilement générés par les techniques de restriction/ligation conventionnelles [23-25]. Le clonage sans ligation (LIC, *ligation-independent cloning*), qui utilise de longues extrémités cohésives hybridées *in vitro*, puis liées par les enzymes bactériennes après transformation, est également une méthode simple et rapide qui permet l'assemblage des TALEN à grande échelle [26]. D'autres approches, qui n'utilisent pas les méthodes de clonage traditionnelles, ni la sélection et l'amplification des bactéries après les étapes de ligation, mais qui sont basées sur l'assemblage automatisé des répétitions en phase solide (FLASH, *fast ligation-based automatable solid-phase high-throughput*; ICA, *iterative capped assembly*), sont également développées. Ces stratégies permettent l'ingénierie des TALEN en quelques heures et peuvent être utilisées à plus grande échelle [27, 28]. Ces différentes approches rendent la génération des TALEN accessible à des coûts relativement faibles à tous les laboratoires, même les plus petits.

Champs d'application des TALEN

Depuis leur première utilisation rapportée en 2010 [13], les TALEN ont été largement utilisés aussi bien *in vitro* dans des cellules en culture,

qu'*in vivo* dans un grand nombre d'organismes modèles, tels que la levure [13, 20], les plantes [19, 22, 29], le xénope [30, 31], les poissons [19, 23, 32-35], la drosophile [25], *Caenorhabditis elegans* [36], le rat [17], la souris [37], le lapin [38], la vache ou le cochon [39] (Tableau 1). Ainsi, les TALEN peuvent donc être employés pour manipuler beaucoup, voir tous les génomes.

Une paire de TALEN permet de cibler une cassure double-brin d'ADN en un site choisi du génome (Figure 3A). Cette cassure de l'ADN est généralement réparée par jonction d'extrémités non homologues et peut s'accompagner de petites insertions et/ou délétions de paires de bases (mutations de type *indel*) qui conduisent à des modifications du génome. Les mutations de type *indel* induites par l'action des TALEN sont de taille variable et conduisent souvent à des décalages de la phase de lecture quand elles sont situées dans les régions codantes du génome. Selon la paire de TALEN considérée, la fréquence de mutation est variable et peut se situer entre 0 % à plus de 70 % [40]. L'utilisation d'un ADN matrice avec les TALEN permet de modifier le génome de manière particulièrement précise. En présence d'un ADN homologue donneur simple-brin ou double-brin, la cassure double-brin d'ADN peut stimuler la voie de réparation par recombinaison homologue, permettant l'insertion d'une séquence d'ADN exogène [18, 33, 34] ou le remplacement précis d'un nucléotide particulier [41]. La réparation des cassures double-brin d'ADN par jonction d'extrémités non homologues est beaucoup plus efficace que la réparation par recombinaison homologue. Aussi, l'inactivation de gènes par les TALEN est plus aisée que le remplacement de gènes ou l'insertion d'ADN exogènes. Une paire de TALEN permet donc la génération de mutations de type *indel*, l'insertion de mutations ponctuelles ou l'insertion des séquences exogènes. Il est également possible d'utiliser deux paires de TALEN qui ciblent le même chromosome afin d'induire des délétions et/ou des inversions de larges segments chromosomiques (plusieurs centaines de kpb) [27, 42]. La délétion de larges régions génomiques par les TALEN est particulièrement intéressante pour l'étude de la fonction des longs ARN non codants. En effet, les mutations ponctuelles ou de type *indel* ne sont certainement pas suffisantes pour abroger la fonction de ces ARN qui ne possèdent pas de phase de lecture ouverte. Enfin, l'utilisation de deux paires de TALEN qui ciblent des chromosomes différents permet d'induire une translocation réciproque [43] (Figure 3B).

Ainsi, la technologie d'édition des génomes à l'aide des TALEN, en induisant un grand nombre de modifications

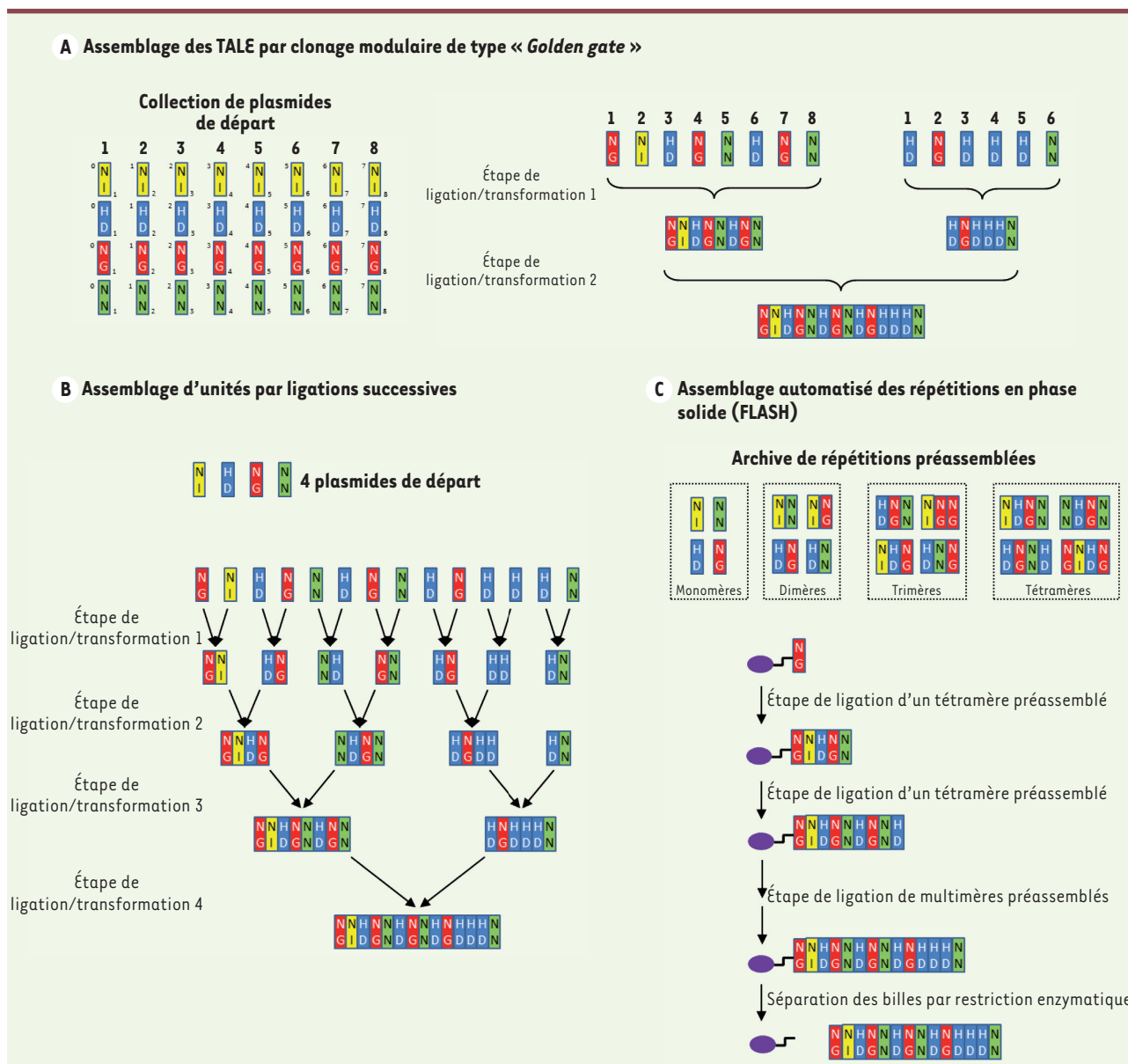


Figure 2. Stratégies d'assemblage des TALEN. **A.** Les méthodes d'assemblages par clonage modulaire de type « Golden gate » utilisent les enzymes de restriction de type IIS et permettent l'assemblage d'au plus dix répétitions orientées en une seule étape de ligation, grâce à l'utilisation d'extrémités cohésives différentes [19]. **B.** L'assemblage d'unités par ligations successives permet l'ingénierie de TALEN contenant un nombre illimité de répétitions à partir de quatre plasmides de départ par des séries de ligations successives [23]. **C.** Les méthodes de ligation en phase solide permettent l'assemblage des TALEN sur un support sans passer par les étapes de transformation et de sélection des bactéries durant les étapes intermédiaires [27].

génomiques différentes, ouvre de larges champs d'application et offre de nombreuses perspectives thérapeutiques. Les TALEN sont largement employés pour induire l'inactivation de gènes [19, 20, 22-25, 29-31, 34-39], mais aussi pour restaurer la fonction de gènes mutants [41], introduire des marqueurs de l'expression génique, tels que la GFP (*green fluorescent protein*) [34], ou générer des translocations chromosomiques [43]. La possibilité d'introduire des sites LoxP et/ou FRT (*Flp recombinase target*) par recombinaison homologue impliquant les TALEN [33] permet également d'augmenter le répertoire des manipulations génomiques pos-

sibles en ouvrant la voie aux stratégies d'inactivation de gènes conditionnelles ou spécifiques de tissus.

Le fait que les TALEN puissent être utilisés chez de nombreux organismes afin de générer des modifications génomiques va inévitablement conduire à l'expansion considérable du nombre d'animaux modèles pour l'étude des maladies humaines et pour la recherche médicale. Il est également probable que l'utilisation des TALEN remplace progressivement les méthodes

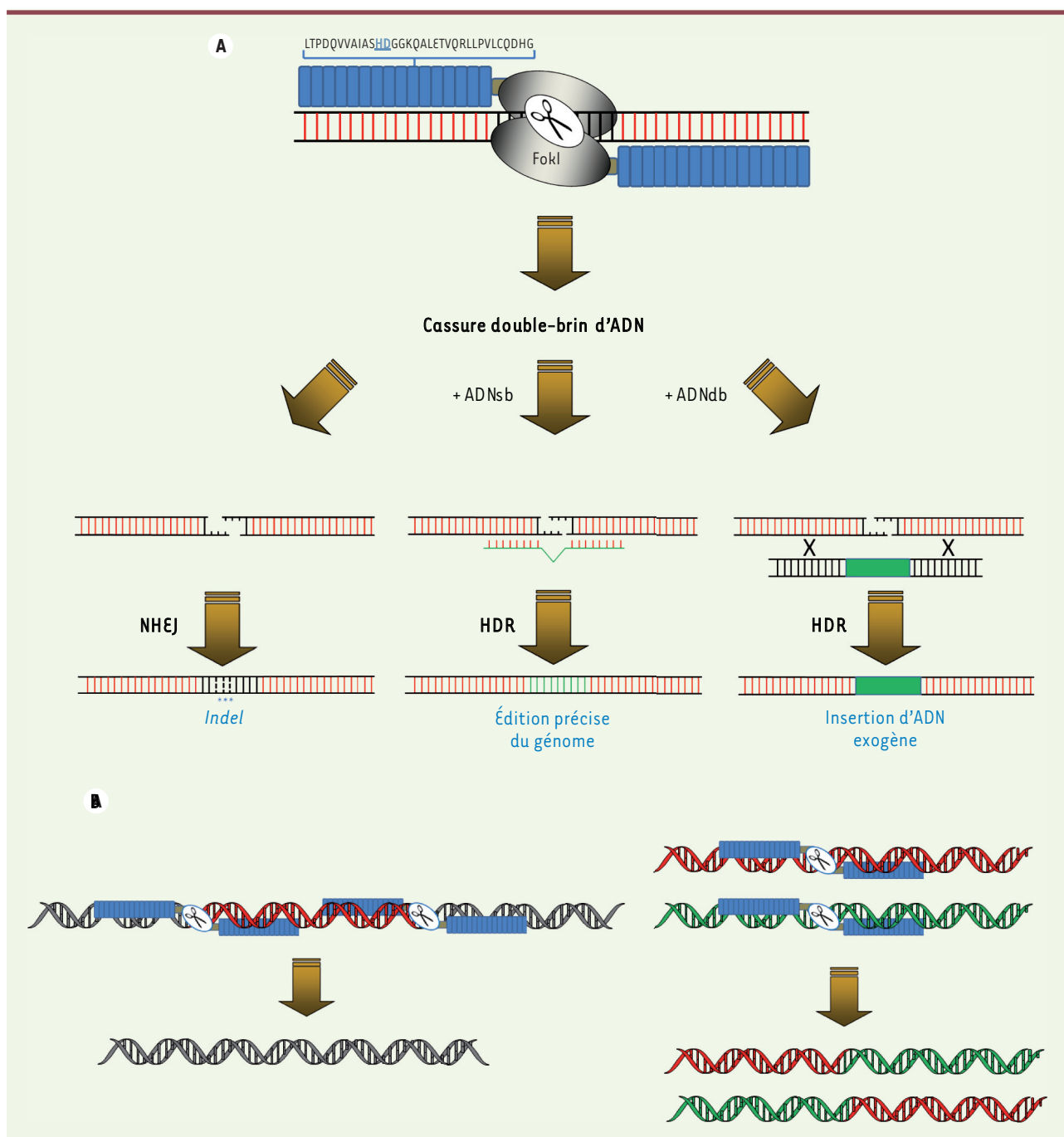


Figure 3. Ingénierie des génomes par les TALEN. **A.** Les TALEN induisent une cassure double-brin (db) d'ADN en un site spécifique du génome. La réparation de cette cassure par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) conduit à des insertions ou délétions d'un nombre variable de nucléotides (mutations *indel*). En présence d'ADN matriciel simple-brin (sb) ou double-brin (db), la réparation des cassures par recombinaison homologue (HDR) permet l'introduction de substitutions nucléotidiques précises ou l'insertion de séquences d'ADN exogènes. **B.** L'utilisation de deux paires de TALEN en *cis* sur le même chromosome conduit à la délétion des séquences (en rouge) localisées entre les deux cassures (à gauche), alors que l'introduction de cassures double-brin d'ADN sur deux chromosomes permet de générer des translocations réciproques (à droite).

classiques de génétique inverse chez la souris. En effet, l'emploi des TALEN permet l'inactivation de gènes, la modification de gènes ou l'introduction de séquences exogènes dans le génome murin sans passer par les étapes du ciblage de gènes dans les cellules ES et de génération

des souris chimères avant transmission germinale. De la même manière, l'utilisation des TALEN, en permettant l'insertion de séquences exogènes en des sites particuliers et contrôlés du génome, peut servir d'alternative

à la transgénèse classique chez la souris ou chez d'autres organismes modèles tels que le poisson zèbre ou la drosophile.

En combinaison avec l'utilisation de technologies cellulaires basées sur les cellules souches pluripotentes induites (iPS), les TALEN se révèlent être des outils prometteurs en médecine régénératrice [15, 44, 45]. Choi *et al.* [44] ont, par exemple, utilisé la stratégie de réparation par recombinaison homologue des cassures double-brin d'ADN induite par les TALEN pour restaurer un gène $\alpha 1$ -antitrypsine fonctionnel dans des cellules iPS dérivées de patients porteurs d'une déficience dans le gène codant pour l' $\alpha 1$ -antitrypsine, avec une efficacité de ciblage des deux allèles de 25 % à 33 %. Cette étude montre la faisabilité des stratégies de transplantations autologues dans lesquelles les cellules dérivées de patients pourraient être corrigées *ex vivo* avant leur réimplantation ; ces approches sont associées, en principe, à une diminution des risques de complications immunitaires.

Conclusion et perspectives

Les TALEN sont des ciseaux moléculaires capables d'induire des cassures double-brin d'ADN en un site choisi, au sein de n'importe quel génome. Cette spécificité est conférée par l'existence d'un code de reconnaissance précis des nucléotides par les répétitions des TALE. La réparation des cassures double-brin d'ADN, par jonction d'extrémités non homologues ou par recombinaison homologue, permet la modification précise des génomes. Grâce au développement de plusieurs stratégies, l'assemblage des TALEN artificiels devient un exercice aisé et rapide. Aussi, au cours des trois dernières années, l'utilisation des TALEN a pris une ampleur considérable. L'application des TALEN pour induire toutes sortes de modifications génétiques dans de nombreux organismes modèles démontre la robustesse et la simplicité de cette approche, et de nombreuses preuves de concept appliquées à l'ingénierie des génomes ont été décrites (Tableau 1). Les TALEN sont au cœur d'une véritable révolution dans le domaine de la génétique inverse, et il est probable qu'ils deviennent, au cours des prochaines années, un des outils les plus efficaces et les plus utilisés en recherche fondamentale, tout comme en recherche médicale.

Les TALEN s'ajoutent à d'autres outils qui permettent d'induire des cassures double-brin d'ADN ciblées afin de modifier les génomes, tels que les méganucléases [46], les nucléases à doigts de zinc (ZFN, *zinc-finger nuclease*) [47] ou le système CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*)/Cas9 nouvellement développé [48]. Les méganucléases sont des endonucléases qui se caractérisent par un site de reconnaissance de l'ADN de grande taille (12 à 40 bp), généralement absent ou présent en peu d'exemplaires dans un génome donné. Cependant, la réalisation de recombinaisons génétiques induites par des méganucléases est limitée par le répertoire d'enzymes disponibles, car la probabilité de trouver une méganucléase susceptible de couper un gène donné en un site spécifique reste faible, et ce malgré les efforts d'ingénierie de nouvelles méganucléases pourvues de nouveaux sites de reconnaissance. Les ZFN sont des protéines chimériques, entre un domaine de liaison à l'ADN, constitué de répétitions de doigts de zinc de type C_2H_2 et le domaine endonucléasique de

FokI. Chaque doigt de zinc reconnaît une série de trois nucléotides. Cependant, l'ingénierie des génomes par les ZFN est difficilement applicable aux régions dépourvues ou pauvres en trinuécléotides GNN (où N représente n'importe quel nucléotide), car ces séquences sont préférentiellement ciblées par les doigts de zinc de type C_2H_2 . Cette contrainte limite l'utilisation large des ZFN afin de modifier des génomes. À l'inverse du code de reconnaissance de l'ADN par les TALE ou les doigts de zinc de type C_2H_2 , le système CRISPR/Cas9 reconnaît une séquence d'ADN cible grâce à un ARN guide, tandis que la protéine bactérienne Cas9 associée clive l'ADN sur les deux brins. Le clivage par le système CRISPR/Cas9 nécessite la présence d'une séquence nucléotidique particulière appelée PAM (*protospacer adjacent motif*) adjacente au site de reconnaissance de l'ARN guide, sur le brin complémentaire. Pour le système CRISPR/Cas9 dérivé de *Streptococcus pyogenes*, la séquence PAM est NGG. La nécessité de sa présence fait qu'environ 40 % du génome peut être la cible du clivage par le complexe ribonucléoprotéique CRISPR/Cas9. Actuellement, encore relativement peu d'applications du système CRISPR/Cas9 sont décrites, mais il semble que cette approche de modification des génomes soit aussi efficace que celle basée sur les TALEN.

Plus récemment, le code de reconnaissance des séquences d'ADN par les TALE a été utilisé pour cibler des protéines ou activités enzymatiques autres que nucléasiques, au niveau de régions génomiques particulières. En particulier, Miyazaki *et al.* [49] ont utilisé les TALE pour cibler la GFP au niveau de séquences génomiques spécifiques afin d'étudier la dynamique des chromosomes. De manière similaire, Maeder *et al.* ont décrit la déméthylation d'îlots CpG spécifiques grâce à l'utilisation de TALE artificiels fusionnés au domaine catalytique hydroxylase de la protéine TET1 [50]. Il est fort probable que d'autres applications qui utilisent les TALE artificiels soient rapidement développées. ♦

SUMMARY

Targeted genome modifications using TALEN

Precise modifications of genomes have been one of the biggest goals in the fields of biotechnology and biomedical research. Recent discovery of TALE (transcription activator-like effectors) and the engineering of customized TALEN (transcription activator-like effector nucleases) allowed rapid genome editing in a variety of cell types and different model organisms. TALEN are molecular scissors used to induce a wide range of specific and efficient genomic modifications. TALEN promise to have profound impacts on biological and medical research over the coming years. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

L'activité du laboratoire est soutenue par l'Inserm, le CNRS, l'université de Lille 1, la région Nord-Pas de Calais et le Fond européen de développement régional (FEDER) au travers du contrat de projets État-région (CPER) 2007-2013.

RÉFÉRENCES

1. International mouse knockout consortium, Collins FS, Rossant J, Wurst W. A mouse for all reasons. *Cell* 2007 ; 128 : 9-13.
2. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 2010 ; 79 : 181-211.
3. Van den Bosch M, Lohman PH, Pastink A. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biol Chem* 2002 ; 383 : 873-92.
4. Grabarz A, Barascu A, Guirouilh-Barbat J, Lopez BS. Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am J Cancer Res* 2012 ; 2 : 249-68.
5. Kay S, Hahn S, Marois E, et al. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* 2007 ; 318 : 648-51.
6. Bogdanove AJ, Schornack S, Lahaye T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol* 2010 ; 13 : 394-401.
7. Mak AN, Bradley P, Cernadas RA, et al. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* 2012 ; 335 : 716-9.
8. Deng D, Yan C, Pan X, et al. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* 2012 ; 335 : 720-3.
9. Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 2009 ; 326 : 1509-12.
10. Mascou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 2009 ; 326 : 1501.
11. Cong L, Zhou R, Kuo YC, et al. Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. *Nat Commun* 2012 ; 3 : 968.
12. Streubel J, Blücher C, Landgraf A, Boch J. TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nat Biotechnol* 2012 ; 30 : 593-5.
13. Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 2010 ; 186 : 757-61.
14. Grau J, Boch J, Posch S. TALEN offer: genome-wide TALEN off-target prediction. *Bioinformatics* 2013 ; 29 : 2931-2.
15. Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol* 2011 ; 29 : 731-4.
16. Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res* 2011 ; 39 : 9283-93.
17. Tesson L, Usal C, Ménoret S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol* 2011 ; 29 : 695-6.
18. Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 2011 ; 29 : 143-8.
19. Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 2011 ; 39 : e82.
20. Li T, Huang S, Zhao X, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 2011 ; 39 : 6315-25.
21. Li L, Piatek MJ, Atef A, et al. Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification. *Plant Mol Biol* 2012 ; 78 : 407-16.
22. Morbitzer R, Elsaesser J, Hausner J, Lahaye T. Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning. *Nucleic Acids Res* 2011 ; 39 : 5790-9.
23. Huang P, Xiao A, Zhou M, et al. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol* 2011 ; 29 : 699-700.
24. Sander JD, Cade L, Khayter C, et al. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol* 2011 ; 29 : 697-8.
25. Liu J, Li C, Yu Z, et al. Efficient and specific modifications of the Drosophila genome by means of an easy TALEN strategy. *J Genet Genomics* 2012 ; 39 : 209-15.
26. Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Kaiser V, et al. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat Biotechnol* 2013 ; 31 : 76-81.
27. Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol* 2012 ; 30 : 460-5.
28. Briggs AW, Rios X, Chari R, et al. Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. *Nucleic Acids Res* 2012 ; 40 : e117.
29. Li T, Liu B, Spalding MH, et al. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol* 2012 ; 30 : 390-2.
30. Ishibashi S, Cliffe R, Amaya E. Highly efficient bi-allelic mutation rates using TALENs in *Xenopus tropicalis*. *Biol Open* 2012 ; 1 : 1273-6.
31. Lei Y, Guo X, Liu Y, et al. Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 17484-9.
32. Huang P, Zhu Z, Lin S, Zhang B. Reverse genetic approaches in zebrafish. *J Genet Genomics* 2012 ; 39 : 421-33.
33. Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, et al. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* 2012 ; 491 : 114-8.
34. Zu Y, Tong X, Wang Z, et al. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods* 2013 ; 10 : 329-31.
35. Ansai S, Sakuma T, Yamamoto T, et al. Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases. *Genetics* 2013 ; 193 : 739-49.
36. Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science* 2011 ; 333 : 307.
37. Sung YH, Baek IJ, Kim DH, et al. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol* 2013 ; 31 : 23-4.
38. Song J, Zhong J, Guo X, et al. Generation of RAG 1- and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs. *Cell Res* 2013 ; 23 : 1059-62.
39. Carlson DF, Tan W, Lillico SG, et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 17382-7.
40. Cade L, Reyon D, Hwang WY, et al. Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. *Nucleic Acids Res* 2012 ; 40 : 8001-10.
41. Sun N, Liang J, Abil Z, Zhao H. Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. *Mol Biosyst* 2012 ; 8 : 1255-63.
42. Ma S, Zhang S, Wang F, et al. Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs. *PLoS One* 2012 ; 7 : e45035.
43. Piganeau M, Ghezraoui H, De Cian A, et al. Cancer translocations in human cells induced by zinc finger and TALE nucleases. *Genome Res* 2013 ; 23 : 1182-93.
44. Choi SM, Kim Y, Shim JS, et al. Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology* 2013 ; 57 : 2458-68.
45. Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell* 2013 ; 12 : 238-51.
46. Arnold S, Delenda C, Grizot S, et al. The I-Cre1 meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Eng Des Sel* 2011 ; 24 : 27-31.
47. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 2010 ; 11 : 636-46.
48. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013 ; 31 : 227-9.
49. Miyazari Y, Ziegler-Birling C, Torres-Padilla ME. Live visualization of chromatin dynamics with fluorescent TALEs. *Nat Struct Mol Biol* 2013 ; 20 : 1321-4.
50. Maeder ML, Angstman JF, Richardson ME, et al. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nat Biotechnol* 2013 ; 31 : 1137-42.
51. Cohen-Tannoudji M, Guénet JL. Une nouvelle ère pour la génétique du rat. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 387-90.
52. Gatinois V, Puechberty J, Lefort G, et al. Les remaniements chromosomiques complexes : un paradigme pour l'étude de l'instabilité chromosomique. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 55-63.

TIRÉS À PART
P.O. Angrand



Review Article

Diverse involvement of EZH2 in cancer epigenetics

Pamela Völkel^{1,2}, Barbara Dupret¹, Xuefen Le Bourhis¹, Pierre-Olivier Angrand¹

¹Cell Plasticity & Cancer - Inserm U908, University of Lille, Bâtiment SN3, Cité Scientifique, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France; ²Interdisciplinary Research Institute - CNRS USR3078/University of Lille, Parc de la Haute Borne, 50 Avenue de Halley, F-59658 Villeneuve d'Ascq, France

Received December 25, 2014; Accepted January 9, 2015; Epub February 15, 2015; Published February 28, 2015

Abstract: EZH2 is the catalytic subunit of Polycomb Repressor Complex 2 (PRC2) which catalyzes methylation of histone H3 at lysine 27 (H3K27me) and mediates gene silencing of target genes via local chromatin reorganization. Numerous evidences show that EZH2 plays a critical role in cancer initiation, progression and metastasis, as well as in cancer stem cell biology. Indeed, EZH2 dysregulation alters gene expression programs in various cancer types. The molecular mechanisms responsible for EZH2 alteration appear to be diverse and depending on the type of cancer. Furthermore, accumulating evidences indicate that EZH2 could also act as a PRC2-independent transcriptional activator in cancer. In this review, we address the current understanding of the oncogenic role of EZH2, including the mechanisms of EZH2 dysregulation in cancer and progresses in therapeutic approaches targeting EZH2.

Keywords: EZH2, polycomb repression, chromatin modification, histone lysine methylation, cancer, cancer stem cells

Introduction

During embryogenesis, the fertilized egg develops into a complex organism composed of many differentiated cell types. The maintenance of the differentiation status of these cell types requires a cellular memory system responsible for the stable inheritance of gene expression programs. The Polycomb group (PcG) and trithorax group (trxG) genes were discovered in *Drosophila melanogaster* as part of such a memory system [1, 2]. They have been identified as repressors (PcG) and activators (trxG) of genetic programs, respectively. Mutations in the PcG and trxG genes result in pleiotropic defects, of which homeotic transformations are the most apparent [3]. In vertebrates, the PcG and trxG proteins have similar roles in the maintenance of homeotic gene expression patterns. Indeed, changes in the body plan have been observed in PcG and trxG gene homolog mouse mutants [4-7]. Although primarily known for their involvement in the control of homeotic genes during the establishment of the body plan, PcG and trxG members have also been shown to be implicated in the control of various cellular processes, such as stem cell renewal and differentiation, cell fate

decisions, senescence, chromosome X-inactivation in mammals, or tumorigenesis and neoplastic development [8-10].

Perturbations in local chromatin structure cause inappropriate gene expression and genomic instability, resulting in cellular transformation and malignant outgrowth. Therefore, proteins involved in chromatin organization, including Polycomb group (PcG) proteins constitute fundamental players in cancer pathogenesis [11-13].

Polycomb repression and EZH2 activity

PcG proteins have been found to interact with each other to form multimeric, chromatin-associated protein complexes of two general types: the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) and PRC2 [14, 15]. These complexes post-translationally modify histone tails and are believed to cooperate in transcriptional repression of target genes by altering local, higher order chromatin structure. The PRC2 protein complex contains EZH2, a histone methyltransferase that catalyzes trimethylation of histone H3 lysine 27 (H3K27me₃) [16, 17]. In addition to EZH2, core PRC2 is composed of EED, SUZ12 and RBBP4/

EZH2 and cancer

Table 1. EZH2 alterations and cancers

Alteration	Cancer type	References
Overexpression	Prostate, breast, bladder, ovarian, renal carcinoma, lung, liver, brain, gastric, esophageal, pancreatic, melanoma	[35, 38, 39-56, 166]
Activating mutations	Large follicular and B-cell lymphomas	[99, 100, 102, 103]
Inactivating/hypomorphic mutations	Myeloproliferative neoplasms Pediatric cancers	[115, 116, 118-120]
H3.3K27M-mediated EZH2 inhibition	Pediatric gliomas	[121-124]

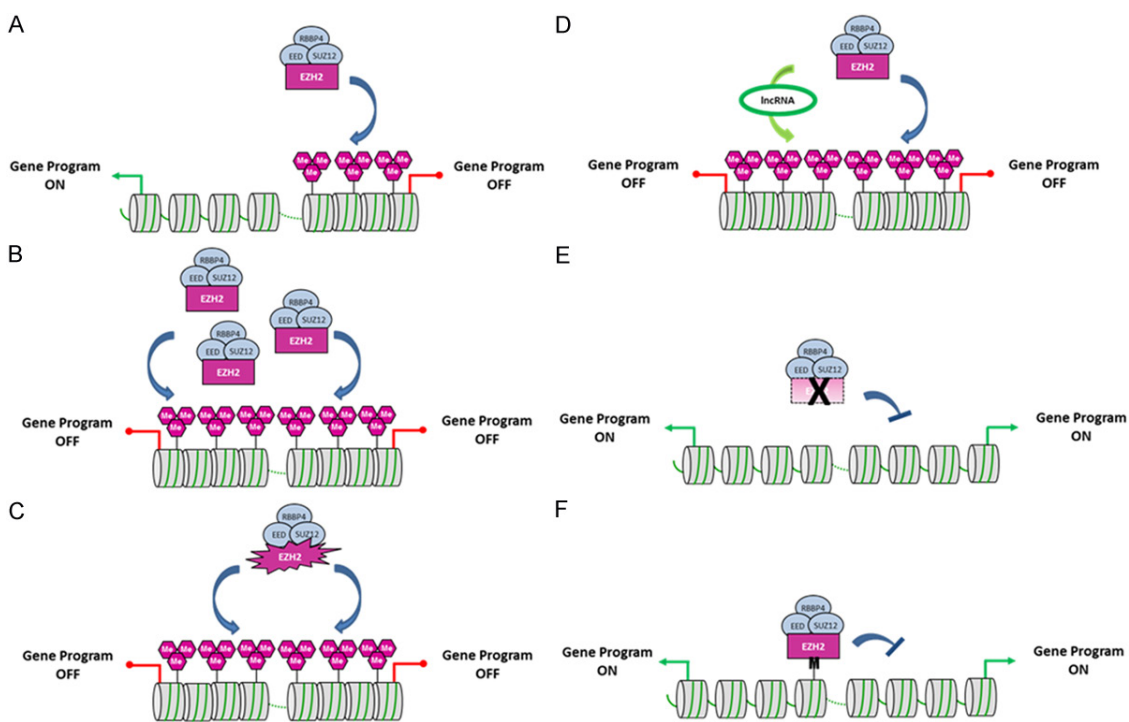


Figure 1. Schematic representation of the diverse EZH2 dysregulations found in cancer. A. The histone lysine methyltransferase EZH2 catalyzes H3K27 methylation at defined target genes and silences their expression. B. Overabundance of EZH2 is responsible for an increase in H3K27me3 repressive mark levels leading to the silencing of tumor suppressor genes in cancer cells. C. EZH2 bearing activating mutations at residues Y641, A677 or A687 possesses an enhanced activity leading to an increase in H3K27me3 levels. D. Overexpression of EZH2-interacting partners such as specific lncRNAs enhances recruitment of EZH2 to targets and increases H3K27me3 levels. E. EZH2 harboring an inactivating mutation or EZH2 gene deletion leads to a decrease in H3K27me3 levels and activation of EZH2 target gene programs in cancer. F. A lysine to methionine substitution at position 27 (K27M) in the gene encoding histone H3.3 (H3F3A) inhibits EZH2 activity and leads to nearly undetectable H3K27me3 repressive mark levels in pediatric gliomas. Purple hexagons represent H3K27me epigenetic marks, and M illustrates H3.3K27M mutant histones.

RbAp48/NURF55 which are required for full EZH2 histone methyltransferase activity [18, 19]. The PRC1 protein complex binds to PRC2-modified residues (H3K27me3) and monoubiquitylates histone H2A at lysine 119 (H2AK119ub1) [20, 21]. These modifications (H3K27me3 and H2AK119ub1) cause in turn local chromatin compaction and transcriptional silencing.

EZH2 is the catalytic subunit of the PRC2 protein complex, and its C-terminal SET domain

exhibits the H3K27 methyltransferase function. However, EZH2 by itself lacks enzymatic activity. Two other PRC2 components, the zinc-finger-containing protein SUZ12 and the WD40-repeat protein EED are required to maintain the integrity of the PRC2 complex and for EZH2 robust methyltransferase activity [22-24]. The fourth PRC2 core subunit, RBBP4/RbAp48 also contributes to PRC2 function but subcomplexes lacking this component retain substantial enzyme activity [18, 19]. Additional PRC2 components, such as AEBP2, PCL (PHF) and

EZH2 and cancer

JARID2 may function as accessory factors regulating the activity of the PRC2 protein complex. However, their role appears to be modulatory rather than essential [17, 25-28].

In the context of the PRC2 protein assembly, EZH2 SET domain performs three successive methyl transfer reactions, producing ultimately H3K27me3. This contrasts with other SET-domain protein methyltransferases whose capacity for methyl transfer appears more limited. For example, SET7/9 produces only monomethylated products (H3K4me1), whereas G9a/EHMT2 catalyzes mono- and dimethylation (H3K9me1 and H3K9me2) and SUV39H2 can di- and trimethylate monomethylated substrates (H3K9me1 methylation into H3K9me2 and H3K9me3) [29, 30].

EZH1 is a paralog of EZH2; PRC2-EZH2 and PRC2-EZH1-containing complexes control overlapping sets of target genes but act differently to maintain the repressed chromatin state [31]. Furthermore, EZH2 is mainly expressed in proliferating tissues, whereas EZH1 expression is found in dividing and differentiated cells [31, 32]. This observation suggests that EZH2-containing PRC2 complexes might establish the H3K27me3 repressive marks, whereas EZH1-containing PRC2 complexes might contribute to the restoration of the H3K27me3 methylation profile after histone demethylation or histone exchanges.

Involvement of EZH2 in cancer

The genome-wide mapping of PcG target genes revealed more than 2,000 sites in the mouse embryonic stem cell genome [8, 33, 34]. Interaction of PcG proteins with chromatin at these loci is associated with increased levels of H3K27me3 repressive marks and Polycomb repression affects numerous genes encoding key developmental regulators and signaling proteins. These genomic studies point on the widespread roles of PRC2 and H3K27 methylation in developmental and differentiation processes of multicellular organisms, and on their implication in fundamental chromatin mechanisms that underlie stem cell regulatory circuits and cancer progression. Thus, it is not surprising that increasing evidences indicate that EZH2 deregulation is frequently observed in a variety of cancers (**Table 1**). Interestingly, different ways by which the function of EZH2 may be

impaired in tumors have been described (**Figure 1**). It also appears that the type of EZH2 dysregulation often correlates with the malignancy. EZH2 overexpression is mainly found in solid tumors, whereas activating or inactivating mutations are identified in hematologic malignancies. A missense mutation Lys27Met (K27M) in the gene encoding histone H3.3 (H3F3A) is present at high frequencies in pediatric gliomas. This mutation behaves as a potent inhibitor of EZH2 activity. Thus, although mechanisms could be different, misregulation of H3K27 methylation is common in tumorigenesis and EZH2 appears to have both oncogenic and tumor suppressive functions.

EZH2 overabundance in solid cancer

Overexpression of EZH2 was first found in prostate and breast cancer in microarray studies [35, 36]. Furthermore, EZH2 overexpression is linked to aggressive and advanced metastatic stages of the disease and is strongly associated with poor clinical outcome and prognosis [36-38]. Overexpression of EZH2 has also been reported in a large number of other solid tumors such as bladder cancers [39-42], ovarian cancers [43, 44], renal carcinomas [45], small cell and non-small cell lung cancers [46-49], hepatocellular carcinomas [50], brain tumors [51], kidney cancers [52], gastric tumors [53], esophageal cancers [54], pancreatic cancers [55] or melanomas [38, 56]. EZH2 has been shown to promote cell proliferation, migration, and invasion in different *in vitro* cancer cell models [32, 36, 43, 57-59]. EZH2 overexpressing cells are also tumorigenic when injected into the mammary fat pads of nude mice [60], while overexpression of wild-type EZH2 in mammary epithelial cells *in vivo* results in epithelial hyperplasia and promotes mammary tumor initiation [61, 62]. Furthermore, the oncogenic property of EZH2 in mice correlates with its H3K27 methyltransferase activity [63].

Overabundance of EZH2 in tumor cells may result from different mechanisms. In some cases, EZH2 up-regulation is associated to gene amplification [35, 64]. Using FISH techniques, Sramaki and colleagues studied the copy number of the EZH2 gene in several prostate cancer cell lines such as LNCaP, DU145, PC-3, 22Rv1, in xenografts and in clinical tumors [64]. In contrast to early prostate cancer, in late stage tumor samples, EZH2 gene amplification was shown to correlate with its overexpression.

EZH2 and cancer

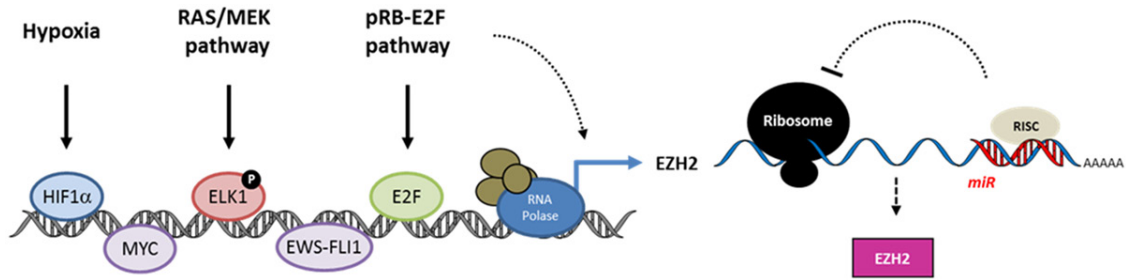


Figure 2. Schematic representation of EZH2 overexpression controlling levels. EZH2 overexpression in cancer cells is achieved at the transcriptional level through the binding of transcription factors to its promoter or at the post-transcriptional level via the alteration of the micro-RNA regulation.

Table 2. Regulators of EZH2 transcription

Factor/Pathway	Cancer type	References
MYC	Prostate	[69]
ETS/ERG	Prostate	[70]
E2F (pRB-E2F pathway)	Breast	[32]
	Lung	[68]
	Bladder	[66, 67]
ELK1 (MEK-ERK pathway)	Breast	[65, 76]
ATAD2/ANCCA	Breast	[73]
NF-YA	Ovarian	[71]
STAT3	Colorectal	[72]
BRAF (V600E)	Melanoma	[75]
EWS-FLI1	Ewing's sarcoma	[74]
HIF1 α (Hypoxia)	Breast	[76]

Increased EZH2 levels in cancer may also be caused by a variety of transcriptional signals and pathways, some of them common for different cancer types while others may be more specific or limited to specific malignancies (**Figure 2**, **Table 2**). The MEK-ERK-ELK1 pathway, which is often activated in cancer, has been demonstrated to be responsible for EZH2 overexpression in triple-negative and ERBB2-overexpressing subtypes of breast cancer [65]. Upon phosphorylation ELK1 binds to three ELK1-binding motifs located within the EZH2 gene promoter and activates EZH2 transcription. The pRb-E2F signaling is another pathway involved in numerous tumors. Upon pRb/RB1 phosphorylation, E2F dissociates from the pRb-E2F complex and the activated E2F transcription factor binds to E2F-binding sites located in the EZH2 promoter to activate its transcription [32]. Overexpression of E2F or deregulation of the pRb-E2F pathway correlate with activated EZH2 expression in breast, bladder and small-cell lung cancer [32, 66-68]. A num-

ber of transcription factors involved in tumorigenesis directly bind to the EZH2 promoter and activate its mRNA expression in different cancer models. In particular, MYC and ETS transcription factors directly regulate EZH2 transcription in prostate cancer [69, 70], whereas NF-YA, STAT3 and the co-activator of the androgen receptor ATAD2/ANCCA regulate EZH2 expression in epithelial ovarian, colorectal, and breast cancer cells, respectively [71-73]. In Ewing's sarcoma, the fusion oncoprotein EWS-FLI1 induces EZH2 expression which has a key role in endothelial/neuroectodermal differentiation and tumor growth [74]. Also, expression of EZH2 was found profoundly affected by the BRAF (V600E) mutation in melanoma although the precise mechanism of regulation is not yet fully understood [75].

Hypoxia in solid tumors represents another pathway directly regulating EZH2 transcription. Chang and colleagues identified a consensus sequence for hypoxia-inducible factor-1 α (HRE) within the EZH2 promoter [76]. Hypoxic micro-environment in tumors induces HIF1 α binding to the HRE and transactivates EZH2 to promote breast tumor expansion (**Table 2**).

In addition, EZH2 abundance is controlled at the post-translational level by multiple micro-RNAs (miRs). The miR-25, -26a, -30d, -98, -101, -124, -137, -138, -144, -214 and let-7 interact with defined sequences within the EZH2 3'UTR and directly downregulate EZH2 protein abundance. The loss of control by these miR results in the up-regulation of EZH2 and appears to be involved in the aggressiveness of various cancers [57, 77-98] (**Figure 2**, **Table 3**).

EZH2 and cancer

Table 3. EZH2 post-transcriptional regulation by miR

MiR	Cancer Type	References
miR-25, miR-30d	Thyroid cancer	[77]
miR-26a	Lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, breast cancer, prostate cancer	[78-80]
miR-98	Nasopharyngeal carcinoma, gastric cancer	[81, 82]
miR-101	Nasopharyngeal carcinoma, glioblastoma multiform, prostate cancer, bladder cancer, head and neck cancer, non-small cell lung cancer, melanoma	[57, 83-88]
miR-124	Hepatocellular carcinoma, gastric cancer	[89, 90]
miR-137	Melanoma	[91]
miR-138	Head and neck cancer, glioblastoma multiform, non-small cell lung cancer	[92-94]
miR-144	Bladder cancer	[98]
miR-214	Gastric cancer, hepatocellular carcinoma	[81, 95]
Let-7	Prostate cancer, nasopharyngeal carcinoma	[96, 97]

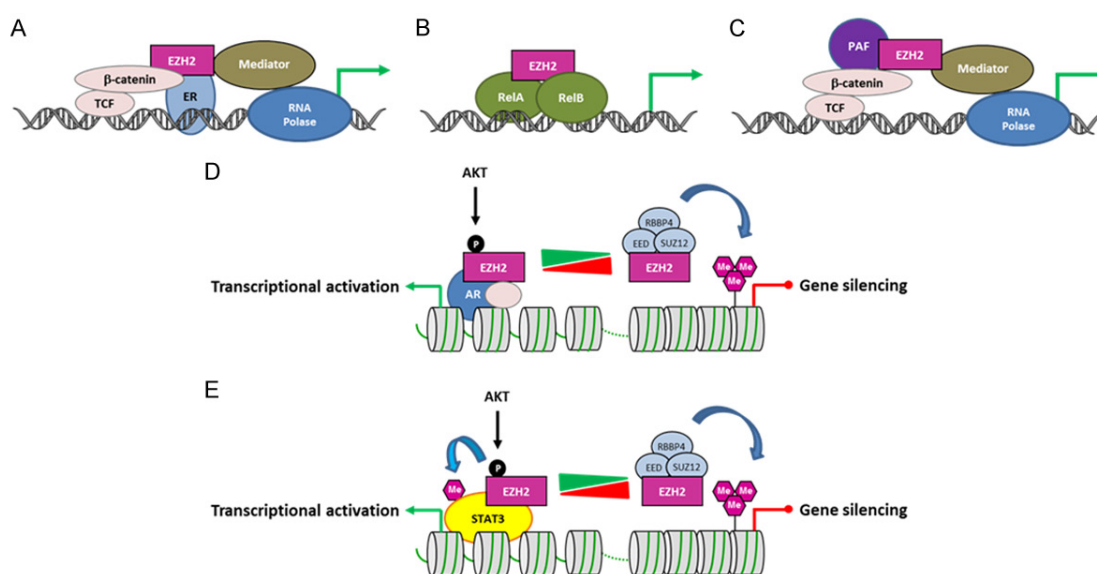


Figure 3. PRC2-independent transcriptional activation by EZH2 in cancer. A. In ER-positive breast cancer cells, EZH2 interacts with β -catenin and ER, and functionally enhances gene expression. B. In ER-negative breast cancer cells, EZH2 interacts with RELA/RELB to stimulate NF- κ B target gene expression. C. In colorectal cancer cells, EZH2 forms a complex with β -catenin and PAF to promote transcription. D. In castration-resistant prostate cancer, AKT1-mediated phosphorylation of EZH2 at serine 21 allows EZH2 to interact with the AR at target genes to activate transcription. The AKT pathway then acts as a molecular switch changing EZH2 function from a chromatin silencer to a transcriptional co-activator of the AR. This transcriptional activation function is methyltransferase activity-dependent. E. AKT1-mediated phosphorylation of EZH2 at serine 21 also facilitates STAT3 methylation and activation in glioblastoma stem cells. ER: estrogen receptor; TCF: T-cell factor; AR: androgen receptor; PAF: PCNA-associated factor; RNA Polase: RNA polymerase II.

Altogether, different studies suggest that the diverse mechanisms involved in EZH2 overabundance depend on the cell context. However, EZH2 functions as an oncogenic factor in the majority of solid tumors and regardless of the molecular mechanisms involved, EZH2 overabundance leads to higher levels of H3-K27me3 repressive epigenetic marks that would be responsible in turn, for the silencing of tumor suppressor genes in cancer cells (Figure 1B).

EZH2 activating mutations in lymphoma

In about 7% of large follicular lymphomas and 22% of diffuse B-cell lymphomas, recurrent somatic mutations were identified at tyrosine 641 (Y641) within the catalytic SET domain of EZH2 [99]. Initially reported to be a loss-of-function mutation [99], it has been demonstrated that these mutations shift the methylation capacity of EZH2 [100]. Indeed, EZH2-Y641 mutants have reduced H3K27 mono- and

EZH2 and cancer

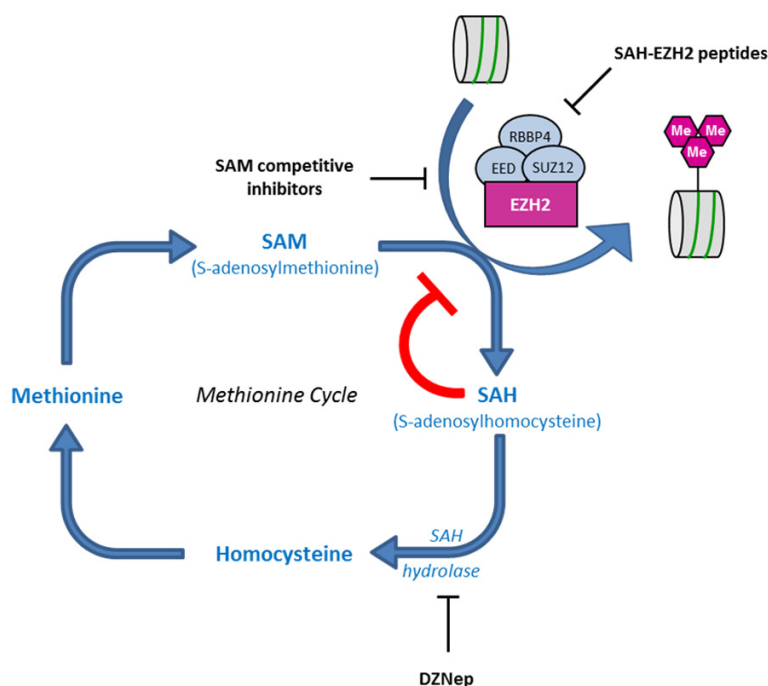


Figure 4. Methionine cycle and mode of action of several EZH2 inhibitors. DZNep is an inhibitor of SAH hydrolase leading to an accumulation of SAH which in turn inhibits EZH2 activity, as well as other cellular methyltransferases. SAM competitors such as EPZ005687, EPZ-6438, EI1, UNC1999 and GSK126 bind to the SAH-binding pocket of EZH2 to prevent the recruitment of the SAM methyl donor. SAH-EZH2 peptides disrupt the PRC2 assembly required for full EZH2 activity.

dimethylation activities, but aberrantly elevated trimethyltransferase activity. Because of their reduced H3K27me_{1/2} activities, EZH2-Y641 mutant alleles are invariably found at heterozygous forms together with the wild-type EZH2 allele in lymphomas. In agreement with these observations, transgenic mice expressing the EZH2-Y641F mutant in lymphocytes displayed a global increase in trimethylated H3K27 in spleen cells and developed lymphomas when combined with E μ -Myc expression [101]. Similar to the Y641 mutation, mutations within the EZH2 SET domain at residues Alanine 677 (A677G) and Alanine 687 (A687V) are drivers of H3K27 hypertrimethylation [102-104]. Thus, EZH2-Y641, EZH2-A677 and EZH2-A687 are oncogenic mutants responsible for an excess of H3K27me₃ repressive marks impairing gene expression programs in lymphomas (Figure 1C).

Increased recruitment of EZH2 at chromatin in cancer

An excess of H3K27me₃ repressive marks in cancer can also result from an increase of

PRC2 recruitment at chromatin (Figure 1D). In particular, long non-coding RNAs (lncRNAs) have emerged as potential factors involved in PRC2 recruitment. HOTAIR is one of these lncRNAs interacting with EZH2 and playing an oncogenic role in cancer [105-109]. Overexpression of HOTAIR increases invasiveness and metastatic potential of epithelial cancer cells and induces relocalization of the PRC2 complex which binds to target genes in a pattern similar to that observed in embryonic fibroblasts, whereas HOTAIR knockdown decreases cancer invasiveness, especially in cells expressing high levels of PRC2 proteins [106]. Other lncRNAs, such as HEIH, PCAT-1, H19 or linc-UBC1 have been shown to interact with EZH2 and to be involved in cancer [110-113].

EZH2 null-mutations in malignant myeloid disorders

Mutations in EZH2 have been identified in about 10%-23% of various subtypes of myelodysplastic syndromes and myeloproliferative neoplasms, as well as in 13% of myelofibrosis [114-118]. Both monoallelic and biallelic mutations were identified, and almost all are predicted to inactivate the methyltransferase activity of EZH2. In particular mutations found in myeloid disorders include missense mutations, frameshift mutations, premature stop codons, and spliceosomal mutations. In addition to EZH2 mutation, decreased EZH2 expression was found to be associated with hemizygous deletion (7/del7q) involving the EZH2 gene. EZH2 loss-of-function mutations are associated with reduced H3K27me₃ methylation and derepression of EZH2 target genes, which may contribute to leukemogenesis (Figure 1E). Consistent with these findings, deletion of *Ezh2* alone is sufficient to induce myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm-like diseases in mice [119].

EZH2 and cancer

Furthermore, EZH2-inactivating mutations are also primarily detected in pediatric cancers including core binding factor acute myeloid leukemia and T-lineage acute lymphoblastic leukemia [120].

Altogether, these studies outline the tumor suppressor function of EZH2 in myeloid malignancies, in addition to its role as an oncogene in other cancer types.

H3.3K27M mutation-dependent inhibition of EZH2 in high-grade pediatric gliomas

Sequencing studies of high-grade pediatric gliomas, including glioblastoma multiforms (GBM) and diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) identify recurrent heterozygous Lysine to Methionine substitutions at position 27 (K27M) in the gene encoding histone H3.3 (H3F3A) [121, 122]. H3.3K27M mutation occurs in 70-80% of midline GBM and DIPG in young children and confers a dismal prognosis [122-124]. The mutation also leads to nearly undetectable H3K27me3 repressive mark levels in gliomas [125-128]. Furthermore, it has been shown that H3.3K27M peptides bind to EZH2 and interfere with its methyltransferase activity, potentially as methionine mimics the structure of monomethyl lysine [127] (**Figure 1F**). Since H3.3 is a variant of canonical histone H3 which contributes to a minority of total histone H3 in gliomas, H3.3K27M behaves like a powerful dominant negative inhibitor of EZH2 activity. Interestingly, EZH2 protein and remaining H3-K27me3 repressive marks were also shown to be locally increased at hundreds of gene loci in glioma cells expressing H3.3K27M [128]. Therefore, H3.3K27M mutation alters gene expression programs and the global epigenetic landscape which may drive to tumorigenesis in gliomas.

PRC2-independent function of EZH2 in cancer

EZH2 is primarily known for its role in gene silencing through H3K27 trimethylation. However, several studies reveal that EZH2 may also function as a transcriptional activator in different cancer models [129-131] (**Figure 3**).

In breast cancer cells, EZH2 has been reported to act as a transcriptional activator but its mechanism of action depends on the cell type [129, 130]. In estrogen receptor-positive, lumi-

nal-like MCF-7 breast cancer cells, EZH2 links physically the estrogen receptor α to the Wnt signaling components β -catenin and TCF at target gene promoters. By this way, EZH2 activates Cyclin D1 (CCND1) and MYC transcription, independently of its methyltransferase activity [129] (**Figure 3A**). By contrast, in estrogen receptor-negative, basal like MDA-MB-231 breast cancer cells, EZH2 interacts with the NF- κ B components RELA and RELB to activate transcription of several NF- κ B target genes, such as the TNF and IL6 genes [130] (**Figure 3B**). Thus, EZH2 could act as a transcriptional repressor via its H3K27 histone methyltransferase activity or, as a transcriptional activator through different molecular mechanisms, in promoting breast tumorigenesis.

The PCNA-associated factor PAF (KIAA0101) is overexpressed in colon cancers and is required for cancer cell proliferation via Wnt signaling activation. Jung and colleagues [131] identified a PAF-EZH2- β -catenin protein complex involved in Wnt target gene transactivation in colon cancer cells. Upon Wnt signaling activation, PAF dissociates from PCNA, binds to β -catenin and recruits EZH2 at Wnt target genes to induce their expression independently of EZH2's enzymatic activity (**Figure 3C**).

EZH2 is oncogenic and functions as a transcriptional activator in castration-resistant prostate cancer (CRPC) [132]. However in contrast to what was described in breast cancer cells and in colon cancer cells, the transcriptional properties of EZH2 in CRPC rely on its methyltransferase activity, but do not require the other PRC2 components. It has been suggested that EZH2-mediated transcriptional activation may occur through the methylation of the androgen receptor or other associated proteins. Furthermore, Xu et al. [132] reported that AKT1-mediated phosphorylation of EZH2 at serine 21 (S21) allows the methyltransferase to interact with the androgen receptor at many target genes. Thus, the AKT pathway acts as a molecular switch changing EZH2 function from a chromatin silencer to a transcriptional co-activator of the androgen receptor (**Figure 3D**). A similar situation has been described in glioblastoma where AKT1-mediated phosphorylation of EZH2 at S21 enhances STAT3 activation via its EZH2-mediated trimethylation at lysine 180 [133] (**Figure 3E**).

EZH2 and cancer

The methyltransferase activity of EZH2 is required for EZH2-dependent gene activation in CRPC and in glioblastoma, indicating that EZH2 can methylate non-histone substrates. In this regard, it is worth noting that previous studies showed that EZH2 indeed methylates non-histone proteins such as the transcription factors GATA4 and ROR α , although the role of these methylations in cancer remains to be explored [134, 135].

Post-translational modifications of EZH2 in cancer

The discovery that AKT1-mediated EZH2 phosphorylation at S21 converts EZH2 silencing activity into an activating effector [60, 132, 133] underlines the important role cell signaling may have on EZH2 activity control. There is growing evidence showing that EZH2 activity and stability are tightly regulated by multiple post-translational modifications.

In addition to phosphorylation at S21, EZH2 could be phosphorylated at multiple threonine residues [136-139]. In particular, cyclin-dependent kinases (CDK1/2) phosphorylate EZH2 at T350 and T492. T350 phosphorylation promotes the interaction between EZH2 and lncRNAs such as HOTAIR [137]. Thus, CDK-mediated phosphorylation positively impacts EZH2 action by enhancing its recruitment at chromatin. In contrast, T492 phosphorylation reduces the methyltransferase activity of EZH2 by disrupting PRC2 assemblies [138]. However, phosphomimic change at the corresponding mouse Ezh2 residue (T487D) does not seem to have an effect on methyltransferase activity nor on PRC2 assembly [137]. In another study, Wu and Zhang [139] reported that CDK1-mediated phosphorylation at T350 and T492 promotes EZH2 ubiquitinylation and subsequent degradation of the protein by the proteasome. These discrepancies might reflect that distinct regulatory mechanisms control EZH2 activity in different cell types.

Finally, recent experiments suggest that glycosylation may also affect EZH2 stability and H3K27me3 levels [140]. EZH2 interacts with O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (OGT) and the methyltransferase is O-GlcNAcylated at serine 75 (S75) *in vivo*. Furthermore, OGT knockdown specifically down-regulates EZH2 protein stability and greatly

reduces H3K27me3 levels. EZH2-S75A mutants also exhibit a reduction in stability. This OGT-EZH2 axis might then explain in part how the dysregulation of OGT is implicated in cancer.

Involvement of EZH2 in cancer stem cell biology

According to the cancer stem cell (CSC) hypothesis, the CSCs which represent a small fraction of the tumor population are the only tumor-initiating clones. CSCs have unlimited self-renewal capacities and the ability to differentiate in many cancer cell types. They are resistant to chemotherapy [141] and thought to be responsible for metastatic spreading [142]. Thus, deciphering the cellular regulations involved in CSC biology is central to the development of efficient anti-cancer opportunities.

EZH2 is a crucial factor playing a role in the maintenance of self-renewal of adult and embryonic stem cells [13, 143, 144], while EZH2 expression is reduced in differentiated cells. Since EZH2 overexpression is linked to cancer initiation and metastasis and considering that high-grade tumors are enriched with a high content of CSCs, it is proposed that EZH2 expression could favor the transition of dormant progenitors and/or differentiated cells into a more aggressive stem-cell like phenotype. Indeed, EZH2 expression has been shown to be involved in breast CSCs formation and expansion that promote cancer progression [76]. Similarly, EZH2 expression is crucial for glioblastoma CSC self-renewal and tumor-initiating capacity [145-147].

Anti-cancer strategies targeting EZH2

Numerous experimental evidences indicate that EZH2 plays a prominent role in carcinogenesis, from tumor initiation to metastasis, in various cancer types. EZH2 has thus emerged as a potential cancer therapeutic target. Indeed, knock-down of EZH2 inhibits cancer cell proliferation and decreases *in vivo* tumor growth in xenograft models [148, 149].

The search for pharmacological inhibitors of EZH2 activity also yielded several promising molecules. Among them, 3-deazaneplanocin A (DNZep) has been shown to exhibit significant anti-tumor activity against different cancer

EZH2 and cancer

models, such as breast, prostate, lung, brain, colorectal and liver cancer cells [150-152]. Indeed, DNZep treatment reduces EZH2 protein and H3K27me3 levels, reactivates PRC2 target genes and is responsible for apoptosis of cancer cells, but not of normal cells [150]. Interestingly, DNZep has also been shown to abrogate self-renewal and tumor-initiating capacities of glioblastoma cancer stem cells, ovarian cancer stem cell-like populations and prostate cancer stem cells [59, 146, 153, 154]. However, DNZep is an S-adenosylhomocysteine (SAH) hydrolase inhibitor causing intracellular SAH levels to increase. Accumulation of SAH subsequently inhibits diverse methyltransferases including EZH2, by a feed-back loop mechanism (**Figure 4**). DNZep is therefore not selective and specific to EZH2 [155, 156].

More recently, high-throughput screens performed with the PRC2 complex led to the discovery of potent compounds that selectively inhibit EZH2 enzymatic activity [157-161]. These molecules including EPZ005687, EPZ-6438, EI1, UNC1999 and GSK126, all act as S-adenosylmethionine (SAM) competitive inhibitors (**Figure 4**).

The compound EPZ005687 has an equilibrium dissociation constant (K_i) value of 24 nM and has a 50-fold selectivity for EZH2 against the closely related EZH1 enzyme and more than 500-fold selectivity against 15 other protein methyltransferases [157]. Interestingly, EPZ-005687 can also inhibit the H3K27 methylation activities of lymphoma cells harboring heterozygous EZH2-Y641 and EZH2-A677 mutations, killing these cells with minimal effects on the proliferation of wild-type cells [157]. EPZ-6438, with a K_i value of 2.5 nM, possesses a superior potency and drug-like properties, including good oral bioavailability in EZH2-mutant xenograft mice models [158]. The molecule is currently undergoing a phase I clinical trial in patients with advanced solid tumors or refractory B-cell lymphoma [158].

EI1 (K_i of about 13 nM), UNC1999 an orally bioavailable compound in mice, but non-selective for EZH1 and GSK126, the most potent EZH2 inhibitor (K_i of about 0.5-3 nM) [159-161], as well as EPZ005687 and EPZ-6438, all bind to the SAM pocket of the EZH2 catalytic SET domain and selectively inhibit its H3K27 methyltransferase activity. However, the inhibitors are

only effective in killing cell lines harboring gain-of-function EZH2 mutations (EZH2-Y641, EZH2-A677), although all of these compounds induce a decrease in H3K27me3 levels in both EZH2-mutated and wild-type cancer cells. This indicates that the SAM competitive inhibitors may be more beneficial to patients with lymphoma rather than with other cancer types.

Since the enzymatic activity of EZH2 requires its association with other components of the PRC2 complex, such as EED and SUZ12, a strategy disrupting PRC2 assembly has been successfully developed to inhibit EZH2 methyltransferase activity [162]. A hydrocarbon-stapled peptide that mimics the α -helical EED-binding domain of EZH2 (SAH-EZH2 peptide) was shown to disrupt the interaction between EZH2 and EED (**Figure 4**). Indeed, the SAH-EZH2 peptide reduces the H3K27 methyltransferase activity of the PRC2 complex and leads to growth arrest and differentiation of MLL-AF9 leukemia cells which are dependent on PRC2 activity. The antiproliferative activity of SAH-EZH2 was also extended to EZH2-dependent B-cell lymphomas; the inhibitory peptide reduces H3K27 trimethylation, EZH2 protein levels, as well as cancer cell viability. Thus, disruption of the PRC2 complex may represent an alternative and complementary strategy for selectively arresting the proliferation of at least some EZH2-dependent cancers. It is also worth noting that the SAH-EZH2 peptide also dissociates EZH1-EED complexes, in addition to EZH2-EED assemblies [162].

In addition, some natural chemopreventive agents have been shown to effectively inhibit EZH2 and reactivate PRC2-silenced target genes in various cancer models. These compounds include epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a major component of green tea and dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFAs) which both reduce EZH2 levels by increasing proteasomal degradation [163, 164]. Curcumin, a natural ingredient of turmeric also decreases cancer proliferation by modulating EZH2 levels, but in that case down-regulation of EZH2 expression is mediated by the MAPK pathway rather than by the increase of protein degradation [165].

Conclusion

A large set of experimental data have established that EZH2 acts as a key player in tumori-

EZH2 and cancer

genesis. However, the molecular mechanisms involved in EZH2 dysregulation in cancer appear to be diverse. EZH2 overexpression is mainly found in solid tumors and activating mutations are found in B-cell lymphomas while inactivating mutations are often identified in myelodysplastic syndromes and myeloproliferative neoplasms. Finally a missense mutation in the gene encoding histone H3.3 (H3F3A) inhibiting EZH2 activity is present at high frequencies in pediatric gliomas. Thus, EZH2 functions as an oncogene in solid tumors and lymphomas whereas it behaves like a tumor suppressor gene in myeloid disorders and in pediatric glioblastomas. The oncogenic role of EZH2 mainly depends on its ability to repress gene expression programs via H3K27 methylation and chromatin compaction. However, studies in certain cancers revealed that the oncogenic function of EZH2 could also result of its action as a PRC2-independent transcriptional activator. Then, EZH2 could be involved in cancer through multiple mechanisms and could be regulated by different pathways depending on cellular context and cancer type. A better understanding of the regulatory network involving EZH2 is consequently required for the development of novel anti-cancer therapeutic strategies.

Acknowledgements

This work was supported by Inserm, the University of Lille, the CNRS and grants from the Ligue Contre le Cancer and the Cancéropole Nord-Ouest. BD is supported by a fellowship from the Région Nord-Pas de Calais and the University of Lille 1.

Disclosure of conflict of interest

None to disclose.

Address correspondence to: Pierre-Olivier Angrand, Cell Plasticity & Cancer - Inserm U908, University of Lille, Bâtiment SN3, Cité Scientifique, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France France. Tel: +33 3 20 33 62 22; E-mail: pierre-olivier.angrand@univ-lille1.fr

References

- [1] Kennison JA. The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu Rev Genet* 1995; 29: 289-303.
- [2] Schuettenbruger B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by Polycomb and Trithorax proteins. *Cell* 2007; 128: 735-745.
- [3] Jürgens G. A group of genes controlling the special expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* 1985; 316: 153-155.
- [4] Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GAJ, Korsmeyer SJ. Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 1995; 378: 505-508.
- [5] Akasaka T, Kanno M, Balling R, Mieza MA, Taniguchi M, Koseki H. A role for mel-18, a Polycomb group-related vertebrate gene, during the anteroposterior specification of the axial skeleton. *Development* 1996; 122: 1513-1522.
- [6] van der Lugt NM, Alkema M, Berns A, Deschamps J. The Polycomb-group homolog Bmi-1 is a regulator of murine Hox gene expression. *Mech Dev* 1996; 58: 153-164.
- [7] Coré N, Bel S, Gaunt SJ, Aurrand-Lions M, Pearce J, Fisher A, Djabali M. Altered cellular proliferation and mesoderm patterning in Polycomb-M33-deficient mice. *Development* 1997; 124: 721-729.
- [8] Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006; 441: 349-353.
- [9] Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray HL, Zucker JP, Yuan B, Bell GW, Herbolsheimer E, Hannett NM, Sun K, Odom DT, Otte AP, Volkert TL, Bartel DP, Melton DA, Gifford DK, Jaenisch R, Young RA. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125: 301-313.
- [10] Heard E. Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15: 482-489.
- [11] Crea F, Paolicchi E, Marquez VE, Danesi R. Polycomb genes and cancer: time for clinical application? *Crit Rev Oncol Hematol* 2012; 83: 184-193.
- [12] Jacobs JJ, van Lohuizen M. Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602: 151-161.
- [13] Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 846-856.
- [14] Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 299-213.

EZH2 and cancer

- [15] Ringrose L, Paro R. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* 2004; 38: 413-443.
- [16] Völkel P, Angrand PO. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* 2007; 89: 1-20.
- [17] Müller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA. Histone methyltransferase activity of the Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* 2002; 111: 197-208.
- [18] Nekrasov M, Klymenko T, Fraterman S, Papp B, Oktaba K, Köcher T, Cohen A, Stunnenberg HG, Wilm M, Müller J. Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *EMBO J* 2007; 26: 4078-4088.
- [19] Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 2004; 15: 57-67.
- [20] Ketel CS, Andersen EF, Vargas ML, Suh J, Strome S, Simon JA. Subunit contributions to histone methyltransferase activities of fly and worm polycomb group complexes. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 6857-6868.
- [21] Wang H, Wang LJ, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H2A ubiquitination in polycomb silencing. *Nature* 2004; 431: 873-978.
- [22] Cao R, Tsukada Y, Zhang Y. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* 2005; 20: 845-854.
- [23] Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzerini Denchi E, Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J* 2004; 23: 4061-4071.
- [24] Montgomery ND, Yee D, Chen A, Kalantry S, Chamberlain SJ, Otte AP, Magnuson T. The murine polycomb group protein Eed is required for global histone H3 lysine-27 methylation. *Curr Biol* 2005; 15: 942-947.
- [25] Montgomery ND, Yee D, Montgomery SA, Magnuson T. Molecular and functional mapping of EED motifs required for PRC2-dependent histone methylation. *J Mol Biol* 2007; 374: 1145-1157.
- [26] Kim H, Kang K, Kim J. AEBP2 as a potential targeting protein for Polycomb Repression Complex PRC2. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 2940-2950.
- [27] Walker E, Chang WY, Hunkapiller J, Cagney G, Garcha K, Torchia J, Krogan NJ, Reiter JF, Stanford WL. Polycomb-like 2 associates with PRC2 and regulates transcriptional networks during mouse embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 2010; 6: 153-166.
- [28] Peng JC, Valouev A, Swigut T, Zhang J, Zhao Y, Sidow A, Wysocka J. Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell* 2009; 139: 1290-1302.
- [29] Li G, Margueron R, Ku M, Chambon P, Bernstein BE, Reinberg D. Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes Dev* 2010; 24: 368-380.
- [30] Xiao B, Jing C, Wilson JR, Walker PA, Vasisht N, Kelly G, Howell S, Taylor IA, Blackburn GM, Gambliin SJ. Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature* 2003; 421: 652-656.
- [31] Wu H, Min J, Lunin VV, Antoshenko T, Dombrovski L, Zeng H, Allali-Hassani A, Campagna-Slater V, Vedadi M, Arrowsmith CH, Plotnikov AN, Schapira M. Structural biology of human H3K9 methyltransferases. *PLoS One* 2010; 5: e8570.
- [32] Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell* 2008; 32: 503-518.
- [33] Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 2003; 22: 5323-5335.
- [34] Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH, Helin K. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev* 2006; 20: 1123-1136.
- [35] Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, Adli M, Kasif S, Ptaszek LM, Cowan CA, Lander ES, Koseki H, Bernstein BE. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet* 2008; 4: e1000242.
- [36] Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002; 419: 624-629.
- [37] Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 11606-11611.
- [38] Collett K, Eide GE, Arnes J, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Aas T, Otte AP, Akslen LA. Exp-

EZH2 and cancer

- ression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 268-273.
- [39] Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol* 2006; 24: 268-273.
- [40] Raman JD, Mongan NP, Tickoo SK, Boorjian SA, Scherr DS, Gudas LJ. Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8570-8576.
- [41] Hinz S, Kempkensteffen C, Christoph F, Hoffmann M, Krause H, Schrader M, Schostak M, Miller K, Weikert S. Expression of the polycomb group protein EZH2 and its relation to outcome in patients with urothelial carcinoma of the bladder. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 331-336.
- [42] Wang H, Albadine R, Magheli A, Guzzo TJ, Ball MW, Hinz S, Schoenberg MP, Netto GJ, Gonzalez ML. Increased EZH2 protein expression is associated with invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Urol Oncol* 2012; 30: 428-433.
- [43] Weikert S, Christoph F, Köllermann J, Müller M, Schrader M, Miller K, Krause H. Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas. *Int J Mol Med* 2005; 16: 349-353.
- [44] Rao ZY, Cai MY, Yang GF, He LR, Mai SJ, Hua WF, Liao YJ, Deng HX, Chen YC, Guan XY, Zeng YX, Kung HF, Xie D. EZH2 supports ovarian carcinoma cell invasion and/or metastasis via regulation of TGF-beta1 and is a predictor of outcome in ovarian carcinoma patients. *Carcinogenesis* 2010; 31: 1576-1583.
- [45] Li H, Cai Q, Godwin AK, Zhang R. Enhancer of zeste homolog 2 promotes the proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res* 2010; 8: 1610-1618.
- [46] Lee HW, Choe M. Expression of EZH2 in renal cell carcinoma as a novel prognostic marker. *Pathol Int* 2012; 62: 735-741.
- [47] Behrens C, Solis LM, Lin H, Yuan P, Tang X, Kadara H, Riquelme E, Galindo H, Moran CA, Kalhor N, Swisher SG, Simon GR, Stewart DJ, Lee JJ, Wistuba II. EZH2 protein expression associates with the early pathogenesis, tumor progression, and prognosis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 6556-6565.
- [48] Sato T, Kaneda A, Tsuji S, Isagawa T, Yamamoto S, Fujita T, Yamanaka R, Tanaka Y, Nukiwa T, Marquez VE, Ishikawa Y, Ichinose M, Aburatani H. PRC2 overexpression and PRC2-target gene repression relating to poorer prognosis in small cell lung cancer. *Sci Rep* 2013; 3: 1911.
- [49] Kikuchi J, Kinoshita I, Shimizu Y, Kikuchi E, Konishi J, Oizumi S, Kaga K, Matsuno Y, Nishimura M, Dosaka-Akita H. Distinctive expression of the polycomb group proteins Bmi1 polycomb ring finger oncogene and enhancer of zeste homolog 2 in nonsmall cell lung cancers and their clinical and clinicopathologic significance. *Cancer* 2010; 116: 3015-3024.
- [50] Lv Y, Yuan C, Xiao X, Wang X, Ji X, Yu H, Wu Z, Zhang J. The expression and significance of the enhancer of zeste homolog 2 in lung adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2012; 28: 147-154.
- [51] Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima N, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JP, Sekido Y. Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 2007; 37: 974-983.
- [52] Crea F, Hurt EM, Farrar WL. Clinical significance of Polycomb gene expression in brain tumors. *Mol Cancer* 2010; 9: 265.
- [53] Xu B, Abourbih S, Sircar K, Kassouf W, Mansure JJ, Aprikian A, Tanguay S, Brimo F. Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with metastasis and adverse clinical outcome in clear cell renal cell carcinoma: a comparative study and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 1326-1336.
- [54] Matsukawa Y, Semba S, Kato H, Ito A, Yanagihara K, Yokozaki H. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci* 2006; 97: 484-491.
- [55] Yamada A, Fujii S, Daiko H, Nishimura M, Chiba T, Ochiai A. Aberrant expression of EZH2 is associated with a poor outcome and P53 alteration in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Oncol* 2011; 38: 345-353.
- [56] Ougolkov AV, Bilim VN, Billadeau DD. Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6790-6796.
- [57] McHugh JB, Fullen DR, Ma L, Kleer CG, Su LD. Expression of polycomb group protein EZH2 in nevi and melanoma. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 597-600.
- [58] Smits M, Nilsson J, Mir SE, van der Stoop PM, Hulleman E, Niers JM, de Witt Hamer PC, Marquez VE, Cloos J, Krichevsky AM, Noske DP, Tannous BA, Würdinger T. miR-101 is

EZH2 and cancer

- down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget* 2010; 1: 710-720.
- [59] Tong ZT, Cai MY, Wang XG, Kong LL, Mai SJ, Liu YH, Zhang HB, Liao YJ, Zheng F, Zhu W, Liu TH, Bian XW, Guan XY, Lin MC, Zeng MS, Zeng YX, Kung HF, Xie D. EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin. *Oncogene* 2012; 31: 583-594.
- [60] Crea F, Hurt EM, Mathews LA, Cabarcas SM, Sun L, Marquez VE, Danesi R, Farrar WL. Pharmacologic disruption of Polycomb Repressive Complex 2 inhibits tumorigenicity and tumor progression in prostate cancer. *Mol Cancer* 2011; 10: 40.
- [61] Cha TL, Zhou BP, Xia W, Wu Y, Yang CC, Chen CT, Ping B, Otte AP, Hung MC. Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3. *Science* 2005; 310: 306-310.
- [62] Gonzalez ME, Moore HM, Li X, Toy KA, Huang W, Sabel MS, Kidwell KM, Kleer CG. EZH2 expands breast stem cells through activation of NOTCH1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 3098-3103.
- [63] Li X, Gonzalez ME, Toy K, Filzen T, Merajver SD, Kleer CG. Targeted overexpression of EZH2 in the mammary gland disrupts ductal morphogenesis and causes epithelial hyperplasia. *Am J Pathol* 2009; 175: 1246-1254.
- [64] Croonquist PA, Van Ness B. The polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH 2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the mutant ras phenotype. *Oncogene* 2005; 24: 6269-6280.
- [65] Saramaki OR, Tammela TL, Martikainen PM, Vessella RL, Visakorpi T. The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 639-645.
- [66] Fujii S, Tokita K, Wada N, Ito K, Yamauchi C, Ito Y, Ochiai A. MEK-ERK pathway regulates EZH2 overexpression in association with aggressive breast cancer subtypes. *Oncogene* 2011; 30: 4118-4128.
- [67] Feber A, Clark J, Goodwin G, Dodson AR, Smith PH, Fletcher A, Edwards S, Flohr P, Falconer A, Roe T, Kovacs G, Dennis N, Fisher C, Wooster R, Huddart R, Foster CS, Cooper CS. Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene* 2004; 23: 1627-1630.
- [68] Oeggerli M, Tomovska S, Schraml P, Calvano-Forte D, Schafroth S, Simon R, Gasser T, Mihatsch MJ, Sauter G. E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Oncogene* 2004; 23: 5616-5623.
- [69] Coe BP, Thu KL, Aviel-Ronen S, Vucic EA, Gazdar AF, Lam S, Tsao MS, Lam WL. Genomic deregulation of the E2F/Rb pathway leads to activation of the oncogene EZH2 in small cell lung cancer. *PLoS One* 2013; 8: e71670.
- [70] Koh CM, Iwata T, Zheng Q, Bethel C, Yegnabramanian S, De Marzo AM. Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Oncotarget* 2011; 2: 669-683.
- [71] Kunderfranco P, Mello-Grand M, Cangemi R, Pellini S, Mensah A, Albertini V, Malek A, Chiorino G, Catapano CV, Carbone GM. ETS transcription factors control transcription of EZH2 and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene Nkx3.1 in prostate cancer. *PLoS One* 2010; 5: e10547.
- [72] Garipov A, Li H, Bitler BG, Thapa RJ, Balachandran S, Zhang R. NF- κ B underlies EZH2 upregulation and is essential for proliferation of human epithelial ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res* 2013; 11: 360-369.
- [73] Lin YW, Ren LL, Xiong H, Du W, Yu YN, Sun TT, Weng YR, Wang ZH, Wang JL, Wang YC, Cui Y, Sun DF, Han ZG, Shen N, Zou W, Xu J, Chen HY, Cao W, Hong J, Fang JY. Role of STAT3 and vitamin D receptor in EZH2-mediated invasion of human colorectal cancer. *J Pathol* 2013; 230: 277-290.
- [74] Kalashnikova EV, Revenko AS, Gemo AT, Andrews NP, Tepper CG, Zou JX, Cardiff RD, Borowsky AD, Chen HW. ANCCA/ATAD2 overexpression identifies breast cancer patients with poor prognosis, acting to drive proliferation and survival of triple-negative cells through control of B-Myb and EZH2. *Cancer Res* 2010; 70: 9402-9412.
- [75] Richter GH, Plehm S, Fasan A, Rossler S, Unland R, Bennani-Baiti IM, Hotfilder M, Lowel D, von Luetichau I, Mossbrugger I, Quintanilla-Martinez L, Kovar H, Staeger MS, Muller-Tidow C, Burdach S. EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 5324-5329.
- [76] Hou P, Liu D, Dong J, Xing M. The BRAF(V600E) causes widespread alterations in gene methylation in the genome of melanoma cells. *Cell Cycle* 2012; 11: 286-295.
- [77] Chang CJ, Yang JY, Xia W, Chen CT, Xie X, Chao CH, Woodward WA, Hsu JM, Hortobagyi GN, Hung MC. EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1-beta-catenin signaling. *Cancer Cell* 2011; 19: 86-100.

EZH2 and cancer

- [78] Esposito F, Tornincasa M, Pallante P, Federico A, Borbone E, Pierantoni GM, Fusco A. Down-regulation of the miR-25 and miR-30d contributes to the development of anaplastic thyroid carcinoma targeting the polycomb protein EZH2. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E710-718.
- [79] Sander S, Bullinger L, Klapproth K, Fiedler K, Kestler HA, Barth TF, Möller P, Stilgenbauer S, Pollack JR, Wirth T. MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a. *Blood* 2008; 112: 4202-4212.
- [80] Salvatori B, Iosue I, Djodji Damas N, Mangiacavacchi A, Chiaretti S, Messina M, Padula F, Guarini A, Bozzoni I, Fazi F, Fatica A. Critical role of c-Myc in acute myeloid leukemia involving direct regulation of miR-26a and histone methyltransferase EZH2. *Genes Cancer* 2011; 2: 585-592.
- [81] Lu J, He ML, Wang L, Chen Y, Liu X, Dong Q, Chen YC, Peng Y, Yao KT, Kung HF, Li XP. MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2. *Cancer Res* 2011; 71: 225-233.
- [82] Huang SD, Yuan Y, Zhuang CW, Li BL, Gong DJ, Wang SG, Zeng ZY, Cheng HZ. MicroRNA-98 and microRNA-214 post-transcriptionally regulate enhancer of zeste homolog 2 and inhibit migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 2012; 11: 51.
- [83] Alajez NM, Shi W, Hui AB, Bruce J, Lenarduzzi M, Ito E, Yue S, O'Sullivan B, Liu FF. Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2) is overexpressed in recurrent nasopharyngeal carcinoma and is regulated by miR-26a, miR-101, and miR-98. *Cell Death Dis* 2010; 1: e85.
- [84] Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, Brenner JC, Yu J, Kim JH, Han B, Tan P, Kumar-Sinha C, Lonigro RJ, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 2008; 322: 1695-1699.
- [85] Friedman JM, Liang G, Liu CC, Wolff EM, Tsai YC, Ye W, Zhou X, Jones PA. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Res* 2009; 69: 2623-2629.
- [86] Wang HJ, Ruan HJ, He XJ, Ma YY, Jiang XT, Xia YJ, Ye ZY, Tao HQ. MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. *Eur J Cancer* 2010; 46: 2295-2303.
- [87] Banerjee R, Mani RS, Russo N, Scanlon CS, Tsodikov A, Jing X, Cao Q, Palanisamy N, Mewally T, Inglehart RC, Tomlins S, Bradford C, Carey T, Wolf G, Kalyana-Sundaram S, Chinnaiyan AM, Varambally S, D'Silva NJ. The tumor suppressor gene rap1GAP is silenced by miR-101-mediated EZH2 overexpression in invasive squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2011; 30: 4339-4349.
- [88] Zhang JG, Guo JF, Liu DL, Liu Q, Wang JJ. MicroRNA-101 exerts tumor-suppressive functions in non-small cell lung cancer through directly targeting enhancer of zeste homolog 2. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 671-678.
- [89] Luo C, Merz PR, Chen Y, Dickes E, Pscherer A, Schadendorf D, Eichmüller SB. MiR-101 inhibits melanoma cell invasion and proliferation by targeting MITF and EZH2. *Cancer Lett* 2013; 341: 240-247.
- [90] Zheng F, Liao YJ, Cai MY, Liu YH, Liu TH, Chen SP, Bian XW, Guan XY, Lin MC, Zeng YX, Kung HF, Xie D. The putative tumour suppressor microRNA-124 modulates hepatocellular carcinoma cell aggressiveness by repressing ROCK2 and EZH2. *Gut* 2012; 61: 278-289.
- [91] Xie L, Zhang Z, Tan Z, He R, Zeng X, Xie Y, Li S, Tang G, Tang H, He X. microRNA-124 inhibits proliferation and induces apoptosis by directly repressing EZH2 in gastric cancer. *Mol Cell Biochem* 2014; 392: 153-159.
- [92] Luo C, Tetteh PW, Merz PR, Dickes E, Abukiwan A, Hotz-Wagenblatt A, Holland-Cunz S, Sinnberg T, Schitteck B, Schadendorf D, Diederichs S, Eichmüller SB. miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 768-775.
- [93] Liu X, Wang C, Chen Z, Jin Y, Wang Y, Kolokythas A, Dai Y, Zhou X. MicroRNA-138 suppresses epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cell lines. *Biochem J* 2011; 440: 23-31.
- [94] Qiu S, Huang D, Yin D, Li F, Li X, Kung HF, Peng Y. Suppression of tumorigenicity by microRNA-138 through inhibition of EZH2-CDK4/6-pRb-E2F1 signal loop in glioblastoma multiforme. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832: 1697-1707.
- [95] Zhang H, Zhang H, Zhao M, Lv Z, Zhang X, Qin X, Wang H, Wang S, Su J, Lv X, Liu H, Du W, Zhou W, Chen X, Fei K. MiR-138 inhibits tumor growth through repression of EZH2 in non-small cell lung cancer. *Cell Physiol Biochem* 2013; 31: 56-65.
- [96] Xia H, Ooi LL, Hui KM. MiR-214 targets beta-catenin pathway to suppress invasion, stem-like traits and recurrence of human hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2012; 7: e44206.
- [97] Kong D, Heath E, Chen W, Cher ML, Powell I, Heilbrun L, Li Y, Ali S, Sethi S, Hassan O, Hwang C, Gupta N, Chitale D, Sakr WA, Menon M, Sarkar FH. Loss of let-7 up-regulates EZH2 in

EZH2 and cancer

- prostate cancer consistent with the acquisition of cancer stem cell signatures that are attenuated by BR-DIM. *PLoS One* 2012; 7: e33729.
- [98] Cai K, Wan Y, Sun G, Shi L, Bao X, Wang Z. Let-7a inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting EZH2 in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol Rep* 2012; 28: 2101-2106.
- [99] Guo Y, Ying L, Tian Y, Yang P, Zhu Y, Wang Z, Qiu F, Lin J. miR-144 downregulation increases bladder cancer cell proliferation by targeting EZH2 and regulating Wnt signaling. *FEBS J* 2013; 280: 4531-4538.
- [100] Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, Paul JE, Boyle M, Woolcock BW, Kuchenbauer F, Yap D, Humphries RK, Griffith OL, Shah S, Zhu H, Kimbara M, Shashkin P, Charlot JF, Tcherpakov M, Corbett R, Tam A, Varhol R, Smailus D, Moksa M, Zhao Y, Delaney A, Qian H, Birol I, Schein J, Moore R, Holt R, Horsman DE, Connors JM, Jones S, Aparicio S, Hirst M, Gascoyne RD, Marra MA. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 2010; 42: 181-185.
- [101] Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng SW, Moradian A, Morin RD, Mungall AJ, Meissner B, Boyle M, Marquez VE, Marra MA, Gascoyne RD, Humphries RK, Arrowsmith CH, Morin GB, Aparicio SA. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood* 2011; 117: 2451-2459.
- [102] Berg T, Thoene S, Yap D, Wee T, Schoeler N, Rosten P, Lim E, Bilenky M, Mungall AJ, Oellerich T, Lee S, Lai CK, Umlandt P, Salmi A, Chang H, Yue L, Lai D, Cheng SW, Morin RD, Hirst M, Serve H, Marra MA, Morin GB, Gascoyne RD, Aparicio SA, Humphries RK. A transgenic mouse model demonstrating the oncogenic role of mutations in the polycomb-group gene EZH2 in lymphomagenesis. *Blood* 2014; 123: 3914-3924.
- [103] McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, Jiang Y, Smitheman KN, Ott HM, Pappalardi MB, Allen KE, Chen SB, Della Pietra A 3rd, Dul E, Hughes AM, Gilbert SA, Thrall SH, Tummino PJ, Kruger RG, Brandt M, Schwartz B, Creasy CL. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 2989-2994.
- [104] Majer CR, Jin L, Scott MP, Knutson SK, Kuntz KW, Keilhack H, Smith JJ, Moyer MP, Richon VM, Copeland RA, Wigle TJ. A687V EZH2 is a gain-of-function mutation found in lymphoma patients. *FEBS Lett* 2012; 586: 3448-3451.
- [105] Ott HM, Graves AP, Pappalardi MB, Huddleston M, Halsey WS, Hughes AM, Groy A, Dul E, Jiang Y, Bai Y, Annan R, Verma SK, Knight SD, Kruger RG, Dhanak D, Schwartz B, Tummino PJ, Creasy CL, McCabe MT. A687V EZH2 is a Driver of Histone H3 Lysine 27 (H3K27) Hypertrimethylation. *Mol Cancer Ther* 2014; 13: 3062-3073.
- [106] Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 2007; 129: 1311-1323.
- [107] Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, van de Vijver MJ, Sukumar S, Chang HY. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010; 464: 1071-1076.
- [108] Kogo R, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K, Imoto S, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Suzuki A, Komune S, Miyano S, Mori M. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Res* 2011; 71: 6320-6326.
- [109] Liu Z, Sun M, Lu K, Liu J, Zhang M, Wu W, De W, Wang Z, Wang R. The long noncoding RNA HOTAIR contributes to cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma cells via downregulation of p21(WAF1/CIP1) expression. *PLoS One* 2013; 8: e77293.
- [110] Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, Johnson G, Frank J, Burghardt R, Kim S, Safe S. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. *Oncogene* 2013; 32: 1616-1625.
- [111] Yang F, Zhang L, Huo XS, Yuan JH, Xu D, Yuan SX, Zhu N, Zhou WP, Yang GS, Wang YZ, Shang JL, Gao CF, Zhang FR, Wang F, Sun SH. Long noncoding RNA high expression in hepatocellular carcinoma facilitates tumor growth through enhancer of zeste homolog 2 in humans. *Hepatology* 2011; 54: 1679-1689.
- [112] Prensner JR, Iyer MK, Balbin OA, Dhanasekaran SM, Cao Q, Brenner JC, Laxman B, Asangani IA, Grasso CS, Kominsky HD, Cao X, Jing X, Wang X, Siddiqui J, Wei JT, Robinson D, Iyer HK, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM. Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 742-749.
- [113] Luo M, Li Z, Wang W, Zeng Y, Liu Z, Qiu J. Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. *Cancer Lett* 2013; 333: 213-221.

EZH2 and cancer

- [114] He W, Cai Q, Sun F, Zhong G, Wang P, Liu H, Luo J, Yu H, Huang J, Lin T. linc-UBC1 physically associates with polycomb repressive complex 2 (PRC2) and acts as a negative prognostic factor for lymph node metastasis and survival in bladder cancer. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832: 1528-1537.
- [115] Cardoso C, Mignon C, Hetet G, Grandchamps B, Fontes M, Colleaux L. The human EZH2 gene: genomic organisation and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 174-180.
- [116] Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A, Hochhaus A, Drexler HG, Duncombe A, Cervantes F, Oscier D, Boulwood J, Grand FH, Cross NC. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 2010; 42: 722-726.
- [117] Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tönnissen ER, van der Heijden A, Scheele TN, Vandenbergh P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2010; 42: 665-667.
- [118] Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, Szpurka H, Huang Y, Traina F, Visconte V, Sugimoto Y, Prince C, O'Keefe C, Hsi ED, List A, Sekeres MA, Rao A, McDevitt MA, Maciejewski JP. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood* 2011; 118: 3932-3941.
- [119] Makishima H, Jankowska AM, Tiu RV, Szpurka H, Sugimoto Y, Hu Z, Sauntharajah Y, Guinta K, Keddache MA, Putnam P, Sekeres MA, Moliterno AR, List AF, McDevitt MA and Maciejewski JP. Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. *Leukemia* 2010; 24: 1799-1804.
- [120] Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, Iwama A. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med* 2013; 210: 2627-2639.
- [121] Huether R, Dong L, Chen X, Wu G, Parker M, Wei L, Ma J, Edmonson MN, Hedlund EK, Rusch MC, Shurtleff SA, Mulder HL, Boggs K, Vadordaria B, Cheng J, Yergeau D, Song G, Becksfort J, Lemmon G, Weber C, Cai Z, Dang J, Walsh M, Gedman AL, Faber Z, Easton J, Gruber T, Kriwacki RW, Partridge JF, Ding L, Wilson RK, Mardis ER, Mullighan CG, Gilbertson RJ, Baker SJ, Zambetti G, Ellison DW, Zhang J, Downing JR. The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. *Nat Commun* 2014; 5: 3630.
- [122] Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang DA, Tönjes M, Hovestadt V, Albrecht S, Kool M, Nantel A, Konermann C, Lindroth A, Jäger N, Rausch T, Ryzhova M, Korbel JO, Hielscher T, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Ebinger M, Schuhmann MU, Scheurlen W, Pekrun A, Frühwald MC, Roggendorf W, Kramm C, Dürken M, Atkinson J, Lepage P, Montpetit A, Zakrzewska M, Zakrzewski K, Liberski PP, Dong Z, Siegel P, Kulozik AE, Zapatka M, Guha A, Malkin D, Felsberg J, Reifenberger G, von Deimling A, Ichimura K, Collins VP, Witt H, Milde T, Witt O, Zhang C, Castelo-Branco P, Lichter P, Faury D, Tabori U, Plass C, Majewski J, Pfister SM, Jabado N. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 2012; 482: 226-231.
- [123] Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfort J, Qu C, Ding L, Huether R, Parker M, Zhang J, Gajjar A, Dyer MA, Mullighan CG, Gilbertson RJ, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Ellison DW, Zhang J, Baker SJ; St. Jude Children's Research Hospital-Washington University Pediatric Cancer Genome Project. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet* 2012; 44: 251-253.
- [124] Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, Fontebasso AM, Bouffet E, Bartels U, Albrecht S, Schwartzenuber J, Letourneau L, Bourgey M, Bourque G, Montpetit A, Bourret G, Lepage P, Fleming A, Lichter P, Kool M, von Deimling A, Sturm D, Korshunov A, Faury D, Jones DT, Majewski J, Pfister SM, Jabado N, Hawkins C. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol* 2012; 124: 439-447.
- [125] Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S, Kool M, Zapatka M, Becker N, Zucknick M, Hielscher T, Liu XY, Fontebasso AM, Ryzhova M, Albrecht S, Jacob K, Wolter M, Ebinger M, Schuhmann MU, van Meter T, Frühwald MC, Hauch H, Pekrun A, Radlwimmer B, Niehues T, von Komorowski G, Dürken M, Kulozik AE, Madden J, Donson A, Foreman NK, Drissi R, Fouladi M, Scheurlen W, von Deimling A, Monoranu C, Roggendorf W, Herold-Mende C, Unterberg A, Kramm CM, Felsberg J, Hartmann C, Wiestler B, Wick W, Milde T, Witt

EZH2 and cancer

- O, Lindroth AM, Schwartzenruber J, Faury D, Fleming A, Zakrzewska M, Liberski PP, Zakrzewski K, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Morrissy S, Cavalli F, Taylor MD, van Sluis P, Koster J, Versteeg R, Volckmann R, Mikkelsen T, Aldape K, Reifemberger G, Collins VP, Majewski J, Korshunov A, Lichter P, Plass C, Jabado N, Pfister SM. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 2012; 22: 425-437.
- [126] Bender S, Tang Y, Lindroth AM, Hovestadt V, Jones DT, Kool M, Zapatka M, Northcott PA, Sturm D, Wang W, Radlwimmer B, Højfeldt JW, Truffaux N, Castel D, Schubert S, Ryzhova M, Seker-Cin H, Gronych J, Johann PD, Stark S, Meyer J, Milde T, Schuhmann M, Ebinger M, Monoranu CM, Ponnuswami A, Chen S, Jones C, Witt O, Collins VP, von Deimling A, Jabado N, Puget S, Grill J, Helin K, Korshunov A, Lichter P, Monje M, Plass C, Cho YJ, Pfister SM. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell* 2013; 24: 660-672.
- [127] Venneti S, Garimella MT, Sullivan LM, Martinez D, Huse JT, Heguy A, Santi M, Thompson CB, Judkins AR. Evaluation of histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and enhancer of Zest 2 (EZH2) in pediatric glial and glioneuronal tumors shows decreased H3K27me3 in H3F3A K27M mutant glioblastomas. *Brain Pathol* 2013; 23: 558-564.
- [128] Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS, Cordero F, Lin S, Banaszynski LA, Garcia BA, Muir TW, Becher OJ, Allis CD. Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* 2013; 340: 857-861.
- [129] Chan KM, Fang D, Gan H, Hashizume R, Yu C, Schroeder M, Gupta N, Mueller S, James CD, Jenkins R, Sarkaria J, Zhang Z. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev* 2013; 27: 985-990.
- [130] Shi B, Liang J, Yang X, Wang Y, Zhao Y, Wu H, Sun L, Zhang Y, Chen Y, Li R, Zhang Y, Hong M, Shang Y. Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the Polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 5105-5119.
- [131] Lee ST, Li Z, Wu Z, Aau M, Guan P, Karuturi RK, Liou YC, Yu Q. Context-specific regulation of NF-kappaB target gene expression by EZH2 in breast cancers. *Mol Cell* 2011; 43: 798-810.
- [132] Jung HY, Jun S, Lee M, Kim HC, Wang X, Ji H, McCrea PD, Park JI. PAF and EZH2 induce Wnt/beta-catenin signaling hyperactivation. *Mol Cell* 2013; 52: 193-205.
- [133] Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, Wu X, Stack EC, Loda M, Liu T, Xu H, Cato L, Thornton JE, Gregory RI, Morrissey C, Vessella RL, Montironi R, Magi-Galluzzi C, Kantoff PW, Balk SP, Liu XS, Brown M. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science* 2012; 338: 1465-1469.
- [134] Kim E, Kim M, Woo DH, Shin Y, Shin J, Chang N, Oh YT, Kim H, Rhee J, Nakano I, Lee C, Joo KM, Rich JN, Nam DH, Lee J. Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell* 2013; 23: 839-852.
- [135] He A, Shen X, Ma Q, Cao J, von Gise A, Zhou P, Wang G, Marquez VE, Orkin SH, Pu WT. PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. *Genes Dev* 2012; 26: 37-42.
- [136] Lee JM, Lee JS, Kim H, Kim K, Park H, Kim JY, Lee SH, Kim IS, Kim J, Lee M, Chung CH, Seo SB, Yoon JB, Ko E, Noh DY, Kim KI, Kim KK, Baek SH. EZH2 generates a methyl degran that is recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 ubiquitin ligase complex. *Mol Cell* 2012; 48: 572-586.
- [137] Chen S, Bohrer LR, Rai AN, Pan Y, Gan L, Zhou X, Bagchi A, Simon JA, Huang H. Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 1108-1114.
- [138] Kaneko S, Li G, Son J, Xu CF, Margueron R, Neubert TA, Reinberg D. Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes Dev* 2010; 24: 2615-2620.
- [139] Wei Y, Chen YH, Li LY, Lang J, Yeh SP, Shi B, Yang CC, Yang JY, Lin CY, Lai CC, Hung MC. CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 87-94.
- [140] Wu SC, Zhang Y. Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)-mediated phosphorylation of enhancer of zeste 2 (Ezh2) regulates its stability. *J Biol Chem* 2011; 286: 28511-28519.
- [141] Chu CS, Lo PW, Yeh YH, Hsu PH, Peng SH, Teng YC, Kang ML, Wong CH, Juan LJ. O-GlcNAcylation regulates EZH2 protein stability and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 1355-1360.
- [142] Crea F, Danesi R, Farrar WL. Cancer stem cell epigenetics and chemoresistance. *Epigenomics* 2009; 1: 63-79.
- [143] Hurt EM, Farrar WL. Cancer stem cells: the seeds of metastasis? *Mol Interv* 2008; 8: 140-142.
- [144] Chou RH, Yu YL, Hung MC. The roles of EZH2 in cell lineage commitment. *Am J Transl Res* 2011; 15: 243-250.

EZH2 and cancer

- [145] Chen YH, Hung MC, Li LY. EZH2: a pivotal regulator in controlling cell differentiation. *Am J Transl Res* 2012; 4: 364-375.
- [146] Lee J, Son MJ, Woolard K, Donin NM, Li A, Cheng CH, Kotliarova S, Kotliarov Y, Walling J, Ahn S, Kim M, Totonchy M, Cusack T, Ene C, Ma H, Su Q, Zenklusen JC, Zhang W, Maric D, Fine HA. Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell* 2008; 13: 69-80.
- [147] Suvà ML, Riggi N, Janiszewska M, Radovanovic I, Provero P, Stehle JC, Baumer K, Le Bitoux MA, Marino D, Cironi L, Marquez VE, Clément V, Stamenkovic I. EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Res* 2009; 69: 9211-9218.
- [148] Natsume A, Ito M, Katsushima K, Ohka F, Hatanaka A, Shinjo K, Sato S, Takahashi S, Ishikawa Y, Takeuchi I, Shimogawa H, Uesugi M, Okano H, Kim SU, Wakabayashi T, Issa JP, Sekido Y and Kondo Y. Chromatin regulator PRC2 is a key regulator of epigenetic plasticity in Glioblastoma. *Cancer Res* 2013; 73: 4559-4570.
- [149] Gonzalez ME, Li X, Toy K, DuPrie M, Ventura AC, Banerjee M, Ljungman M, Merajver SD, Kleer CG. Downregulation of EZH2 decreases growth of estrogen receptor-negative invasive breast carcinoma and requires BRCA1. *Oncogene* 2009; 28: 843-853.
- [150] Fan T, Jiang S, Chung N, Alikhan A, Ni C, Lee CC, Hornyak TJ. EZH2-dependent suppression of a cellular senescence phenotype in melanoma cells by inhibition of p21/CDKN1A expression. *Mol Cancer Res* 2011; 9: 418-429.
- [151] Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, Karuturi RK, Tan PB, Liu ET, Yu Q. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* 2007; 21: 1050-1063.
- [152] Puppe J, Drost R, Liu X, Joosse SA, Evers B, Cornelissen-Steijger P, Nederlof P, Yu Q, Jonkers J, van Lohuizen M, Pietersen AM. BRCA1-deficient mammary tumor cells are dependent on EZH2 expression and sensitive to Polycomb Repressive Complex 2-inhibitor 3-deazaneplanocin A. *Breast Cancer Res* 2009; 11: R63.
- [153] Rao M, Chinnasamy N, Hong JA, Zhang Y, Zhang M, Xi S, Liu F, Marquez VE, Morgan RA, Schrupp DS. Inhibition of histone lysine methylation enhances cancer-testis antigen expression in lung cancer cells: implications for adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 4192-4204.
- [154] Rizzo S, Hersey JM, Mellor P, Dai W, Santos-Silva A, Liber D, Luk L, Titley I, Carden CP. Ovarian cancer stem cell-like side populations are enriched following chemotherapy and overexpress EZH2. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 325-335.
- [155] Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK, Marquez VE, Jones PA. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 1579-1588.
- [156] Richon VM, Johnston D, Sneeringer CJ, Jin L, Majer CR, Elliston K, Jerva LF, Scott MP, Copeland RA. Chemogenetic analysis of human protein methyltransferases. *Chem Biol Drug Des* 2011; 78: 199-210.
- [157] Knutson SK, Wigle TJ, Warholc NM, Sneeringer CJ, Allain CJ, Klaus CR, Sacks JD, Raimondi A, Majer CR, Song J, Scott MP, Jin L, Smith JJ, Olhava EJ, Chesworth R, Moyer MP, Richon VM, Copeland RA, Keilhack H, Pollock RM, Kuntz KW. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat Chem Biol* 2012; 8: 890-896.
- [158] Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, Warholc NM, Huang KC, Xiao Y, Kadowaki T, Uesugi M, Kuznetsov G, Kumar N, Wigle TJ, Klaus CR, Allain CJ, Raimondi A, Waters NJ, Smith JJ, Porter-Scott M, Chesworth R, Moyer MP, Copeland RA, Richon VM, Uenaka T, Pollock RM, Kuntz KW, Yokoi A, Keilhack H. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2014; 13: 842-854.
- [159] Qi W, Chan H, Teng L, Li L, Chuai S, Zhang R, Zeng J, Li M, Fan H, Lin Y, Gu J, Ardayfio O, Zhang JH, Yan X, Fang J, Mi Y, Zhang M, Zhou T, Feng G, Chen Z, Li G, Yang T, Zhao K, Liu X, Yu Z, Lu CX, Atadja P, Li E. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 21360-21365.
- [160] Konze KD, Ma A, Li F, Barsyte-Lovejoy D, Parton T, Macnevin CJ, Liu F, Gao C, Huang XP, Kuznetsova E, Rougie M, Jiang A, Pattenden SG, Norris JL, James LI, Roth BL, Brown PJ, Frye SV, Arrowsmith CH, Hahn KM, Wang GG, Vedadi M, Jin J. An orally bioavailable chemical probe of the Lysine Methyltransferases EZH2 and EZH1. *ACS Chem Biol* 2013; 8: 1324-1334.
- [161] McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Della Pietra A 3rd, Diaz E, LaFrance LV, Mellinger M, Duquenne C, Tian X, Kruger RG, McHugh CF, Brandt M, Miller WH, Dhanak D, Verma SK, Tummino PJ, Creasy CL. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 2012; 492: 108-112.

EZH2 and cancer

- [162] Kim W, Bird GH, Neff T, Guo G, Kerenyi MA, Walensky LD, Orkin SH. Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer. *Nat Chem Biol* 2013; 9: 643-650.
- [163] Choudhury SR, Balasubramanian S, Chew YC, Han B, Marquez VE, Eckert RL. (-)-Epigallocatechin-3-gallate and DZNep reduce polycomb protein level via a proteasome-dependent mechanism in skin cancer cells. *Carcinogenesis* 2011; 32: 1525-1532.
- [164] Dimri M, Bommi PV, Sahasrabudhe AA, Khandekar JD, Dimri GP. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2010; 31: 489-495.
- [165] Hua WF, Fu YS, Liao YJ, Xia WJ, Chen YC, Zeng YX, Kung HF, Xie D. Curcumin induces down-regulation of EZH2 expression through the MAPK pathway in MDA-MB-435 human breast cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2010; 637: 16-21.
- [166] Alford SH, Toy K, Merajver SD, Kleer CG. Increased metastasis in patients with familial early-stage breast cancer and high EZH2 expression. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132: risk for distant 429-437.

Combining genotypic and phenotypic analyses on single mutant zebrafish larvae

Barbara Dupret^{1, 2}, Pamela Völkel^{1, 2, 3}, Pauline Follet^{1, 2, 4, 5}, Xuefen Le Bourhis^{1, 2}
and Pierre-Olivier Angrand^{1, 2*}

¹ Inserm U908, Cell Plasticity & Cancer, Lille, France

² University of Lille, Lille, France

³ CNRS, Lille, France

⁴ FRABio, CNRS FR3688, Lille, France

⁵ SIRIC ONCOLille, Lille, France

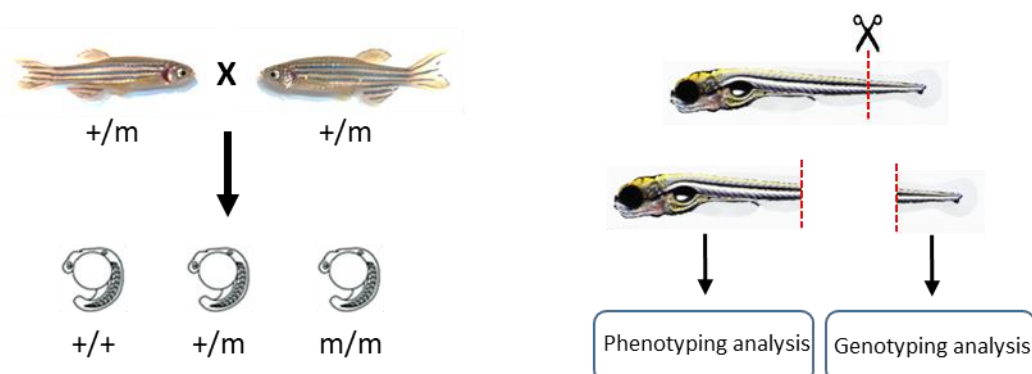
* Corresponding author

Cell Plasticity & Cancer, Inserm U908 / University of Lille, Bâtiment SN3, Cité Scientifique, F-59655
Villeneuve d'Ascq, France.

Tel.: + 33 3 20 33 62 22

E-mail: pierre-olivier.angrand@univ-lille1.fr

GRAPHICAL ABSTRACT



Method name: Single zebrafish larvae characterization

Keywords: Zebrafish, genotyping, protein extraction, histone extraction, RNA extraction, histology, spinal cord regeneration.

ABSTRACT

Zebrafish is a powerful animal model used to study vertebrate embryogenesis, organ development and diseases. The usefulness of the model was established as a result of various large forward genetic screens identifying mutants in almost every organ or cell type [1, 2]. More recently, the advent of genome editing methodologies, including TALENs [3] and the CRISPR/Cas9 technology [4], led to an increase in the production of zebrafish mutants. A number of these mutations are homozygous lethal at the embryonic or larval stages preventing the generation of homozygous mutant zebrafish lines. Here, we present a method allowing both genotyping and phenotype analyses of mutant zebrafish larvae from heterozygous zebrafish incrosses. The procedure is based on the genotyping of the larval tail after transection, whereas phenotypic studies are performed on the anterior part of the zebrafish larvae.

- The method includes (i) a protocol for genotyping, (ii) protocols for paraffin embedding and histological analyses, (iii) protocols for protein and histone extraction and characterization by Western blot, (iv) protocols for RNA extraction and characterization by RT-PCR, and (v) protocols to study caudal spinal cord regeneration.
- The technique is optimized in order to be applied on single zebrafish embryos and larvae.

PROTOCOL DETAILS

The method is designed to investigate the phenotype of sibling zebrafish larvae from heterozygous zebrafish incrosses. As so, single zebrafish larvae must be genotyped in order to eventually establish a correlation between different phenotypes and distinct genotypes. After transection, the larval tail is used for genotyping, whereas phenotypic studies are performed on the anterior part of the zebrafish larvae.

Larval tail transection

Equipment:

- Sterile disposable scalpels (Paramount, # PDSS11)
- Stereomicroscope Leica M125 or equivalent
- Generic laboratory equipment

Materials:

- Living zebrafish embryos or larvae at the desired stage [between 5 and 12 days post-fertilization (dpf)]
- MS-222 (Sigma, # A5040)
- Trizma base (Sigma, # T1503)

Reagents:

- MS-222 stock solution: A 0.4% stock solution is prepared by dissolving 400 mg MS-222 in 97.9 mL H₂O. The pH of the stock solution is adjusted to pH7-7.5 by adding 2.1 mL of Tris pH9, prepared by dissolving 260 mg Trizma Base into 2.1 mL H₂O. This stock solution is stored at -20°C.
- MS-222 anesthetic solution: 4.2 mL MS-222 stock solution are added to 100 mL tank water (final MS-222 concentration is about 0.016%).

Procedure:

1. Anesthetize zebrafish embryos or larvae with 0.168 g/mL MS-222 in 6-well plates.
2. Sedated embryos or larvae are transferred using a P20 micropipettor and a cut-off tip into a 10-cm Petri dish containing 0.168 g/mL MS-222 to a stereomicroscope
3. Cut the tail with a sterile scalpel distal to the end of the intestine in order to preserve most of the embryo for phenotypic analyses and to recover a tail biopsy allowing easy handling and efficient DNA extraction (**Figure 1A**).
4. Transfer the tail biopsy into a 0.2 mL sterile tube for DNA extraction whereas the anterior part of the larvae is transferred into a 24-well dish containing a lethal dose of MS-222 (300 mg/mL)

Note: After 5 to 10 min in a MS-222-containing bath, zebrafish embryos and larvae are totally motionless. Embryos and larvae may be kept in MS-222 up to 2 hours without effect on viability.

DNA extraction from tail biopsies and genotyping

DNA extraction from zebrafish embryonic and larval tails is achieved using a protocol based on the use of sodium hydroxide and Tris, modified from Meeker et al. [5]. This method allows fast genomic DNA extraction used for genotyping by RFLP assay (Restriction Fragment Length Polymorphism; [6]). The method detects a mutation that either creates or abolishes a site recognized by a specific restriction enzyme. In the RFLP assay, a sequence of interest is first PCR-amplified and the PCR

product is subjected to restriction enzyme digestion to identify whether the amplified alleles harbor or not the mutation.

Equipment:

- Thermocycler MJ Research PTC-200 or equivalent
- DNA electrophoresis tank and Power pack
- UV table equipped with a digital camera
- Generic laboratory equipment

Reagents:

- 50 mM NaOH
- 1 mM Tris-HCl, pH7.4
- Taq Polymerase (5U/ μ L), 10 x Polymerase Buffer, 25 mM MgCl₂ (Euromedex, # 01-01-02000)
- 10 mM dNTP Mix (Promega, # U1515)
- Forward and Reverse primers (10 μ M), Eurogentec
- 10x Restriction Buffer
- Restriction Enzyme
- 50x TAE (Euromedex, # ET330)
- DNA loading buffer (New England Biolabs, # B70245)
- Agarose (Euromedex, # LE-8200-B)
- Ethidium bromide (Euromedex, # EU0071-A)

DNA extraction procedure:

1. Add 10 μ L 50 mM NaOH to the tail biopsy
2. Heat the sample at 95°C for 20 min before cooling it down at 4°C for at least 15 min
3. Neutralize the solution by adding 1 μ L 1M Tris-HCl, pH7.4 (1/10 volume), vortex and centrifuge briefly.

Genotyping:

4. Transfer 2.5 μ L of the lysate into a 0.2 mL PCR tube
5. Add 2 μ L of 10x Polymerase buffer, 2 μ L 25 mM MgCl₂, 0.4 μ L of 10 mM dNTPs, 1 μ L of each forward and reverse primers (10 μ M), 0.2 μ L of Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) and complete to 20 μ L final volume with H₂O.
6. Run the PCR as follows, 94°C 2 min, [94°C 20 sec, 65°C 45 sec, 72°C 30 sec] 40 cycles, 72°C 5 min.

7. Digest 4 μL of the PCR product with 4 U of restriction enzyme and 1.5 μL 10x Restriction buffer in 15 μL final volume.
8. Incubate 3 hours to overnight at the desired temperature.
9. Add 2 μL of DNA loading buffer to 15 μL digested sample and analyze on a 2% agarose electrophoresis gel in TAE.

Figure 1B exemplifies the genotyping of the progeny of an *ezh2*^{ul2} [7] heterozygous incross using this protocol. The *ezh2*^{ul2} mutation destroys a DdeI restriction site allowing genotyping by RFLP. PCR amplification of the *ezh2* wild-type gene using forward (5'-GGTATGGTTGTTGCAGTTCACAGAC-3') and reverse (5'-AACACCAAACCTACACAAGCAGCA-3') primers generates a 466 bp DNA molecule which is cleaved by DdeI into 2 DNA fragments of approximately 356 bp and 110 bp. In contrast, PCR amplification and DdeI digestion of the *ezh2*^{ul2} gene gives a 466 bp fragment resistant to DdeI cleavage. Under these conditions, it is possible to distinguish wild-type and *ezh2*^{ul2} alleles by RFLP [7].

Notes:

- This procedure may also be used on paraformaldehyde-fixed samples to genotype entire embryos and larvae in 20 μL 50 mM NaOH after *in situ* hybridization, Alcian blue–Alizarin red staining or Oil red-O staining [7, 8].
- The setting of the PCR conditions may be modified according to the annealing temperature of the Forward and Reverse primers.

Histological analysis

For histological studies, sections of the anterior part of zebrafish embryos or larvae are performed after paraffin embedding.

Equipment:

- Glass pillboxes (Dutscher, # 211672)
- Hybridization oven
- Heating plate
- Stainless steel molds (Dutscher, # 040731)
- Paraffin fountain (Leica, # 1120)
- Microtome (Leica, # RM2245, or equivalent)
- Cover slips (WWR, # 631-1575)

- Glass slides, SuperFrost plus (Thermo, # 4951 PLUS4)
- Razor blades
- Generic laboratory equipment

Reagents:

- 4% paraformaldehyde (PFA) in Phosphate Buffer Saline (PBS) (wt/vol)
- Ethanol
- Claral (CML, RAL Diagnostic, # 320640-5000)
- Paraffin Paraplast Plus (Leica, # 39602004)
- Phosphate Buffer Saline (PBS)

Procedure:

1. Transfer the anterior part of the larvae into a 24-well dish after transection followed death in a lethal dose of MS-222 bath (300 mg/L)
2. Remove the MS-222 solution as much as possible and fix the samples by adding 1.5 mL 4% PFA. Embryos and larvae are fixed overnight at 4°C
3. Wash the embryos or larvae once with PBS
4. Transfer the embryos and larvae into glass pillboxes
5. Dehydrate the embryos and larvae with successive dilutions of ethanol in water: 10 min in 1.5 mL 30% (vol/vol) ethanol, 10 min in 1.5 mL 50% (vol/vol) ethanol, 10 min in 1.5 mL 70% (vol/vol) ethanol, 15 min in 1.5 mL 100% ethanol
6. Put the embryos and larvae for 10 min in 1.5 mL 50% ethanol – 50% Claral (vol/vol) at room temperature
7. Incubate embryos and larvae for 15 min in 1.5 mL 100% Claral at room temperature
8. After removal of the Claral, fill the glass pillboxes with pre-warmed paraffin in a paraffin fountain overnight at 58°C, and incubate 15 min in an oven at 58°C
9. Change the paraffin and incubate again for 15 min at 58°C
10. Put the embryos and larvae in new warm paraffin solution into stainless steel molds and orientate the samples as required
11. Let the molds on the heating plate at 58°C for 30 min. Then, on the heating plate at 37°C for 1 hour, and finally at room temperature for 4 hours to overnight
12. Place the molds for at least 4 hours at 4°C before demolding and keep the zebrafish-containing paraffin blocks at 4°C
13. Reduce the paraffin around the embryo with a razor blade

14. Stick the zebrafish-containing paraffin block to a bigger one (**Figure 1C**) which is placed on the microtome
15. Perform 5 μm sections with the microtome
16. Deposit the paraffin sections in a water drop onto a glass slide placed on a heating plate at 37°C for 5 min and then remove the water
17. Let the glass slide on the heating plate at 37°C for 30 min to 1 hour maximum
18. Store the glass slides for at least 1 night at 37°C in an incubator

Histological sections could then be analyzed by hematoxylin-eosin staining (**Figure 1C**), TUNEL labeling, *in situ* hybridization, or *in situ* immunohistochemistry [7].

Protein analysis by Western blot

For protein studies (**Figure 1D**), the anterior part of zebrafish embryos or larvae is transferred in a 1.5 mL Eppendorf tube, snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C for at least 1 night.

Equipment:

- Pestles for 1.5 mL tubes (Dutscher, # 045650)
- Cooling centrifuge for Eppendorf tubes (Eppendorf, # 5417R or equivalent)
- NuPAGE, 4-12% Bis-Tris polyacrylamide gel (Invitrogen, # WG1401BOX)
- iBlot Dry Blotting System (Invitrogen, # IB1001W)
- Power pack
- Orbital shaker
- Hybridization oven
- Generic laboratory equipment

Materials:

- Triton X-100 (Sigma, # T9284)
- Tween 20 (Sigma, # P5927)
- NP40 (Sigma, # I3021)
- Phenyl-methylsulfonyl fluorid (PMSF) (Sigma, # P7626)
- NaN_3 (Sigma, # S2002)
- Glycine (Sigma, # G7126)
- NaCl (Sigma, # S9888)
- 10x Phosphate Buffer Saline (PBS) (Euromedex, # ET330)

- 37% HCl (Sigma, # 320331)
- β -mercaptoethanol (Sigma, # M6250)
- DL-Dithiothreitol (DTT) (Sigma, # 43819)
- 20x MES SDS Running Buffer (Invitrogen, # NP0002)
- Milk powder (Regilait, skimmed milk)
- Nitrocellulose membrane (Invitrogen, # IB3010-01)
- Parafilm M (Dutscher, # 90998)

Reagents:

- 2x Laemmli buffer (Sigma, # S3401)
- Triton Extraction Buffer (TEB): 0.5% Triton X-100, 2 mM PMSF, 0.02% NaN_3 in PBS
- 4x Loading buffer (Invitrogen, NP0007)
- 1 M Tris-HCl pH6.8 (Genomic Solution, # 80-0161)
- 20x SDS (Biorad, # 161-0418)
- Primary and secondary antibodies
- PBST: 0.1% Tween 20 in PBS
- Blocking Buffer: 5% milk powder (wt/vol) in PBST
- Western Blotting detection System, Super Signal West Femto (Thermo, # 34096)
- 10x Reducing Agent is prepared by adding 1.6 mL β -mercaptoethanol and 3.78 g DTT in 10 mL H_2O final. The solution is stored at -20°C
- Stripping Buffer for total proteins: Add 4.5 mL 1 M Glycine, 9 mL 5 M NaCl, 450 μL 20% NP40 and 234 μL 37% HCl to 75.816 mL H_2O (final volume is 90 mL)
- Stripping Buffer for histone blots: Add 3.125 mL 1 M Tris-HCl pH6.8, 5 mL 20% SDS and 350 μL β -mercaptoethanol to 41.525 mL H_2O (final volume is 50 mL)

Protein extraction procedure:

1. Add 7.5 μL of 1x Laemmli buffer to the frozen embryo or larvae
2. Mash the embryo with a pestle in a 1.5 mL Eppendorf tube, at least 20 times
3. Add 1 volume (7.5 μL) of 1x Laemmli buffer and mash the embryo again
4. Put the Eppendorf tube containing the mashed embryo 1 min in boiling water
5. Centrifugate the tube for 10 min at 14,000 rpm (20,817 g), 4°C
6. Recover the supernatant and keep it at -80°C for Western blotting

Note: To study proteins of low abundance, several embryos or larvae from the same genotype could be pooled after freezing, in the same 1.5 mL Eppendorf tube. In this case, 15 μ L of 1x Leammli buffer should be used for 5 to 10 embryos.

Histone extraction procedure:

1. Add 7.5 μ L of Triton Extraction buffer (TEB) to the frozen embryo or larvae
2. Mash the embryo with a pestle in a 1.5 mL Eppendorf tube, at least 20 times
3. Keep on ice for 10 min
4. Centrifugate for 10 min at 14,000 rpm (20,817 g), 4°C
5. Discard the supernatant and resuspend the pellet in 7.5 μ L TEB with a P20 micropipettor
6. Centrifugate for 10 min at 14,000 rpm (20,817 g), 4°C
7. Discard the supernatant and resuspend the pellet in 7.5 μ L 0.2N HCl with a P20 micropipettor
8. Extract the histones overnight at 4°C on a rocking table
9. Centrifugate for 10 min at 14,000 rpm (20,817 g), 4°C
10. Keep the supernatant containing the histone proteins at -20°C
11. Add 3.75 μ L 4x Loading buffer, 1.5 μ L 10x Reducing Agent and adjust the volume to 15 μ L with 0.2 N HCl

Notes:

- All the steps of the histone extraction procedure should be performed at 4°C and the samples kept on ice.
- This method allows the recovering of approximately 3 μ g histone proteins per 7 dpf embryo.
- If several embryos or larvae from the same genotype are processed together, mash 5 to 10 embryos in 15 μ L TEB, resuspend in 7.5 μ L TEB after the first centrifugation (step 5) and extract the histones with 7.5 μ L 0.2 N HCl (step 7).
- Protein concentration is measured using the Bradford reagent (Biorad, # 500 00 06) with 2 μ L of sample.

Western blot procedure:

1. Boil the samples 10 min at 95°C
2. Load the protein samples onto a SDS denaturing gel (NuPAGE, 4-12% Bis-Tris polyacrylamide gel, Invitrogen) and run for about 90 min at constant 150 V
3. Transfer the proteins to a nitrocellulose membrane by iBlot Gel Transfer Stacks (Invitrogen) using the program 3, 20 V, 8 min

4. Block the membrane by incubation in Blocking Buffer, 1 hour on an orbital shaker. Alternatively, membranes could be blocked overnight at 4°C
5. Incubate the membrane with the primary antibody in Blocking Buffer for 1 hour at room temperature. The incubation of the membrane with the antibody is performed by spreading the antibody solution with a pipette on the membrane, placed onto a Parafilm M flattened on the bench
6. Wash the membrane 3 times 10 min in PBST
7. Incubate the membrane with the secondary antibody in Blocking Buffer for 1 hour at room temperature
8. Wash the membrane 3 times 10 min in PBST
9. Visualize the protein using a chemiluminescence substrate (Super Signal West Femto, Thermo) and a Luminescent Image Analyzer (LAS-4000, Fujifilm).

Membrane stripping for re-use:

1. Incubate the membrane 2 times 10 min at room temperature in freshly prepared Stripping Buffer for total proteins
2. Wash the membrane twice 5 min in PBST at room temperature
3. Block the membrane 1 hour in Blocking Buffer at room temperature, before re-use with a Primary Antibody

For histone blots the procedure is modified as follow:

1. Incubate the membrane 30 min in an hybridization oven at 50°C with pre-warmed Stripping Buffer for histone blots
2. Shake the membrane every 10 min
3. Wash the membrane 10 times 5 min in PBST at room temperature
4. Block the membrane 1 hour in Blocking Buffer at room temperature before re-use with a Primary Antibody

RNA analysis

For RNA studies (**Figure 1E**), the anterior part of zebrafish embryos or larvae is transferred in a 1.5 mL Eppendorf tube, 200 μ L Trizol is added before snap freezing in liquid nitrogen and storage at -80°C for at least 1 night. The RNAs are extracted based on a modified version of the protocol from de Jong et al. [9].

Equipment:

- Pestles for 1.5 mL tubes (Dutscher, # 045650)
- Cooling centrifuge for Eppendorf tubes (Eppendorf, # 5417R or equivalent)
- Vortex
- Thermocycler MJ Research PTC-200 or equivalent
- DNA electrophoresis tank and Power pack
- UV table with digital camera
- Generic laboratory equipment

Materials:

- RNeasy Mini Kit (Qiagen, # 74104)
- SuperScriptIII Kit (Invitrogen, # 11752-050)

Reagents:

- Trizol (Ambion, # 15-596-018)
- Chloroform (Sigma, # 650498)
- Taq Polymerase (5 U/ μ L), 10x Polymerase Buffer, 25 mM $MgCl_2$ (Euromedex, # 01-01-02000)
- 10 mM dNTP Mix (Promega, # U1515)
- Forward and Reverse primers (10 μ M each), Eurogentec
- 100 bp DNA Marker (New England Biolabs, # N3231S)
- 6x Gel Loading Dye Purple (New England Biolabs, # B7024S)
- Agarose (Euromedex, # LE-800-B)
- 50x TAE (Euromedex, # ET330)
- Ethidium bromide (Euromedex, # EU0071-A)

RNA Extraction Procedure:

1. Put the zebrafish and Trizol-containing Eppendorf tubes on ice and mash the frozen samples with a pestle
2. Rinse the pestle with 100 μ L Trizol to recover all material stuck to the pestle
3. Vortex 15 sec
4. Keep 5 min at room temperature
5. Centrifuge for 15 sec at 14,000 rpm (20,817 g)
6. Add 60 μ L Chloroform (corresponding to 1/5 Vol. Trizol)

7. Vortex the sample for 15 sec and then keep the tube 3 min at room temperature
8. Centrifugate for 20 min at 14,000 rpm (20,817 g), 4°C
9. Transfer the upper aqueous phase (about 100 µL) in a new Eppendorf tube
10. Purify RNAs according to the RNA cleanup protocol provided in the RNeasy Mini Kit (Quiagen) following the manufacturer instructions and including the DNase digestion option
11. Recover the RNAs in 14 µL RNase free water

Reverse transcription Procedure:

1. Transfer 7 µL of RNAs into a 0.2 mL PCR tube
2. Add 10 µL of RT Reaction Mix, 2 µL of RT Enzyme Mix and 1 µL of DEPC-treated water (final volume is 20 µL)
3. Mix gently and incubate for 10 min at 25°C
4. Incubate for 30 min at 50°C
5. Heat inactivate for 5 min at 85°C and transfer the tube into ice
6. Add 1 µL RNase H
7. Incubate for 20 min at 37°C
8. Store the cDNA samples at -20°C

Note: The Reverse transcription procedure follows the instruction provided with the SuperScriptIII Kit (Invitrogen).

PCR Procedure:

1. Transfer 5 µL of cDNAs from the reverse transcription into a 0.2 mL PCR tube
2. Add 2.5 µL of 10x Polymerase Buffer, 0.5 µL 10 mM dNTPs Mix, 2.5 µL 25 mM MgCl₂, 0.5 µL of each forward and reverse primers (10 µM), 0.5 µL Taq DNA Polymerase (5 U/µL) and 13 µL distilled water (final volume is 25 µL)
3. Run the PCR as follows, 95°C 4 min, [95°C 45 sec, 55°C 45 sec, 72°C 1 min] 35 cycles, 72°C 10 min
4. Add 4 µL of Loading Buffer to the PCR product and analyze on a 1% agarose electrophoresis gel in TAE

Note: The PCR conditions may be modified according to the annealing temperature of the Forward and Reverse primers.

Study of caudal spinal cord regeneration

The ability to regenerate tissues after amputation is part of the phenotypic studies that can be performed on zebrafish mutants at the larval stage [7].

Equipment:

- Sterile disposable scalpels (Paramount, # PDSS11)
- Stereomicroscope Leica M125 or equivalent
- Generic laboratory equipment

Materials:

- MS-222 (Sigma, # A5040)
- Trizma base (Sigma, # T1503)

Reagents:

- MS-222 stock solution: A 0.4% (wt/vol) stock solution is prepared by dissolving 400 mg MS-222 into 97.9 mL H₂O. The pH of the stock solution is adjusted to pH7-7.5 by adding 2.1 mL Tris pH9, prepared by dissolving 260 mg Trizma Base into 2.1 mL H₂O. Store the stock solution at -20°C.
- MS-222 anesthetic solution: 4.2 mL MS-222 stock solution are added to 100 mL tank water (final MS-222 concentration is about 168 mg/mL).
- 100x Penicillin-Streptomycin (Gibco, # 15140122)

Procedure:

1. Anesthetize zebrafish embryos at 3 dpf with 0.168 g/mL MS-222 in 6-well plates
2. Transfer the sedated embryos using a P20 micropipettor and a cut-off tip into a 10-cm Petri dish containing 0.168 g/mL MS-222 to a stereomicroscope
3. Cut the spinal cord with a sterile scalpel after the blood vessel within the pigment gap as described by Wilkinson et al. [10] and shown on **Figure 2A**.
4. Transfer the tail biopsy for DNA extraction and genotyping as previously described
5. Transfer the embryos in a 24-well plate with tank water containing 1x Penicillin-Streptomycin (**Figure 2B**)
6. Follow spinal cord regeneration 2 days after amputation (**Figure 2C**)

Figure 2D shows the genotyping of the progeny of an *ezh2^{ul2}* [7] heterozygous incross using tail biopsy from 3 dpf embryos generated by this procedure.

ANIMAL ETHICS STATEMENT

The zebrafish experiments described in this study were conducted according to the French and European Union guidelines for the handling of laboratory animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes). At the end of the experiment, fish older than 6 dpf were humanely euthanized by immersion in an overdose of tricaine methane sulfonate (MS-222, 300 mg/L) for at least 10 minutes, whereas younger fish were immobilized by submersion in ice water (5 parts ice/1 part water, 0-4°C) for at least 1 hour to ensure death by hypoxia.

FUNDING

This work was supported by the Inserm, the University of Lille, the SIRIC ONCOLille, the Région Hauts de France Nord-Pas de Calais-Picardie and the ITMO Biologie Cellulaire, Développement et Evolution (BCDE). BD is supported by a fellowship from the Région Hauts de France Nord-Pas de Calais-Picardie and the University of Lille.

ACKNOWLEDGEMENTS.

We thank Constance Vennin for technical assistance.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

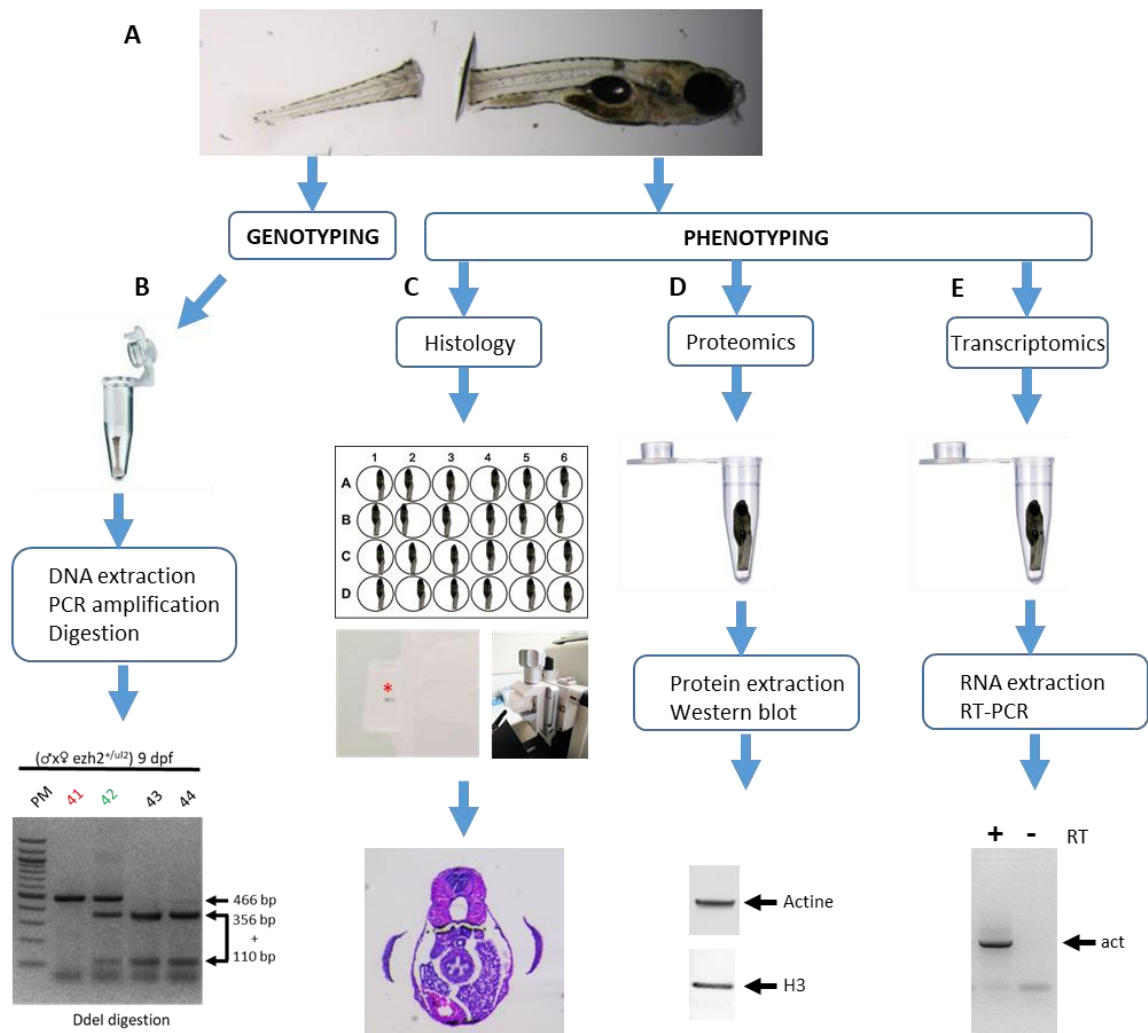
- [1] Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkruis F, Abdelilah S, Rangini Z, Belak J, Boggs C. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*. 1996; 123: 37-46.
- [2] Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nüsslein-Volhard C. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. 1996; 123: 1-36.
- [3] Sander JD, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, Joung JK, Yeh JR. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol*. 2011; 29: 697-8.
- [4] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. 2013; 31: 227-9.
- [5] Meeker ND, Hutchinson SA, Ho L, Trede NS. Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *Biotechniques*. 2007; 43: 610-4.
- [6] Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 1980; 32: 314-31.
- [7] Dupret B, Völkel P, Vennin C, Toillon RA, Le Bourhis X, Angrand PO. The histone lysine methyltransferase *Ezh2* is required for maintenance of the intestine integrity and for caudal fin regeneration in zebrafish. *Biochim Biophys Acta*. 2017; 1860: 1079-93.
- [8] Dupret B, Völkel P, Le Bourhis X, Angrand PO. The Polycomb Group Protein *Pcgf1* Is Dispensable in Zebrafish but Involved in Early Growth and Aging. *PLoS One*. 2016; 11: e0158700.
- [9] de Jong M, Rauwerda H, Bruning O, Verkooijen J, Spaink HP, Breit TM. RNA isolation method for single embryo transcriptome analysis in zebrafish. *BMC Res Notes*. 2010; 3: 73.
- [10] Wilkinson RN, Elworthy S, Ingham PW, van Eeden FJ. A method for high-throughput PCR-based genotyping of larval zebrafish tail biopsies. *Biotechniques*. 2013; 55: 314-6.

FIGURE LEGENDS

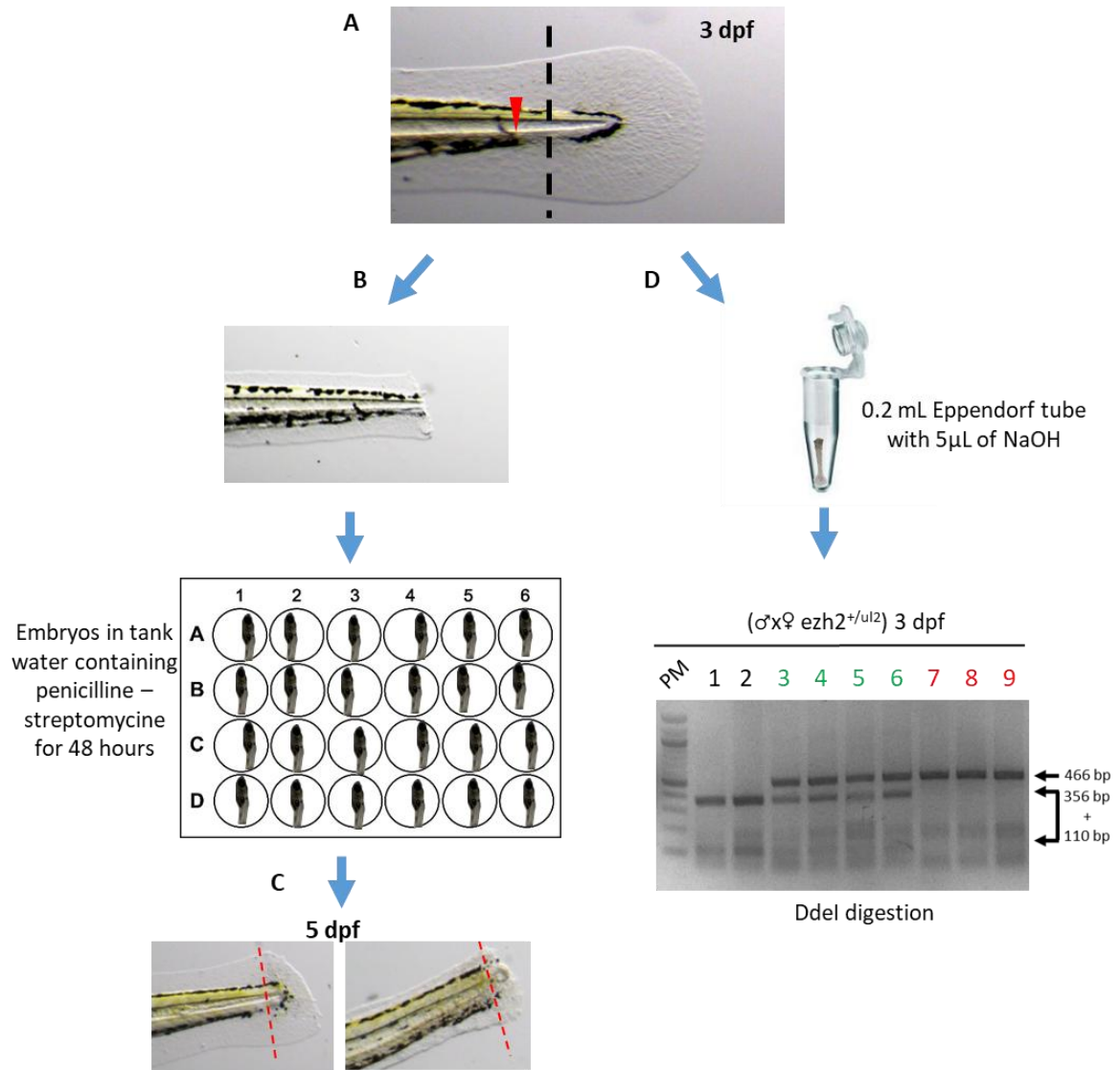
Figure 1. Overview of the method for genotypic and phenotypic analyses of single zebrafish larvae.

(A) Larval transection at 9 dpf. (B) Genotyping analysis of larval tail biopsies from an $ezh2^{+/ul2}$ heterozygous incross. DNA from the tail biopsy is extracted, PCR amplified and digested by DdeI. PCR amplification of the wild-type allele results in a 466 bp DNA molecule which is cleaved by DdeI into 2 DNA fragments of approximately 356 bp and 110 bp. In contrast, PCR amplification and DdeI digestion of the $ezh2^{ul2}$ gene leads to a 466 bp fragment resistant to DdeI cleavage. Samples 43 and 44 correspond to wild-type individuals, sample 41 is from a homozygous $ezh2^{ul2/ul2}$ mutant and sample 42 from a heterozygous $ezh2^{+/ul2}$ sibling. (C) Histological analysis of larval anterior moieties. Samples are fixed in 4% paraformaldehyde in 24-well dishes and embedded in paraffin. On the picture, the left panel shows a 9 dpf larvae (asterisk) inside the paraffin block and the right panel, a paraffin block placed on the microtome. A hematoxylin-eosin stained section of a larvae at 9 dpf is shown at the bottom. (D) Proteins or histones are extracted from the anterior part of the larvae and studied by Western blot. The upper panel shows actin expression by Western blot using total proteins extracted from the anterior part of a single zebrafish larvae at 9 dpf whereas the lower panel shows the histone H3 signal after histone extraction from the anterior part of a single zebrafish larvae at 9 dpf. The primary antibodies used were a rabbit anti-H3 antibody (1:5,000; ab1791, Abcam) and a rabbit anti-actin antibody (1:10,000; A2066, Sigma). The secondary antibody was a peroxidase conjugated anti-rabbit antibody (1:10,000; 711-035-152, Jackson ImmunoResearch) (E) RNAs are extracted from the anterior part of a larvae at 9 dpf and analyzed by RT-PCR using the primers b-actinF: 5'-CGTGACATCAAGGAGAAGCT-3' and b-actinR: 5'-ATCCACATCTGCTGGAAGGT-3', to detect β -actin expression in presence of reverse transcriptase (+), but not in its absence (-).

Figure 2. Study of caudal spinal cord regeneration. (A) Embryonic fin transection. The caudal fin of embryos at 3 dpf is cut (dotted line) distal to the caudal limit of blood circulation (red arrowhead). (B) Transected fin 2 days after the amputation at 5 dpf showing spinal cord regeneration (left) or defect in spinal cord regeneration (right) (C) Genotyping analysis of embryonic tail biopsies from an $ezh2^{+/ul2}$ heterozygous incross. DNA from the biopsy is extracted, PCR amplified and digested by DdeI. PCR amplification of the wild-type allele results in a 466 bp DNA molecule which is cleaved by DdeI into 2 DNA fragments of approximately 356 bp and 110 bp whereas, PCR amplification and DdeI digestion of the $ezh2^{ul2}$ gene leads to a DNA fragment resistant to DdeI cleavage. Samples 1 and 2 correspond to wild-type individuals, sample 7, 8 and 9 are from homozygous $ezh2^{ul2/ul2}$ mutants and samples 3, 4, 5, 6 from heterozygous $ezh2^{+/ul2}$ siblings.



Dupret et al. – Figure 1



Dupret et al. – Figure 2