

UNIVERSITE DE LILLE

Laboratoire CANTHER UMR9020-U1277 INSERM

# THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE  
École Gradué Biologie-Santé de Lille (n° 446)  
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

---

## Caractérisation des effets de l'inactivation zygotique du gène *ezh2* sur le développement du cerveau chez le poisson zèbre *Danio rerio*

---

Présentée et soutenue publiquement par

**Mariette HANOT**

Le 12 décembre 2025

### **Membres du Jury**

Président : Pr Jamal Ghoumid - Université de Lille

Rapporteurs : Pr Johanna Chluba - Université Bourgogne Europe

Pr Pascale Dufourcq - Université Paul Sabatier Toulouse

Examineurs : Dr Sophie Halliez - Maître de conférences - Université de Lille

Dr Karima Kissa - Chargée de recherche - Université de Montpellier

Directeur de thèse : Pr Pierre-Olivier Angrand - Université de Lille





## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury, Madame le Professeur **Johanna Chluba**, Madame le Professeur **Pascale Dufourcq**, Monsieur le Docteur **Jamal Ghoumid**, Madame le Docteur **Sophie Halliez** et Madame le Docteur **Karima Kissa** pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je souhaite également remercier mon directeur de thèse, le Professeur **Pierre-Olivier Angrand** pour m'avoir encadré pendant le M2 et la thèse. Merci aussi à **Pamela Völkel** pour son aide pour les manip. Merci également à l'ensemble des membres de l'équipe Plasticité.

Un grand merci à **Ludivine Raby** pour son amitié et son soutien, pendant le M2 et tout au long de ma thèse. Merci aussi pour ces fêtes de la musique mémorables !

Je souhaite aussi remercier mes amis pour leur soutien et leur présence. Un grand merci à **Louise** et **Flavie** pour les soirées jeux, les verres partagés et pour avoir râlé avec moi (et même plus que moi). Merci également à **Vincent**, **Sacha** et **Juliette** de m'avoir écoutée et encouragée. Merci aussi à **Laura** pour ses conseils et sa bonne humeur légendaire. Je remercie enfin les copains et copines de Strasbourg ou d'ailleurs, pour leurs gentils messages et leur soutien à distance : **Éric**, **Sonia**, **Camille**, **Valentine**, **Michel** et **Sophie**. Je mesure la chance que j'ai de vous avoir tous dans ma vie !

Finalement, je souhaite remercier ma famille. Merci à **Amandine** pour son soutien au quotidien et pour avoir supporté mes moments de doutes. Un énorme merci à ma mère pour son écoute, ses conseils et pour avoir corrigé mes fautes d'orthographe. Merci également à mon grand-père **Jean-Claude** de m'avoir transmis le goût des sciences.

Pour terminer, j'ai une tendre pensée pour ma grand-mère **Josette** que j'aurais aimé avoir à mes côtés le jour de ma soutenance.



## Résumé

Le développement cérébral dépend de la régulation fine des programmes transcriptionnels, assurée en partie par les complexes Polycomb (PRC1 et PRC2). Le complexe PRC2, dont EZH2 constitue l'une des deux sous-unités catalytiques, dépose la marque répressive H3K27me3 et joue un rôle essentiel dans le contrôle de la prolifération et la différenciation neuronale. Cependant, l'implication précise d'EZH2 au cours du développement cérébral *in vivo* reste mal comprise.

Le poisson zèbre est un modèle particulièrement intéressant pour l'étude du développement cérébral grâce à son développement rapide, à la transparence de ses embryons et à la conservation des voies génétiques et épigénétiques des mammifères. Contrairement à la souris, où l'inactivation d'*Ezh2* est létale lors de la gastrulation, l'inactivation zygotique d'*ezh2* chez le poisson zèbre est viable jusqu'à 12 jours post-fécondation et offre ainsi l'opportunité d'étudier directement le rôle du complexe PRC2-Ezh2 dans le développement cérébral.

Cette thèse repose sur l'analyse de l'expression de gènes impliqués dans différents aspects du développement neuronal par hybridation *in situ* sur le modèle de poisson zèbre *ezh2* mutant. Les résultats obtenus mettent en évidence que l'inactivation zygotique d'*ezh2* affecte spécifiquement le développement des neurones du cervelet chez le poisson zèbre. Sur le plan fonctionnel, les larves *ezh2* mutantes présentent un phénotype d'hyperactivité locomotrice, évoquant des défauts dans l'établissement des circuits neuronaux impliqués dans le contrôle moteur. Ces données soulignent l'intérêt du modèle pour explorer les mécanismes épigénétiques impliqués dans le développement cérébral et leurs liens avec les pathologies associées à une perte de la marque H3K27me3.

Mots clés : Poisson zèbre, Ezh2, PRC2, Développement, Cervelet.



# Abstract

Brain development depends on the fine regulation of transcriptional programs, partly ensured by Polycomb complexes (PRC1 and PRC2). The PRC2 complex, of which EZH2 constitutes one of the two catalytic subunits, deposits the repressive mark H3K27me3 and plays an essential role in controlling proliferation and neuronal differentiation. However, the precise involvement of EZH2 during in vivo brain development remains poorly understood.

The zebrafish is a particularly interesting model for studying brain development due to its rapid development, the transparency of its embryos, and the conservation of genetic and epigenetic pathways from mammals. Unlike in mice, where *Ezh2* inactivation is lethal during gastrulation, zygotic inactivation of *ezh2* in zebrafish is viable up to 12 days post-fertilization, thus offering the opportunity to directly study the role of the PRC2-*Ezh2* complex in brain development.

This thesis is based on the analysis of gene expression involved in various aspects of neuronal development through in situ hybridisation using the *ezh2* mutant zebrafish model. The results obtained highlight that zygotic inactivation of *ezh2* specifically affects the development of cerebellar neurones in zebrafish. On a functional level, mutant *ezh2* larvae exhibit a phenotype of locomotor hyperactivity, suggesting defects in the establishment of neuronal circuits involved in motor control. These data highlight the interest of the model for exploring the epigenetic mechanisms involved in brain development and their links to pathologies associated with a loss of the H3K27me3 mark.

Keywords : Zebrafish, *Ezh2*, PRC2, Development, Cerebellum.



# Abréviations

## A

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AEBP2** : Adipocyte Enhancer-Binding Protein

**AP** : Antéro-postérieur

**AR** : Récepteur aux androgènes

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**AUTS2** : Autism Susceptibility Candidate 2

## B

**BCOR** : BCL6 co-repressor

**BHE** : Barrière hémato-encéphalique

**bHLH** : Hélice-boucle-hélice

**BMI1** : B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1

**BMP** : Bone morphogenetic protein

## C

**CBX** : Chromobox

**CCe** : Corpus cerebelli

**CCG** : Couche des cellules granulaires

**CCP** : Couche des cellules de Purkinje

**CDK** : Kinase dépendante de la cycline

**CDKI** : Inhibiteur de CDK

**ChIP-Seq** : Séquençage par immunoprécipitation de la chromatine

**CK2** : Casein kinase 2

**CLP** : Progéniteur lymphoïde commun

**CM** : Couche moléculaire

**CMP** : Progéniteur myéloïde commun

**CpG** : Dinucléotide cytosine-guanine

**CSN** : Cellule souche neurale

## D

**DMG** : Gliome diffus de la ligne médiane

## E

**EED** : Embryonic ectoderme development

**EG** : Eminentia granularis

**EGL** : Couche granulaire externe

**EloB/C** : Elongine B/C

**EPOP** : Elongin BC and Polycomb Repressive Complex 2 Associated Protein

Cellule **ES** : Cellule souche embryonnaire

**Esc** : Extra sex comb

**E(z)** : Enhancer of Zeste

**EZH1** : Enhancer of Zeste Homolog 1

**EZH2** : Enhancer of Zeste Homolog 2

**EZH2i** : Inhibiteur d'EZH2

**EZHIP** : EZH1/2 inhibitor protein

**E2F6** : E2F Transcription Factor 6

## F

**FBRS** : Fibrosin

**FGF** : Fibroblast Growth Factor

**FT** : Facteur de transcription

**FZD** : Frizzled

## G

**GABA** : Acide gamma-butyrique

**GAD** : Glutamate décarboxylase

**GBM** : Glioblastome multiforme

**GMP** : Progéniteur granulocytaire-monocyte

## H

**HCC** : Carcinome hépatocellulaire

**HDACi** : Inhibiteur d'histone désacétylase

**HGG** : Gliome de haut-grade

**HIS** : Hybridation *in situ*

**HKMT** : Histone lysine méthyltransférase

**HOX** : Homeobox

**Hpf** : Heure post-fécondation

**HSC** : Cellule souche hématopoïétique

**HSPC** : Cellule souche et progéniteur hématopoïétique

## J

**JAK** : Janus Kinase

**JARID2** : Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2

**Jpf** : Jour post-fécondation

## K

**KDM2B** : Lysine déméthylase 2B

## L

**LCa** : Lobus caudalis cerebelli

**LMPP** : Progéniteur multipotent à amorce lymphoïde

**L3MBTL2** : Histone Methyl-Lysine Binding Protein 2

## M

**MAX** : MYC Associated Factor X

**MB** : Médulloblastome

**MEP** : Progéniteur mégacaryocytaire-érythrocytaire

**MES** : Précurseur du mésoderme cardiaque précoce

**MGA** : MAX gene-associated protein

**MO** : Morpholino

**MPP** : Progéniteur multipotent

**MTF2** : Metal Response Element Binding Transcription Factor 2

**MZT** : Transition maternelle-zygotique

## N

**NICD** : Domaine intracellulaire de Notch

**NPC** : Cellule progénitrice neurale

**NZF** : Npl4 Zinc Finger

## O

**OPC** : Cellule progénitrice des oligodendrocytes

## P

**Pc** : Polycomb

**PcG** : Protéine du groupe Polycomb

**PCGF** : Polycomb Group RING finger

**Pcl** : Polycomb-like

**PCL** : Polycomb-like protein

**PDAC** : Adénocarcinome canalaire du pancréas

**Ph** : Polyhomeotic

**PHC** : Polyhomeotic Homolog

**PHF** : PHD finger protein

**Pho** : Pleiohomeotic

**pMN** : Progenitor domain of motoneurons

**PRC1** : Polycomb Repressive Complex 1

**PRC1c** : PRC1 canonique

**PRC1nc** : PRC1 non canonique

**PRC2** : Polycomb Repressive Complex 2

**PRE** : Polycomb Responsive Elements

**Psc** : Posterior sex comb

**PUFD** : PCGF Ub-like fold discriminator

## R

**RAWUL** : Ring-finger And WD40 associated Ubiquitin-Like

**RBBP** : RB binding protein

**REST** : RE1 Silencing Transcription Factor

**RKIP** : Raf-1 kinase inhibitor protein

**RNA-Seq** : Séquençage de l'ARN

**RNF2** : Ring Finger Protein 2

**RPC** : Cellules progénitrices rétinienne

**RT-qPCR** : PCR quantitative après transcription inverse

**RYBP** : RING1 and YY1 binding protein

## S

**SAM** : Motif alpha stérile

**Shh** : Sonic Hedgehog

**STAT3** : Signal transducer and activator of transcription 3

**SUZ12** : Suppressor of Zeste 12

## T

**TALEN** : Transcription Activator-like Effector Nuclease

**TGD** : Duplication du génome des téléostéens

**TH** : Tyrosine hydroxylase

**TL** : Torus longitudinalis

## U

**URL** : Lèvre rhombique supérieure

## V

**Va** : Valvula cerebelli

**VEFS** : VRN2-EMF2-FIS2-Su(z)12

**VGLUT** : Transporteur de glutamate vésiculaire

**VZ** : Zone ventriculaire

## W

**WDR** : WD repeat-containing protein

## Y

**YAF2** : YY1 Associated Factor 2



# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>7</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>17</b>
<b>LISTE DES TABLES</b> .....	<b>19</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>21</b>
1.    LE SYSTEME REPRESSIF POLYCOMB .....	25
1.1    Le complexe Polycomb 1 .....	26
1.1.1    Classification des complexes PRC1 .....	26
1.1.2    Composition des complexes PRC1 canoniques .....	28
1.1.3    Compositions des complexes PRC1 non-canoniques.....	33
A.    PRC1.1.....	33
B.    PRC1.2/4.....	34
C.    PRC1.3/5 .....	34
D.    PRC1.6 .....	34
1.2    Le complexe Polycomb 2.....	35
1.2.1    Cœur du complexe PRC2 .....	36
1.2.2    PRC2.1.....	38
1.2.3    PRC2.2.....	39
1.3    Recrutement des complexes Polycomb .....	40
1.3.1    Modèle de recrutement hiérarchique .....	40
1.3.2    Recrutement par le PRC1 .....	40
1.3.3    Recrutement par les modifications d'histones .....	41
1.3.4    Recrutement par les îlots CpG.....	41
1.3.5    Recrutement par des facteurs de liaison à l'ADN.....	42
1.4    Rôle des complexes Polycomb au cours du développement .....	42
1.4.1    Implication dans la pluripotence et le développement précoce.....	45
1.4.2    Implication dans l'organogenèse .....	48
E.    Système hématopoïétique .....	48
F.    Système nerveux central .....	50
1.4.3    Promoteurs bivalents.....	52
1.4.4    Fonctions non-canoniques d'EZH2.....	55
1.5    Implication des complexes Polycomb dans le cancer .....	58
1.5.1    Implication d'EZH2 dans le cancer .....	61

1.5.2	Fonctions non-canoniques d'EZH2 dans le cancer .....	63
A.	Wnt/ $\beta$ -caténine .....	64
B.	STAT3.....	66
C.	Notch .....	68
1.5.3	Tumeurs cérébrales pédiatriques .....	70
A.	Gliome diffus de la ligne médiane.....	70
B.	Médulloblastome .....	74
2.	LE MODELE POISSON ZEBRE .....	77
2.1	Classification .....	77
2.2	Écologie .....	78
2.3	Spécificités des souches de poisson zèbre utilisées en laboratoire .....	79
2.4	Développement embryonnaire .....	80
2.4.1	Développement du système nerveux central.....	84
2.4.2	Développement du cervelet .....	89
2.5	Utilisation en recherche .....	93
2.5.1	Utilisation en cancérologie.....	95
2.5.2	Utilisation pour le criblage pharmacologique .....	97
2.6	La répression Polycomb chez le poisson zèbre .....	99
2.6.1	Conservation et spécificités des complexes Polycomb du poisson zèbre .....	99
2.6.2	Implications du PRC1 dans le développement du poisson zèbre .....	102
2.6.3	Implications du PRC2 dans le développement du poisson zèbre .....	104
	<b>OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>107</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>111</b>
	Maintenance et préparation des embryons de poisson zèbre.....	111
	Hybridation in situ.....	111
	Génotypage.....	114
	Mesure de l'activité locomotrice.....	114
	Analyse statistique .....	115
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>117</b>
1.	EFFETS DE LA MUTATION EZH2 SUR LE DEVELOPPEMENT NEURONAL .....	117
1.1	Cellules souches neurales .....	117
1.2	Oligodendrocytes .....	119
1.3	Prolifération cellulaire .....	122
1.4	Cellules du cervelet .....	124
1.4.1	Cellules progénitrices du cervelet .....	124
1.4.2	Cellules granulaires et des cellules de Purkinje.....	128
1.4.3	Migration des neurones du cervelet .....	132
1.4.4	Facteurs de transcription FOXP/SKOR .....	133
1.5	Neurotransmetteurs .....	136
1.6	Gènes de la voie Notch.....	140

2.	EFFETS DE LA MUTATION <i>EZH2</i> SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE .....	145
<b>DISCUSSION .....</b>		<b>157</b>
1.	EFFETS DE LA PERTE DE FONCTION D' <i>EZH2</i> SUR LE DEVELOPPEMENT CEREBRAL .....	159
2.	EFFETS DE LA PERTE DE FONCTION D' <i>EZH2</i> SUR LE DEVELOPPEMENT DU CERVELET .....	162
3.	EFFETS DE LA PERTE DE FONCTION D' <i>EZH2</i> SUR LE COMPORTEMENT LOCOMOTEUR.....	167
4.	PERTINENCE DU MODELE <i>EZH2</i> MUTANT POUR L'ETUDE DES DMG ET DES MB.....	169
4.1	Gliome diffus de la ligne médiane .....	169
4.2	Médulloblastome.....	172
5.	UTILISATION DU MODELE <i>EZH2</i> MUTANT POUR LES CRIBLAGES PHARMACOLOGIQUES .....	174
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>		<b>177</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>179</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>235</b>
1.	REFERENCES TABLE 5.....	235
2.	PUBLICATIONS.....	238



# Liste des figures

FIGURE 1. STRUCTURE DE LA CHROMATINE. ....	22
FIGURE 2. LES COMPLEXES PRC1 CANONIQUES ET NON CANONIQUES. ....	27
FIGURE 3. PARALOGUES DES SOUS-UNITES CANONIQUES DU PRC1. ....	30
FIGURE 4. CHANGEMENTS DE COMPOSITION DES COMPLEXES PRC1 AU COURS DE LA SPECIFICATION DES LIGNEES CELLULAIRES. ....	32
FIGURE 5. LES COMPLEXES PRC2. ....	36
FIGURE 6. FONCTIONS DES SOUS-UNITES SPECIFIQUES DU PRC2.1. ....	39
FIGURE 7. REPRESENTATION DES ETAPES DE DIFFERENCIATION CELLULAIRE AU COURS DE L'HEMATOPOÏESE. ....	49
FIGURE 8. ROLES D'EZH2 DANS LA DETERMINATION DES LIGNEES CELLULAIRES AU COURS DU DEVELOPPEMENT. ....	52
FIGURE 9. REGULATION DYNAMIQUE DE LA HIERARCHIE DES GENES LORS DU CHOIX DU DESTIN CELLULAIRE PAR LES COMPLEXES PROTEIQUES PcG. ....	54
FIGURE 10. REGULATION DU DEPOT DE LA MARQUE H3K27ME3 PAR JARID2-K116ME3 AU COURS DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE. ....	56
FIGURE 11. BILAN DES DIFFERENTES FONCTIONS D'EZH2 DANS LES CANCERS. ....	61
FIGURE 12. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT / $\beta$ -CATENINE. ....	65
FIGURE 13. VOIE DE SIGNALISATION JAK-STAT3. ....	67
FIGURE 14. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH. ....	69
FIGURE 15. CHRONOLOGIE DU DEVELOPPEMENT DU POISSON ZEBRE. ....	80
FIGURE 16. COMPARATIF DE LA TRANSITION MATERNELLE-ZYGOTIQUE (MZT) DANS PLUSIEURS ORGANISMES MODELES. ....	81
FIGURE 17. PRINCIPAUX DERIVES DES FEUILLETS EMBRYONNAIRES CHEZ LES VERTEBRES. ....	83
FIGURE 18. ÉTAPES DE LA NEUROGENESE. ....	85
FIGURE 19. FORMATION DES GRANDES SUBDIVISIONS DE L'ENCEPHALE. ....	87
FIGURE 20. MODELE CONVENTIONNEL D'EVERSION CHEZ LES POISSONS A NAGEOIRES RAYONNEES. ....	88
FIGURE 21. COUPE CORONALE SCHEMATIQUE MONTRANT L'ANATOMIE DU CERVELET DU POISSON ZEBRE. ....	90
FIGURE 22. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CERVELET DE LA LARVE DU POISSON ZEBRE A 5 JPF. ....	91
FIGURE 23. VUE SCHEMATIQUE DES DOMAINES PROGENITEURS CEREBELLEUX. ....	92
FIGURE 24. ILLUSTRATION DES SITES D'INJECTION LES PLUS COMMUNS UTILISES LORS DES EXPERIENCES DE XENOTRANSPLANTATION DANS LES EMBRYONS DE POISSON ZEBRE DE 2 JPF. ....	96
FIGURE 25. MODELES <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> POUR LES TESTS DE NEUROTOXICITE DEVELOPPEMENTALE. ....	99
FIGURE 26. MARQUAGE PAR HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DE L'EXPRESSION DE MARQUEURS DES CELLULES SOUCHES NEURALES CHEZ LES LARVES <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> A 5 JPF. ....	118
FIGURE 27. MARQUAGE PAR HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DE L'EXPRESSION DU GENE <i>OLIG2</i> CHEZ LES LARVES <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> AU COURS DU DEVELOPPEMENT LARVAIRE. ....	120
FIGURE 28. MARQUAGE PAR HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DES GENES EXPRIMES DANS LES OLIGODENDROCYTES MATURES CHEZ LES LARVES <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> A 5 JPF. ....	121

FIGURE 29. HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DES MARQUEURS DE LA PROLIFERATION CHEZ LES LARVES <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> AU COURS DU DEVELOPPEMENT. ....	123
FIGURE 30. HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DES MARQUEURS DES PROGENITEURS DU CERVELET SUR LES LARVES <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> AU COURS DU DEVELOPPEMENT. ....	126
FIGURE 31. PROFILS D'EXPRESSION DU GENE <i>PTF1A</i> DANS LE PANCREAS DES LARVES <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> A 5 JPF. ....	127
FIGURE 32. HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DES MARQUEURS DES CELLULES GRANULAIRES ET DES CELLULES DE PURKINJE SUR LES LARVES <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> AU COURS DU DEVELOPPEMENT. ....	130
FIGURE 33. HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DU GENE <i>NTN1A</i> SUR LES LARVES <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> AU COURS DU DEVELOPPEMENT. .	133
FIGURE 34. HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DES REGULATEURS IMPLIQUES DANS LA DIFFERENCIATION DES CELLULES DE PURKINJE SUR LES LARVES <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> A 5 JPF. ....	135
FIGURE 35. HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DES MARQUEURS DES PRINCIPAUX NEUROTRANSMETTEURS SUR LES LARVES <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> A 5 JPF. ....	138
FIGURE 36. HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DES MARQUEURS DES GENES DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH SUR LES LARVES <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> A 2 ET 5 JPF. ....	141
FIGURE 37. ANALYSE DU COMPORTEMENT DE THIGMOTACTISME CHEZ LES LARVES SAUVAGES ET <i>EZH2</i> MUTANTES A 5 JPF. ....	146
FIGURE 38. ANALYSE DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE CHEZ LES LARVES DE POISSON ZEBRE <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> . ....	148
FIGURE 39. ANALYSE DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE CHEZ LES LARVES DE POISSON ZEBRE <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> . ....	151
FIGURE 40. ANALYSE DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE CHEZ LES LARVES DE POISSON ZEBRE <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> ET <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> . ....	153
FIGURE 41. ANALYSE DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE MOYENNE DES LARVES <i>EZH2<sup>-/-</sup></i> ET <i>EZH2<sup>+/+</sup></i> EN FONCTION DE LA PHASE LUMINEUSE. ....	155

## Liste des tables

TABLE 1. LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE RESIDUS DANS LES QUEUES D'HISTONES.....	23
TABLE 2. EXPRESSION DES PCG DANS LES TISSUS NORMAUX. ....	28
TABLE 3. PHENOTYPES DES MUTANTS PCG MURINS.....	43
TABLE 4. RESUME DES SUBSTRATS NON-HISTONES D'EZH2, DU SITE DE METHYLATION ET DE LA FONCTION ASSOCIEE. ....	55
TABLE 5. EXPRESSION ET MUTATIONS DES GENES PCG DANS LES CANCERS HUMAINS. ....	59
TABLE 6. GENES DU POISSON ZEBRE CODANT POUR LES SOUS-UNITES PRC2 ET PRC1.....	100
TABLE 7. RECAPITULATIF DES SONDAS UTILISEES POUR MARQUER LES NEURONES EN FONCTION DE LEURS NEUROTRANSMETTEURS.....	137



## Introduction

Le génome des cellules eucaryotes est organisé en un complexe nucléoprotéique appelé chromatine ([Figure 1](#)). La chromatine est constituée d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones pour former des nucléosomes. Cette structure chromatinienne permet, d'une part, d'organiser structurellement l'information génétique au sein du noyau et, d'autre part, de réguler l'accès de la machinerie transcriptionnelle aux gènes à travers l'établissement de différents niveaux de compaction. En fonction du contexte, la chromatine peut se trouver dans un état condensé, pour empêcher la transcription des gènes, ou, au contraire, dans un état décondensé, ouvert, facilitant ainsi l'expression des gènes. Des protéines associées à la chromatine sont responsables de la modulation de l'environnement chromatinien et contribuent ainsi à établir et à maintenir les profils d'expression génique au cours du temps et des divisions cellulaires. Par conséquent, l'état d'expression d'un gène particulier est déterminé par le niveau de condensation de la chromatine au niveau de ses promoteurs et/ou de ses activateurs ainsi que par la présence de facteurs de transcription (FT) et d'enzymes modifiant la chromatine. La chromatine est donc une structure hautement dynamique dont la plasticité est assurée par le remodelage des nucléosomes, les modifications post-traductionnelles des histones ou l'incorporation de variants d'histones, les protéines de liaison à l'ADN non-histone et les ARN non codants (Tyagi et al., 2016). Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine ([Figure 1](#)). Il se compose de 146 à 147 paires de bases d'ADN et d'un octamère d'histones, lui-même composé de deux exemplaires de chacune des histones (H2A, H2B, H3 et H4) (Zhang et al., 2021). Les histones sont de petites protéines basiques contenant un domaine globulaire de nature hydrophobe, le domaine « histone-fold », de part et d'autre duquel s'étendent les extrémités amino- (N) et carboxyterminales (C), également appelées « queues des histones », qui se lient à l'ADN (Bertin et Mangenot, 2008). Ces queues sont le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles qui changent la charge, la conformation ou les interactions des histones, influencent directement l'état de compaction de la chromatine, et participent ainsi à la régulation fine de l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription ([Table 1](#)). La dynamique des modifications post-traductionnelles des histones repose sur des enzymes spécialisées, responsables soit de leur mise en place (« writers »), soit de leur retrait (« erasers »), souvent organisés au sein de complexes multiprotéiques.

L'équilibre entre ces modifications actives ou répressives est un facteur essentiel du contrôle transcriptionnel.

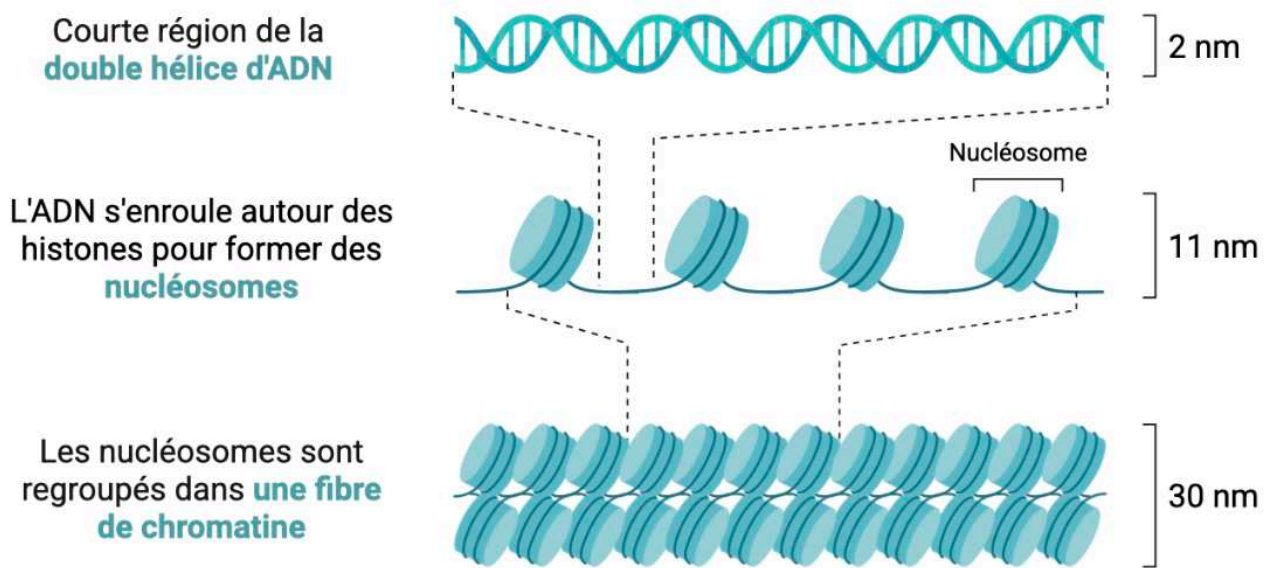


Figure 1. Structure de la chromatine.

L'ADN est enroulé autour d'un octamère d'histone pour former des nucléosomes. Les nucléosomes sont reliés par des segments d'ADN de liaison. Cette structure de base du nucléosome est repliée en une structure fibreuse d'environ 30 nm de diamètre, appelée chromatine. Adapté de Jansen et Verstrepen, 2011. Figure réalisée sur Biorender.com

Les quatre histones principales H2A, H2B, H3 et H4 sont des substrats de la méthylation et de l'acétylation de la lysine. Néanmoins, l'histone H3 est la cible prédominante de ces modifications et semble être la plus étroitement impliquée dans la régulation de la transcription ([Table 1](#)) (Cunliffe et al., 2016). Parmi les marques associées à un état répressif de la chromatine, la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) est particulièrement bien caractérisée. Elle est catalysée par le complexe Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), qui joue un rôle fondamental dans l'établissement de domaines chromatinien silencieux. Cette marque est ensuite reconnue par le Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1), qui consolide la répression en compactant la chromatine et en inhibant l'initiation de la transcription. Ensemble, ces deux complexes forment le système répressif Polycomb, un mécanisme épigénétique conservé impliqué dans le contrôle de l'expression des gènes de développement, le maintien de l'identité cellulaire et la mémoire transcriptionnelle.

Table 1. Les modifications post-traductionnelles de résidus dans les queues d'histones.

Aperçu des modifications post-traductionnelles des histones connues pour être impliquées dans la régulation de la transcription des gènes. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont des substrats d'acétylation (ac), de méthylation (me) et de phosphorylation (P) sur des résidus spécifiques de lysine (K), d'arginine (R) et de sérine (S). Les enzymes qui ajoutent ou suppriment ces modifications sont également présentées. Adapté de Cunliffe 2016.

Histone	Modification	Rôle dans la transcription	Writer	Eraser
H2A	K4/5/7ac	Activation		
	K119ub	Répression	RING1A	
H2B	S33P	Activation		
	K5/11/12ac	Activation		
	K15/16/20ac	Activation		
	K120ub	Activation		
H3	K4me1	Activation	MLL3/4, Set7/9	KDM1A
	K4me2	Activation	MLL, PRDM9	KDM1A
	K4me3	Activation	Set1A/B, MLL	KDM5
	K9me1	Répression	G9a, PRMD3/16	KDM1A, KDM3B, PHF8
	K9me2	Répression	G9a	KDM1A, KDM3B, PHF8
	K9me3	Répression	G9a, Suv39h1	KDM4
	K27me1	Activation		
	K27me2	Répression		KDM6
	K27me3	Répression	EZH2	KDM6
	K36me3	Élongation	SETD2	KDM4
	R17me	Activation	PRMT4	
	K4ac	Activation		
	K9ac	Activation	MOZ	HDAC1/2
	K14ac	Activation	P300/CBP, Tip60	HDAC1
	K18/23ac	Activation	P300/CBP	
	K27ac	Activation	CBP, MOZ	HDAC1/2/3
S10/28P	Activation	MSK1	PP1 $\alpha$	
H4	K20me1	Activation & Répression	Pr-SET7	PHF8, Suv420h1
	K20me3	Activation & Répression	SMYD3/5	
	K5/8/12/16ac	Activation	P300/CBP, Tip60	HDAC1/2



## 1. Le système répressif Polycomb

Les protéines du groupe Polycomb (PcG) ont été initialement découvertes chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) pour leur rôle dans le maintien transcriptionnel répressif des gènes homéotiques (HOX), des gènes essentiels à l'établissement de l'identité segmentaire le long de l'axe antéro-postérieur (Kennison, 1995). Une fois que l'expression des gènes HOX est initiée par des facteurs de transcription régulateurs exprimés de manière transitoire, les complexes Polycomb assurent la mémoire épigénétique de ces états d'expression, permettant de maintenir le bon programme d'expression dans chaque segment, même en l'absence du signal inducteur initial. Chez les vertébrés, les PcG conservent ce rôle fondamental de contrôle spatial et temporel de l'expression des gènes HOX, mais leur fonction s'est élargie à la régulation d'un grand nombre de gènes du développement, au maintien de l'identité cellulaire au cours de la différenciation, ainsi qu'au contrôle du renouvellement et de la différenciation des cellules souches (Schuettengruber et al., 2017). Les complexes Polycomb interviennent également dans des processus post-embryonnaires comme l'organogenèse, la régénération tissulaire, et la tumorigenèse, en modulant durablement l'accessibilité de la chromatine à la machinerie transcriptionnelle.

Les protéines PcG ne sont pas uniformément réparties dans le génome mais s'organisent en domaines nucléaires spécialisés appelés corps Polycomb (Polycomb bodies), qui correspondent à des foyers de répression transcriptionnelle (Pirrotta et Li, 2012). Le nombre, la taille et la distribution de ces corps varient selon le type cellulaire, le stade de développement et l'état de différenciation, suggérant un lien étroit entre l'organisation nucléaire des PcG et leur fonction régulatrice. Par ailleurs, les PcG exercent leur action au sein de deux complexes mutiprotéiques distincts, nommés complexe Polycomb 1 (PRC1) et complexe Polycomb 2 (PRC2). Ces deux complexes agissent de manière hiérarchique et coopérative pour instaurer et maintenir la chromatine dans un état répressif. On distingue pour chacun d'eux des formes canoniques et non-canoniques, selon la nature des sous-unités auxiliaires qui les composent, ce qui confère une spécificité contextuelle à leurs fonctions transcriptionnelles (van Mierlo et al., 2019 ; Geng & Gao, 2020).

## 1.1 Le complexe Polycomb 1

Chez la drosophile, le complexe PRC1 est composé des protéines : Polycomb (Pc), une protéine à chromodomaine qui se lie à H3K27me3, Polyhomeotic (Ph), Posterior sex combs (Psc) et dRing, l'enzyme responsable de l'ubiquitination de l'histone H2A (Gao et al., 2012). Le PRC1 des mammifères contient l'une des six protéines à chromodomaine (CBX2/4/6/7/8), homologues à la protéine Pc de la drosophile, l'enzyme RING1 (ou son paralogue RNF2), une enzyme homologue à dRing, trois homologues à Ph nommés PHC1-3 et l'un des six homologues à Psc regroupés sous le nom de Polycomb Group RING finger (PCGF1-6). La liaison des sous-unités PCGF est essentielle à l'activité enzymatique du complexe PRC1. En s'associant avec RING1/RNF2, l'enzyme catalytique centrale du PRC1, elles stimulent sa fonction ligase E3. L'activité de RING1/RNF2 permet alors la mono-ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub1) (Gao et al., 2012). Cette modification exerce plusieurs effets sur la chromatine et est essentielle à l'activité de répresseur transcriptionnel du PRC1. D'une part, la marque H2AK119ub1 contribue à la compaction locale de la chromatine en coopération avec l'histone H1, ce qui réduit l'accessibilité de l'ADN à la machinerie transcriptionnelle (Zhao et al., 2024). D'autre part, cette marque perturbe l'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II, en bloquant son passage ou en empêchant sa phosphorylation (Stock et al., 2007). Enfin, le dépôt de H2AK119ub1 peut également agir comme plateforme de recrutement du complexe PRC2, ce qui assure une répression renforcée et durable par la coopération entre les deux complexes (Tamburri et al., 2020).

### 1.1.1 Classification des complexes PRC1

Les complexes PRC1 sont classiquement subdivisés en six groupes en fonction de la PCGF qui les compose et sont nommés PRC1.1-6 selon la PCGF associée. Un deuxième niveau de subdivision peut être établi en fonction de la composition des complexes et de leur mode de recrutement. Les complexes dont l'assemblage inclut les protéines CBX sont considérés comme étant les PRC1 canoniques (PRC1c) ; les autres complexes sont qualifiés de non canoniques (PRC1nc) (Geng & Gao, 2020) ([Figure 2](#)).

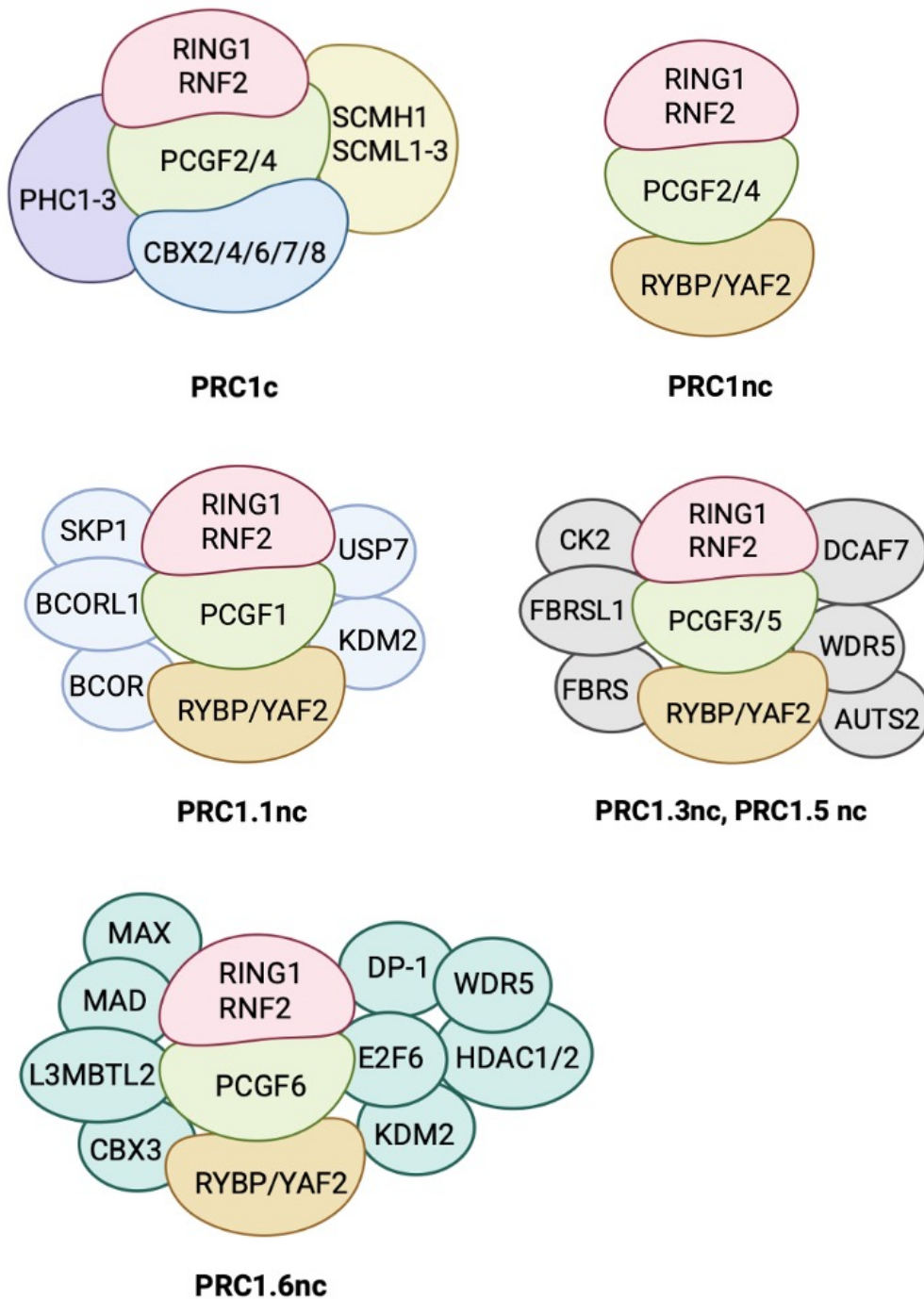


Figure 2. Les complexes PRC1 canoniques et non canoniques.

Le cœur du complexe PRC1 est composé des sous-unités RING1 ou RNF2 en association avec l'une des six protéines PCGF. L'identité de la sous-unité PCGF impose la nature des protéines auxiliaires présentes dans l'assemblage, définissant ainsi divers complexes PRC1 distincts. Figure réalisée sur Biorender.com

### 1.1.2 Composition des complexes PRC1 canoniques

Les PRC1c sont caractérisés par la présence de protéines CBX dans leur assemblage, ce qui permet la liaison de ces complexes à la marque H3K27me3 déposée par le PRC2.

**RING1/RNF2.** L'activité catalytique des complexes PRC1 canoniques est portée par les protéines RING1 (RING1A) et RNF2 (RING1B), deux protéines ubiquitines ligases E3 spécifiques à l'histone H2A (De Napoles et al., 2004). Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un domaine RING, qui s'apparente aux motifs de liaison à doigts de zinc (Lovering et al., 1993) et permet la fixation à l'ADN, et d'un domaine ubiquitine-like associé au WD40 (domaine RAWUL) (Sanchez-Pulido et al., 2008) ([Figure 3](#)). RING1 est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus normaux, en revanche RNF2 présente une distribution tissulaire plus variable ([Table 2](#)) (Sánchez-Beato et al., 2006). En outre, RNF2 est la seule protéine du PRC1 canonique essentielle au développement embryonnaire précoce (Voncken et al., 2003).

Table 2. Expression des PcG dans les tissus normaux.

Table de Sánchez-Beato et al., 2006.

	<i>RING1</i>	<i>RNF2</i>	<i>BMI1</i>	<i>MEL18</i>	<i>RYBP</i>
Testicule	++	+	+	+	-
Placenta	++	+	+	+	++
Glande thyroïde	++	+	+	+	+
SNC	++	+	+	+	-
Pancréas	++	+	+	++	-
Peau	++	+	+	+	-
Amygdale	++	+	+	+	-
Rate	++	+	+	+	
Thymus	++	+	+	+	-
Sein	++	+	+	+	-
Rein	++	+	+	+	-
Glande pituitaire	++	-	-	+	+
Parathyroïde	++	-	++	+	+
Glande surrénale	++	-	+	+	-
Estomac	++	-	+	+	-
Intestin grêle	++	-	+	+	-
Côlon	++	-	+	+	-

Glande parotide	++	-	+	+	-
Prostate	++	-	+	+	-
Utérus	++	-	+	+	-
Voies respiratoires	++	-	-	+	-
Foie	++	-	-	+	-
Ovaires	++	+	+	-	-
Muscle strié	++	-	-	-	-

**PCGF.** Les protéines du groupe Polycomb Group Finger (PCGF) sont les orthologues vertébrés de la protéine Psc identifiée chez la Drosophile. Ce groupe se compose de six paralogues PCGF1-6 qui interagissent avec RING1/RNF2 de façon mutuellement exclusive et créent ainsi six complexes PRC1 distincts (PRC1.1-PRC1.6) (Di Croce et Helin, 2013). Les PCGF présentent une architecture de domaine similaire à celle de RING/RNF2, comprenant un domaine RING qui permet leur dimérisation, et un domaine RAWUL nécessaire à la liaison de diverses sous-unités auxiliaires (Blackledge et Klose, 2021) ([Figure 3](#)). La liaison des PCGF améliore l'ubiquitination médiée par RING1/RNF2 bien que cette capacité d'amélioration diffère en fonction des paralogues PCGF (Connelly et Dykhuizen, 2017). Seules les protéines PCGF2 (MEL18) et PCGF4 (BMI1) composent les PRC1c (PRC1.2 et PRC1.4). Ces deux protéines se distinguent des autres PCGF par la présence d'un domaine supplémentaire riche en sérine PS en C-terminal, qui facilite les interactions avec les autres protéines du complexe (Geng & Gao, 2020). Par ailleurs, leur expression varie en fonction du type cellulaire ([Table 2](#)) (Sánchez-Beato et al., 2006). Par exemple, les cellules souches embryonnaires (ES) contiennent exclusivement MEL18, qui est remplacé par BMI1 dans les cellules progénitrices telles que les cellules hématopoïétiques ou neurales (Connelly et Dykhuizen, 2017) ([Figure 4](#)), dans lesquelles l'expression de BMI1 est nécessaire pour assurer leur auto-renouvellement (Molofsky et al., 2003 ; Park et al., 2003).

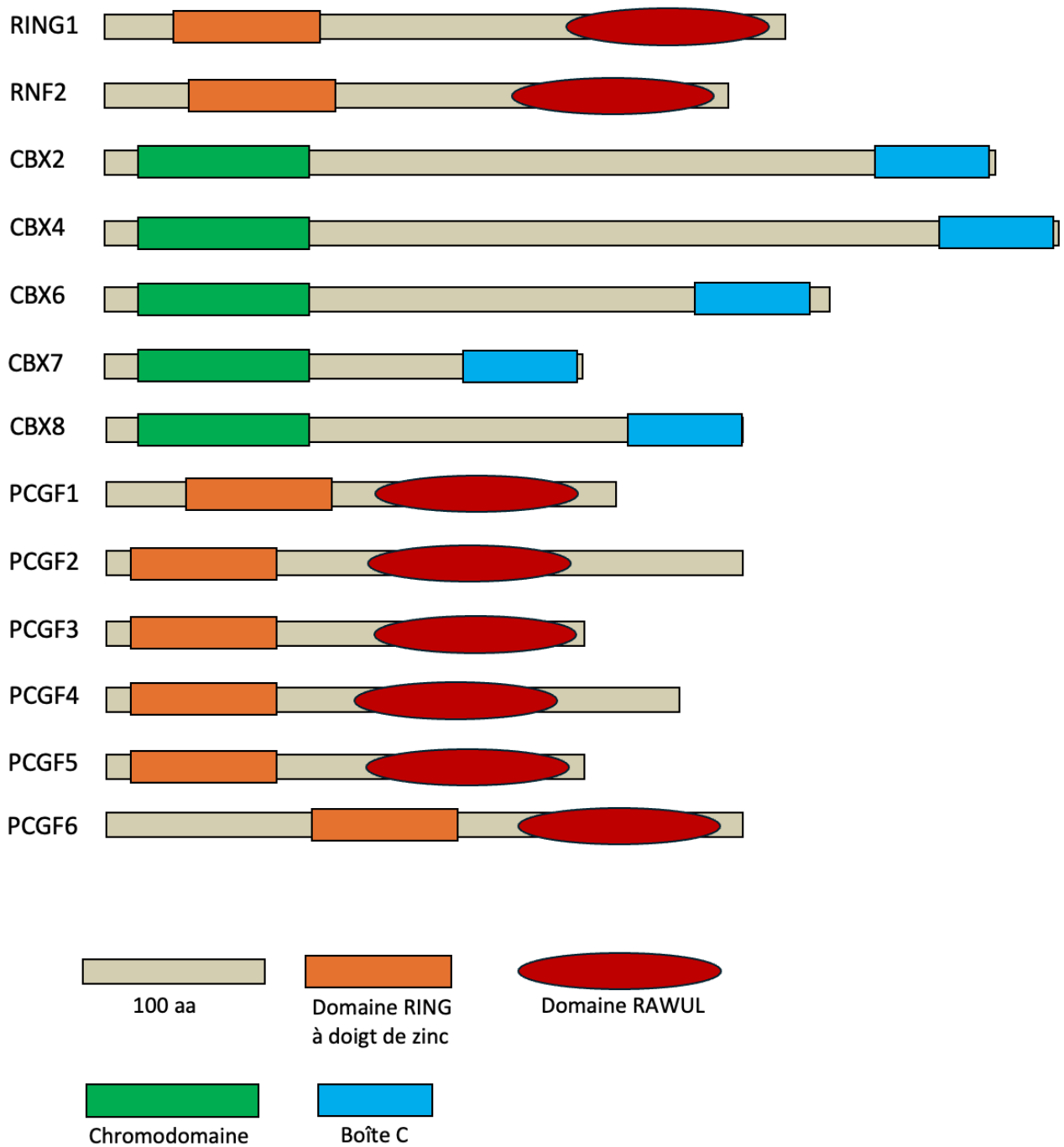


Figure 3. Paralogues des sous-unités canoniques du PRC1.

Chez les mammifères, le PRC1 possède au moins deux paralogues pour chaque sous-unité. Les principaux domaines conservés sont représentés afin de visualiser les similitudes et les différences entre les paralogues. Adapté de Connelly et Dykhuizen, 2017.

**CBX.** La famille de protéines CBX est l'un des deux groupes de protéines spécifiques aux formes canoniques du PRC1, l'autre étant les protéines PHC (Gao et al., 2012). Au sein des complexes PRC1 des mammifères, on trouve six paralogues CBX (CBX2/4/6/7/8) qui sont les orthologues de la protéine Pc de la drosophile. Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un chromodomaine à leur extrémité N-terminale et d'un domaine appelé « boîte C » à l'extrémité C-terminale ([Figure 3](#)) qui permet l'incorporation des isoformes CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 et CBX8 dans les complexes PRC1c. Le chromodomaine des CBX permet la reconnaissance des marques H3K27me3, ce qui leur confère un rôle essentiel dans la liaison du PRC1c à l'hétérochromatine (Van Wijnen et al., 2021). Au cours du développement précoce, les protéines CBX des complexes PRC1c sont impliquées dans la balance entre l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules ES pluripotentes. En outre, en fonction de leur lignée cellulaire, les cellules différenciées expriment différentes combinaisons de protéines CBX, ce qui suggère que ces protéines possèdent des fonctions tissus-spécifiques (Kim et Kingston, 2020). Par exemple, dans les cellules souches hématopoïétiques (HSC), CBX7 est l'isoforme prédominante. Cependant, lors de la différenciation en lignées hématopoïétiques, CBX8 remplace CBX7 (Klauke et al., 2013) ([Figure 4](#)). De la même manière, lors de l'induction de la différenciation, le complexe PRC1 prédominant dans les cellules précurseurs du mésoderme cardiaque précoce est composé de CBX2 qui est remplacé par CBX4 lors de la différenciation en cardiomyocytes (Morey et al., 2015) ([Figure 4](#)).

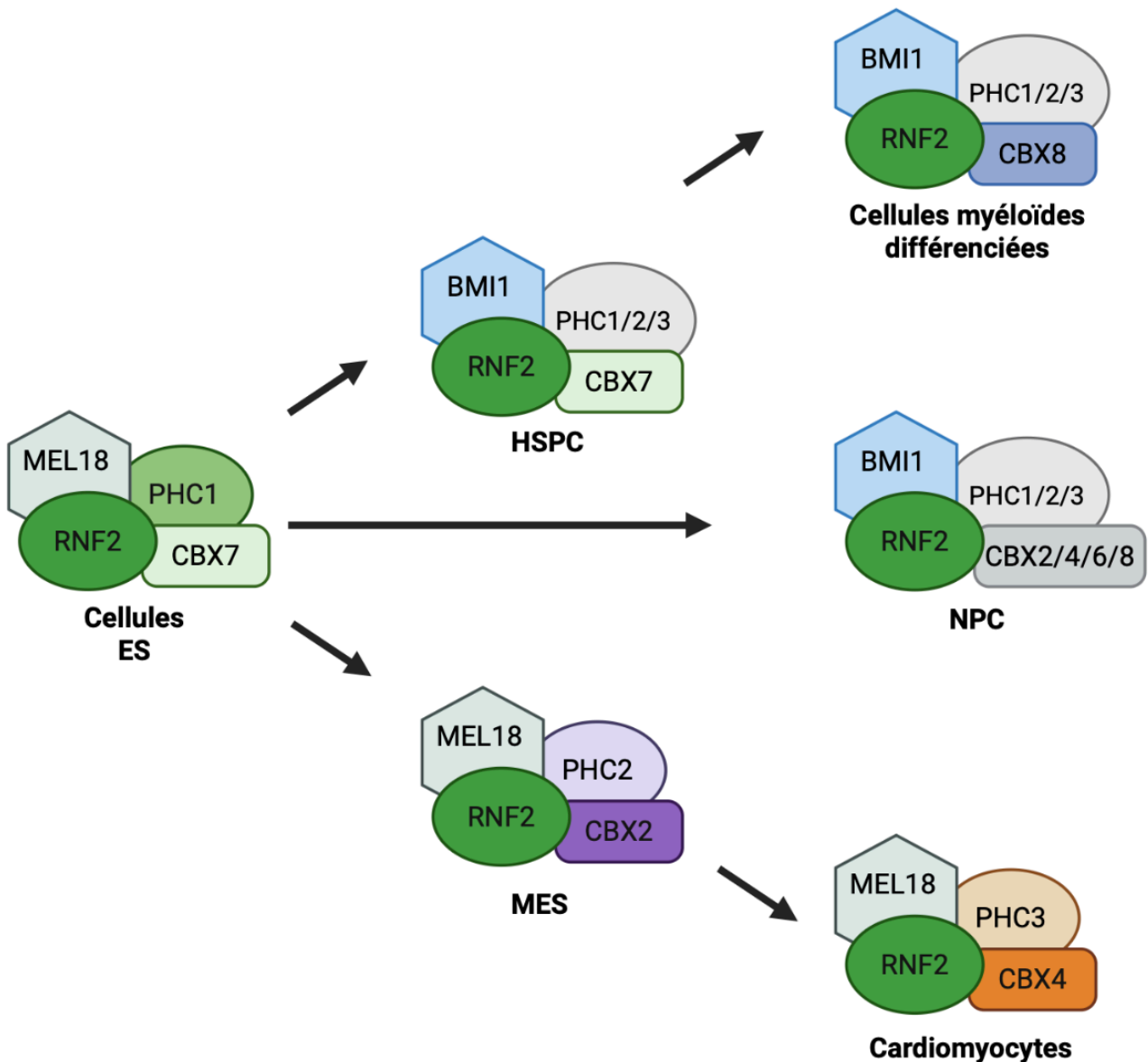


Figure 4. Changements de composition des complexes PRC1 au cours de la spécification des lignées cellulaires.

HSPC : Cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques ; NPC : Cellules progénitrices neurales ; MES : Précurseurs du mésoderme cardiaque précoce. Adapté de Connelly et Dykhuizen, 2017. Figure réalisée sur Biorender.com

**PHC.** Les protéines PHC (Polyhomeotic Homolog) sont les autres composants essentiels uniques du PRC1c. Chez les mammifères, trois protéines PHC (PHC1, PHC2 et PHC3) ont été identifiées. Ces protéines sont connues pour leur capacité à générer des interactions à longue portée via leur domaine à motif alpha stérile (SAM) capable de s'oligomériser (Isono et al. 2013 ; Kim et al., 2002). Les PHC contribuent ainsi à la formation de boucles de chromatine grâce à leur domaine SAM (Bieluszewski et al., 2021). Le PRC1c incorpore ainsi l'un des paralogues PHC en fonction de la lignée cellulaire (Figure 4).

### 1.1.3 Compositions des complexes PRC1 non-canoniques

Les PRC1nc contiennent les protéines RYBP/YAF2, l'une des sous-unités catalytiques RING1/RNF2 et l'une des six protéines PCGF. En fonction de la PCGF présente, diverses unités auxiliaires sont associées au complexe ([Figure 2](#)). Chacune des six protéines PCGF identifiées chez les mammifères peut être intégrée dans les complexes PRC1nc. Les complexes PRC1nc sont ainsi subdivisés en six groupes en fonction de la PCGF qui les compose.

**RYBP/YAF2.** La protéine RYBP (RING1 and YY1 binding protein), ou son homologue YAF2, établit une interaction avec RING1 grâce à un domaine en C-terminal (Garcia, 1999). Il s'agit d'un domaine en doigt de zinc qui comprend un domaine spécifique NZF ayant une fonction de liaison avec l'ubiquitine, ce qui facilite leur association avec la marque H2AK119ub1 (Arrigoni et al., 2006). Cette association permet non seulement de renforcer le dépôt d'H2AK119ub1 par RING1, mais aussi de propager la marque et de maintenir la compaction chromatinienne indépendamment de l'activité du PRC2 (Gao et al., 2012 ; Rose et al., 2016). Par exemple, dans les cellules ES, la présence de RYBP en association avec des PCGF spécifiques peut moduler l'activité enzymatique du complexe et spécifier différentes fonctions biologiques (Morey et al., 2013). Par ailleurs, la distribution de RYBP dans les tissus humains n'est pas ubiquitaire mais localisée dans le placenta, le cordon ombilical, la glande thyroïde et les cellules de l'hypophyse ([Table 2](#)) (Sánchez-Beato et al., 2006). Néanmoins, des études génétiques chez la souris démontrent que RYBP est essentiel à l'embryogenèse précoce (Pirity et al., 2005).

#### A. PRC1.1

Chez les mammifères, en plus de RING1/RNF2, RYBP/YAF2 et PCGF1, le PRC1.1 contient des composants tels que la lysine déméthylase 2B (KDM2B) et la protéine BCOR (BCL6 co-repressor) et son homologue BCORL1 (Geng & Gao, 2020). La sous-unité KDM2B est impliquée dans le ciblage de la chromatine par le PRC1.1, indépendamment de son activité de déméthylation des histones. En effet, KDM2B contient un domaine CxxC à doigt de zinc qui se lie spécifiquement aux dinucléotides CpG non méthylés et permet donc le ciblage des îlots CpG par le PRC1.1 (Tsukada et al., 2006 ; Blackledge et al., 2010). Lors du recrutement par KDM2B, PRC1.1 se lie à ses gènes cibles et dépose H2AK119ub1 qui réprime ensuite la transcription dans les cellules ES de souris (Farcas et al., 2012). Cependant, la perte de fonction de KDM2B dans les cellules ES humaines n'affecte pas gravement le recrutement du PRC1.1

(Wang et al., 2018b). Les résultats de cette étude ont démontré qu'un autre composant du PRC1.1, BCOR, est nécessaire et suffisant pour permettre le recrutement et l'activité répressive du PRC1.1. En effet, les protéines BCOR/BCORL1 possèdent un domaine PUFD capable de se lier au domaine RAWUL de PCGF1, assurant ainsi la formation du complexe PRC1.1 (Wong et al., 2016). La présence de BCOR au sein du complexe PRC1.1 est suffisante pour orchestrer le recrutement du complexe et médier l'activité répressive du PRC1.1 (Wang et al., 2018b).

#### B. PRC1.2/4

Parmi les PCGF, PCGF2 (MEL18) et PCGF4 (BMI1) sont les seules à avoir été identifiées à la fois dans les PRC1c et dans les PRC1nc (Gao et al., 2012). Des études génomiques ont montré que les PRC1.2/4nc sont associés à un taux plus élevé de H2AK119ub1 par rapport aux PRC1.2/4c (Gao et al., 2012 ; Rose et al., 2016). Cette différence s'explique par la présence de RYBP/YAF2 dans les PRC1.2/4nc. En effet, RYBP stimule directement l'activité ligase de RING1/RNF2, augmentant ainsi l'efficacité de l'ubiquitination de H2A sur la lysine 119 (Rose et al., 2016).

#### C. PRC1.3/5

PCGF3 et PCGF5 partagent un groupe d'interacteurs, dont font partie AUTS2, FBRS, FBRS1, WDR68 et CK2 (Gao et al., 2012). Les PRC1.3/5 sont connus pour être impliqués dans l'inactivation du chromosome X grâce à leur liaison au long ARNnc Xist (Almeida et al., 2017). En outre, les protéines PCGF3/5 interagissent directement avec AUTS2, lequel est en contact direct avec CK2 et P300 ; ces deux facteurs contribuent à l'activation transcriptionnelle médiée par PRC1.3/5 (Gao et al., 2014). De la même façon, WDR68 forme un complexe stable avec AUTS2, RNF2 et d'autres composants. Ce complexe est essentiel à l'activation transcriptionnelle, notamment dans les cellules souches embryonnaires mésenchymateuses (Wang et al., 2018a). Ces résultats mettent en évidence que les complexes non-canoniques PRC1.3/5 sont capables d'agir en tant qu'activateurs transcriptionnels contrairement aux complexes PRC1 canoniques.

#### D. PRC1.6

Le PRC1.6 contient plusieurs facteurs associés à l'ADN ou à la chromatine qui contribuent à son recrutement vers les loci cibles, comme MGA, E2F6 ou L3MBTL2. La protéine associée

au gène MAX (MGA) contient des domaines de liaison à l'ADN hélice-boucle-hélice (bHLH) et T-box70. MGA, associé à MAX, reconnaît les motifs boîte E de l'ADN et s'y lie, ce qui induit le recrutement du complexe PRC1.6 en amont du promoteur des gènes (Jolma et al., 2013 ; Stielow et al., 2018). De la même manière, E2F6 forme un hétérodimère avec DP-1/2 pour se lier à une séquence qui reconnaît E2F (Jolma et al., 2013). Enfin, L3MBTL2 contient quatre domaines MBT qui lui permettent d'interagir avec les queues des histones H3 et H4, quel que soit leur niveau de méthylation (Stielow et al., 2014). Cela permet le recrutement des complexes PRC1.6-L3MBTL2 aux loci cibles indépendamment du niveau de méthylation des histones et donc indépendamment de l'activité du PRC2 (Trojer et al., 2011).

### *1.2 Le complexe Polycomb 2*

Chez la drosophile, le cœur du complexe PRC2 est formé des sous-unités Suppressor of zeste 12 (Su(z)12), Extra sex combs (Esc), Enhancer of zeste (E(z)) et Nurf55 (Nekrasov et al., 2007). E(z) est une protéine à domaine SET portant l'activité histone méthyltransférase responsable de la triméthylation H3K27me3, une modification essentielle à la répression transcriptionnelle (Pengelly et al., 2013). Deux complexes PRC2 distincts ont été identifiés chez la drosophile qui sont définis par la présence des sous-unités Polycomb-like (Pcl) ou Jarid2 au sein du complexe (Nekrasov et al., 2007).

Chez les vertébrés, le cœur du complexe PRC2 est composé des sous-unités EED, SUZ12, EZH1/EZH2 et RBBP4/7 ([Figure 5](#)) qui forment deux « lobes » fonctionnels (Glancy et al., 2021). Le lobe catalytique comprend l'un des deux paralogues histones méthyltransférases EZH1 ou EZH2, EED et le domaine C-terminal de SUZ12. Le lobe « de ciblage » est formé par le domaine N-terminal de SUZ12 et de RBBP4 (NURF55) (Bieluszewski et al., 2021). L'activité de répression du PRC2 est médiée par le dépôt de 3 groupements méthyl sur la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) (Conway et al., 2015). Cette marque favorise la formation d'un environnement chromatinien répressif et la compaction de la chromatine (Bracken et al., 2019). Par ailleurs, H3K27me3 sert de site de reconnaissance pour les sous-unités CBX des complexes PRC1c, assurant ainsi le recrutement du PRC1c sur la chromatine et couplant la répression instaurée par le PRC2 à celle du PRC1 (Margueron et Reinberg, 2011).

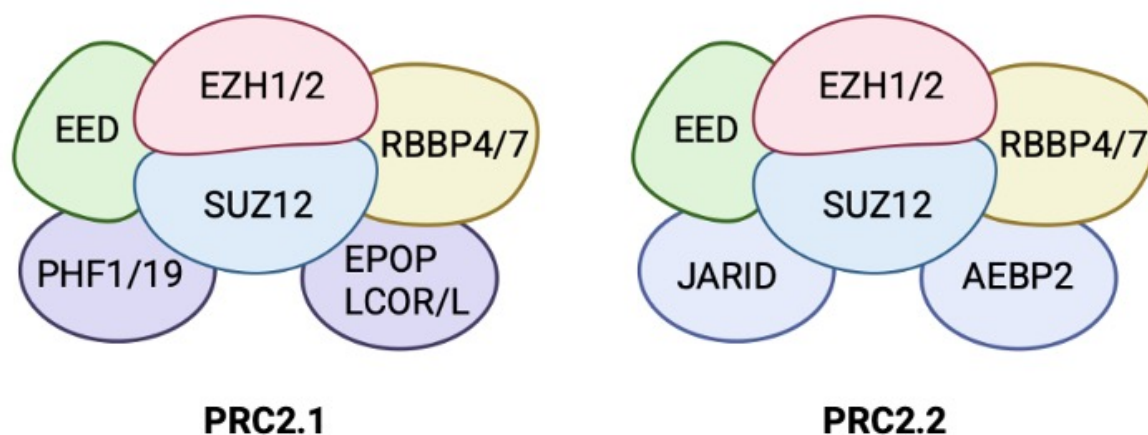


Figure 5. Les complexes PRC2.

Le cœur du complexe PRC2 est composé des sous-unités EZH1/2, EED, SUZ12 et RBBP4/7. Deux complexes PRC2 distincts (PRC2.1 et PRC2.2) sont différenciés en fonction des protéines auxiliaires qui leur sont associées. Figure réalisée sur Biorender.com

### 1.2.1 Cœur du complexe PRC2

**EZH1/EZH2.** L'activité histone lysine méthyltransférase (HKMT) du complexe PRC2 réside dans les protéines EZH1/EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 1/2), lesquels sont les orthologues mammifères de la protéine E(z) identifiée chez la drosophile. Ces protéines contiennent un domaine SET qui leur confère une activité HKMT mais celle-ci nécessite une interaction avec d'autres sous-unités du complexe principal : SUZ12 contenant un doigt de zinc et les protéines à répétition WD40 des sous-unités EED et RBBP4 (Margueron et al., 2009). Les protéines EZH1 et EZH2 sont identiques à 65% et interagissent avec les mêmes sous-unités du PRC2 (Simon & Kingston, 2009). Pourtant, il existe des différences fonctionnelles entre EZH1 et EZH2 : d'une part, la protéine EZH1 possède une activité catalytique plus faible qu'EZH2 (Shen et al., 2008) ; d'autre part, l'analyse des profils d'expression d'EZH1/2 révèle qu'EZH1 est majoritairement exprimé dans les tissus adultes et les cellules ne se divisant pas alors qu'EZH2 est principalement exprimé pendant l'embryogenèse, dans les cellules qui prolifèrent (Simon & Kingston, 2009). Le complexe PRC2-EZH2 est considéré comme étant la forme classique du PRC2, majoritairement responsable de l'activité histone H3 méthyltransférase (Cao et al., 2021). La perte de fonction d'EZH2 cause une diminution drastique de H3K27me2/3, contrairement à la perte d'EZH1 (Margueron et al., 2008). Ainsi, l'activité d'EZH1 n'est capable de compenser la perte d'activité d'EZH2 que partiellement, dans certains contextes tels que la maintenance des cellules souches hématopoïétiques (Mochizuki-Kashio et al., 2015).

**EED.** Chez les mammifères, la protéine EED (Embryonic Ectoderme Development) est l'orthologue de la protéine Esc identifiée chez la drosophile. EED contient six répétitions WD40 à son extrémité C terminale (Denisenko & Bomsztyk, 1997). Ces domaines WD40 sont responsables d'interactions protéine-protéine et protéine-acide nucléique (Neer et al., 1994). La présence des répétitions WD40 permet la liaison des protéines EED et EZH2, nécessaire à l'activité histone méthyltransférase du PRC2 (Han et al., 2007). EED interagit également avec la marque H3K27me3. Cette interaction stimule l'activité HKMT du PRC2, suggérant la responsabilité d'EED dans la propagation de la marque (Hansen et al., 2008 ; Margueron et al., 2009).

**SUZ12.** La protéine SUZ12 (Suppressor of Zeste) contient deux segments d'acides aminés conservés contenant un motif de liaison à doigt de zinc et une boîte VEFS, nécessaire à l'interaction entre SUZ12 et EZH2 (Yamamoto et al., 2004). L'étude de l'inactivation de SUZ12 chez la souris a mis en évidence que la protéine SUZ12 est nécessaire pour l'activité histone méthyltransférase du PRC2, d'une part en garantissant l'intégrité du complexe, d'autre part en agissant sur la stabilité d'EZH2 (Pasini et al., 2004). En outre, la protéine SUZ12 est impliquée dans l'interaction entre EZH2 et les nucléosomes et est donc nécessaire à l'activité catalytique d'EZH2 (Cao & Zhang, 2004).

**RBBP4/7.** RBBP4 et RBBP7 (RB binding protein 4/7) sont des chaperons d'histone jouant des rôles clés dans l'établissement et le maintien de la structure chromatinienne (Murzina et al., 2008). Ces protéines partagent une forte homologie de séquence (environ 90% d'acides aminés en commun) ainsi qu'une redondance fonctionnelle partielle. Elles possèdent des répétitions WD40 permettant une liaison simultanée aux dimères d'histones H3 et H4 et au complexe PRC2 (Vizán et al., 2014). L'incorporation de RBBP4/7 au PRC2 est nécessaire pour assurer la liaison du PRC2 aux nucléosomes non modifiés et est également indispensable pour maximiser l'activité méthyltransférase du complexe (Van Mierlo et al., 2019).

En complément, le complexe cœur du PRC2 interagit avec diverses sous-unités auxiliaires, définissant au moins deux complexes PRC2 distincts : PRC2.1 et PRC2.2 ([Figure 5](#)). PRC2.1 inclut l'une des trois protéines PCL (PHF1, PHF19 ou MTF2) ainsi que EPOP, PALI1 (LCOR) ou PALI2 (LCORL) (Van Mierlo et al., 2019). Les protéines auxiliaires du PRC2.2 sont JARID2 (Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2) et AEBP2 (Adipocyte Enhancer-Binding Protein). Ces facteurs auxiliaires régulent l'activité méthyltransférase H3K27 de plusieurs

façons : par l'augmentation de la liaison du PRC2 à la chromatine, par des interactions avec les modifications d'histone post-traductionnelles et/ou par la régulation de l'activation allostérique du complexe cœur du PRC2.

### 1.2.2 PRC2.1

Le PRC2.1 est caractérisé par la présence d'une des protéines PCL (Polycomb-like protein), impliquées dans le recrutement du PRC2 ([Figure 6](#)). MTF2 permet le recrutement *de novo* du PRC2 à travers la liaison aux îlots CpG non méthylés (Li et al., 2017). PHF1 permet d'augmenter l'activité catalytique du PRC2 en augmentant le temps de liaison du PRC2 à la chromatine et en stimulant le dépôt de la marque H3K27me3 (Sarma et al., 2008). PHF19 permet également de moduler le recrutement et l'activité catalytique du PRC2, d'une façon similaire à ceux de PHF1 (Hunkapiller et al., 2012).

En plus des protéines PCL, la sous-unité EPOP (Elongin BC and Polycomb Repressive Complex 2 Associated Protein) a été exclusivement identifiée en association avec les sous-unités composant le PRC2.1. La présence d'EPOP n'est pas essentielle pour l'établissement des niveaux d'H3K27me3 sur les gènes cibles mais cette protéine est impliquée dans l'interaction du PRC2.1 avec l'élongine B/C (EloB/C) ([Figure 6](#)). Les élongines sont des facteurs associés à l'ARN polymérase II qui stimulent l'activité d'élongation de l'ARN polymérase II engagée dans la transcription génique (Beringer et al., 2016). La connexion EloB/C-PRC2 facilite l'élongation de l'ARN polymérase II et module H3K4me3 et H2Bub1 au niveau des gènes cibles (Liefke et al., 2016), contribuant ainsi à maintenir de faibles niveaux de transcription permissive au niveau des gènes bivalents et fournissant un mécanisme potentiel par lequel PRC2 régule la transcription. La suppression de l'EPOP ou de l'EloB/C entraîne une augmentation de l'occupation de PRC2 et H3K27me3, suggérant que EPOP-EloB/C agit en ajustant les niveaux de PRC2 et H3K27me3 sur les gènes cibles (Beringer et al., 2016).

Finalement, les protéines PALI1 et PALI2 ont été identifiées exclusivement en association avec les sous-unités du PRC2.1. La présence de PALI1/2 et d'EPOP dans le PRC2.1 est mutuellement exclusive (Alekseyenko et al., 2014 ; Kloet et al., 2016). PALI1, ou son paralogue PALI2, interagit avec divers autres régulateurs chromatiniens et favorise l'activité histone méthyltransférase du PRC2 (Conway et al., 2018) ([Figure 6](#)).

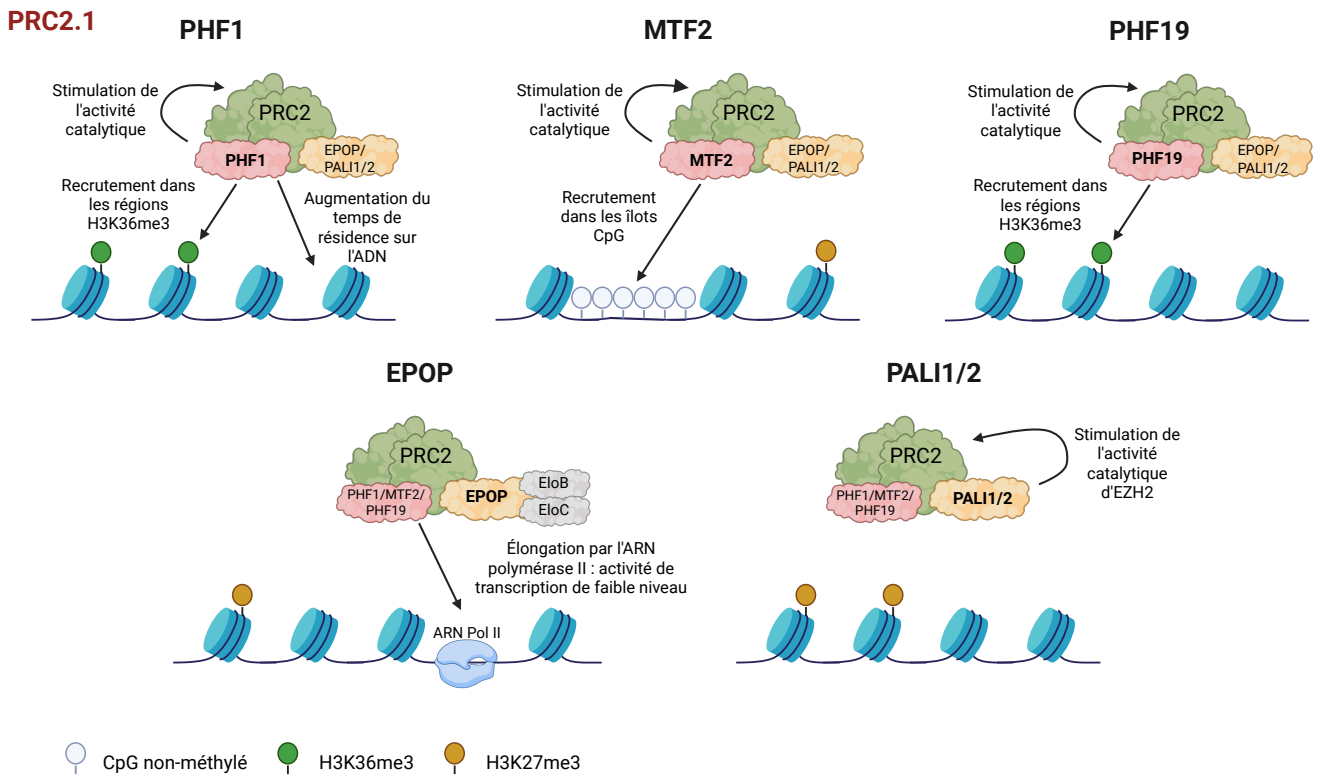


Figure 6. Fonctions des sous-unités spécifiques du PRC2.1.

Les protéines PCL ont principalement des fonctions liées au recrutement. Toutes les protéines PCL stimulent l'activité de PRC2.1. PHF1 et PHF19 peuvent s'associer à H3K36me3 et recruter le PRC2.1 dans des régions génomiques contenant des niveaux élevés de H3K36me3 lors de la différenciation des cellules souches embryonnaires. De plus, PHF1 augmente le temps de résidence du PRC2.1 sur la chromatine. MTF2 recrute le PRC2.1 dans des îlots CpG non méthylés. EPOP s'associe à EloB/C, ce qui maintient de faibles niveaux de transcription. PALI1/2 favorise l'activité catalytique de EZH2. Ainsi, EPOP et PALI1/2 optimisent l'activité du PRC2 au niveau des gènes cibles. Adapté de Van Mierlo et al., 2019. Figure réalisée sur Biorender.com

### 1.2.3 PRC2.2

Au sein du PRC2.2, les sous-unités cœur du PRC2 sont associées à AEBP2 et JARID2 (Van Mierlo et al., 2019). JARID2 est un membre de la famille des protéines Jumonji, contenant un domaine Jumonji C, et a été identifié en tant que facteur contribuant au recrutement du PRC2 à ses gènes cibles (Shen et al., 2008). En outre, il a été démontré que l'activité catalytique d'EZH2 est stimulée par la méthylation de JARID2 sur sa lysine 116 (K116me) (Sanulli et al., 2015). JARID2-K116me agit comme un support de liaison pour le domaine WD40 de EED, induisant un changement conformationnel de PRC2.2 et entraînant une augmentation de l'activité catalytique d'EZH2.

AEBP2 est une protéine à doigts de zinc capable d'interagir avec plusieurs sous-unités du PRC2 : EED, SUZ12 et RBBP4. L'interaction d'AEBP2 avec ces protéines augmente l'activité catalytique du PRC2 (Kim et al., 2009). De plus, AEBP2 stimule la liaison du PRC2 aux nucléosomes et favorise ainsi le dépôt de la marque H3K27me3 par EZH2 (Lee et al., 2018). Finalement, l'étude par cryomicroscopie électronique de la structure du PRC2.2 suggère que AEBP2 imite structurellement une queue d'histone non modifiée et interagit avec RBBP4/7, contribuant ainsi à la stabilité de PRC2.2 (Kasinath et al., 2018).

### *1.3 Recrutement des complexes Polycomb*

Les complexes PRC1 et PRC2 ne possèdent pas de protéine de liaison à l'ADN. Chez la drosophile, les PcG s'associent à des séquences cis-régulatrices spécifiques, appelées Polycomb Responsive Elements (PRE). Le complexe PRC2 est recruté sur les PREs à travers son interaction avec la protéine de liaison à l'ADN Pleiohomeotic (Pho) (Fritsch et al., 1999). Les PREs servent ainsi de plateforme de liaison pour le complexe PRC2 et également pour le PRC1 (Müller et Kassis, 2006). En revanche, chez les mammifères, l'implication de séquences d'ADN spécifiques dans le ciblage des PcG reste incertaine. Néanmoins, différents mécanismes de recrutement des complexes PcG chez les mammifères, ont été proposés et sont détaillés dans les sections suivantes.

#### *1.3.1 Modèle de recrutement hiérarchique*

Historiquement, le premier modèle de recrutement des complexes Polycomb est connu sous le nom de modèle de recrutement hiérarchique. Ce modèle repose sur le fait que la marque H3K27me3, placée par le PRC2, est reconnue par les complexes PRC1c contenant des protéines CBX, à chromodomaine (Cao et al., 2002 ; Min et al., 2003 ; Wang et al., 2004). Ainsi, ce modèle postule que le PRC1c peut être recruté de manière hiérarchique aux sites présentant une activité préexistante de PRC2 et portant la marque H3K27me3. Le modèle de recrutement hiérarchique a depuis été remis en cause et des mécanismes alternatifs de recrutement des PcG ont été proposés.

#### *1.3.2 Recrutement par le PRC1*

Le modèle de recrutement hiérarchique suppose la liaison du PRC1 au niveau de H3K27me3 par les sous-unités CBX alors que ces protéines sont exclusives au PRC1c.

L'identification des complexes PRC1nc suggère donc que le modèle de recrutement hiérarchique ne peut expliquer l'intégralité du recrutement des complexes PRC1. De plus, une série d'études a démontré que le recrutement du PRC1 et l'ubiquitination H2AK119ub1 peuvent survenir indépendamment de l'activité du PRC2 (Pasini et al., 2007 ; Schoeftner et al., 2006 ; Tavares et al., 2012). En outre, la liaison des complexes PRC1nc à la chromatine est suffisante pour initier la formation d'un domaine Polycomb contenant PRC2 et H3K27me3 (Blackledge et al., 2014). Cette activité est spécifique aux PRC1nc et repose sur l'ubiquitination H2AK119ub1. Dans ce contexte, l'équipe de Blackledge et collaborateurs a proposé un modèle de recrutement alternatif basé sur la reconnaissance de l'ADN non méthylé par KDM2B, un élément du complexe PRC1.1nc. Le recrutement du PRC1.1nc induit le dépôt de H2AK119ub1 et permet le recrutement du PRC2, probablement à travers une interaction avec les sous-unités JARID2 et/ou AEBP2. Cet effet est renforcé dans les nucléosomes contenant H2AK119ub1, ce qui suggère la formation d'une boucle de rétroaction positive dans laquelle H2AK119ub1 favorise la liaison du PRC2 et la triméthylation H3K27me3, cette modification favorisant à son tour la liaison des PRC1c via les protéines CBX (Kalb et al., 2014).

### 1.3.3 Recrutement par les modifications d'histones

La reconnaissance de la marque H2AK119ub1 par le PRC2 n'est pas le seul mécanisme de recrutement des complexes Polycomb impliquant la reconnaissance d'une modification d'histone ; la marque H3K27me3 peut également être reconnue par le PRC2 et être utilisée comme plateforme pour propager la triméthylation H3K27 sur les nucléosomes. En effet, la sous-unité EED du PRC2 contient le domaine WD40, qui reconnaît préférentiellement les peptides triméthylés H3K27, H3K9 et H1K26 (Xu et al., 2010). La liaison d'EED à la marque H3K27me3 entraîne l'activation allostérique de l'activité méthyltransférase du PRC2 et fournit ainsi un mécanisme de propagation de la marque (Margueron et al., 2009). En revanche, la liaison d'EED à la marque H1K26me3 a un effet inhibiteur sur l'activité de méthylation du PRC2 (Xu et al., 2010).

### 1.3.4 Recrutement par les îlots CpG

Des analyses pangénomiques ont révélé que les complexes Polycomb s'associent essentiellement aux îlots CpG (Ku et al., 2008 ; Mikkelsen et al., 2007). Les îlots CpG correspondent à de courts segments d'ADN dans lesquels la concentration en dinucléotides

CpG est bien plus élevée que dans le reste du génome. Chez les mammifères, environ 70% des promoteurs de gènes sont associés à un îlot CpG (Saxonov et al., 2006). Les îlots CpG sont ciblés à la fois par le complexe PRC1.1nc et par le complexe PRC2.1. D'une part, la sous-unité KDM2B contient un domaine CxxC à doigt de zinc qui se lie spécifiquement aux dinucléotides CpG non méthylés et permet donc le ciblage des îlots CpG par le PRC1.1nc. D'autre part, il a été démontré que les protéines PCL des complexes PRC2.1 sont capables de se lier à l'ADN contenant des CpG non méthylés par l'intermédiaire d'un domaine en hélice ailé (Li et al., 2017).

### 1.3.5 Recrutement par des facteurs de liaison à l'ADN

Chez la drosophile, le recrutement des complexes Polycomb repose principalement sur des facteurs de liaison à l'ADN spécifiques à la séquence. Cependant, un grand nombre de ces facteurs ne possède pas d'orthologue chez les mammifères. Néanmoins, chez ces derniers, le complexe PRC1.6nc incorpore des sous-unités auxiliaires qui fonctionnent comme des domaines de liaison à l'ADN spécifiques à la séquence (Blackledge et Klose, 2021). C'est par exemple le cas de la sous-unité MAX, qui contient des domaines de liaison à l'ADN bHLH et T-box70. Ces domaines sont importants pour le recrutement du PRC1.6nc sur un sous-ensemble de ses sites cibles, et en particulier sur un certain nombre de gènes spécifiques de la lignée germinale (Endoh et al., 2017). De plus, certains complexes Polycomb peuvent interagir de manière plus transitoire avec des facteurs de liaison à l'ADN. C'est, par exemple, le cas du complexe PRC1.3nc qui reconnaît certains de ses sites cibles dans les cellules ES en interagissant avec les FT USF1 et USF272 (Scelfo et al., 2019). Enfin, d'autres facteurs de liaison à l'ADN, notamment REST, RUNX1 et SNAIL1, ont été proposés pour contribuer au ciblage de PRC1 ou PRC2 dans certains types cellulaires (Ren et Kerppola, 2011 ; Yu et al., 2012 ; Herranz et al., 2008). Néanmoins, l'ensemble de ces études met en évidence que le recrutement des complexes Polycomb par les facteurs de liaison à l'ADN est un mécanisme complémentaire aux autres modes de recrutement et est limité à certains contextes développementaux spécifiques.

## 1.4 Rôle des complexes Polycomb au cours du développement

La régulation épigénétique de l'expression des gènes est un mécanisme clé dans la régulation des choix des destins cellulaires et dans l'acquisition de l'identité cellulaire au cours

du développement. Les PcG possèdent un rôle important dans l'orchestration de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et dans divers processus développementaux. Nombre de ces rôles a été mis en évidence à travers l'inactivation des gènes codants pour certaines PcG chez la souris ([Table 3](#)).

Table 3. Phénotypes des mutants PcG murins.

Liste des modèles murins présentant une mutation homozygote pour un gène associé à une PcG et de leurs phénotypes. Les phénotypes associés aux modèles hétérozygotes ou d'inactivation conditionnelle sont précisés.

Gène	Phénotypes	Références
<b>PRC1</b>		
<i>Ring1</i>	Développement anormal du squelette le long de l'axe antéro-postérieur	Lorente et al., 2000
<i>Rnf2</i>	Létalité embryonnaire. Prolongement de la neurogenèse et retard d'initiation de la gliogenèse.	Voncken et al., 2003 ; Hirabayashi et al., 2009
<i>Cbx2</i>	Mortalité périnatale. Transformations homéotiques du squelette, défauts de l'hématopoïèse. Hypoplasie des gonades et inversion du sexe mâle vers femelle. Réduction de la production des thymocytes.	Katoh-Fukui et al., 1998 ; Katoh-Fukui et al., 2012 ; Coré et al., 1997
<i>Cbx4</i>	Retard de croissance et létalité post-natale, avant le sevrage. Hypoplasie du thymus, défaut de différenciation des cellules souches épithéliales. Réduction de la production des thymocytes.	Piunti et Shilatifard, 2021 ; Luis et al., 2011 ; Liu et al., 2013
<i>Cbx7</i>	Augmentation du tissu adipeux. Développement de tumeurs hépatiques et pulmonaires à l'âge adulte.	Forzati et al., 2014 ; Forzati et al., 2012
<i>Pcgf2</i>	Létalité précoce (entre 3 et 6 semaines). Retard de croissance. Défauts de développement des lymphocytes B et T, hypertrophie du muscle lisse de l'intestin, transformation postérieure de l'axe antéro-postérieur.	Akasaka et al., 1996
<i>Pcgf3/5</i>	Létalité embryonnaire spécifique aux femelles. Supprime la répression génique médiée par Xist.	Almeida et al., 2017
<i>Pcgf4</i>	Retard de croissance. Anomalies du développement neurologique et du système hématopoïétique. Malformations du squelette, le long de l'axe antéro-postérieur.	Van der Lugt et al., 1994

<i>Pcgf6</i>	Forte létalité embryonnaire au stade blastocyste et pendant les phases post-implantatoires. Antériorisation segmentale le long de l'axe antéro-postérieur.	Endoh et al., 2017
<i>Phc1</i>	Létalité périnatale. Défaut de développement du squelette axial. Anomalies dans le développement des dérivés des cellules de la crête neurale.	Isono et al., 2005 ; Takahara et al., 1997
<i>Phc2</i>	Défaut de développement du squelette axial.	Isono et al., 2005
<i>Rybp</i>	Létalité embryonnaire. Anomalies importantes du tube neural chez les souris <i>Rybp</i> <sup>+/-</sup> et les chimères.	Pirity et al., 2005 ; Ujhelly et al., 2015
<i>Kdm2b</i>	Létalité embryonnaire. Graves défauts de croissance, notamment au niveau cérébral. Insuffisance de fermeture du tube neural. Malformations crânio-faciales.	Andricovich et al., 2016
<i>Bcor</i>	Retard de croissance, mortalité précoce. Prédilection à des maladies inflammatoires résultant de réponses hyperimmunes médiées par Th2.	Dent et al., 1997 ; Ye et al., 1997
<i>Auts2</i>	Retard de croissance, petite taille et faible poids de naissance. Phénotypes comportementaux probablement dus à des anomalies du développement cérébral. Perturbation de la migration neuronale corticale.	Gao et al., 2014 ; Hori et al., 2014
<i>L3mbtl2</i>	Létalité embryonnaire post-implantatoire, défauts de prolifération et de différenciation des cellules ES.	Qin et al., 2012
<i>Max</i>	Létalité embryonnaire post-implantatoire.	Shen-Li et al., 2000
<i>Mga</i>	Létalité embryonnaire péri-implantatoire.	Washkowitz et al., 2015
<b>PRC2</b>		
<i>Ezh1</i>	Viable et fertiles. Défaut de maintenance des cellules souches hématopoïétiques. Défauts de régénération musculaire.	Ezhkova et al., 2011 ; Hidalgo et al., 2012 ; Feng et al., 2023
<i>Ezh2</i>	Létalité embryonnaire pendant la gastrulation. Inactivation conditionnelle induit des défauts dans l'hématopoïèse, l'adipogenèse et la neurogenèse.	O'Carroll et al., 2001 ; Su et al., 2003 ; Wang et al., 2010 ; Pereira et al., 2010
<i>Eed</i>	Létalité embryonnaire pendant la gastrulation. Défauts de formation, d'homéostasie et de différenciation des cellules souches hématopoïétiques. La mutation hétérozygote entraîne des défauts myélo- et lymphoprolifératifs.	Faust et al., 1995 ; Yu et al., 2017 ; Lessard et al., 1999

<i>Suz12</i>	Létalité embryonnaire pendant la gastrulation. Inactivation conditionnelle dans la moëlle épinière et la rate : dysfonctionnement des cellules souches hématopoïétiques et défauts de développement des lymphocytes B et T.	Pasini et al., 2004 ; Lee et al., 2015
<i>Rbbp4/7</i>	Inactivation conjointe de <i>Rbbp4</i> et <i>Rbbp7</i> induit une mortalité embryonnaire lors de la transition morula-blastocyste.	Xiao et al., 2022
<i>Mtf2</i>	Létalité embryonnaire. Retard de croissance, altérations squelettiques, défauts dans l'érythropoïèse.	Rothberg et al., 2018 ;
<i>Phf19</i>	Transformations homéotiques, défauts dans le système hématopoïétique.	Vizán et al., 2020
<i>Lcor/Lcorl</i>	Létalité périnatale.	Conway et al., 2018
<i>Jarid2</i>	Létalité embryonnaire. Anomalies du tube neural autour de la région du mésencéphale et du cœur.	Takeuchi et al., 1995 ; Takeuchi et al., 1999
<i>Aebp2</i>	Létalité embryonnaire, transformations antérieures du squelette. Les hétérozygotes présentent un ensemble de phénotypes causés par des défauts de migration des cellules des crêtes neurales.	Grijzenhout et al., 2016 ; Kim et al., 2011

#### 1.4.1 Implication dans la pluripotence et le développement précoce

Les complexes Polycomb jouent des rôles importants dans le développement des mammifères. Des études sur la perte de fonction précoce de certaines PcG réalisées chez la souris ont souligné l'importance cruciale de la répression Polycomb dans les processus précoces du développement telles que la gastrulation et la formation de l'axe corporel. En effet, l'inactivation des gènes codants pour les sous-unités du PRC1 RNF2 et PCGF6 est létale chez la souris, au moment de la gastrulation (Voncken et al., 2003 ; Endoh et al., 2017). La perte de fonction des sous-unités du PRC2, EED, SUZ12, EZH2 et AEBP, est également létale chez la souris à la gastrulation (Faust et al., 1995 ; Pasini et al., 2007 ; O'Carroll et al., 2001 ; Kim et al., 2011). L'activité du complexe PRC2 et, dans une moindre mesure, des complexes PRC1, est donc indispensable lors des étapes précoces du développement embryonnaire.

Au cours des premiers stades du développement des mammifères, l'épiblaste reçoit des signaux inductifs et répressifs pour réguler précisément la sortie de la pluripotence et le début de la différenciation. Dans les cellules ES de souris, les gènes *Suz12*, *Eed* et *Ezh2* du PRC2 ne sont pas indispensables à la pluripotence naïve mais ils sont nécessaires au maintien de la

pluripotence à l'état amorcé (Shan et al., 2017) et à la spécification des précurseurs précoces tels que ceux de l'endoderme primitif (Illingworth et al., 2016). En outre, le PRC2 joue un rôle clé dans la sortie de la pluripotence dans les cellules ES. En effet, la perte de fonction de la sous-unité du PRC2 MTF2 entraîne une réduction de la méthylation H3K27me3 au niveau des promoteurs de FT clés de la gastrulation, ce qui affecte la sorte de la pluripotence des cellules ES (Loh et al., 2021). La protéine EPOP du PRC2.1 joue également un rôle important dans les cellules ES : sa suppression empêche l'interaction du PRC2.1 avec les protéines élongines B/C, ce qui réduit l'élongation de l'ARN polymérase II sur les gènes cibles et réduit leurs niveaux de transcription (Beringer et al., 2016). L'ensemble de ces éléments met en évidence l'importance des PcG dans la régulation de l'expression génique dans les cellules ES. Le PRC1 est principalement non-canonique dans les cellules ES ; la présence de complexes PRC1 canonique dans ces cellules est limitée au complexe contenant CBX7, MEL18, PHC1 et RNF2, tandis que les sous-unités canoniques PRC1 restantes sont transcriptionnellement réprimées (Connelly et Dykhuizen, 2017). Par exemple, le PRC1.6 est impliqué dans la répression des gènes spécifiques des cellules germinales dans les cellules ES. En effet, l'inactivation conditionnelle de *Pcwf6* dans les cellules ES a mis en évidence d'une part un enrichissement de ses cibles dans les gènes liés à la méiose et aux cellules germinales et d'autre part une forte dérégulation de ces gènes en l'absence de PCGF6 (Endoh et al., 2017). Par ailleurs, la répression de l'expression des gènes liés aux cellules germinales médiée par PCGF6 joue probablement un rôle dans la prolifération et la croissance des cellules ES. PCGF6 est également impliqué dans le développement pré- et péri-implantatoire chez la souris (Endoh et al., 2017).

Le plan d'organisation de l'animal est établi à l'issue de la période de gastrulation, sous le contrôle de l'expression des gènes Hox. Ces gènes codent pour des FT à homéodomaine qui instruisent localement la morphogenèse de l'ectoderme axial et du mésoderme de chaque paire de somites (l'unité segmentaire de l'axe antéro-postérieur dans l'embryon en développement). Chez les souris porteuses de mutations dans des sous-unités des complexes Polycomb non-essentiels à la gastrulation, une transformation homéotique est fréquemment observée, suggérant que les PcG sont impliquées dans le contrôle de l'expression des gènes Hox. Par exemple, les souris *Ring1A* homozygotes mutantes présentent un développement anormal du squelette le long de l'axe antéro-postérieur (AP) (Lorente et al., 2000). Le développement de la deuxième vertèbre cervicale est particulièrement affecté et se traduit

par un élargissement de l'arc neural, par une ossification ectopique et par une croissance aberrante du cartilage chez toutes les souris mutantes. En outre, la région de la première vertèbre cervicale est également impactée chez la moitié des souris mutantes. Au niveau thoracique, on observe une antériorisation de l'identité des vertèbres, laquelle a également été observée chez les souris *Pcgf6* homozygotes mutantes (Endoh et al., 2017). A l'inverse, une transformation postérieure de l'axe AP a été mise en évidence chez les souris *Pcgf2* homozygotes mutantes, corrélée à une altération de l'expression de plusieurs gènes Hox dans le mésoderme paraxial en développement (Akasaka et al., 1996). L'inactivation du gène *Bmi1* chez la souris entraîne l'apparition d'un phénotype similaire (Van der Lugt et al., 1994). Ainsi, les phénotypes de transformations homéotiques observés dans les différents modèles murins illustrent le rôle central des PcG dans le contrôle spatial et temporel de l'expression des gènes Hox. Ils soulignent également que la perte de fonction spécifique des différentes sous-unités des complexes PRC1 peuvent conduire à des altérations distinctes de l'organisation corporelle, reflétant ainsi la diversité fonctionnelle des PcG dans la régulation des gènes du développement.

### 1.4.2 Implication dans l'organogenèse

L'étude de la perte de fonction des différentes sous-unités des complexes PRC1 et PRC2 chez la souris a également permis l'observation de phénotypes relativement tardifs, suggérant que certaines de ces sous-unités sont impliquées dans l'organogenèse et les étapes ultérieures du développement. L'organogenèse correspond à la période développementale au cours de laquelle sont formés les différents organes. Cette étape suit la gastrulation et son déroulement nécessite la réponse des cellules progénitrices multipotentes à des signaux de développement qui orientent leur destin cellulaire. Cette période est donc régulée par des changements importants dans l'expression des gènes, permettant ainsi de mettre en œuvre les programmes de différenciation et de maturation cellulaires. A travers leur rôle de répresseur transcriptionnel, les complexes Polycomb jouent un rôle important dans la régulation de l'expression de gènes clés pour le développement de nombreux tissus, notamment le système hématopoïétique ou le système nerveux central.

#### E. Système hématopoïétique

Le développement du système hématopoïétique (ou hématopoïèse) implique des processus d'engagement et de différenciation hautement régulés pour transformer les HSC multipotentes en chacun des nombreux types de cellules sanguines terminalement différenciées ([Figure 7](#)). La multitude de destins cellulaires possibles pour les HSC suggère l'implication de mécanismes épigénétiques pour réguler l'expression de programmes transcriptionnels distincts à partir d'un ADN identique et permettre le développement des différentes lignées cellulaires hématopoïétiques. En effet, l'échec de l'inactivation épigénétique lors de l'hématopoïèse est associé à l'apparition de cancers hématopoïétiques ainsi qu'à une altération des réponses immunitaires (Goyama et Kitamura, 2017 ; Keenan et Allan, 2019).

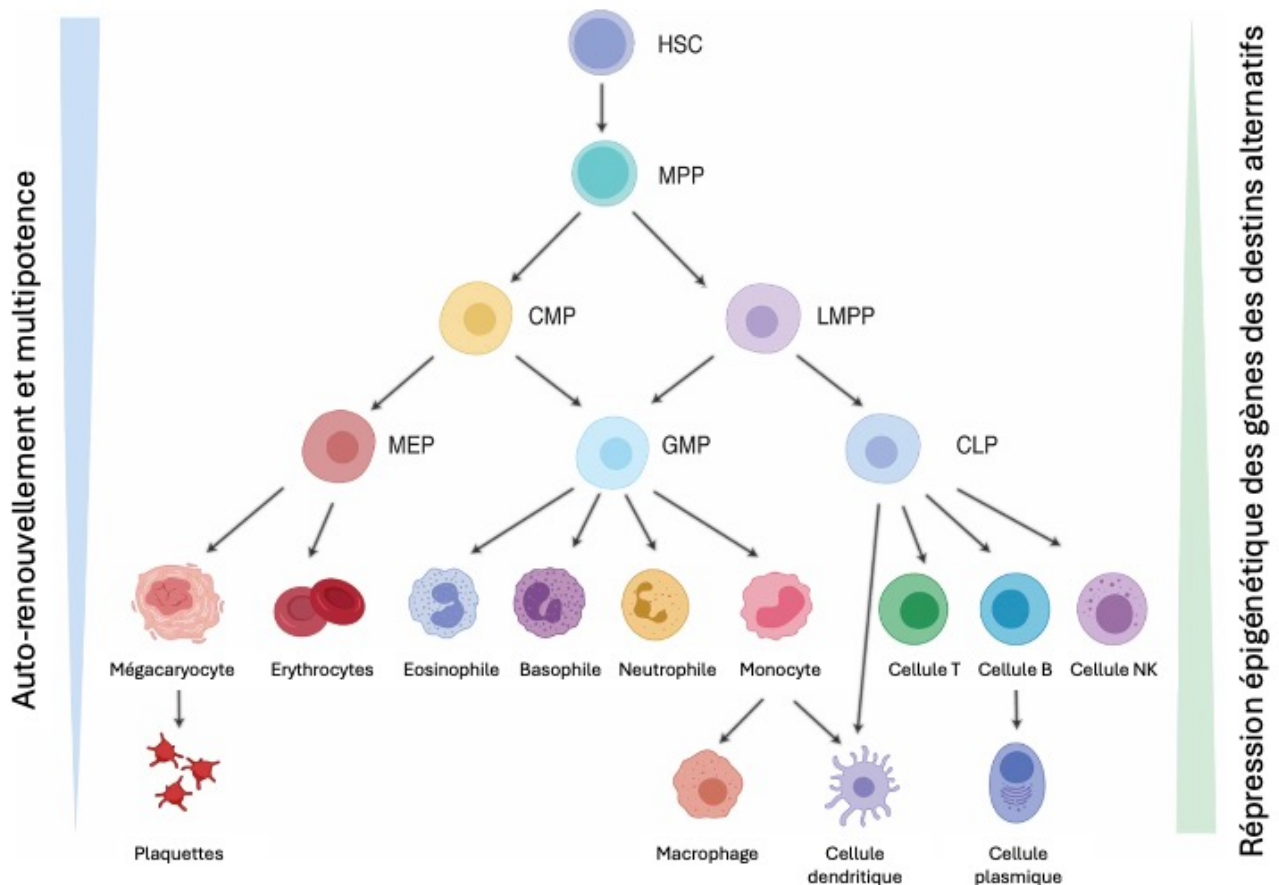


Figure 7. Représentation des étapes de différenciation cellulaire au cours de l'hématopoïèse.

L'hématopoïèse implique l'inactivation épigénétique des gènes des destins alternatifs, réduisant ainsi la multipotence et la capacité d'auto-renouvellement des cellules lors de la différenciation cellulaire. Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) se différencient en progéniteurs multipotents (MPP), qui à leur tour se différencient en progéniteurs myéloïdes communs (CMP), de plus en plus engagés, et en progéniteurs multipotents à amorce lymphoïde (LMPP). Ceux-ci produisent à leur tour les lignées myéloïdes et lymphoïdes, respectivement, via les progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP), les progéniteurs granulocytaires-monocytes (GMP) et les progéniteurs lymphoïdes communs (LMPP). Adapté de Keenan et al., 2021.

Les complexes PRC1 et PRC2 sont impliqués dans le contrôle de l'hématopoïèse à travers la régulation de l'expression de gènes du cycle cellulaire nécessaires à l'auto-renouvellement et à la différenciation, ainsi que les programmes transcriptionnels contrôlant les voies de différenciation et la restriction des gènes à destin alternatif (Keenan, 2021). Dans les HSC, les complexes Polycomb sont responsables de la répression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p16Ink4a ce qui empêche l'arrêt du cycle cellulaire et favorise donc l'auto-renouvellement des cellules (Brand et al., 2019). Plusieurs études ont démontré que la perte de fonction du PRC1 (Majewski et al., 2010) ou du PRC2 (Mochizuki-Kashio et al., 2015 ; Lee et al., 2015 ; Xie et al.,

2014) affecte fortement la fonction et l'auto-renouvellement des HSC. En revanche, la surexpression d'EZH2 dans les HSC augmente fortement leur capacité d'auto-renouvellement (Kamminga et al., 2006). En particulier, la sous-unité EZH1 du PRC2 joue un rôle essentiel dans le maintien des HSC. L'activité d'EZH1 est suffisante pour assurer l'auto-renouvellement des HSC en l'absence d'EZH2 fonctionnel (Mochizuki-Kashio et al., 2015 ; Hidalgo et al., 2012).

Les HSC ont la capacité de générer toutes les lignées de cellules sanguines : les lymphocytes B et T, les érythrocytes, les plaquettes, les granulocytes et les macrophages. Chez la souris, *Ezh2* est abondant dans les sites de lymphopoïèse embryonnaire tels que le foie et le thymus (Hobert et al., 1996). *Ezh2* est fortement exprimé dans les HSC puis son expression est rapidement régulée à la baisse pendant la différenciation (Kamminga et al., 2006), ce qui indique que l'activité d'*Ezh2* est nécessaire pour préserver le caractère souche des HSC. Par ailleurs, l'inactivation conditionnelle d'*Ezh2* dans les cellules de la lignée hématopoïétique réduit la production de lymphocytes B matures dans la moëlle osseuse (Su et al., 2003), suggérant ainsi que l'activité d'*Ezh2* est requise pour la génération des lymphocytes B. *Ezh2* est également nécessaire pour prévenir l'activation aberrante des lymphocytes T naïfs à travers la répression de régulateurs cruciaux (Zhang et al., 2014). Ces études révèlent donc que la sous-unité EZH2 du PRC2 est indispensable au maintien à long terme de l'hématopoïèse et de la maturation de la lignée lymphoïde.

#### F. Système nerveux central

La neurogenèse est un processus fondamental du développement du système nerveux central au cours de laquelle les cellules souches neurales (CSN) génèrent l'ensemble des types cellulaires neuronaux et gliaux. La neurogenèse comprend une succession d'étapes dont l'enchaînement est finement régulé : l'auto-renouvellement des CSN, la production de cellules progénitrices neurales, leur prolifération et enfin leur engagement vers des lignées neuronales ou gliales spécifiques. De nombreuses études ont montré que l'activité du PRC2 est nécessaire au déroulement de la neurogenèse. En effet, il a été démontré que de nombreux gènes impliqués dans la neurogenèse sont des cibles pour le dépôt de la marque H3K27me3 médiée par le PRC2 (Boyer et al., 2006 ; Lee et al., 2006). Par exemple, la perte de fonction de *Suz12* cellules ES induit une réduction de la triméthylation H3K27me3 et empêche l'exécution correcte des programmes de différenciation neuronale (Pasini et al., 2007). En outre, le maintien prolongé de H3K27me3 par l'inhibition de la déméthylase *Jmjd3* spécifique de

H3K27me3 affecte également la différenciation neuronale des cellules ES, ce qui suggère que le dépôt transitoire de H3K27me3 est essentiel au bon déroulement du programme de différenciation neuronale (Burgold et al., 2008 ; Sen et al., 2008). L'activité d'EZH2 est particulièrement importante pour la mise en place d'un large éventail de processus neurogènes. Au cours du développement du cortex cérébral, la suppression conditionnelle d'Ezh2 aux premiers stades embryonnaires induit une différenciation neuronale prématurée, ce qui entraîne une diminution du nombre de neurones à la naissance (Pereira et al. 2010). Plus tardivement, l'activité d'EZH2 est nécessaire pour réprimer l'expression de *Ngn1* et réguler temporellement le passage entre la neurogenèse et la gliogenèse (Hirabayashi et al., 2009). Initialement, *Ezh2* est hautement exprimé dans les CSN en prolifération puis son expression diminue lorsque les CSN se différencient en neurones, jusqu'à être complètement supprimée lors de la différenciation des astrocytes. En revanche, *Ezh2* resté fortement exprimé dans les CSN engagées dans la différenciation des cellules de la lignée oligodendrocytaire, depuis les cellules précurseur des oligodendrocytes (OPC) jusqu'aux oligodendrocytes matures myélinisants. La surexpression et l'inhibition d'*Ezh2* dans les CSN en différenciation entraînent respectivement une augmentation et une réduction du nombre d'oligodendrocytes, démontrant ainsi le rôle important joué par *Ezh2* dans la différenciation des oligodendrocytes (Sher et al., 2008).

EZH2 joue également un rôle essentiel dans le développement du cervelet. En effet, *Ezh2* est fortement exprimé dans le primordium cérébelleux et régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération des cellules progénitrices et la différenciation des neurones du cervelet. Ainsi, l'inactivation d'*Ezh2* dans la partie dorsale du tube neural chez la souris résulte en une hypoplasie du cervelet (Feng et al., 2016). En outre, la migration des précurseurs neuronaux vers les sites de maturation, une étape clé dans la différenciation des neurones du cervelet (Sotelo, 2004), implique également l'activité EZH2 (Di Meglio et al., 2013).

Le PRC1 et le PRC2 semblent jouer des rôles similaires dans la régulation du développement cortical. En effet, chez la souris, l'inactivation conditionnelle dans les progéniteurs neuronaux du gène *EZH2* entraîne la dérégulation de l'expression du gène *NGN1* et affecte le passage de la neurogenèse vers la gliogenèse (Hirabayashi et al., 2009). Ce même phénotype est observé lors de l'inactivation conditionnelle du gène codant pour RNF2 (Hirabayashi et Gotoh, 2010), soulignant l'implication du PRC1 dans la régulation de ce

processus. Par ailleurs, BMI1 est nécessaire à l'auto-renouvellement des CSN, à travers la répression des inhibiteurs du cycles cellulaire p16 et p19 (Molofsky et al., 2003). L'inactivation de *Bmi1* chez la souris entraîne une déplétion précoce des CSN et affecte la neurogenèse, ce qui confirme le rôle essentiel de BMI1 dans le maintien des CSN.

L'ensemble de ces études met en lumière l'implication des complexes PRC1 et PRC2 dans l'organogenèse et notamment dans le développement de l'hématopoïèse et de la neurogenèse. EZH2 semble particulièrement impliqué dans ces processus et de nombreuses études ont démontré d'implication d'EZH2 dans la détermination des lignées cellulaires au cours du développement (Figure 8).

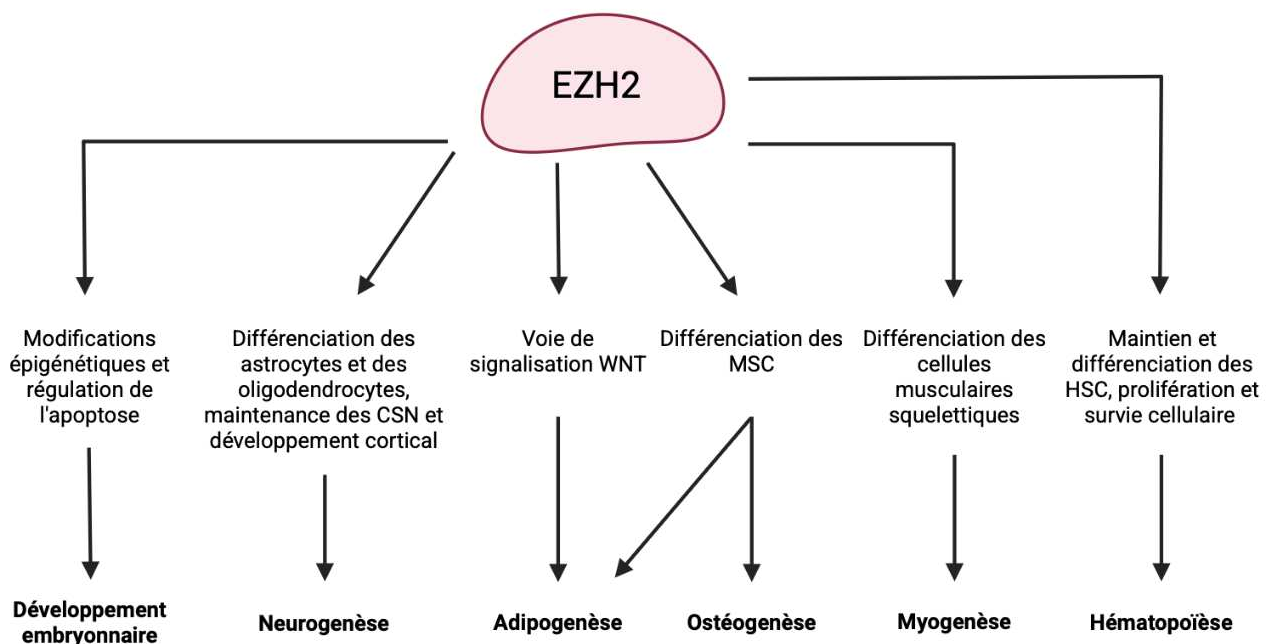


Figure 8. Rôles d'EZH2 dans la détermination des lignées cellulaires au cours du développement.

CSN : cellules souches neurales ; MSC : cellules souches musculaires ; HSC : cellules souches hématopoïétiques. Adapté de Batool et al., 2019. Figure réalisée sur Biorender.com

### 1.4.3 Promoteurs bivalents

L'étude de la méthylation des histones dans les cellules ES a conduit à la découverte que la quasi-totalité des sites de dépôt de la marque répressive H3K27me3 sont également fortement enrichis pour la marque activatrice H3K4me3 (Azura et al., 2006 ; Bernstein et al., 2006). La présence de ces deux marques opposées caractérise les « domaines bivalents », qui se retrouvent souvent au niveau des promoteurs de gènes clés régulés au cours du développement (Bernstein et al., 2006 ; Mohn et al., 2008). La présence de ces domaines

bivalents maintient les gènes dans un état transcriptionnellement inactif en l'absence de signaux de différenciation mais les prépare pour une activation rapide. En effet, une grande partie des gènes cibles des PcG, y compris les principaux régulateurs du développement, sont activés lors de la différenciation et perdent simultanément la marque répressive H3K27me3 (Schuettengruber et Cavalli, 2009) ([Figure 9](#)). Les domaines bivalents prédisposent donc leurs cibles à l'activation transcriptionnelle, mais également à la répression. En effet, l'engagement des cellules dans une voie de différenciation correspondant à un destin cellulaire en particulier entraîne la perte de la marque activatrice H3K4me3 sur les promoteurs de gènes bivalents non induits, alors que la marque répressive H3K27me3 est conservée (Mohn et al. 2008). Ainsi, l'activité histone méthyltransférase du PRC2, médiée par EZH2, est fondamentale pour l'établissement des domaines bivalents et la répression des gènes du développement en l'absence de signaux de différenciation.

L'établissement des domaines bivalents est requis pour la différenciation correcte de différentes lignées cellulaires. Par exemple, dans une étude publiée en 2023, Mätlik et collaborateurs ont démontré que la colocalisation des modifications d'histone H3K4me3 et H3K27me3 régule la migration et la maturation des cellules granulaires du cervelet. En effet, leurs résultats mettent en évidence la présence de domaines bivalents dans les progéniteurs des cellules granulaires en prolifération et montrent que ceux-ci sont enrichis au niveau des promoteurs des gènes neuronaux. En outre, ils ont démontré que la perte de fonction d'EZH1 et d'EZH2 inhibe la migration de ces cellules et induit une accélération de la maturation neuronale. Ainsi, leurs résultats suggèrent l'importance de la présence des domaines bivalents dans le contrôle de l'expression génique au cours du développement du cervelet (Mätlik et al., 2023).

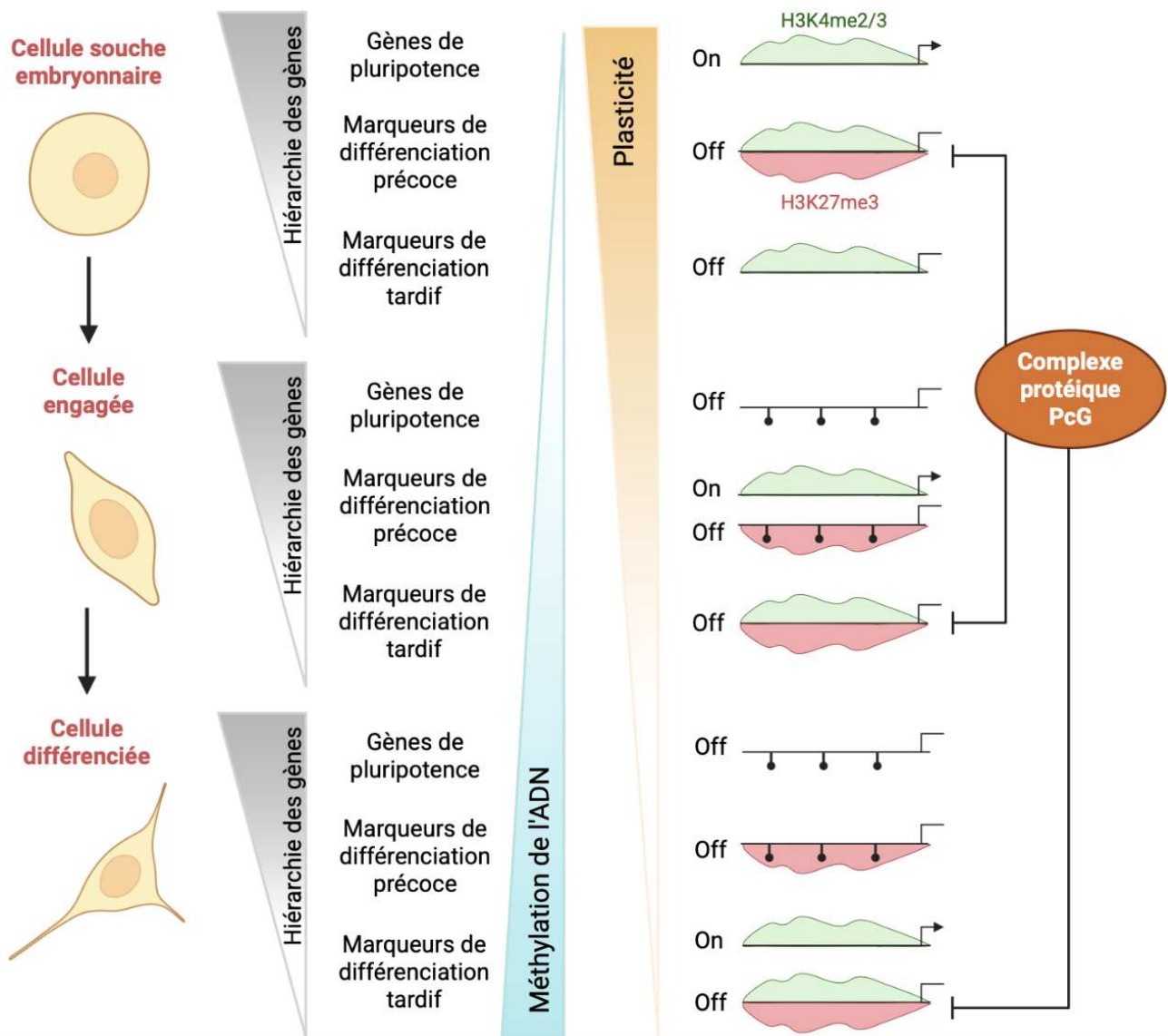


Figure 9. Régulation dynamique de la hiérarchie des gènes lors du choix du destin cellulaire par les complexes protéiques PcG. Dans les cellules souches embryonnaires, de nombreux gènes sont dans un état bivalent, marqués à la fois par des modifications activatrices (H3K4me3) et répressives (H3K27me3). Ces gènes sont maintenus réprimés par les PcG pour préserver l'identité des cellules souches. Lors de l'engagement cellulaire vers une lignée, les gènes spécifiques de cette lignée sont activés en perdant H3K27me3, tandis que d'autres sont définitivement réprimés via perte de H3K4me3 et la méthylation de l'ADN (cercles noirs). En parallèle, les complexes PcG agissent sur les gènes de différenciation plus tardifs, qu'ils répriment avec H3K27me3, créant de nouveaux domaines bivalents. À la fin de la différenciation, certains de ces gènes tardifs sont activés, d'autres restent réprimés. Le nombre total de domaines bivalents reste globalement stable au cours de la différenciation. Adapté de Schuettengruber et Cavalli, 2009). Figure réalisée sur Biorender.com

#### 1.4.4 Fonctions non-canoniques d'EZH2

Au sein du complexe PRC2, l'activité catalytique d'EZH2 est responsable de la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27. Néanmoins, de plus en plus de preuves soutiennent qu'EZH2 est capable d'induire la méthylation de la lysine sur divers substrats non-histones tels que des FT et des protéines associées à la chromatine ([Table 4](#)) de manière dépendante ou indépendante du PRC2. EZH2 exerce donc également des fonctions non-canoniques qui participent au développement embryonnaire. Par exemple, au cours du développement cardiaque, EZH2 interagit directement avec GATA4 et le méthyle au niveau de sa lysine 299, ce qui réduit l'interaction GATA4:p300 et atténue ainsi l'activation transcriptionnelle médiée par GATA4 (He et al., 2012).

Table 4. Résumé des substrats non-histones d'EZH2, du site de méthylation et de la fonction associée.

Adapté de Wang & Wang, 2020.

Substrat	Site	Fonction	Référence
JARID2	K116me2 ; K116me3	Permet la liaison de JARID à EED ce qui induit l'activation allostérique de PRC2.	Sanulli et al., 2015
EZH2	K510me ; K514me ; K515me	Augmente l'activité méthyltransférase du PRC2.	Lee et al., 2019 ; Wang et al., 2019
EloA	K754me	Impacte négativement l'activité du complexe élongine ce qui induit une régulation négative de l'expression des gènes cibles.	Ardehali et al., 2017
STAT3	K180me3 ; K49me2	Favorise l'activation de STAT3.	Kim et al., 2013 ; Dasgupta et al., 2015
PCNA	K110me3	Stabilise le trimère PCNA et son association avec l'ADN polymérase $\delta$ .	A et al., 2018
AR	-	Améliore l'activité AR dans les gènes co-ciblés AR/EZH2 dans les cellules cancéreuses de la prostate.	Xu et al., 2012
GATA4	K299me	Réduit la capacité d'activation transcriptionnelle de GATA4 en empêchant son interaction avec P300.	He et al., 2012

PLZF	K430me	Favorise l'ubiquitination et la dégradation de PLZF dans les cellules natural killer T.	Vasanthakumar et al., 2017
ROR $\alpha$	K38me	Favorise l'ubiquitination et la dégradation du ROR $\alpha$ dans le cancer.	Lee et al., 2012
Taline	K2454me3	Interrompt la liaison de la taline à l'actine F dans les neutrophiles et les cellules dendritiques.	Gunawan et al., 2015

Par ailleurs, EZH2 peut méthyler JARID2, un cofacteur accessoire du PRC2, au niveau de sa lysine 116 (JARID2-K116me3) (Figure 10). La méthylation de JARID2 permet sa liaison avec le domaine WD40 de EED, un domaine favorisant l'activité enzymatique du PRC2. La méthylation de JARID2 par EZH2 augmente donc l'activité méthyltransférase du PRC2, en particulier dans les loci génomiques dépourvus de H3K27me3. Ainsi, la méthylation de JARID2 par EZH2 conduit à la formation d'une boucle de rétroaction qui permet d'ajuster l'activité du PRC2 en fonction du contexte chromatinien. Ce mécanisme est nécessaire pour initier le marquage H3K27me3 sur des loci dépourvus de cette marque, ce qui est crucial lors de l'engagement des cellules dans la différenciation (Sanulli et al., 2015).

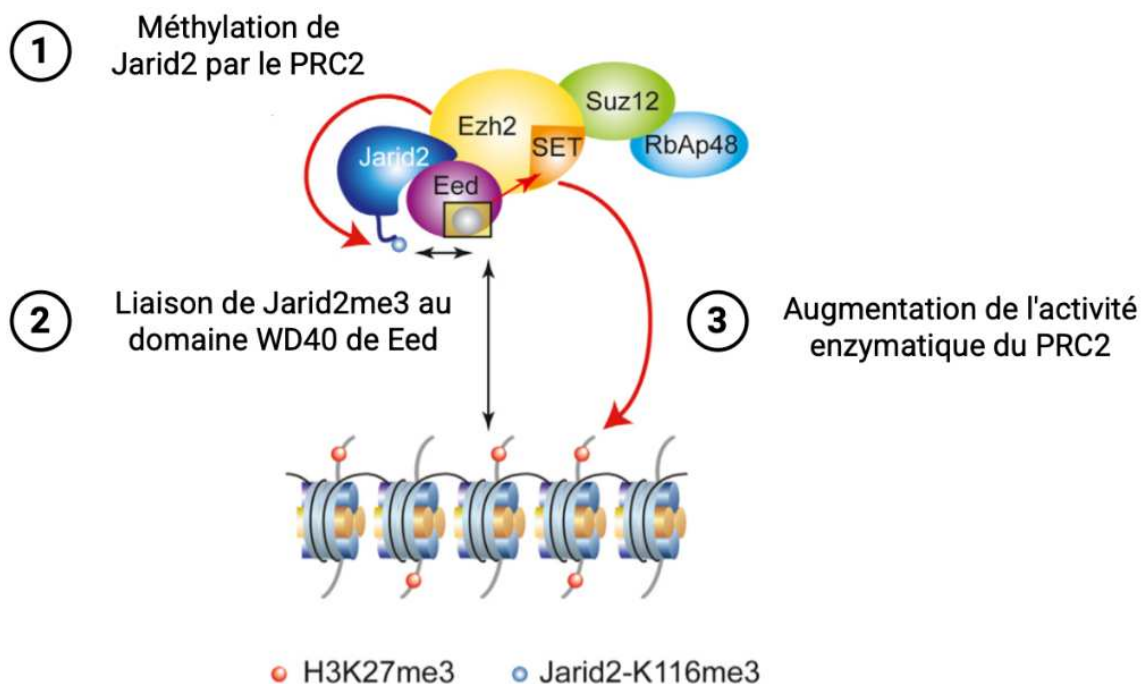


Figure 10. Régulation du dépôt de la marque H3K27me3 par Jarid2-K116me3 au cours de la différenciation cellulaire.

Adapté de Sanulli et al., 2015.

Le PRC2-EZH2 peut également auto-métyler EZH2 au niveau des lysines 510, 514 et 515. L'auto-méthylation d'EZH2 permet son activation en l'absence de cofacteurs stimulants tels que AEBP2. En outre, la présence d'EZH2 auto-méthylé au sein du PRC2 induit une augmentation de l'activité méthyltransférase du complexe, nécessaire à l'obtention de taux adéquats de H3K27me3 dans les cellules. Ce mécanisme pourrait être important lors de la différenciation des cellules souches, où une méthylation *de novo* de H3K27 est nécessaire (Wang et al., 2019).

Une étude a également mis en évidence le rôle du PRC2-EZH2 dans la monométhylation de la lysine 754 d'EloA (EloA-K754me1). EloA forme avec EloB/C le complexe Elongine pour favoriser l'élongation transcriptionnelle par l'ARN polymérase II, nécessaire à l'activation génique (Aso et al., 1995). La méthylation EloA-K754me1 réduit la capacité d'EloA à favoriser la transcription via l'ARN Pol II et permet ainsi de réduire l'expression des gènes cibles. Cette modification s'avère essentielle au bon déroulement de la différenciation cellulaire. En effet, les cellules exprimant une version non méthylable d'EloA présentent une dérégulation transcriptionnelle similaire à celle observée chez les cellules déficientes en PRC2, ainsi que des défauts marqués dans la formation des corps embryoides (Ardehali et al., 2017).

L'ensemble de ces études met en évidence qu'EZH2 est capable d'interagir avec divers substrats et ainsi de réguler l'expression des gènes cibles indépendamment du PRC2. Les fonctions non-canoniques d'EZH2 jouent des rôles importants dans le développement embryonnaire et ont par ailleurs été mises en cause dans le développement de certains cancers.

### *1.5 Implication des complexes Polycomb dans le cancer*

Les mécanismes épigénétiques contribuent à établir l'identité cellulaire ; la perte des marques épigénétiques peut donc entraîner une activation ou une inhibition inappropriée de diverses voies de signalisation cellulaire conduisant au cancer. Le séquençage de nombreuses tumeurs humaines a permis d'identifier des mutations dans les gènes codants pour des facteurs liés à la chromatine, suggérant leur implication dans le développement et la progression de nombreux cancers (You et Jones, 2012). Les complexes Polycomb contrôlent l'accessibilité des éléments régulateurs des gènes à la machinerie transcriptionnelle, leur activité est donc cruciale pour le développement et, est souvent dérégulée dans les cancers. La surexpression ou l'inactivation de certaines sous-unités des complexes PRC1 et PRC2 ont été mis en évidence dans de nombreux cancers ([Table 5](#)). Le paragraphe suivant se concentrera spécifiquement sur l'implication d'EZH2 dans l'initiation et la progression tumorales.

Table 5. Expression et mutations des gènes PcG dans les cancers humains.

Adapté de Sauvageau et Sauvageau, 2010. Les chiffres en exposant correspondent aux références telles qu'indiquées dans la publication d'origine et font référence à la liste disponible en annexe.

	Sous-unité	Anomalie	Type de cancer
<b>PRC2</b>	Ezh2	Surexpression/Amplification	Lymphomes <sup>5, 37</sup> , lymphomes non hodgkiniens à cellules B <sup>35</sup> , cancers de la vessie <sup>1, 5, 29, 41</sup> , cancers du sein <sup>2, 5, 8, 15, 27</sup> , cancers du côlon <sup>5, 22</sup> , glioblastomes <sup>5</sup> , lymphomes de Hodgkin <sup>28</sup> , cancers de la bouche <sup>5</sup> , cancers du foie <sup>33</sup> , cancers du poumon <sup>5</sup> , mélanomes <sup>2</sup> , cancers de la prostate <sup>2, 36</sup> , cancers des testicules <sup>5</sup> .
		Mutation faux sens	Lymphomes <sup>23</sup> , syndromes myélodysplasiques/myéloprolifératifs <sup>10, 25</sup> .
	Suz12	Surexpression/Amplification	Cancers du sein <sup>14</sup> , cancers du côlon <sup>14, 42</sup> , cancers du foie <sup>14</sup> , cancers du poumon <sup>20</sup> , lymphomes <sup>20</sup> , mélanomes <sup>20</sup> , adénomes parathyroïdiens et hypophysaires <sup>20</sup> .
	Phf19	Surexpression	Cancers du côlon <sup>39</sup> , cancers de la peau <sup>39</sup> , cancers du poumon <sup>39</sup> , cancers du rectum <sup>39</sup> , cancers du col de l'utérus <sup>39</sup> , cancers du foie <sup>39</sup> .
<b>PRC1</b>	Ring1	Perte d'expression	Carcinomes rénaux à cellules claires <sup>30</sup> , tumeurs germinales testiculaires <sup>30</sup> .
	Rnf2	Surexpression	Cancers de la vessie <sup>30</sup> , cancers du sein <sup>30</sup> , tumeurs du côlon <sup>30</sup> , tumeurs gynécologiques <sup>30</sup> , cancers du rein <sup>30</sup> , cancers du larynx <sup>30</sup> , cancers du foie <sup>30</sup> , cancers du poumon <sup>30</sup> , lymphomes <sup>30</sup> , mélanomes <sup>30</sup> , cancers du pancréas <sup>30</sup> , cancers de la thyroïde et de la parathyroïde <sup>30</sup> , cancers de la prostate <sup>30</sup> , cancers du thymus <sup>30</sup> , cancers des voies urinaires <sup>30</sup> .
	Cbx7	Surexpression	Lymphome folliculaire <sup>32</sup> .
		Perte d'expression	Cancers du pancréas <sup>13</sup> .
	Phc1	Perte d'hétérozygotie	Leucémies lymphoblastiques aiguës <sup>34</sup> .

	Phc3	Perte d'hétérozygotie	Ostéosarcomes <sup>12, 17</sup> .
	Bmi1	Surexpression/Amplification	Leucémies myéloïdes aiguës <sup>31</sup> , cancers du sein <sup>30</sup> , tumeurs gastro-intestinales <sup>30</sup> , lymphomes <sup>30</sup> , médulloblastomes <sup>18</sup> , neuroblastomes <sup>26</sup> , cancers du poumon <sup>38, 30</sup> , adénomes parathyroïdiens et hypophysaires <sup>30</sup> .
	Pcgf2	Perte d'expression	Carcinomes épidermoïdes cutanés <sup>30</sup> , tumeurs gynécologiques <sup>30</sup> , cancers de la prostate <sup>30, 40</sup> .

### 1.5.1 Implication d'EZH2 dans le cancer

De nombreuses études ont mis en relief l'implication d'EZH2 dans l'initiation et la progression tumorales. En fonction du type de cancer, on trouve des surexpressions/amplifications ainsi que des mutations gain ou perte de fonction touchant la protéine EZH2. La surexpression d'EZH2 est principalement observée dans les tumeurs solides tandis que les mutations gain ou perte de fonction sont identifiées dans les cancers hématologiques. Ainsi, la protéine EZH2 peut jouer un rôle oncogénique ou suppresseur de tumeur en fonction du contexte ([Figure 11](#)).

	<b>Activité répressive</b>	<b>Activité activatrice</b>
<b>Activité oncogénique</b>	<p><b>Surexpression ou amplification</b> Cancers du pancréas, du sein, du foie, des poumons, de la prostate, etc.</p> <p><b>Mutations gain de fonction</b> Lymphomes diffus à grandes cellules B, lymphomes folliculaires.</p>	<p><b>Activité indépendante des PcG</b> Cancers du sein et de la prostate</p>
<b>Activité suppresseur de tumeur</b>	<p><b>Mutations perte de fonction</b> Syndromes myéloprolifératifs et myélodysplasiques, etc.</p>	

Figure 11. Bilan des différentes fonctions d'EZH2 dans les cancers.

Adapté de Koubi et al., 2017.

La surexpression d'EZH2 a été rapportée dans plusieurs cancers tels que ceux du pancréas, de la prostate, du sein, du poumon et de la vessie et, est associée à une augmentation de la marque répressive H3K27me3 (Chase et Crosse, 2011). Par exemple, EZH2 joue un rôle crucial dans la tumorigenèse pancréatique, notamment dans l'adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC), forme la plus fréquente et agressive du cancer pancréatique. EZH2 catalyse la triméthylation H3K27me3, induisant la répression transcriptionnelle de gènes suppresseurs de tumeurs tels que les inhibiteurs de CDK (CDKI), dont la perte de fonction est fréquemment observée dans le PDAC (Ougolkov et al., 2008). Les CDKI sont des protéines qui inhibent les kinases cyclines dépendantes et empêchent ainsi le passage d'un point de contrôle du cycle

cellulaire. L'activité de ces protéines est fondamentale pour contrôler la prolifération cellulaire. En conséquence, la surexpression d'EZH2 dans les PDAC entraîne une répression anormale des CDKI et contribue à la prolifération des cellules cancéreuses pancréatiques. La surexpression d'EZH2 dans les PDAC lui confère donc un rôle oncogénique.

De la même façon, EZH2 joue un rôle central dans le développement et la progression du cancer de la prostate. En effet, dans ce contexte tumoral, EZH2 est fréquemment surexprimé, notamment dans les formes agressives et métastatiques de la maladie, et son expression est corrélée à un mauvais pronostic clinique (Varambally et al., 2002). La cartographie des sites génomiques occupés par le PRC2 dans les tissus cancéreux prostatiques agressifs à un stade avancé ont mis en évidence qu'un grand nombre de ces gènes est sous-exprimé dans le cancer et associé à une faible survie des patients, ce qui concorde avec la surexpression d'EZH2 dans les cancers agressifs (Yu et al., 2007). Ainsi, la surexpression d'EZH2 dans les formes agressives de cancer de la prostate a un effet oncogénique à travers la répression aberrante de l'expression de nombreux gènes, y compris des gènes suppresseurs de tumeur. Par exemple, la surexpression d'EZH2 est responsable de l'accélération de l'invasion cellulaire dans le cancer de la prostate à travers la répression transcriptionnelle du suppresseur de métastases *RKIP* (Ren et al., 2012).

Dans certains lymphomes, des mutations somatiques récurrentes ont été identifiées au niveau de la tyrosine 641 (Y641) dans le domaine catalytique SET de l'EZH2 (Guo et al., 2013). La présence de la protéine EZH2 mutée est associée à une réduction de la mono- et de la diméthylation mais également à une augmentation de la triméthylation H3K27. De la même façon, des mutations du domaine SET d'EZH2 au niveau des résidus alanine 677 (A677G) et alanine 687 (A687V) sont également à l'origine de l'hypertriméthylation de H3K27 (McCabe et al., 2012 ; Majer et al., 2012). Ces mutations gain de fonction favorisent ainsi l'activité répressive d'EZH2, ce qui altère les programmes d'expression géniques dans les lymphomes.

Des mutations touchant EZH2 ont également été révélées dans différents syndromes myéloïdes (Cardoso et al., 2000 ; Ernst et al., 2010 ; Nikoloski et al., 2010). Ces mutations entraînent une perte de fonction d'EZH2 et sont associés à une réduction de la méthylation H3K27me3 et à une dérégulation des gènes cibles, notamment des oncogènes, contribuant ainsi à la tumorigenèse. Les études soulignent la fonction suppressive de tumeur d'EZH2 dans les tumeurs malignes myéloïdes, en plus de son rôle d'oncogène dans d'autres types de cancer.

### 1.5.2 Fonctions non-canoniques d'EZH2 dans le cancer

EZH2 peut également contribuer à la tumorigenèse indépendamment de PRC2 et/ou de ses activités d'histone méthyltransférase (Zimmerman et al., 2023). Par exemple, dans certains cancers de la prostate (cancer de la prostate résistant à la castration et cancer de la prostate androgéno-dépendant), EZH2 agit en tant qu'activateur transcriptionnel indépendamment du PRC2. EZH2 active la transcription du gène récepteur aux androgènes (AR) en occupant directement son promoteur (Kim et al., 2018). Les AR sont des FT hormonodépendants qui jouent des rôles importants dans le développement de la prostate mais qui sont également impliqués dans la tumorigenèse. Ils agissent majoritairement en tant que répresseurs transcriptionnels. Dans le cancer de la prostate, la surexpression d'EZH2 induit l'activation aberrante de la transcription des AR, qui entraîne une augmentation de la signalisation androgénique. En cas de signalisation androgénique excessive, les gènes réprimés par les AR peuvent devenir excessivement inhibés entraînant une différenciation cancéreuse (Zhao et al., 2012). De la même façon, EZH2 agit comme activateur transcriptionnel de la sous-unité RelB, impliquée dans la signalisation NF- $\kappa$ B, pour stimuler l'auto-renouvellement cellulaire et favoriser l'initiation tumorale dans le cancer du sein triple-négatif (Lawrence et Baldwin, 2016).

Par ailleurs, la méthylation des protéines joue un rôle clé dans les voies de signalisation. Au cours du développement embryonnaire, les voies de signalisation jouent un rôle central dans l'orchestration des processus morphogénétiques et dans la spécification des différentes lignées cellulaires. Ces cascades de signaux permettent la coordination spatio-temporelle des événements de prolifération, de différenciation, de migration et d'apoptose indispensables à la formation correcte des tissus et des organes. De nombreuses études ont révélé qu'EZH2 est capable de réguler directement ou indirectement certaines voies de signalisation ; or la dérégulation des voies de signalisation est à l'origine du développement de certains cancers. Par exemple, dans le cancer du sein, la surexpression ciblée d'EZH2 dans l'épithélium mammaire de souris transgéniques entraîne l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Li et al., 2009). Les auteurs ont démontré que EZH2 interagit directement avec  $\beta$ -caténine dans les cellules hyperplasiques favorisant ainsi la transcription de gènes prolifératifs comme cyclin D1.

## A. Wnt/ $\beta$ -caténine

La voie de signalisation Wnt joue un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Clevers, 2006). Dès les premiers stades du développement embryonnaire, la voie Wnt est impliquée dans l'établissement de l'axe corporel, puis elle est nécessaire au développement de nombreux organes (Smalley et Dale, 1999). Les voies de signalisation Wnt comprennent quatre branches parmi lesquelles la voie Wnt/ $\beta$ -caténine considérée comme la voie canonique. Cette voie est activée par la liaison des protéines WNT au récepteur Frizzled et au co-récepteur LRP5 ou LRP6, localisés sur la membrane cellulaire (Batool et al., 2019). L'activation de cette voie induit la stabilisation et l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme qui se transloque dans le noyau et stimule la transcription des gènes cibles ([Figure 12](#)).

Plusieurs études ont mis en évidence qu'EZH2 contribue directement et/ou indirectement à l'activation constitutive de la voie de signalisation Wnt canonique ; or l'activation aberrante de la voie Wnt est mise en cause dans le développement de divers cancers (Cheng et al., 2011 ; Jung et al., 2013 ; Li et al., 2009 ; Shi et al., 2007). Par exemple, dans le carcinome hépatocellulaire (HCC), EZH2 se lie aux promoteurs des gènes codant pour des antagonistes de la voie Wnt et inhibe leur expression, ce induit l'activation constitutive de la signalisation Wnt / $\beta$ -Caténine. L'activité d'EZH2 stimule ainsi la prolifération des cellules du HCC en régulant positivement l'expression des gènes cibles de la voie Wnt / $\beta$ -caténine *CCND1* et *EGFR* (Cheng et al., 2011). En outre, la transcription des gènes cibles de Wnt / $\beta$ -caténine peut également être améliorée par le recrutement d'EZH2 directement dans le complexe transcriptionnel de la  $\beta$ -caténine (Jung et al., 2013).

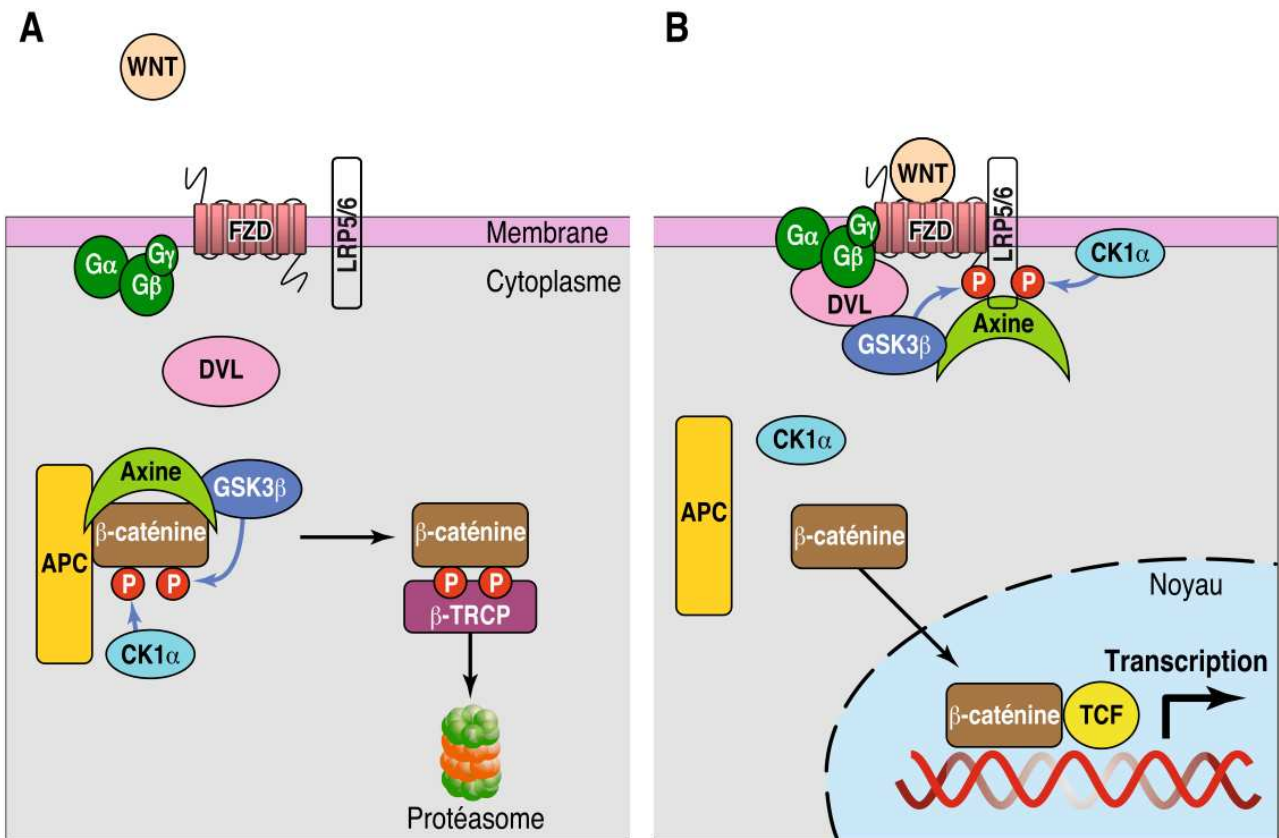


Figure 12. Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt / $\beta$ -caténine.

A) En l'absence de stimulation des récepteurs Frizzled (FZD) par un ligand Wnt, la  $\beta$ -caténine est phosphorylée dans un complexe de destruction dont fait notamment partie l'axine. Cette phosphorylation conduit à la dégradation de la  $\beta$ -caténine par le protéasome. B) La liaison d'un ligand Wnt sur le récepteur FZD permet la phosphorylation du corécepteur LRP5/6 et le recrutement de l'axine à la membrane. La  $\beta$ -caténine non phosphorylée peut donc entrer dans le noyau, où elle s'associe aux facteurs de transcription TCF ou LEF et active la transcription des gènes cibles. Figure de Robert, 2010.

## B. STAT3

La signalisation STAT3 joue un rôle central dans le contrôle de la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire mais également le développement de l'inflammation (Yue et Turkson, 2009). Les protéines STAT3 sont des facteurs de transcription cytoplasmiques activés par phosphorylation. Cette voie est activée en réponse à divers signaux extracellulaires tels que les cytokines (ex. IL-6) ou les facteurs de croissance (ex. EGF) à travers l'activation de ces récepteurs membranaires et des kinases associées de type Janus Kinases (JAK). Une fois phosphorylés, STAT3 se dimérise et se transloque au noyau où il stimule la transcription de nombreux gènes cibles, notamment certains impliqués dans l'oncogenèse (Yu et al., 2014) ([Figure 13](#)). L'activité de cette voie de signalisation est strictement régulée dans les tissus normaux mais son activation constitutive a été associée au développement de plusieurs cancers. Dans ce contexte, plusieurs études ont montré une coopération fonctionnelle entre EZH2 et STAT3. Par exemple, dans le cancer de la prostate résistant à la castration, EZH2 est phosphorylé au niveau de sa sérine 21 (pS21) et agit alors comme coactivateur pour la transcription d'un sous-ensemble de gènes essentiels à la croissance tumorale (Xu et al., 2012). La présence de EZH2-pS21 est notamment impliquée dans le développement des glioblastomes multiforme (GBM). Dans ce cancer, la phosphorylation d'EZH2 favorise son interaction avec STAT3 et résulte en la triméthylation de STAT3 au niveau de sa lysine 180. La triméthylation de STAT3 induit une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine et l'activation de STAT3. EZH2 agit ainsi en tant qu'activateur transcriptionnel de STAT3 dans le développement des GBM (Kim et al., 2013).



### C. Notch

La voie de signalisation Notch joue un rôle important dans les décisions relatives au destin cellulaire au cours du développement précoce et dans des étapes plus tardives comme la neurogenèse (Artavanis-Tsakonas et al., 1999 ; Blader et al., 1997). L'activation de la voie dépend de la liaison d'un ligand transmembranaire de la famille DSL (*Delta*, *Serrate*, *Jagged*) au récepteur Notch. Cette liaison induit une coupure du domaine extracellulaire du récepteur Notch puis une coupure du domaine transmembranaire. Le domaine intracellulaire du récepteur Notch (NICD) rentre alors dans le noyau et s'associe à un complexe protéique pour activer la transcription ([Figure 14](#)).

La voie de signalisation Notch est dérégulée dans de nombreux cancers, notamment par la surexpression des récepteurs Notch et de leurs ligands (Shao et al., 2015). Une étude a révélé que, dans les GBM, EZH2 est impliqué dans la régulation de l'expression de *NOTCH1*, en interagissant directement avec son promoteur (Zheng et al., 2017). EZH2 agit alors comme un activateur de la signalisation Notch, ce qui favorise le maintien des populations de cellules souches cancéreuses. Cette voie de signalisation EZH2-NOTCH1 a également été mise en cause dans le développement du cancer du sein triple-négatif (Gonzalez et al., 2014).

L'inhibition de la voie de signalisation Notch est également impliquée dans le développement de certaines pathologies comme la sclérodermie systémique ou la myopathie de Duchenne. Plusieurs études ont révélé l'implication d'EZH2 dans la dérégulation de la signalisation Notch dans ces pathologies (Tsou et al., 2018 ; Acharyya et al., 2010). En effet, les résultats de ces études démontrent qu'EZH2 inhibe la fonction Notch en réprimant l'expression du ligand Notch Delta-like 4 (DLL4) et en favorisant la méthylation du promoteur de *NOTCH1*.

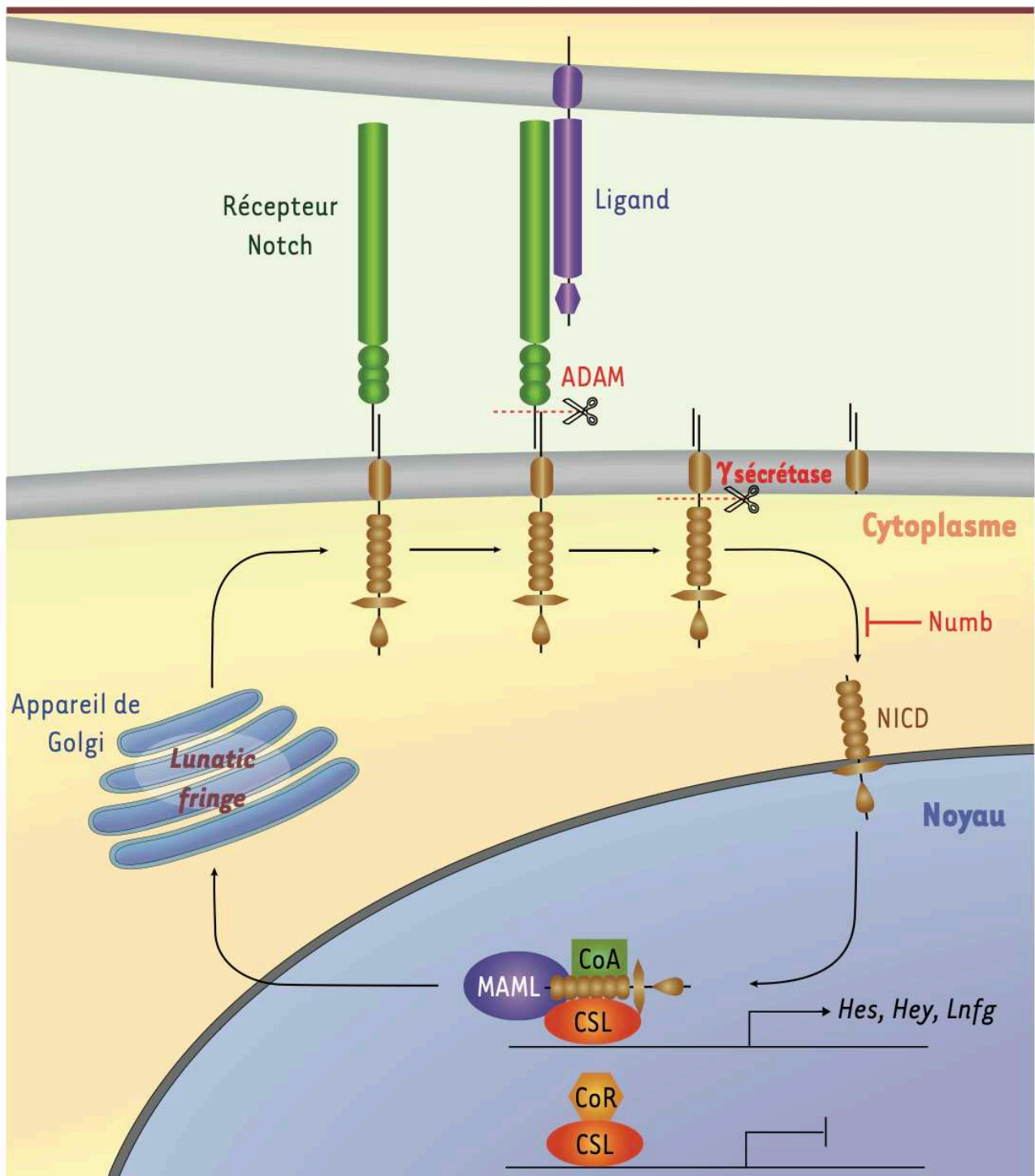


Figure 14. Représentation schématique de la voie de signalisation Notch.

L'interaction du récepteur Notch avec les ligands Delta et Jagged entraîne son clivage, ce qui libère le domaine intracellulaire du récepteur (NICD) dans le cytoplasme de la cellule réceptrice. Le NICD est transloqué dans le noyau où il interagit avec le complexe CSL associé à des corépresseurs (CoR), ce qui permet le recrutement de coactivateurs transcriptionnels (CoA) et l'activation de la transcription des gènes cibles de la voie Notch. Figure de Mayeuf et Relaix, 2011.

L'ensemble des études mentionnées met en évidence que l'activité d'EZH2 peut être détournée dans différents cancers. Selon le contexte tumoral, EZH2 peut adopter des fonctions d'oncogène ou de suppresseur de tumeur. EZH2 peut également agir de manière indépendante de sa fonction de sous-unité méthyltransférase du PRC2, participant ainsi à la régulation de diverses voies de signalisation pro-tumorales. L'ensemble de ces observations souligne l'importance d'une régulation précise de l'activité d'EZH2 et du dépôt la marque H3K27me3 pour le contrôle des programmes cellulaires, dont la dérégulation peut conduire à des pathologies graves. Récemment, des altérations du niveau global de H3K27me3 ont également été observées dans certains cancers, en l'absence de mutations d'EZH2. Ces anomalies suggèrent l'existence de mécanismes de dérégulation alternatifs touchant la dynamique des marques épigénétiques, en particulier dans des tumeurs pédiatriques du système nerveux central.

### 1.5.3 Tumeurs cérébrales pédiatriques

Les tumeurs cérébrales représentent un défi majeur en oncologie pédiatrique, tant en termes de compréhension biologique que de prise en charge clinique. Parmi elles, le gliome diffus de la ligne médiane (en anglais Diffuse Midline Glioma ou DMG) et les médulloblastomes sont particulièrement difficiles à traiter étant donné leur localisation et de leur agressivité. Ces cancers surviennent très tôt au cours du développement et sont associés à un pronostic sombre en raison de leur faible réponse aux traitements actuels. De récentes études ont mis en relief leur lien étroit avec des altérations épigénétiques, affectant en particulier la répression Polycomb médiée par le complexe PRC2.

#### A. Gliome diffus de la ligne médiane

Le DMG est une tumeur cérébrale maligne très agressive localisée dans une partie du tronc cérébral appelée le pont. Des mutations somatiques de l'histone H3, qui entraînent une substitution de la lysine par une méthionine spécifiquement en position 27 (H3K27M), ont été identifiées chez 78% des patients atteints de DMG (St. Jude Children's Research Hospital - Washington University Pediatric Cancer Genome Project, 2012) et se produisent principalement sur les gènes codants pour les histones H3.1 et H3.3, soit les gènes *HIST1H3B* et *H3F3A*, respectivement (Castel et al., 2015). L'analyse de tumeurs DMG H3K27M a mis en évidence que cette mutation entrave l'activité du PRC2, ce qui se traduit par une réduction

drastique de la triméthylation H3K27me3 et une légère augmentation de l'acétylation H3K27ac (Lewis et al., 2013). Néanmoins, l'analyse de la distribution globale d'H3K27me3 a souligné qu'un nombre important de gènes conservent la marque H3K27me3 dans les DMG H3K27M (Bender et al., 2013 ; Chan et al., 2013). Actuellement, deux modèles sont proposés pour expliquer la perte de H3K27me3 dans les tumeurs/cellules exprimant H3K27M : le modèle de séquestration et le modèle d'exclusion H3K27M/H3K27ac. Le modèle de séquestration postule que l'inhibition de l'activité du PRC2 serait liée à l'interaction entre H3K27M et le domaine SET d'EZH2 (Justin et al., 2016). Les similitudes de configuration et de propriétés de charge entre la lysine liée au domaine SET et la chaîne latérale de la méthionine permettent la liaison d'EZH2 à la méthionine. Cependant, la liaison du PRC2 à H3K27M est beaucoup plus forte que la liaison avec H3K27 sauvage. En outre, la substitution de la lysine en méthionine empêche l'activité méthyltransférase d'EZH2, car la méthionine ne peut subir de transfert méthyle. Ainsi, la présence de K27M entraîne la formation d'un complexe PRC2 non productif et séquestre le PRC2, empêchant ainsi la propagation de la marque répressive H3K27me3. En revanche, le modèle d'exclusion postule que H3K27M n'est pas impliqué dans le recrutement ou la séquestration de PRC2 sur la chromatine. Au contraire, dans ce modèle, la liaison de PRC2 à la chromatine est exclue par la formation spécifique de locus de nucléosomes hétérotypiques H3K27M/K27ac (Piunti et al., 2017). Les marques H3K27me3 et H3K27ac sont mutuellement exclusives ; la formation de nucléosomes H3K27M/K27ac empêche donc le recrutement du PRC2 à ses sites de liaison et entrave ainsi son activité répressive.

Plusieurs études ont démontré l'importance des changements d'occupation de H3K27me3 dans la répression génique à long terme dans différents processus biologiques (El-Hashash, 2021). Le séquençage par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-Seq) réalisé sur des échantillons de tumeurs K27M a mis en évidence une réduction de H3K27me3 et une hypométhylation de l'ADN, affectant l'expression génique (Bender et al., 2013). La majorité des gènes dont l'expression est modifiée en présence de la mutation H3K27M est surexprimée, ce qui reflète la dérégulation génique induite par l'inhibition de l'activité du PRC2 (Harutyunyan et al., 2019). En outre, l'analyse de l'ontologie des gènes surexprimés a montré une surreprésentation des gènes impliqués dans la différenciation neuronale et les voies développementales (Bender et al., 2013 ; Harutyunyan et al., 2019). La présence de H3K27M induit en particulier une surexpression des gènes ID1 à ID4 (Harutyunyan et al.,

2019). Ces gènes ID (inhibiteurs de la liaison à l'ADN/différenciation) sont largement impliqués dans les processus développementaux, l'inhibition de la différenciation, le maintien de l'auto-renouvellement et la multipotence des cellules souches. Néanmoins, la manière dont la perte *in vivo* de H3K27me3 induit la tumorigenèse fait toujours l'objet de recherches actives. Des études réalisées sur modèle murin suggèrent que la perte de H3K27me3 dans de vastes zones génomiques entraîne une augmentation de l'expression génique au niveau des promoteurs bivalents (marqués, à l'état normal, par H3K27me3 et H3K4me3), tandis que le dépôt résiduel de H3K27me3 se produit toujours au niveau de plusieurs loci génomiques et intervient dans l'oncogenèse (Harutyunyan et al., 2019). En outre, la surexpression des gènes ID pourrait favoriser un état cellulaire indifférencié, propice à la tumorigenèse. Une autre hypothèse évoque qu'un programme de transcription dépendant d'*Olig2* pourrait être essentiel à l'initiation et à la pathogenèse des DMG (Anderson et al., 2017). En effet, bien que l'identité précise des cellules d'origine des DMG reste inconnue, plusieurs études suggèrent que les progéniteurs des oligodendrocytes en prolifération, exprimant le gène *Olig2*, pourraient représenter les cellules d'origine des DMG (Anderson et al., 2017 ; Monje et al., 2011).

Enfin, il est à noter que, dans certains DMG, la réduction de H3K27me3 n'est pas associée à la présence de la mutation H3K27M mais est liée à une surexpression d'EZHIP (Castel et al., 2020). La découverte de l'expression anormale d'EZHIP dans les DMG a élargi le spectre des DMG avec perte épigénétique globale de H3K27me3 au-delà de la mutation H3K27M et a déclenché la reclassification des sous-types de DMG DMG-H3K27 en DMG H3K27 altéré, qui contiennent à la fois des sous-types surexprimant H3K27M et EZHIP (Louis et al., 2021). EZHIP (EZH1/2 inhibitor protein) est une protéine capable d'interagir avec EZH2 et d'inhiber son activité histone méthyltransférase, induisant ainsi une réduction des taux de H3K27me3 (Ragazzani et al., 2019 ; Piunti et al., 2019). Par ailleurs, des études suggèrent qu'EZHIP partage le modèle de séquestration de PRC2 avec H3K27M. En effet, l'analyse biochimique a mis en évidence un mécanisme allostérique où EZHIP se lie plus efficacement à PRC2 lorsque PRC2 se lie à la chromatine des nucléosomes contenant H3K27me3. Ce complexe chromatinien PRC2-EZHIP inhibe ainsi la propagation en aval de H3K27me3 et favorise le blocage de la fonction de PRC2 (Jain et al., 2020). Cependant, étant donné la reconnaissance récente des DMG-EZHIP et la rareté relative des cas décrits, les études s'inscrivent prioritairement dans le contexte des tumeurs porteuses de la mutation H3K27M, pour lesquelles les connaissances mécanistiques et les données expérimentales sont aujourd'hui les plus avancées.

Ainsi, les mécanismes tumoraux précis et détaillés induits par H3K27M dans le cerveau ne sont pas encore élucidés. Cependant, des études récentes sur les H3K27M-DMG ont permis d'identifier d'importantes cibles médicamenteuses grâce à différentes approches telles que le ciblage des inhibiteurs d'histone désacétylase (HDACi), la restauration des niveaux de H3K27me3 et le ciblage des activités EZH2 résiduelles.

### 1. HDACi

Bien que les cellules DMG H3K27M présentent des taux élevés d'H3K27ac par rapport aux tumeurs exprimant H3 sauvage, le criblage de médicaments agissant sur les mécanismes épigénétiques a montré que les HDACi comptent parmi les composés les plus efficaces pour diminuer la survie des cellules DMG (Grasso et al., 2015). Parmi les HDACi testés dans les DMG, le panobinostat s'est révélé le plus puissant. En effet, les tests de viabilité cellulaire réalisés sur des cellules de DMG en culture avec différentes doses de panobinostat ont démontré une diminution de la viabilité cellulaire après 48 heures (Grasso et al., 2015). En outre, les analyses Western blot ont montré une augmentation dose-dépendante de l'acétylation de H3 et de la triméthylation de H3K27 après administration de panobinostat, suggérant une restauration partielle du phénotype d'hypotriméthylation globale induit par H3K27M. L'augmentation de la triméthylation de K27 est un effet inattendu du médicament, mais elle est cohérente avec les récentes découvertes selon lesquelles H3K27 acétylé peut « détoxifier » l'inhibition de la PCR2 induite par K27M (Brown et al., 2014). Cependant, l'utilisation prolongée de panobinostat entraîne une résistance acquise des cellules H3K27M au traitement. De plus, l'étude préclinique de l'administration du panobinostat confirme son efficacité contre les cellules tumorales DMG *in vitro* et *in vivo* à court terme chez la souris, mais n'a pas d'impact significatif sur la survie des souris porteuses de tumeurs mutantes H3K27M (Hennika et al., 2017). Ainsi, l'utilisation de composés alternatifs ou de la combinaison du panobinostat avec d'autres médicaments semblent être nécessaires pour surmonter la toxicité et la résistance au traitement.

### 2. Inhibiteurs sélectifs des déméthylases JMJD3

L'expression de H3K27M dans les DMG entraîne une diminution des niveaux de H3K27me3 (Lewis et al., 2013). Dans les cellules saines, la marque H3K27me3 est déméthylée par les déméthylases de la sous-famille KDM6, JMJD3 et UTX (Agger et al., 2007). L'utilisation

d'inhibiteurs sélectifs des déméthylases JMJD3 a donc été proposé comme approche thérapeutique dans le traitement des DMG, dans l'optique de restaurer les niveaux normaux de H3K27me3. En particulier, l'inhibiteur de déméthylase GSKJ4 possède des activités antitumorales remarquables *in vivo* et sur les cellules en culture. En effet, le traitement de cellules exprimant K27M par GSKJ4 a révélé une inhibition dose-dépendante de la viabilité cellulaire associée à une réduction de la prolifération (Hashizume et al., 2014). Le GSKJ4 s'est également montré efficace pour prolonger la survie des souris porteuses de tumeurs H3K27M. Cependant, l'inhibition de la croissance du DMG par ce composé a été observée à des concentrations impossibles à atteindre en milieu clinique (Aziz-Bose et Monje, 2019).

### 3. EZH2i

Les activités résiduelles d'EZH2 jouent un rôle important dans l'initiation de la tumorigenèse et dans la croissance des cellules DMG (Mohammad et al., 2017). Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs d'EZH2 (EZH2i) est considérée comme une approche prometteuse pour le traitement des DMG. En effet, l'utilisation de l'EZH2i EPZ6438 affecte la croissance des cellules tumorales murines H3K27M à la fois *in vitro* et *in vivo* à travers l'augmentation de la transcription de la protéine suppressive de tumeur p16INK4A, normalement inhibée par l'activité du PRC2 (Mohammad et al., 2017). Cependant, aucun impact cytotoxique significatif n'a été observé dans les cellules de patients DMG H3K27M en réponse au traitement avec EPZ6438, suggérant que l'inhibition d'EZH2 ne constitue pas une option thérapeutique efficace en monothérapie (Wiese et al., 2016). Néanmoins, l'utilisation d'EPZ6438 en association avec d'autres médicaments cytotoxiques ou avec d'autres molécules agissant sur les mécanismes épigénétiques reste à élucider.

### B. Médulloblastome

Le médulloblastome (MB) englobe plusieurs sous-types tumoraux cliniquement et moléculairement divers qui constituent ensemble la tumeur cérébrale maligne infantile la plus fréquente (Gibson et al., 2010). Ces tumeurs se développent dans le cervelet, à partir des progéniteurs des cellules granulaires dans 25% des cas. Les MB peuvent être classés selon des critères histologiques et moléculaires. La classification moléculaire fait apparaître quatre principaux groupes de MB, chacun présentant des caractéristiques transcriptionnelles, génomiques et cliniques spécifiques : Wnt, Shh, Groupe 3 et Groupe 4 (Taylor et al., 2012). Les

groupes Wnt et Shh ont été nommés d'après les voies de signalisation jouant un rôle important dans la pathogenèse du groupe. Dans les médulloblastomes du groupe Wnt, des mutations activatrices du gène *CTNNB1*, codant pour la  $\beta$ -caténine conduisent à une activation constitutive de la voie Wnt, favorisant la prolifération et la survie des cellules progénitrices localisées dans le cervelet et le tronc cérébral dorsal (Tao et al., 2024). En revanche, les médulloblastomes du groupe Shh sont caractérisés par des mutations affectant des gènes clés de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh). Des études de séquençage humain à grande échelle ont révélé de fréquentes mutations des gènes *PTCH1* (40 %) et *SUFU* (13 %), des mutations activatrices dans le gène *SMO* (9 %) et des amplifications de *MYCN* (13 %) et *GLI2* (6 %) (Kool et al., 2014 ; Northcott et al., 2017). Ces mutations affectent l'activation de la signalisation Shh et altèrent la régulation de la survie et de la prolifération des progéniteurs des cellules granulaires (Garcia-Lopez et al., 2021). Ainsi, au niveau moléculaire, les tumeurs des différents sous-groupes sont caractérisées par des mutations spécifiques, dépendent de voies de signalisation distinctes et ont probablement des origines cellulaires différentes (Kool et al., 2014 ; Taylor et al., 2012). Récemment, l'étude génomique des MB a révélé que plus de 30 % tumeurs présentent des mutations, des délétions ou des amplifications de gènes codant pour des régulateurs épigénétiques (Yi et Wu, 2018). En particulier, les gènes codant pour les sous-unités EZH2, EED et SUZ12 du PRC2 sont souvent surexprimés dans le MB (Bunt et al., 2013 ; Dubuc et al., 2013). En outre, les MB de groupe 3 et de groupe 4 présentent souvent des taux globaux relativement élevés de H3K27me3 (Robinson et al., 2012). Par ailleurs, la mutation H3K27M a récemment été détectée dans un MB du groupe Shh (Dottermusch et al., 2022). A cette découverte s'ajoute l'identification d'une diminution de la triméthylation H3K27me3 dans plusieurs sous-population de MB (Shh, groupe 3 et groupe 4) (Dubuc et al., 2013 ; Gabriel et al., 2022). La réduction de la marque H3K27me3 dans les MB est associée à un phénotype de radiorésistance qui entraîne des taux de rechute élevés et un mauvais pronostic (Gabriel et al., 2022). Ainsi, la dérégulation des niveaux de triméthylation H3K27me3 semble se produire dans tous les sous-groupes de MB et pourrait donc représenter une cible thérapeutique intéressante pour lutter contre ces tumeurs. Cependant, le rôle de la triméthylation H3K27me3 dans le développement des MB et dans la réponse à la radiothérapie n'a pas encore été élucidé (Gabriel et al., 2022).

La démonstration de l'implication de mutations touchant un grand nombre de régulateurs épigénétiques dans les tumeurs malignes cérébrales pédiatriques offre à la fois de nouvelles opportunités thérapeutiques et de nouveaux défis. Le ciblage de l'activité de ces régulateurs constitue ainsi une piste thérapeutique prometteuse, mais les différentes fonctions de ces facteurs dans le développement et la tumorigenèse nécessitent une prudence accrue lors du choix des médicaments. Une meilleure connaissance du rôle des facteurs épigénétiques, notamment de l'activité du PRC2, au cours du développement cérébral est donc fondamentale pour permettre l'élaboration de nouveaux traitements et nécessite le développement de modèles d'étude pertinents. Le modèle murin a longtemps été utilisé dans l'étude des fonctions des PcG mais présente néanmoins certaines limites. En effet, l'inactivation des sous-unités principales du PRC2 chez la souris est létale dès la gastrulation et ne permet donc pas d'observer le développement du cerveau dans le contexte de l'inhibition de l'activité du PRC2 chez cet animal. Afin de mieux comprendre l'impact de la perte d'activité du PRC2 sur le développement cérébral, il est donc nécessaire de développer des modèles alternatifs. Contrairement à la souris, chez laquelle l'inactivation d'*Ezh2* ou d'*Eed* est létale dès la gastrulation (O'Carroll et al., 2001 ; Faust et al., 1995), celles-ci sont viables chez le poisson zèbre jusqu'à 12 jours post-fécondation (jpf) (Raby et al., 2021 ; Dupret et al., 2017). La génération de lignée de poissons zèbres mutants offre ainsi l'opportunité d'étudier le rôle de ces PcG au cours du développement précoce.

## 2. Le modèle poisson zèbre

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un petit poisson téléostéen d'eau douce originaire d'Asie du Sud-Est (Engeszer et al., 2007). Il est apparu comme modèle pour l'étude du développement précoce dans les années 1950, mais a rapidement été utilisé dans des domaines de recherche plus vastes (Laale, 1977). La connaissance de l'écologie du poisson zèbre est essentielle pour interpréter son comportement et sa physiologie, ses variations génétiques et phénotypiques actuelles, ainsi que l'évolution de ses caractéristiques embryonnaires, larvaires et adultes.

### 2.1 Classification

Le poisson zèbre appartient à l'ordre des Cypriniformes, au sein de la vaste classe des Actinoptérygiens (poissons à nageoires rayonnées), qui regroupe plus de 30 000 espèces de poissons osseux. Plus précisément, le poisson zèbre est classé dans la famille des Cyprinidae laquelle constitue la plus grande famille de poissons d'eau douce au monde. Dans le cadre de la phylogénie moléculaire récente, *Danio rerio* se situe au sein du clade Ostariophysii, un groupe monophylétique regroupant plusieurs ordres dont les Siluriformes (poissons-chats), les Characiformes (piranhas, tétras) et les Gymnotiformes (anguilles électriques), caractérisé notamment par la présence d'un appareil de Weber, une structure de transmission du son unique aux ostariophysiens (Betancur-R et al., 2017). Cette position phylogénétique relativement primitive parmi les téléostéens confère au poisson zèbre une valeur comparative importante pour l'étude de l'évolution des vertébrés, en particulier en biologie du développement. En tant que modèle phylogénétiquement éloigné des mammifères, mais néanmoins vertébré, le poisson zèbre permet d'identifier des éléments conservés et divergents dans les mécanismes moléculaires fondamentaux.

Au cours de l'évolution, une duplication complète du génome, appelée duplication du génome des téléostéens (TGD), a eu lieu dans la lignée des téléostéens (Taylor et al., 2001 ; Hoegg et al., 2004). Les orthologues issus du TGD étaient probablement redondants et l'une de ces copies a été perdue de manière aléatoire au fil de l'évolution (Sémon et Wolfe, 2007). Toutefois, dans environ 15 à 20 % des gènes, cette duplication a persisté chez les poissons téléostéens (Brunet et al., 2006). Ainsi, de nombreux gènes des tétrapodes possèdent deux orthologues chez les téléostéens (Taylor et al., 2001). Par exemple, des études ont révélé la

présence de sept groupes de gènes Hox chez les téléostéens contre quatre chez les tétrapodes (Amores et al. 1998). La duplication des gènes du poisson zèbre impose donc une vigilance méthodologique dans le cadre de la recherche. Le ciblage simultané des deux paralogues est souvent nécessaire pour éviter les effets masqués et la transposition des résultats vers les humains requiert une annotation précise des orthologues.

## 2.2 Écologie

On compte environ 45 espèces de *Danio* (Fang Fang, 2003), réparties en Asie du Sud et du Sud-Est, la plus grande diversité d'espèces se trouvant dans le nord-est de l'Inde, au Bangladesh et au Myanmar (Barman, 1991). Les caractéristiques communes à ces espèces sont leur petite taille (<120 mm de longueur), la présence d'une encoche danionine (« danionin notch ») au niveau de la mâchoire et un motif de couleur distinctif basé sur une alternance de bandes horizontales claires et foncées (Spence et al., 2008).

L'aire de répartition naturelle du poisson zèbre présente une large amplitude thermique, allant de 6°C en hiver à plus de 38°C en été (Spence et al., 2008). Le poisson zèbre est généralement décrit comme vivant dans les plans d'eau à courant lent ou stagnant, aux abords des ruisseaux et dans les fossés, notamment à proximité des rizières (Spence et al., 2008). Cette association avec la riziculture pourrait être liée à l'utilisation d'engrais favorisant la croissance du zooplancton (Spence et al., 2007). En effet, le poisson zèbre est une espèce omnivore, dont l'alimentation se compose principalement de zooplancton et d'insectes (Spence et al., 2008). En particulier, il se nourrit d'espèces d'insectes aquatiques ou de larves aquatiques d'insectes terrestres, en particulier les diptères. Il a ainsi été suggéré que le poisson zèbre pourrait avoir une utilité dans la lutte contre les moustiques (Dutta, 1993).

La durée de vie moyenne du poisson zèbre est d'environ 2 ans (Gerhard et al., 2002). La maturité sexuelle est atteinte rapidement, généralement vers l'âge de 3 mois (Nasiadka et Clark, 2012), bien que certaines études indiquent qu'elle dépend davantage de la taille de l'individu que de son âge (Eaton et Farley, 1974a). Une fois matures, les couples de poissons zèbres laissés ensemble frayent à des intervalles fréquents (Eaton et Farley, 1974b), et une seule femelle peut produire plusieurs centaines d'œufs lors d'une seule ponte. Cette reproduction rapide et soutenue permet la génération d'un grand nombre d'embryons en peu de temps, facilitant les études de génétique et de développement.

### *2.3 Spécificités des souches de poisson zèbre utilisées en laboratoire*

Dans une étude publiée en 2020, Suurväli et collaborateurs ont réalisé des analyses de polymorphisme nucléotidique à l'échelle du génome qui ont mis en évidence des différences génétiques et évolutives entre les souches de poisson zèbre sauvages et plusieurs souches de poisson zèbre de laboratoire (Suurväli et al., 2020). Leurs résultats révèlent que les populations sauvages présentent une diversité génétique élevée et une répartition équilibrée de la variation alors que les lignées de laboratoire (notamment AB, TU et WIK) montrent une hétérozygotie réduite, une fixation accrue de certains allèles, et des profils génomiques hétérogènes d'une souche à l'autre. Ainsi, les souches de poisson zèbre utilisées en laboratoire présentent des caractéristiques génétiques et phénotypiques spécifiques qui résultent de processus de domestication, de sélection artificielle et de dérive génétique.

En captivité, la durée de vie du poisson zèbre est en moyenne de 42 mois, bien que l'individu le plus âgé observé ait survécu 66 mois (Gerhard et al., 2002). Un phénotype de courbure vertébrale, causé par la dégénérescence musculaire, apparaît chez les poissons zèbres domestiques après leur deuxième année de captivité (Spence et al., 2008). Ce phénotype n'a jamais été observé dans les populations sauvages de poisson zèbre, ce qui suggère que, dans la nature, les poissons meurent avant que ce phénotype ne se développe. Par ailleurs, les lignées de poisson zèbre de laboratoire se reproduisent toute l'année alors que cette espèce est essentiellement saisonnière à l'état sauvage, la période de reproduction commençant juste avant le début de la mousson (Spence et al., 2007). En outre, les mécanismes de déterminisme sexuel diffèrent entre les souches sauvages et domestiquées de poisson zèbre. Les souches sauvages possèdent un système de déterminisme sexuel à chromosomes hétérogamétiques. Les chromosomes ZZ caractérisent les individus mâles tandis que les chromosomes ZW transmettent le sexe femelle, même si les individus ZW peuvent se développer en mâles dans certaines conditions environnementales (Aharon et Marlow, 2022). En revanche, les lignées domestiquées de poissons zèbres couramment utilisées en laboratoire (AB, TU, etc.) ont perdu ce déterminisme chromosomique stable. Ces souches présentent un système polygénique de détermination du sexe, où plusieurs loci, répartis sur différents chromosomes, influencent le sexe de façon variable selon la souche (Wilson et al., 2014). Ces différences ont des implications majeures sur la robustesse expérimentale et la transposabilité des résultats. Par exemple, les différences dans le

déterminisme sexuel conduisent à des écarts importants de sexe-ratio qui compliquent la fiabilité des études liées au sexe chez le poisson zèbre. Les différences observées entre les souches sauvages et domestiquées de poisson zèbre nécessitent donc de prendre en compte l'origine génétique des poissons utilisés lors des études. Dans cette optique, il est recommandé d'intégrer des données issues de souches sauvages pour améliorer la représentativité biologique des modèles expérimentaux utilisés en recherche biomédicale (Suurväli et al., 2020).

## 2.4 Développement embryonnaire

Le développement du poisson zèbre est très rapide ([Figure 15](#)). Après 72h de développement, les œufs fécondés produisent une larve mobile et capable de se nourrir. La forme juvénile est atteinte à 29 jpf et la forme adulte à 90 jpf.

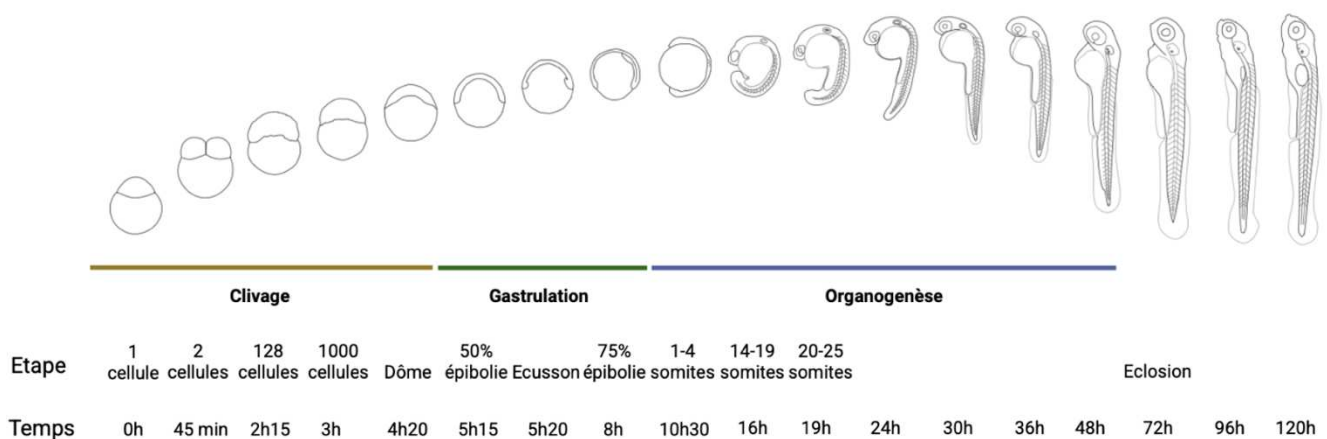


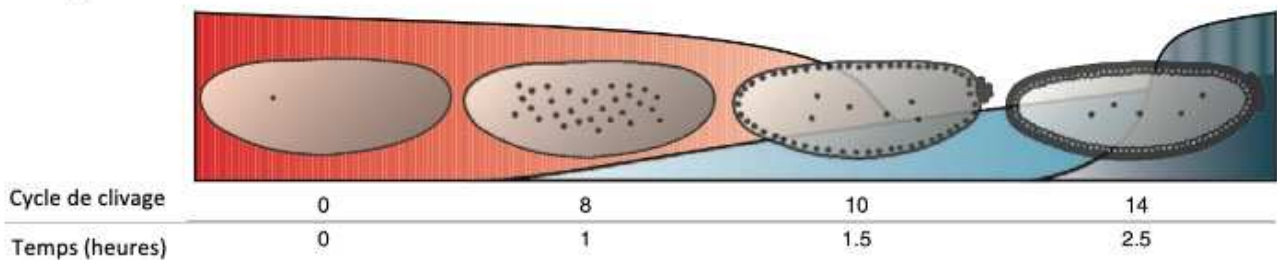
Figure 15. Chronologie du développement du poisson zèbre.

Adapté de White et al., 2017 ; Kimmel et al., 1995.

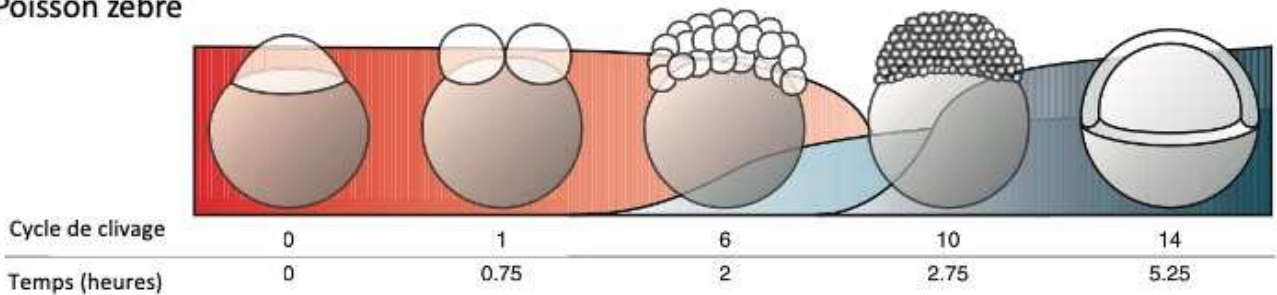
Les toutes premières étapes du développement de l'embryon représentent une période développementale cruciale. Après la fécondation, l'œuf va subir une série de divisions cellulaires pour se transformer en une structure appelée blastula. Cette phase de division, appelée phase de clivage, correspond à une période de multiplication cellulaire rapide et d'organisation spatiale des cellules. Chez le poisson zèbre, la première division cellulaire commence environ 45 minutes après la fécondation et conduit à la création de deux blastomères de dimensions égales. Les neuf premiers cycles de division sont synchronisés et se déroulent à un rythme d'une division toutes les 15 minutes (Kimmel et al., 1995). Durant

les premières heures, les événements cellulaires sont régulés uniquement par les ARNm maternels déposés dans l'ovocyte. Progressivement, le génome zygotique devient transcriptionnellement actif. La période correspondant à la transition entre le contrôle maternel et le contrôle zygotique du développement est appelé « transition maternelle-zygotique » (MZT). La MZT débute à un moment différent en fonction des espèces (Figure 16). Chez le poisson zèbre, la MZT est initiée à l'étape 64 cellules, correspondant au 6<sup>e</sup> cycle de division cellulaire, vers 2 heures post-fécondation (hpf).

### Drosophile



### Poisson zèbre



### Souris

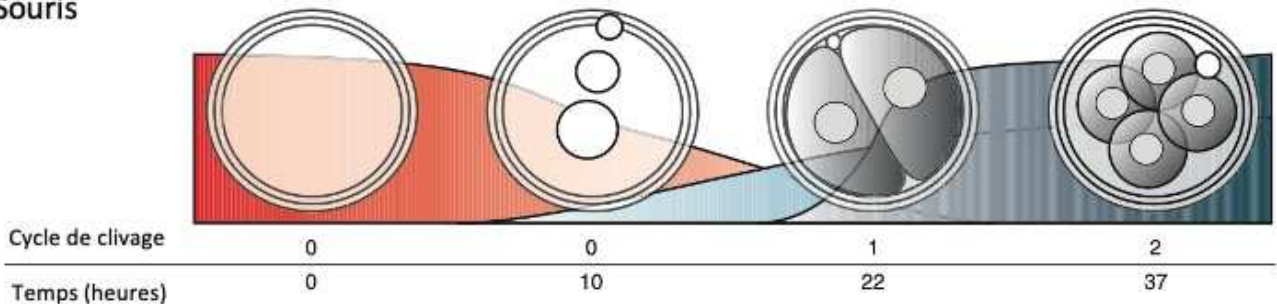


Figure 16. Comparatif de la transition maternelle-zygotique (MZT) dans plusieurs organismes modèles.

Représentation schématique des stades embryonnaires clés de chaque organisme modèle au-dessus du cycle de clivage correspondant et du temps écoulé après la fécondation. Les courbes rouges représentent les profils de dégradation des transcrits maternels déstabilisés chez chaque espèce. Les courbes bleu clair et bleu foncé illustrent respectivement les vagues mineures et majeures d'activation du génome zygotique. Adapté de Tadros et Lipshitz, 2009.

Une fois le génome zygotique activé, la période de gastrulation débute. La gastrulation implique la spécification et la formation des trois feuillets germinaux embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme), établissant ainsi le plan d'organisation de l'animal. La formation correcte des feuillets embryonnaires est fondamentale car ces feuillets sont à l'origine de tous les types cellulaires ([Figure 17](#)). Elle nécessite à la fois l'activité de voies de signalisation clés pour induire la spécification et la structuration de la couche germinale et des mouvements cellulaires pour organiser les progéniteurs de la couche germinale le long des futurs axes corporels (Pinheiro et Heisenberg, 2020). Chez le poisson zèbre, les mouvements morphogénétiques de la gastrulation débutent avec l'épibolie, qui correspond au recouvrement de la région végétative vitelline par les cellules du blastoderme. Le degré d'avancement de l'épibolie est mesuré par le pourcentage d'épibolie, c'est-à-dire la fraction du vitellus recouverte par les cellules du blastoderme (Kimmel et al., 1995). Ainsi, à 30% d'épibolie, la marge du blastoderme se situe à 30% de la distance totale entre les pôles animal et végétatif par rapport à l'axe animal-végétatif. La gastrulation débute à 50% d'épibolie, vers 5 hpf, avec l'internalisation des progéniteurs du mésendoderme sous l'ectoderme et se poursuit jusqu'à épibolie complète (vers 10 hpf) (Pinheiro et Heisenberg, 2020). Le stade d'épibolie complète est dit du « bourgeon caudal » en raison d'un gonflement qui s'observe dans la région caudale. Après internalisation, les progéniteurs du mésendoderme migrent et se différencient en mésoderme ou en endoderme. Les cellules restées en surface lorsque la gastrulation est achevée constituent l'ectoderme, à partir duquel s'individualiseront l'épiderme et le neuroectoderme.

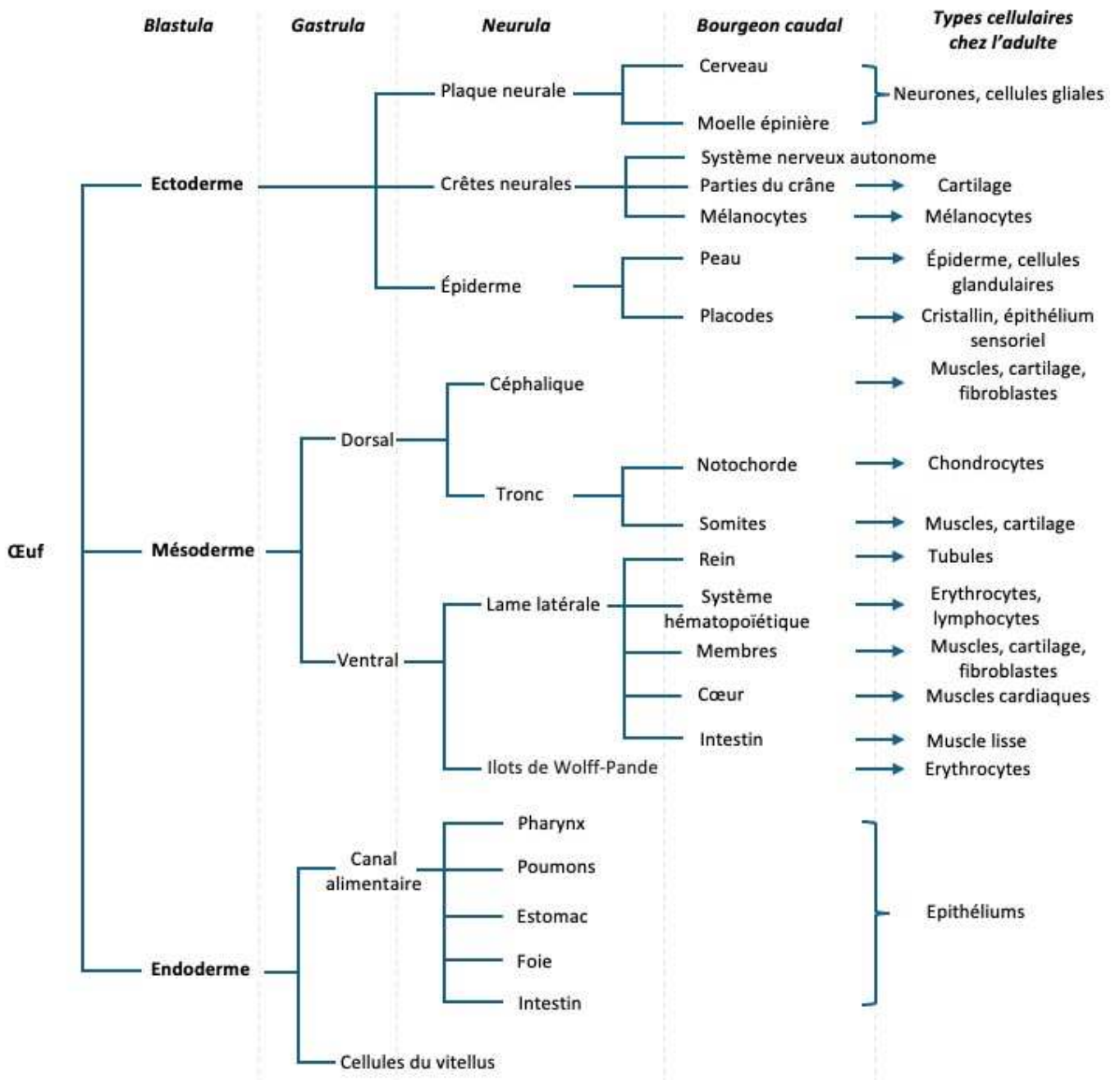


Figure 17. Principaux dérivés des feuillets embryonnaires chez les vertébrés.

Cette représentation repose sur un modèle vertébré général, principalement inspiré des amphibiens et des amniotes, et ne reflète pas certaines particularités du développement du poisson zèbre (*Danio rerio*). Adapté de Slack et al., 1991.

L'organogenèse succède à la gastrulation, à partir de 10 hpf. Cette période se caractérise par un fort accroissement de la taille de l'embryon lié à la mise en place de nouveaux tissus dans la région caudale. L'évènement majeur de cette période est la différenciation et l'organisation des somites (somitogenèse) et sert de référence pour définir les étapes suivantes du développement. Chez le poisson zèbre, la formation des somites débute juste après la fin de la gastrulation, vers 10,5 hpf. L'émergence des somites fait apparaître deux territoires somitiques distincts, le myotome et le sclérotome, à l'origine respectivement du développement des muscles et des vertèbres (Kimmel et al., 1995 ; Brennan et al., 2002). Chez les amniotes, il existe un troisième territoire somitique appelé le dermatome, mais le développement de celui-ci n'a pas été démontré chez le poisson zèbre (Kimmel et al., 1995).

La neurulation constitue l'autre évènement important de l'organogenèse. Ce terme fait référence au processus de formation du tube neural, à l'origine du développement du système nerveux central. Le tube neural se forme par invagination de la plaque neurale, une zone aplatie et épaissie de l'ectoderme, immédiatement après la gastrulation (Schmitz et al., 1993). Il se structure ensuite pour générer des régions spécifiques et donne naissance aux cellules neuroépithéliales, qui forment un neuroépithélium (Miller et Gauthier, 2007). Après plusieurs cycles de prolifération, ces cellules génèrent les cellules souches neurales (CSN) (Götz et Huttner, 2005) qui se différencient ensuite en neurones et en cellules gliales au cours de la neurogenèse.

L'organogenèse est donc une période développementale critique du développement embryonnaire pendant laquelle apparaissent les ébauches des différents organes émergeant depuis les trois feuilletts embryonnaires. Cette période se termine juste avant l'éclosion, vers 48hpf, et clôt ainsi le développement embryonnaire.

#### 2.4.1 Développement du système nerveux central

Le système nerveux des vertébrés est caractérisé par la grande diversité de neurones le composant. La capacité d'un animal à réaliser son répertoire comportemental nécessite que tous ces neurones se développent en nombre, au moment et à l'emplacement approprié, et qu'ils développent des caractéristiques différenciées adéquates (Wilson et al., 2002). La neurogenèse est le mécanisme central du développement du système nerveux au cours de l'embryogenèse. Elle décrit le processus par lequel des cellules progénitrices neurales indifférenciées génèrent des neurones matures et fonctionnels.

Les premières étapes de la neurogenèse sont l'induction des progéniteurs neuraux suivie d'une phase de division cellulaire permettant d'élargir la population de progéniteurs. Par la suite, les progéniteurs sont spécifiés et s'engagent vers un destin neuronal. L'entrée dans la différenciation est marquée par la sortie du cycle cellulaire et l'entrée en état post-mitotique. Finalement, les cellules en différenciation vont migrer hors des régions contenant les cellules progénitrices et acquérir des caractéristiques neuronales telles que l'excitabilité électrique, la synthèse de neurotransmetteurs et la connectivité avec d'autres cellules (Chouly et Bally-Cuif, 2024) (Figure 18). Chacune de ces étapes est orchestrée spatialement et temporellement afin de générer les multiples types de neurones et de cellules gliales qui peupleront le système nerveux central (SNC) mature (Schmidt et al., 2013).

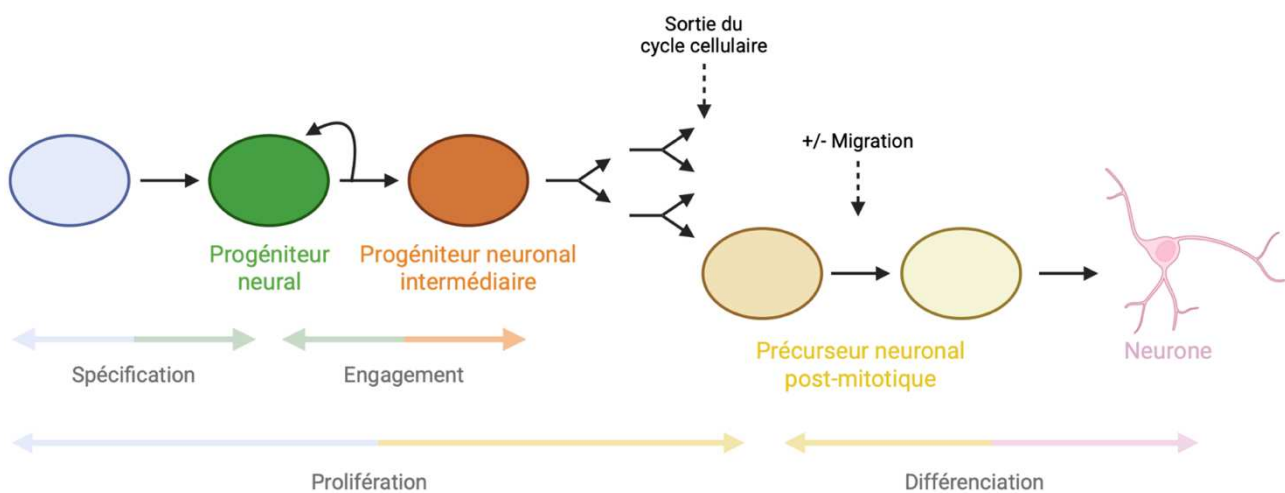


Figure 18. Étapes de la neurogenèse.

Progression des progéniteurs neuronaux le long de la lignée neurogénétique (de gauche à droite). L'ordre relatif de sortie du cycle cellulaire et de spécification du sous-type neuronal n'est pas fixe. Adapté de Chouly et Bally-Cuif, 2024. Figure réalisée sur Biorender.com

La première étape du développement du système nerveux est la spécification du neuroectoderme, un processus connu sous le nom d'induction neurale. Ce phénomène survient durant la gastrulation et repose sur des interactions complexes entre des facteurs de signalisation extrinsèques sécrétés par le mésoderme. La sécrétion ventrale de facteurs de signalisation de la famille des BMP (Bone morphogenetic protein) induit un devenir épidermique des cellules de l'ectoderme. Au niveau du mésoderme dorsal, des antagonistes des BMP sont produits, tels que Noggin et Chordin, et permettent l'établissement du destin neural dans l'ectoderme dorsal et la formation de la plaque neurale (Schmidt et al., 2013).

La neurogenèse débute dans la plaque neurale à la fin de la gastrulation par l'expression des gènes proneuraux, qui appartiennent à la famille des régulateurs transcriptionnels bHLH (Appel et Chitnis, 2002). Les premiers gènes proneuraux exprimés sont *ngn1* et *asc1* (Blader et al., 1997 ; Allende et Weinberg, 1994) et leur expression définit des groupes de cellules appelés groupes proneuraux. Il est à noter que les gènes proneuraux ne sont pas exprimés dans tout le neuroectoderme. Au contraire, leur activation est spatialement régulée et permet de délimiter les territoires neurogéniques des territoires non neurogéniques (Blader et al., 1997). Au sein des groupes proneuraux, certaines cellules vont exprimer les gènes proneuraux et initier les programmes de neurogenèse. En effet, l'expression des gènes proneuraux entraîne l'engagement de la cellule vers un destin neuronal, la sortie du cycle cellulaire et la différenciation cellulaire (Guillemot, 2007). Les autres cellules n'expriment pas les gènes proneuraux et restent des précurseurs neuronaux. Le choix entre ces deux destins cellulaires met en jeu un mécanisme d'inhibition latéral médié par la voie de signalisation Notch (Blader et al., 1997). Parmi les cellules du groupe proneural, certaines expriment les ligands Notch (Delta, Serrate, Jagged) alors que leurs voisines expriment les récepteurs Notch. La liaison d'un ligand au récepteur Notch entraîne la transcription des gènes Her/Hes qui vont à leur tour inhiber l'expression des gènes proneuraux dans les cellules dans lesquelles la voie Notch est activée (Chapouton et Godinho, 2010). Ainsi, les cellules sécrétant les ligands Notch peuvent exprimer les gènes proneuraux et s'engager dans la voie de différenciation neuronale tandis que leurs voisines n'expriment pas les gènes proneuraux et sont maintenues à l'état de progéniteur neuronal. Après une phase exclusivement neurogénique, les progéniteurs neuronaux deviennent également capables de générer des cellules gliales et donc d'initier la gliogenèse. La balance entre neurogenèse et gliogenèse se fait à nouveau grâce à la voie de signalisation Notch : l'activation de la voie Notch dans les cellules inhibe l'expression des gènes proneuraux et favorise l'expression des gènes progliaux.

Chez le poisson zèbre, comme chez tous les vertébrés, le tube neural forme trois vésicules cérébrales primitives le long de l'axe antéropostérieur : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Ces vésicules se transforment ensuite en cinq vésicules cérébrales : le télencéphale, le diencephale, le mésencéphale, métencéphale et myélocéphale (Mueller, 2015 ; Nieuwenhuys, 2009 ; Wullmann et al., 1996) ([Figure 19](#)). Ces structures sont fonctionnellement similaires entre les vertébrés ; cependant, certaines différences anatomiques existent chez le poisson zèbre en raison de la particularité du repliement du tube

neural. Contrairement au neuroépithélium des mammifères qui se replie autour des ventricules, le neuroépithélium du poisson zèbre se réorganise en une structure appelée quille neurale (Lowery et Sive, 2004). En outre, le télencéphale du poisson zèbre subit un processus d'éversion et non d'invagination comme observé chez les mammifères, entraînant un télencéphale inversé où les régions de l'amygdale et de l'hippocampe sont situées sous un ventricule télencéphalique unique (Wullimann, 2009). Néanmoins, la régionalisation générale du cerveau du poisson zèbre ne diffère pas de celle des autres vertébrés et il contient la même diversité de types neuronaux, chacun ayant une fonction spécifique dans le cerveau.

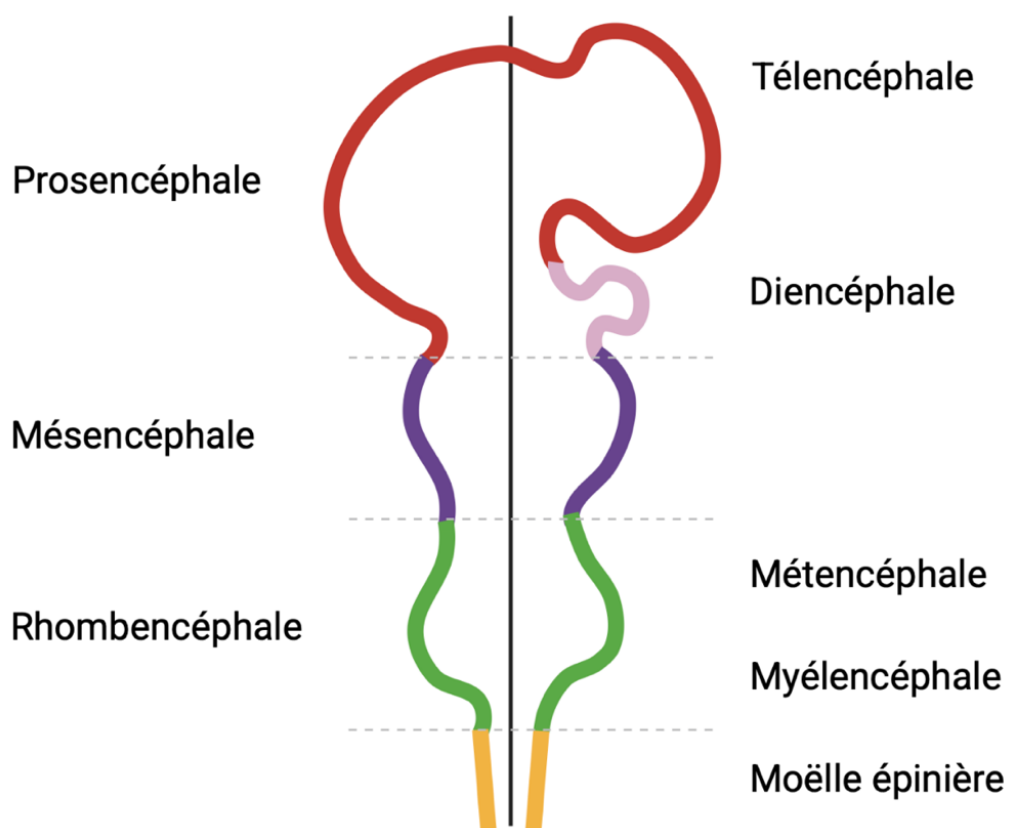


Figure 19. Formation des grandes subdivisions de l'encéphale.

Le tube neural se différencie en 3 vésicules primitives qui se différencient ensuite en 5 vésicules télencéphale, diencéphale, mésencéphale, métencéphale et myélocéphale. Adapté de [Wikimedia Commons](#). Figure réalisée sur Biorender.com

A partir du prosencéphale, le télencéphale se développe selon un mode d'éversion ([Figure 20](#)), propre aux téléostéens, conduisant à une organisation latérale du pallium et médiale du subpallium (Folgueira et al., 2012). Le diencéphale donne naissance au thalamus, à l'épithalamus et à l'hypothalamus, des régions fonctionnellement homologues à leurs équivalents chez les mammifères. En parallèle, le mésencéphale donne naissance au toit optique, une structure centrale dans l'intégration visuelle et le contrôle des fonctions oculomotrices chez le poisson zèbre (Brožko et al., 2022). Enfin, Le rhombencéphale, segmenté en rhombomères, constitue le territoire de développement de nombreux noyaux moteurs et sensoriels du tronc cérébral. Parmi les structures dérivées du rhombencéphale, le cervelet occupe une place centrale en tant que coordinateur des fonctions motrices et sensorielles. Le paragraphe suivant se concentrera spécifiquement sur les étapes précoces de la formation du cervelet et sur les populations cellulaires impliquées dans son développement.

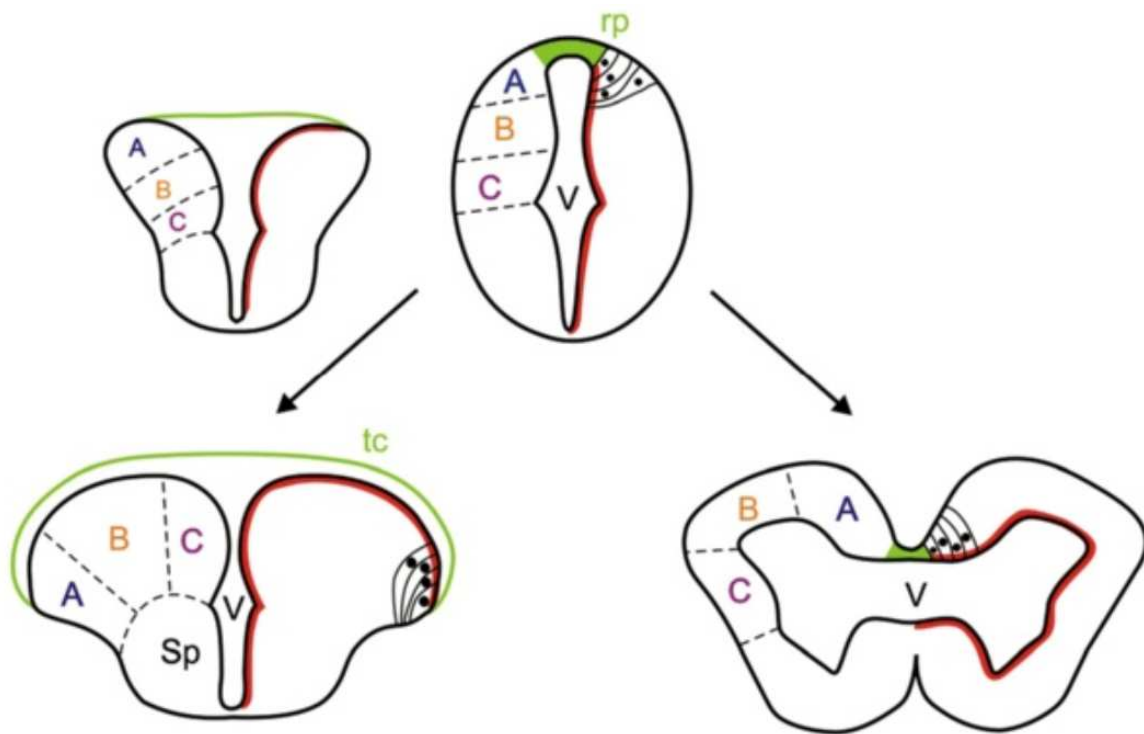


Figure 20. Modèle conventionnel d'éversion chez les poissons à nageoires rayonnées.

Dessin illustrant la vue classique de l'éversion chez les poissons à nageoires rayonnées (à gauche) en contraste avec l'invagination des vésicules télencéphaliques observée chez d'autres vertébrés (à droite). Chez les poissons à nageoires rayonnées, la région dorsale du tube neural télencéphalique (pallium) se replie sur la région ventrale (subpallium), étirant la plaque dorsale du toit du tube neural (en vert) pour former la toile choroïdienne. Cela déplace également certaines cellules ventriculaires vers la surface télencéphalique dorsale (ligne rouge) et provoque des réarrangements médio-latéral des régions palliales). sp, subpallium, tc, toile choroïdienne, v, ventricule. Figure tirée de Folgueira et al., 2012.

#### 2.4.2 Développement du cervelet

Le cervelet est une structure localisée dans le cerveau postérieur et impliquée dans l'intégration de la perception sensorielle et dans le contrôle moteur (Bae et al., 2009). Il est constitué de relativement peu de types cellulaires, lesquels présentent des caractéristiques morphologiques, moléculaires et physiologiques distinctes. Au cours du développement, les différents types de cellule cérébelleuse sont produits selon un ordre temporel strict à partir de progéniteurs de plus en plus impliqués (Kaslin et al., 2013). Les processus de développement des neurones cérébelleux sont conservés entre les mammifères et le poisson zèbre (Bae et al. 2009 ; Kani et al. 2010). Les neurones cérébelleux peuvent être divisés en deux grandes catégories selon leur fonction inhibitrice ou excitatrice. Les neurones inhibiteurs utilisent l'acide gamma-butérique (GABA) ou la glycine comme principaux neurotransmetteurs et incluent les cellules de Purkinje, les interneurones, les cellules de Golgi et les cellules en étoile. Les neurones excitateurs utilisent le glutamate et comprennent les cellules granulaires, les cellules eurydendroïdes et les cellules unipolaires à brosse (Bae et al., 2009). Ces neurones sont organisés en trois couches dans le cervelet, de la couche la plus superficielle à la plus profonde : la couche moléculaire (CM), la couche des cellules de Purkinje (CCP) et la couche des cellules granulaires (CCG) ([Figure 21](#)).

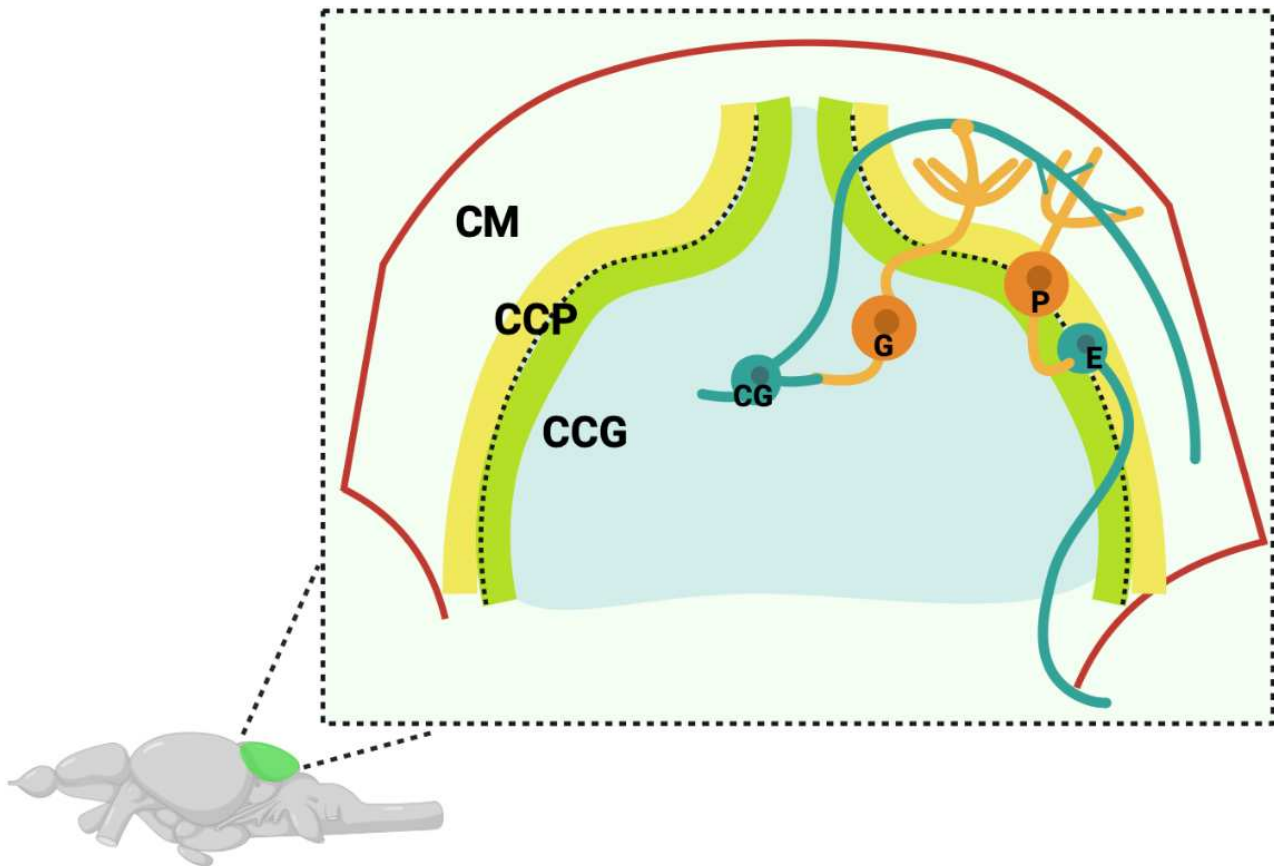


Figure 21. Coupe coronale schématique montrant l'anatomie du cervelet du poisson zèbre.

Le cervelet présente une architecture laminaire simple à trois couches, composée d'une couche moléculaire (CM), d'une couche de cellules de Purkinje (CCP) et d'une couche de cellules granuleuses (CCG). La couche granuleuse est constituée de cellules granuleuses (CG) et de cellules de Golgi (G). La couche de cellules de Purkinje contient des neurones de Purkinje (P) et des cellules eurydendroïdes (E). Adapté de Kaslin et al., 2013. Figure réalisée sur Biorender.com

Le cervelet téléostéen est composé de trois parties principales : la valvula cerebelli (Va), le corpus cerebelli (CCe) et le lobe vestibulo-latéral, qui est constitué de l'eminencia granularis (EG) et du lobus caudalis cerebelli (LCa) (Figure 22) (Wullimann et al., 1996). La Va et le CCe présentent la même structure à trois couches tandis que le lobe vestibulo-latéral ne contient que la CCG (Bae et al., 2009). Il existe quelques différences entre le cervelet des téléostéens et celui des mammifères. Ce dernier est dépourvu de cellules eurydendroïdes et, à leur place, les noyaux cérébelleux profonds jouent un rôle fonctionnellement homologue car ils reçoivent les axones des cellules de Purkinje et émettent des axones efférents. En outre, dans le cervelet des téléostéens, les cellules granulaires du Va et du CCe se situent sous la CCP, tandis que celles localisées dans le lobe vestibulo-latéral sont situées superficiellement (Volkman et al.,

2008). Bien que ces cellules granulaires puissent fonctionner différemment, on ignore si elles utilisent les mêmes gènes pour leur croissance et leur différenciation (Bae et al., 2009).

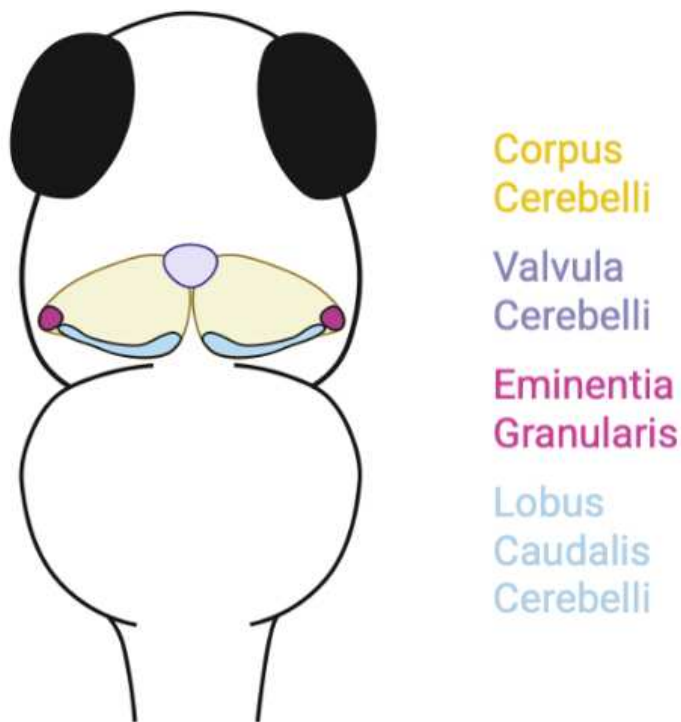


Figure 22. Représentation schématique du cervelet de la larve du poisson zèbre à 5 jpf.

Figure réalisée sur Biorender.com

Le cervelet du poisson zèbre se forme dans la partie antérieure du cerveau postérieur pendant les périodes embryonnaire et larvaire. Les neurones du cervelet sont générés à partir de deux zones de prolifération : la zone ventriculaire cérébelleuse (VZ), située au niveau du toit du quatrième ventricule, et la lèvre rhombique supérieure (URL), située dans la région caudale de l'ébauche du cervelet (Hashimoto et Hibi, 2012) ([Figure 23](#)). La différenciation des neurones GABAergiques et glutamatergiques commence à 3 jpf et les structures stratifiées et lobulaires sont détectables pour la première fois à 5 jpf (Bae et al., 2009).

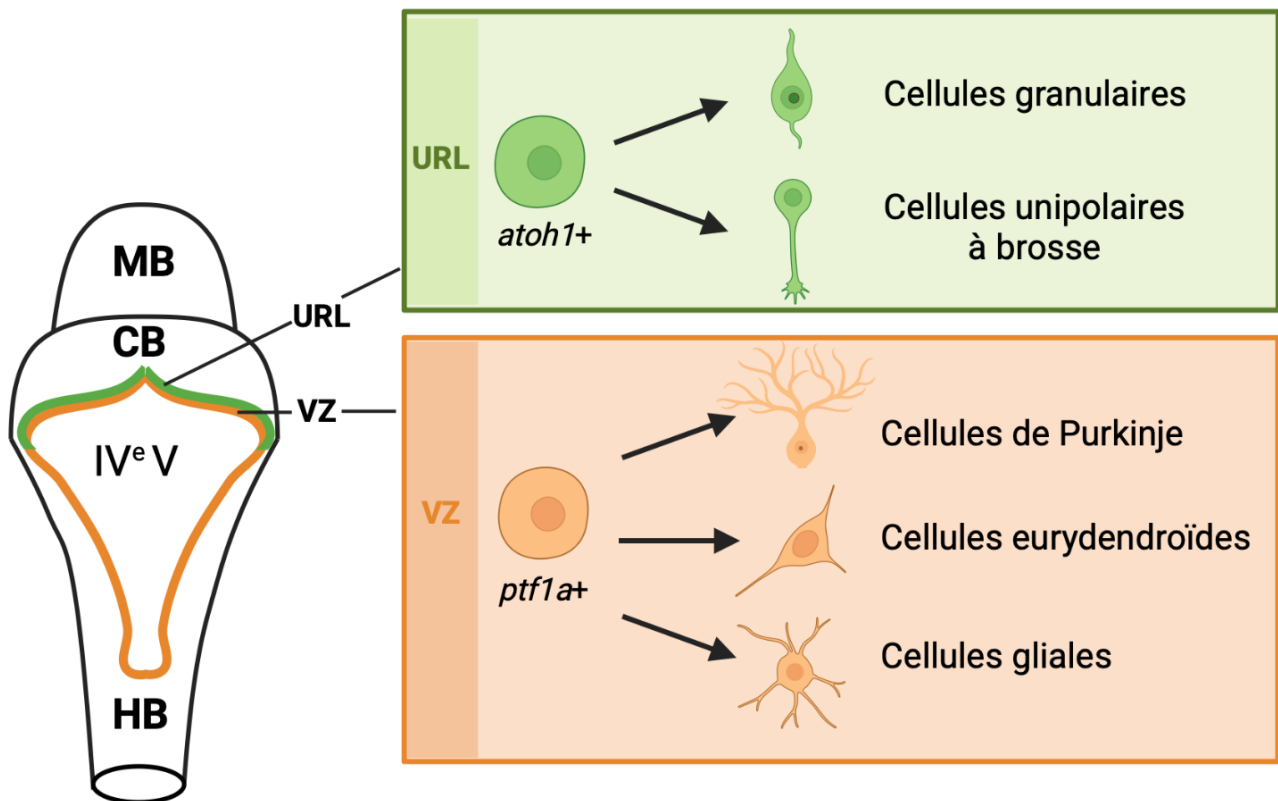


Figure 23. Vue schématique des domaines progéniteurs cérébelleux.

Les neurones du cervelet sont générés à partir de deux zones germinatives : la zone ventriculaire (VZ, orange) et laèvre rhombique supérieure (URL, vert). Adapté de Kaslin et al., 2013. Figure réalisée sur Biorender.com

Parmi les cellules glutamatergiques du cervelet, les cellules granulaires représentent la population neuronale la plus abondante et jouent un rôle fondamental dans le traitement de l'information sensorimotrice. Ces cellules se différencient à partir des progéniteurs localisés dans l'URL exprimant les gènes proneuraux *atoh1a/b/c* (Kani et al., 2010). Les progéniteurs spécifiés sont initialement localisés dans la couche superficielle puis migrent vers l'intérieur pour former la CCG, à l'exception des progéniteurs du LCa qui restent en surface (Kani et al., 2010). Dans les cellules exprimant les gènes *atoh1*, l'activation séquentielle de gènes proneuraux tels que *neurod1* marque l'entrée des cellules dans un programme de différenciation neuronale post-mitotique (Butts et al., 2011). Une fois différenciées, les cellules granulaires migrent vers la couche granulaire interne, où elles s'intègrent dans les circuits cérébelleux en établissant des synapses glutamatergiques. Ce phénotype exciteur est confirmé par l'expression de *vglut1 (slc17a7)*, un gène codant pour le transporteur vésiculaire du glutamate 1, utilisé comme marqueur spécifique des cellules granulaires différenciées dans de nombreuses études de neuroanatomie chez le poisson zèbre (Volkman

et al., 2010). Par ailleurs, les cellules de Purkinje sont considérées comme les principaux neurones cérébelleux et jouent un rôle fondamental dans le traitement de l'information dans le cervelet (Pose-Méndez et al., 2023a). Ces cellules sont GABAergiques et dérivent des progéniteurs localisés dans la VZ et exprimant le gène *ptf1a*. Initialement, ces progéniteurs prolifèrent dans la VZ puis arrêtent leur prolifération et commencent à migrer dorsalement jusqu'à la CCP, où ils se différencient en cellules de Purkinje et en d'autres cellules GABAergiques (Kani et al., 2010). Les cellules de Purkinje finalement différenciées peuvent être identifiées par l'expression du gène *pvalb7*, dont l'expression n'est pas retrouvée dans les autres cellules GABAergiques peuplant le cervelet (Bae et al., 2009). La différenciation des neurones du cervelet a donc lieu entre 3 et 5 jpf mais la maturation fonctionnelle du cervelet se poursuit après cette période, en particulier entre 7 et 20 jpf.

## 2.5 Utilisation en recherche

Le poisson zèbre est apparu comme modèle pour l'étude du développement précoce dans les années 1950 car il est peu coûteux, facile à entretenir et à soigner, et fournit un grand nombre d'œufs en une seule ponte. Les œufs du poisson zèbre sont non adhérents, transparents et se développent très rapidement. En effet, la période de développement située entre la fécondation et l'éclosion est d'environ 96h à 28°C. Ces caractéristiques rendent ce modèle particulièrement adapté aux études embryologiques (Laale, 1977). Dans les années 1990, le poisson zèbre a été le premier vertébré à être utilisé pour un criblage génétique à grande échelle afin d'identifier des gènes importants pour le développement (Astell et Sieger, 2020). La caractérisation des phénotypes associés à ces mutations a révélé que de nombreux phénotypes du poisson zèbre ressemblaient à des maladies humaines en raison de la présence de nombreux gènes orthologues chez les deux espèces (Astell et Sieger, 2020). En effet, la comparaison entre les génomes humain et poisson zèbre a mis en évidence que plus de 70% des gènes humains possèdent au moins un orthologue chez le poisson zèbre. Cette homologie s'élève même à plus de 80% pour les gènes liés aux maladies humaines (Howe et al., 2013).

L'un des atouts majeurs du modèle poisson zèbre réside dans la possibilité d'utiliser des approches de génétique directe et inverse. D'une part, les techniques de mutagenèse chimique couplées à l'analyse génétique à grande échelle ont permis d'identifier chez le poisson zèbre des milliers de mutations affectant de multiples processus développementaux (Driever et al., 1996 ; Haffter et al., 1996). Plus récemment, les outils d'édition du génome tels

que le système des TALEN ou CRISPR/Cas9 se sont imposés comme méthode de choix pour générer des mutants ciblés ou introduire des modifications génétiques précises (Zu et al., 2013 ; Hwang et al., 2013). D'autre part, l'injection de morpholinos (MO) dans des embryons de poisson zèbre au stade 1 cellule permet de moduler l'expression génique rapidement de manière transitoire (Nasevicius et Ekker, 2000). Enfin, le poisson zèbre est également compatible avec des approches pharmacologiques à haut débit, ce qui en fait un système pertinent pour le criblage de molécules d'intérêt thérapeutique (Zon et Peterson, 2005). La complémentarité de ces approches fait du poisson zèbre un modèle de choix pour l'analyse fine des mécanismes moléculaires et cellulaires *in vivo*.

L'intérêt croissant de la communauté scientifique pour le modèle poisson zèbre repose, de plus, sur le fait que l'utilisation de cet animal s'inscrit pleinement dans la logique de la réglementation 3R. Le principe des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) fait référence à la réflexion éthique des biologistes anglais William Russel et Rex Burch (Russel et Burch, 1992). Ce principe a, par la suite, été introduit dans la réglementation européenne et correspond à la directive 2010/63/UE, relative à la protection des animaux utilisés dans les procédures scientifiques. Le remplacement vise à diminuer le nombre d'animaux utilisés à des fins de recherche. Il nécessite donc de recourir à des méthodes substitutives à l'utilisation d'animaux, comme les expérimentations *in vitro*, *in chemico* et *in silico*. Lorsque le remplacement total des modèles animaux n'est pas possible, il faut envisager des méthodes de remplacement dites relatives. L'utilisation d'animaux dont les caractéristiques permettent des approches expérimentales moins invasives, comme le développement externe ou la transparence des tissus, constitue une méthode de remplacement relative (Définition du principe des 3R - FC3R). La réduction consiste à limiter le nombre d'animaux utilisés pour atteindre un même objectif scientifique. Elle vise donc à obtenir le maximum d'informations à partir d'un animal afin d'éviter l'utilisation d'animaux supplémentaires. Cet objectif peut être atteint en favorisant les méthodes permettant le suivi longitudinal grâce à des mesures répétées sur un même animal (Définition du principe des 3R - FC3R). Enfin, le raffinement consiste à assurer et renforcer le bien-être des animaux. Cela implique, par exemple, l'optimisation des pratiques d'élevage ou la prise en charge de la douleur de l'animal (Définition du principe des 3R - FC3R). L'utilisation du poisson zèbre s'inscrit pleinement dans la logique des 3R. En effet, ce modèle permet de remplacer de nombreux tests réalisés traditionnellement sur des mammifères, notamment lors des phases précoces de criblages

toxicologiques ou pharmacologiques. Les embryons et larves de poisson zèbre, jusqu'à cinq jpf, ne sont pas considérés comme des animaux à part entière au sens de la réglementation européenne (Décision d'exécution (UE) 2020/569 de la Commission du 16 avril 2020), ce qui permet de conduire des expérimentations à grande échelle sans enfreindre les contraintes légales associées à l'usage des vertébrés supérieurs (Cassar et al., 2020). Grâce à leur petite taille et à leur développement rapide, ces organismes permettent une réduction substantielle du nombre d'animaux nécessaires tout en augmentant la robustesse statistique des données. En outre, les méthodes d'imagerie *in vivo*, l'utilisation de lignées transgéniques fluorescentes et les approches comportementales automatisées permettent un raffinement des protocoles expérimentaux, réduisant la souffrance animale et optimisant la qualité des données recueillies (D'Amora et Giordani, 2018). Ainsi, le poisson zèbre représente un modèle éthique, efficace et pertinent, favorisant une recherche biomédicale responsable conforme aux attentes sociétales en matière de bien-être animal.

L'ensemble de ces éléments ont permis de reconnaître le potentiel du poisson zèbre comme organisme modèle et son utilisation a été élargie à de nombreux champs de recherche comme la cancérologie, l'épigénétique ou la pharmacologie.

### 2.5.1 Utilisation en cancérologie

Le poisson zèbre présente plusieurs caractéristiques qui le rendent parfaitement adapté à l'étude de la biologie des cancers humains et des métastases. De nombreux facteurs impliqués dans la progression tumorale sont hautement conservés entre le poisson zèbre et l'Homme, tels que des gènes du cycle cellulaire, des suppresseurs de tumeurs et des oncogènes, ce qui permet d'étudier et de cibler ces voies tumorales chez le poisson zèbre. Les techniques d'inactivation/surexpression de gènes et de transgénèse sont facilement réalisables sur le poisson zèbre, ce qui permet la génération de divers cancers présentant des similitudes histopathologiques avec les tumeurs humaines (Amatruda et al., 2002). Par ailleurs, le poisson zèbre présente une séparation temporelle dans la maturation des systèmes immunitaires innés et adaptatifs. Le système immunitaire inné est fonctionnel dès 2 jpf, en revanche le système immunitaire adaptatif ne devient pleinement fonctionnel qu'à partir de 28 jpf (Lam et al., 2004). L'absence d'immunité adaptative chez les larves de poisson zèbre est particulièrement intéressante pour l'injection de cellules cancéreuses, en limitant le risque de rejet. Il est ainsi possible de réaliser des allogreffes à partir d'un poisson zèbre donneur, mais

également des xénogreffes en injectant des cellules de mammifère (Nicoli et al., 2007). La prolifération, l'invasion et les métastases des cellules injectées peuvent donc être étudiées, ainsi que les interactions entre les cellules donneuses, les cellules hôtes et l'environnement extracellulaire (Astell et Sieger, 2020). De nombreuses lignées cellulaires humaines ont ainsi été analysées après leur injection dans différentes régions de l'embryon du poisson zèbre (Figure 24).

Le poisson zèbre offre ainsi à la fois la possibilité de reproduire les mutations associées au développement de cancers chez l'Homme, de générer des tumeurs histopathologiquement similaires à celles observées chez l'humain et de tester *in vivo* des molécules d'intérêt thérapeutique.

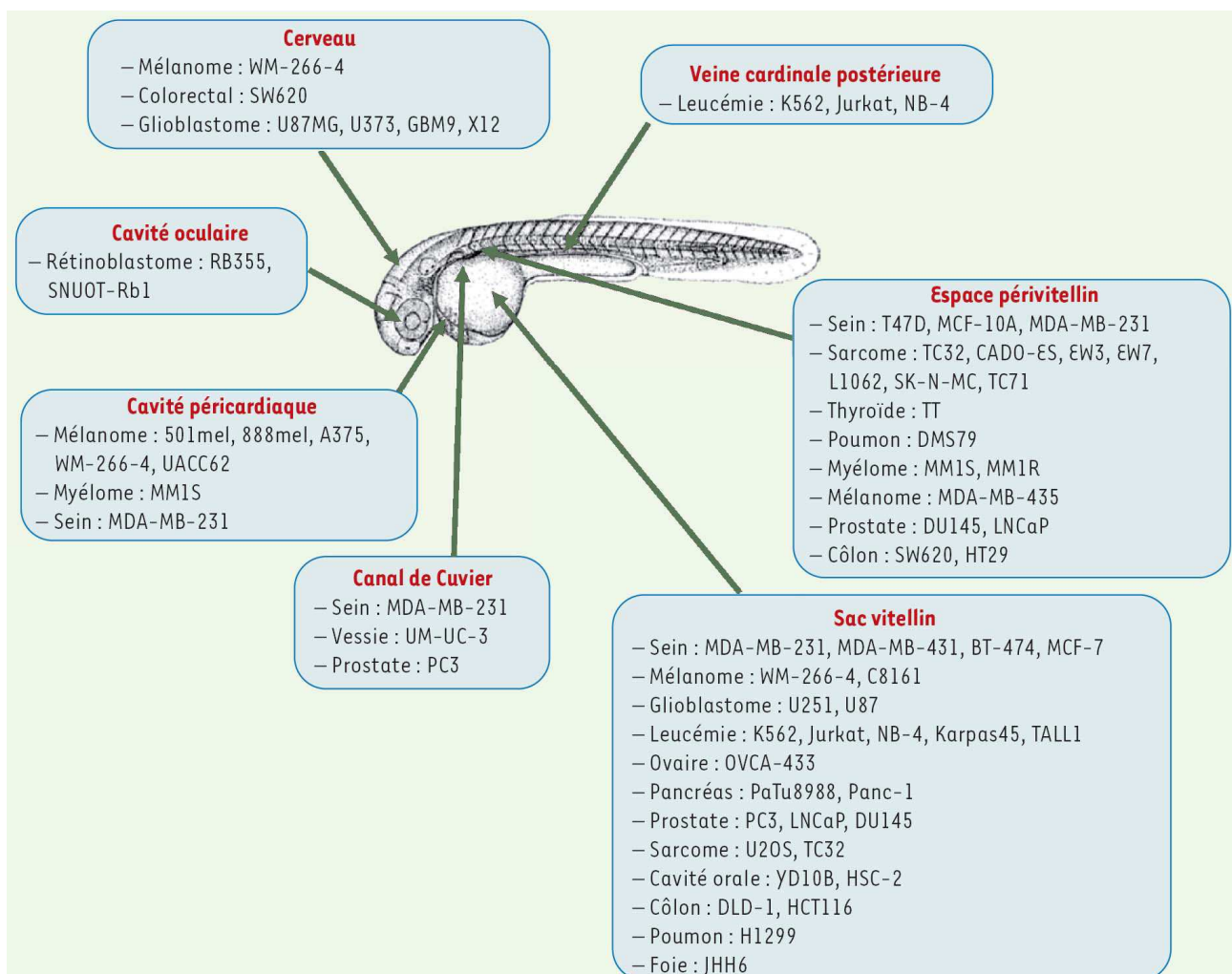


Figure 24. Illustration des sites d'injection les plus communs utilisés lors des expériences de xénotransplantation dans les embryons de poisson zèbre de 2 jpf.

Figure de Völkel et al., 2018.

### 2.5.2 Utilisation pour le criblage pharmacologique

Le poisson zèbre constitue un modèle de choix pour le criblage pharmacologique et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Grâce à sa petite taille, il permet de réaliser des essais pharmacologiques en plaçant les embryons dans des plaques à 96 puits, ce qui réduit la quantité de déchets et de produits chimiques utilisés et limite les coûts (Peterson et al., 2000). La plupart des molécules pénètrent la membrane externe de l'embryon par diffusion passive, ce qui permet de les tester simplement en les diluant dans l'eau dans laquelle sont placés les embryons (D'Amora et Giordani, 2018). De plus, la grande conservation des voies génétiques et physiologiques entre le poisson zèbre et l'humain confère à ce modèle un intérêt marqué pour étudier les mécanismes d'action et de toxicité de nombreuses molécules. En particulier, le poisson zèbre possède une barrière hémato-encéphalique (BHE) structurellement et fonctionnellement très proche de celle des mammifères (O'Brown et al., 2018) ainsi que l'ensemble du complément en cytochrome P450 impliqué dans le métabolisme des drogues (Goldstone et al., 2010). Chez le poisson zèbre, la BHE se forme entre 3 et 10 jpf (Jeong et al., 2008 ; Tam et al., 2012 ; Fleming et al., 2013) et se situe au niveau des cellules endothéliales capillaires qui vascularisent le cerveau. Ces cellules endothéliales sont reliées par des jonctions serrées spécialisées et sont en contact étroit avec les péricytes cérébraux. Le poisson-zèbre possède des cellules gliales radiales qui ressemblent aux astrocytes des mammifères ; cependant, leur rôle dans la BHE du poisson zèbre n'a pas été bien caractérisé (O'Brown et al., 2018). À l'instar des mammifères, la BHE du poisson zèbre est donc renforcée par l'interaction avec les péricytes et les cellules gliales bien que la maturation et la distribution de ces cellules puissent différer légèrement. Par ailleurs, les transporteurs transmembranaires sont globalement conservés entre le poisson zèbre et les mammifères. Par exemple, la P-glycoprotéine, codée par le gène *ABCB1* chez les mammifères, joue un rôle central dans l'efflux de composés endogènes et exogènes à travers la BHE (Schinkel, 1999). Le poisson zèbre est dépourvu du gène *abcb1* mais possède plusieurs orthologues (*abcb4*, *abcb5*) très proches du gène *ABCB1* des mammifères (Flemming et al., 2013). Finalement, la mesure de la perméabilité de la BHE du poisson zèbre aux médicaments a révélé une corrélation avec la perméabilité de la BHE de la souris (Kim et al., 2017). Ainsi, malgré de légères divergences, la forte homologie des voies moléculaires impliquées dans la mise en place et le maintien de la BHE confère au poisson zèbre une grande valeur pour l'étude

des altérations de perméabilité cérébrale dans les contextes de développement, de pathologies neurologiques ou d'administration pharmacologique.

En particulier, le poisson zèbre constitue un modèle privilégié pour l'étude de la neurotoxicité, notamment dans le contexte de criblage à haut débit, en raison de la précocité de la formation de son système nerveux central et de la transparence de ses embryons ([Figure 25](#)). Bien que de taille réduite, le cerveau du poisson zèbre possède une organisation comparable à celle des vertébrés supérieurs, avec des structures homologues telles que le télencéphale, le mésencéphale et le cervelet (Wullimann, 2009). De même, les mécanismes développementaux du système nerveux du poisson zèbre et des autres vertébrés sont bien conservés (Belousov, 2011). La BHE joue un rôle crucial dans la protection du cerveau contre les substances chimiques et la présence chez le poisson zèbre d'une BHE fonctionnellement similaire à celle des mammifères permet de modéliser au mieux les effets neurotoxiques potentiels des molécules. Les modifications neurocomportementales sont les paramètres neurotoxiques les plus fréquemment étudiés chez le poisson zèbre exposé à des produits chimiques (D'Amora et Giordani, 2018). Les propriétés physiques du poisson zèbre permettent de mesurer facilement ces comportements *in vivo* par l'utilisation d'outils d'enregistrement vidéo. Les caractéristiques propres au poisson zèbre en font un modèle d'étude complémentaire pertinent, de plus en plus utilisé pour le dépistage *in vivo* de la neurotoxicité (Fan et al., 2010 ; Cowden et al., 2012).

L'utilisation d'embryons dans les criblages chimiques permet donc la sélection de médicaments actifs au sein d'un organisme multicellulaire, ce qui constitue un atout comparativement aux criblages classiques reposant sur des lignées cellulaires transformées. Les embryons de poissons zèbres sont donc idéaux pour le criblage à haut débit (Horzmann et Freeman, 2018), mais également pour l'évaluation préclinique de la toxicité des composés pharmacologiques (Cassar et al., 2020). Le nombre de publications scientifiques mentionnant l'utilisation du poisson zèbre à des fins toxicologiques a été multiplié par 4 au cours des 10 dernières années, ce qui reflète l'intérêt grandissant de la communauté scientifique pour ce modèle dans le cadre d'études de toxicité moléculaire (Cassar et al., 2020).





<u>Modèles <i>in vitro</i></u>		<u>Modèles <i>in vivo</i></u>	
<b>Culture cellulaire</b>	<b>Organoïdes</b>	<b>Poisson zèbre</b>	<b>Souris</b>
			
<b>Avantages</b>	<b>Avantages</b>	<b>Avantages</b>	<b>Avantages</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facile à travailler</li> <li>• Faible de coût de maintenance</li> <li>• Cycle expérimental court</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caractéristiques proches des conditions <i>in vivo</i><sup>1</sup></li> <li>• Haute reproductibilité<sup>1</sup></li> <li>• Perspectives méthodologiques novatrices<sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Taux de reproduction élevé</li> <li>• Développement externe</li> <li>• Génétique similaire à l'humain</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comportement complexe</li> <li>• Organes homologues à l'humain</li> <li>• Génétique similaire à l'humain</li> </ul>
<b>Limites</b>	<b>Limites</b>	<b>Limites</b>	<b>Limites</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Système simplifié</li> <li>• Hautement contrôlé</li> <li>• Faibles corrélations avec les mécanismes <i>in vivo</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absence de structures critiques<sup>1,3</sup></li> <li>• Grande variabilité<sup>1</sup></li> <li>• Manque de maturation<sup>3</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flexibilité modérée</li> <li>• Prédicativité modérée</li> <li>• Valeur translationnelle modérée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coûts d'élevage très élevés</li> <li>• Cycle expérimental long</li> <li>• Contraintes éthiques</li> </ul>

Figure 25. Modèles *in vitro* et *in vivo* pour les tests de neurotoxicité développementale.

Adapté de D'Amora et Giordani, 2018. Les informations concernant les organoïdes ont été ajoutées à la figure originale.

Références : 1. Zheng et al., 2021 ; 2. Alam El Din et al., 2024 ; 3. Urrestizala-Arenaza et al., 2024

## 2.6 La répression Polycomb chez le poisson zèbre

Historiquement, la plupart des études concernant la répression Polycomb sont des analyses génétiques et biochimiques réalisées sur la drosophile, la souris ou sur des cellules souches embryonnaires. Plus récemment, le poisson zèbre est apparu comme modèle complémentaire pour éclaircir le rôle de la répression Polycomb dans le développement des vertébrés. Ce modèle présente à la fois une conservation fonctionnelle des protéines Polycomb et des particularités génétiques qui permettent d'interroger leurs rôles à des stades avancés du développement, contrairement à ce qui est possible chez la souris.

### 2.6.1 Conservation et spécificités des complexes Polycomb du poisson zèbre

Les principaux mécanismes épigénétiques sont conservés au cours de l'évolution et partagés entre le poisson zèbre et les mammifères, y compris les complexes Polycomb. En effet, la plupart des PcG présentent un ou plusieurs orthologues chez le poisson zèbre ([Table 6](#)) (Hanot et al., 2023). Étonnamment, plusieurs gènes codant pour des sous-unités du PRC1 sont en revanche absents du génome du poisson zèbre (Le Faou et al., 2011). Il s'agit des gènes

codant pour la sous-unité catalytique RING1 ainsi que pour les protéines PCGF2 et PCGF3. Par conséquent, le dépôt de la marque H2AK119ub1 est uniquement réalisé par Rnf2 chez le poisson zèbre. En outre, la sous-unité RBBP7 du PRC2 est également absente chez le poisson zèbre. Néanmoins, malgré la perte de plusieurs gènes codant pour des PcG, la fonction et la diversité des complexes sont conservés chez le poisson zèbre (Hanot et al., 2023). On note toutefois certaines spécificités liées à la duplication du génome chez les téléostéens. Par exemple, le gène codant pour la sous-unité Suz12 existe sous deux formes chez le poisson zèbre, *suz12a* et *suz12b*, toutes deux exprimées au cours du développement (Chrispijn et al., 2018).

Table 6. Gènes du poisson zèbre codant pour les sous-unités PRC2 et PRC1.

Adapté de Hanot et al., 2023

Complexe	Type de complexe	Sous-unité	Orthologue poisson zèbre
PRC2	Cœur	EZH2	Ezh2
		EZH1	Ezh1
		EED	Eed
PRC2.1	Cœur	SUZ12	Suz12a, Suz12b
		RBBP4	Rbbp4
		RBBP7	—
PRC2.2	Cœur	EPOP	Skida1l
		PAL1 (LCOR)	Lcor
		PAL2 (LCORL)	Lcorl
PRC1	Cœur	PHF1	Phf1
		MTF2	Mtf2
		PHF19	Phf19
PRC1	Cœur	AEBP2	Aebp2
		JARID2	Jarid2a, Jarid2b
		PCGF1	Pcgf1
		PCGF2	—
		PCGF3	—
		PCGF4 (BMI1)	Bmi1a, Bmi1b
		PCGF5	Pcgf5a, Pcgf5b
PCGF6	Pcgf6		
RNF2	Rnf2		

		RING1	—
	PRC1c	CBX2 CBX4 CBX6 CBX7 CBX8 PHC1 PHC2 PHC3	Cbx2 Cbx4 Cbx6a, Cbx6b Cbx7a, Cbx7b Cbx8a, Cbx8b Phc1 Phc2a, Phc2b Phc3
	PRC1nc	RYBP YAF2 BCOR BCORL1 KDM2 USP7 SKP1 AUTS2 FBR5 FBRSL1 E2F6 CBX3 HDAC1 HDAC2 L3MBTL2 WDR5 MAX MGA	Rybpa, Rybpb Yaf2 Bcor Bcorl1 Kdm2ba, Kdm2bb Usp7 Skp1 Auts2a, Auts2b Fbrs Fbrsl1 E2f6 Cbx3a, Cbx3b Hdac1 — L3mbtl2 Wdr5 Max Mgaa, Mgab

Chez les vertébrés, le développement embryonnaire précoce repose sur l'activité de produits maternels (ARNm et protéines déposés dans l'ovocyte pendant l'ovogenèse) jusqu'à l'activation du génome zygotique, à la suite de la MZT. Le poisson zèbre se distingue des autres vertébrés par l'initiation tardive de la MZT (Tardos et al., 2009) ([Figure 16](#)), induisant des implications importantes pour la fonction des complexes Polycomb. En effet, la majorité des gènes codant pour des sous-unités du PRC2 sont d'origine maternelle chez le poisson zèbre (Chrispijn et al., 2018), ce qui permet le maintien temporaire des marques H3K27me3 dans les embryons ayant subi l'inactivation zygotique de l'un de ces gènes. La présence de cette

réserve maternelle pourrait ainsi masquer les effets de ces mutations au cours des premières heures de développement et permettre aux embryons mutants de se développer relativement normalement jusqu'à un stade avancé. Cette particularité rend le poisson zèbre particulièrement intéressant pour étudier les fonctions du PRC2 dans des processus tardifs tels que la différenciation et la maturation tissulaire, qui sont inaccessibles dans les modèles murins en raison de la létalité embryonnaire précoce liée à la perte de fonction de nombreuses PcG ([Table 3](#)).

### 2.6.2 Implications du PRC1 dans le développement du poisson zèbre

La majorité des études questionnant la fonction des sous-unités du PRC1 *in vivo* ont été réalisées sur modèle murin et mettent en évidence que les complexes PRC1c et PRC1nc sont impliqués dans le développement précoce chez la souris (Piunti et Shilatifard, 2021). La génération de lignées de poisson zèbres a néanmoins permis de mettre en évidence certaines différences entre les espèces et de fournir davantage d'informations concernant l'implication du PRC1 au cours du développement.

Le rôle de plusieurs protéines de la famille PCGF a été étudié chez la souris. En revanche, *Pcgf1* est la seule protéine de cette famille dont l'inactivation zygotique a été documentée chez le poisson zèbre (Dupret et al., 2016). Les larves de poisson zèbres *pcgf1* homozygote mutants sont viables et fertiles mais présentent un léger retard de croissance par rapport aux larves sauvages, corrélé à une diminution de la prolifération cellulaire. Les résultats de cette étude suggèrent que la protéine *Pcgf1* est dispensable lors du développement embryonnaire mais qu'elle est impliquée dans la prolifération des progéniteurs au cours des étapes précoces du développement.

Par ailleurs, chez la souris, trois protéines PHC ont été identifiées, codées par les gènes *Phc1*, *Phc2* et *Phc3*. Des orthologues de ces gènes ont été identifiés chez le poisson zèbre, lequel présente en plus une duplication du gène *phc2* (*phc2a* et *phc2b*). En complément des études réalisées sur modèle murin, l'utilisation du poisson zèbre a permis de mettre en évidence le rôle de *Phc1* dans la régulation de la transcription des gènes de la voie Notch, essentiels pour la spécification des cellules souches et des progéniteurs de la lignée hématopoïétique. L'analyse de l'inactivation et de la surexpression de *phc1* chez le poisson zèbre a en effet montré que l'activité de *Phc1* au sein du PRC1 influence l'expression des gènes de la voie Notch, probablement en agissant en tant que cofacteur avec une autre protéine

(Espanola et al., 2020). En outre, la réduction de l'expression de *phc2a* à travers l'utilisation de MO a mis en évidence l'implication de Phc2 dans le développement embryonnaire précoce chez le poisson zèbre. L'analyse phénotypique des morphants a révélé que l'expression de *phc2a* est nécessaire au bon déroulement de l'épibolie et à la formation du bourgeon caudal (Komoike et al., 2005). Les effets de la réduction de l'expression de *phc2a* se produisent en aval de la signalisation FGF (Fibroblast Growth Factor), laquelle est impliquée dans la spécification et le maintien des cellules progénitrices et est essentielle au développement de la partie postérieure de l'organisme (Griffin et al., 1995 ; Fürthauer et al., 1997). Cela suggère l'existence d'un lien entre la fonction de Phc2 et la différenciation cellulaire médiée par la voie de signalisation FGF (Komoike et al., 2005). Ensemble, ces éléments mettent en lumière le rôle crucial des protéines Phc au cours du développement embryonnaire.

L'implication du PRC1 dans la régulation de la signalisation FGF a également été mise en évidence à travers l'inactivation du gène *rnf2* chez le poisson zèbre. Contrairement à la souris, le poisson zèbre ne possède qu'un gène codant pour la sous-unité catalytique du PRC1, Rnf2 ; aucun orthologue à Ring1A n'a été identifié. Alors que l'inactivation de Rnf2 chez la souris est létale pendant la gastrulation (Voncken et al., 2003), celle-ci est viable chez le poisson zèbre. Les poissons zèbres *rnf2* homozygote mutants survivent jusqu'à 4-5 jours jpf mais présentent des défauts développementaux dès l'organogenèse (Van der Velden et al., 2013). En particulier, on observe chez les larves *rnf2*<sup>-/-</sup> des malformations de la mâchoire, des œdèmes du péricarde ainsi qu'une réduction de la circulation sanguine. En outre, les mutants *rnf2*<sup>-/-</sup> présentent des défauts dans la croissance des bourgeons des nageoires en raison d'une activation incomplète de la voie de signalisation FGF (Van der Velden et al., 2012). Néanmoins, chez ces mutants, la spécification initiale à partir des précurseurs présumés des nageoires pectorales est correctement initiée. Cette observation rejoint donc l'hypothèse selon laquelle les gènes PcG sont impliqués dans la différenciation terminale de différents types de tissus (Juan et al., 2016).

En outre, la perte de fonction du PRC1 impacte les organes digestifs chez le poisson zèbre. L'analyse par hybridation *in situ* (HIS) des marqueurs de différenciation terminale *fabp2*, *fabp10a* et *prss1* réalisée sur des embryons présentant une inactivation du gène *rnf2* à 3 jpf révèle que l'inactivation du PRC1 entraîne une réduction de la taille de l'intestin, bloque la différenciation terminale dans le foie et altère la formation du pancréas exocrine (Chrispjin et al., 2019). Ensemble, ces éléments révèlent que le PRC1 et le PRC2 ne sont pas impliqués dans

les étapes précoces du développement des organes digestifs mais sont tous deux nécessaires au maintien de l'état de différenciation des tissus digestifs chez le poisson zèbre.

Enfin, plusieurs sous-unités du complexe PRC1 jouent un rôle important dans le développement du système nerveux chez le poisson zèbre. En effet, des études récentes ont questionné l'implication de PCGF1 et PCGF5 dans le développement précoce du tube neurale chez le poisson zèbre, à travers l'inhibition de l'expression des gènes *pcgf1* et *pcgf5a* par l'injection de MO (Li et al., 2021 ; Yang et al., 2024). D'une part, l'inactivation de *pcgf1* a pour conséquence une expression prématurée et augmentée des marqueurs liés au neurodéveloppement précoce, se traduisant par des malformations télencéphaliques chez les larves de poisson zèbre (Li et al., 2024). D'autre part, l'inactivation de *pcgf5a* entraîne la réduction de l'expression des marqueurs du neurodéveloppement et le blocage de l'initiation de la neurogénèse (Yang et al., 2024). Ces éléments révèlent que Pcgf1 et Pcgf5 exercent des fonctions importantes mais opposées dans l'induction neurale chez le poisson zèbre. Pcgf1 semble agir en tant qu'inhibiteur de l'induction neurale alors que Pcgf5 apparaît comme un activateur de cette induction. De même, la génération de poissons zèbres *rnf2* mutants a montré que la perte de fonction d'*rnf2* affecte la migration et la différenciation des progéniteurs neuraux lors du développement du système nerveux central (Feng et Sun, 2022). En particulier, les larves *rnf2*<sup>-/-</sup> présentent des anomalies dans la différenciation et la migration des cellules gliales myélinisantes ainsi que dans la migration des neurones sérotoninergiques. Ces données mettent en relief combien l'expression de *rnf2* est nécessaire à l'établissement correct de l'identité et de la migration de certaines populations de cellules neurales. Ensemble, ces résultats indiquent que l'activité des différentes sous-unités du PRC1 est nécessaire pour le développement correct du système nerveux chez le poisson zèbre.

### 2.6.3 Implications du PRC2 dans le développement du poisson zèbre

A l'instar du PRC1, le PRC2 joue un rôle crucial dans le développement. En effet, chez la souris, l'inactivation des sous-unités principales EZH2, EED et SUZ12 est létale pour l'embryon au moment de la gastrulation (O'Carroll et al, 2001 ; Faust et al., 1995 ; Pasini et al., 2004). Au contraire, chez le poisson zèbre, l'inactivation des gènes *ezh2*, *eed* et *suz12a/b* est viable au-delà de la gastrulation (San et al., 2016 ; Dupret et al., 2017 ; Raby et al., 2021 ; Oppel et al., 2020). Les embryons de poisson zèbre mutants présentent un développement précoce normal puis meurent entre 8 et 12 jpf. La survie des larves mutantes jusqu'aux étapes tardives du

développement permet ainsi d'explorer l'implication des sous-unités du PRC2 au cours de l'organogenèse.

Chez le poisson zèbre, l'inactivation zygotique des sous-unités du PRC2 Eed et Ezh2 est associée à des altérations des organes digestifs (Dupret et al., 2017 ; San et al., 2018 ; Raby et al., 2021). A 9 jpf, les larves de poisson zèbres mutés pour les gènes *ezh2* ou *eed* présentent une réduction de la paroi intestinale. L'analyse histologique a également révélé des anomalies au niveau du foie chez les larves *ezh2*<sup>-/-</sup> et *eed*<sup>-/-</sup>. En particulier, le foie des larves mutantes est caractérisé par une taille réduite et montre des signes de stéatose hépatique. Enfin, les larves *ezh2*<sup>-/-</sup> et *eed*<sup>-/-</sup> présentent un retard de développement du pancréas. Cependant, les anomalies observées au niveau des organes digestifs ne sont pas visibles chez les larves *ezh2*<sup>-/-</sup> ni *eed*<sup>-/-</sup> à 5 jpf, ce qui suggère que la perte de fonction du PRC2 n'altère pas le développement initial de ces organes mais affecte le maintien de l'intégrité tissulaire. De même, l'expression des marqueurs de différenciation terminale des cellules de l'intestin (*fabp2*), du foie (*fabp10a*) et du pancréas exocrine (*prss1*) n'est pas affectée ni chez les larves *ezh2*<sup>-/-</sup> ni chez les larves *eed*<sup>-/-</sup>. Cela indique que l'activité du PRC2 n'est pas indispensable pour la différenciation terminale des organes digestifs mais est en revanche requise pour maintenir la différenciation des tissus au cours du temps.

Par ailleurs, le PRC2 semble être impliqué dans le développement du système nerveux central chez le poisson zèbre, à l'instar du PRC1. En effet, des expériences d'HIS sur des larves *eed* mutantes à 5 jpf ont révélé une altération de l'expression des marqueurs des cellules souches (*bmi1a*), des précurseurs neuronaux (*ccna2*) et des neurones du cervelet (*neurod1*) (Raby et al., 2021). Cependant, malgré l'expression importante d'*eed* dans le cerveau du poisson zèbre, sa perte de fonction entraîne des altérations de l'expression des gènes neuronaux dans des zones relativement discrètes du cerveau des mutants. De la même façon, l'inactivation de *rbbp4* chez le poisson zèbre est létal entre 5 et 10 jpf et entraîne l'apparition d'un phénotype neurogène sévère, notamment caractérisé par une microcéphalie et une microphtalmie (Schultz et al., 2018). L'analyse des larves *rbbp4*<sup>-/-</sup> indique une forte apoptose dans le toit optique et dans la rétine, des régions de prolifération cellulaire, ce qui suggère que Rbbp4 est nécessaire à la survie des précurseurs neuronaux. Ainsi, la perte d'activité du PRC2 ne semble pas affecter globalement le développement du système nerveux central mais entraîner des défauts développementaux spécifiques à certaines populations neuronales.

Finalement, la génération d'embryons mutants maternels zygotiques *ezh2* (MZe $zh2$ ) par transplantation de cellules germinales a révélé que ceux-ci survivent à la gastrulation et présentent une organisation corporelle normale mais meurent vers 2 jpf (San et al., 2016). Ce résultat indique que la contribution maternelle d'*ezh2* contribue au développement du poisson zèbre mais n'est pas nécessaire lors des toutes premières étapes du développement.

Ainsi, le PRC1 et le PRC2 sont tous deux impliqués dans le développement du poisson zèbre en général et dans le développement du système nerveux central en particulier. Cependant, le rôle des protéines PcG dans le développement du système nerveux est encore peu étudié, bien que le poisson zèbre semble être un modèle particulièrement adapté à ces études.

## Objectifs de la thèse

En raison de la létalité embryonnaire précoce induite par l'inactivation des gènes codant pour les sous-unités du PRC2 chez la souris, l'implication du PRC2 au cours de la neurogenèse est difficile à étudier sur les modèles murins. L'utilisation du poisson zèbre comme modèle expérimental offre ainsi une opportunité unique pour étudier précisément les fonctions du PRC2 au cours du développement cérébral. La compréhension du rôle du PRC2 pendant la neurogenèse est particulièrement important compte tenu du lien étroit observé entre la dérégulation des niveaux de triméthylation H3K27me3 et la tumorigenèse cérébrale chez l'enfant, notamment dans les DMG et les MB.

Les avancées récentes dans l'étude des cancers pédiatriques ont révélé des distinctions entre les tumeurs de l'enfant et celles apparaissant chez l'adulte. La principale différence entre les cancers de l'enfant et de l'adulte est l'origine des cellules initiatrices (Behjati et al., 2021). Les cancers de l'adulte surviennent principalement dans les cellules épithéliales consécutivement à l'âge ou à l'exposition à des mutagènes. En revanche, les cancers pédiatriques surviennent principalement dans les tissus en développement et leur incidence démontre des fenêtres d'âge restreintes liées au développement des tissus. Pour les cancers originaires des mêmes tissus, les mécanismes moléculaires associés à leur développement diffèrent en fonction de l'âge. Par exemple, les mutations des gènes codant pour les variants d'histone H3.3 et H3.1 sont fréquemment identifiées dans les gliomes de haut-grade (HGG) pédiatriques mais sont quasiment inexistantes dans les HGG de l'adulte (Wang et al., 2021). En outre, les tumeurs pédiatriques sont formées de diverses populations de cellules dans des états de différenciation différents (cellules souches, cellules progénitrices, cellules différenciées). L'identification des cellules d'origine des tumeurs, mais également des processus développementaux altérés dans les cancers pédiatriques est fondamentale afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Dans le cas des tumeurs du système nerveux central, l'étude du développement cérébral permet de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des tumeurs et de développer des alternatives thérapeutiques.

L'objectif de cette thèse est donc d'interroger les effets de l'inactivation zygotique d'*ezh2* sur le développement cérébral chez le poisson zèbre en utilisant la lignée de poisson *ezh2* mutants générée et décrite précédemment par Dupret et collaborateurs (Dupret et al., 2017). La lignée *ezh2* mutante a été obtenue à l'aide de TALEN (Transcription Activator-like Effector

Nuclease). Les TALEN ont été conçus pour cibler une région du deuxième exon d'*ezh2*. Cette stratégie a conduit à l'introduction d'une mutation non-sens dans la région codant le domaine SET, essentiel à l'activité méthyltransférase d'Ezh2, qui entraîne une perte de fonction complète de l'activité d'Ezh2, confirmée par l'absence de la marque H3K27me3 dans les tissus des larves *ezh2*<sup>-/-</sup>. Les larves mutantes ainsi générées se développent normalement et présentent un plan corporel normal. Toutefois, l'analyse phénotypique des larves *ezh2*<sup>-/-</sup> a révélé des défauts de croissance, une atrophie du pancréas exocrine ainsi qu'une désorganisation des tissus intestinaux et hépatiques, conduisant à une létalité vers 12 jpf. Ces phénotypes suggèrent que l'induction des identités cellulaires initiales peut se produire en l'absence d'Ezh2 mais que leur maintien à long terme nécessite la répression transcriptionnelle assurée par le PRC2. En outre, les résultats de cette étude mettent en évidence que l'inactivation d'*ezh2* se traduit par une réduction drastique de la marque H3K27me3.

La réduction de la marque H3K27me3 identifiée chez les larves *ezh2* mutantes correspond à la signature moléculaire des DMG et de certains MB, ce qui suggère que cette lignée pourrait servir à modéliser ces pathologies. Les DMG et les MB sont des cancers touchant le système nerveux central, plus précisément le tronc cérébral et le cervelet, ce qui suppose que la réduction de H3K27me3 impacte ces régions. Ainsi, dans le cadre de mon projet de thèse, je me suis intéressée aux effets de la réduction de la triméthylation H3K27me3 induits par l'inactivation du gène *ezh2* sur le développement neural des larves de poisson zèbre. Mon approche repose sur le marquage par HIS de l'expression de différents gènes clés du développement cérébral afin de déterminer les conséquences de la perte de fonction d'*ezh2* sur la mise en place et le maintien des différents types de cellules neurales. Cette technique permet de visualiser directement, sur embryon entier, la localisation spatiale et parfois l'intensité d'expression d'un gène au niveau de son ARNm. Elle repose sur l'utilisation d'une sonde nucléotidique marquée, complémentaire à la séquence de l'ARN d'intérêt, qui se lie spécifiquement aux transcrits présents dans les tissus embryonnaires. Après révélation, on obtient une cartographie de l'expression génique en trois dimensions, dans le contexte morphologique global de l'embryon ou de la larve. Le marquage de larves sauvages et *ezh2* mutantes permet la comparaison des profils d'expression associés au gène d'intérêt. Lorsqu'on observe une réduction du signal, cela traduit généralement une diminution de l'abondance de l'ARNm cible dans les cellules où le gène est normalement exprimé. Cette

baisse peut refléter une diminution de la transcription du gène, une instabilité accrue de son ARN mais également une réduction du nombre de cellules exprimant normalement ce gène. Cette démarche a été complétée par la réalisation de tests comportementaux afin de questionner les conséquences fonctionnelles de l'inactivation d'*ezh2*. Mon travail a donc pour objectif, d'une part, de caractériser l'effet de l'inactivation zygotique d'*ezh2* sur les cellules neurales au cours du développement du poisson zèbre et, d'autre part, d'interroger la capacité de ce modèle à reproduire les altérations géniques observées dans les DMG et les MB.



# Matériel et méthodes

## *Maintenance et préparation des embryons de poisson zèbre*

Les poissons zèbres ont été élevés conformément aux directives françaises et européennes (Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010). Les procédures expérimentales ont été examinées et approuvées par le Comité d'éthique local (CEEA 75 Nord Pas-de-Calais) et le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (numéro d'agrément APAFiS 48102-2024031116485688\_v4).

La lignée de poisson zèbre *ezh2<sup>+/-</sup>* (Dupret et al., 2017) présente une insertion nette de 22 pb dans l'exon 2 du gène *ezh2*, entraînant un décalage du cadre de lecture de la séquence codante et l'apparition d'un codon stop prématuré. Cette lignée a été maintenue à 28°C selon un cycle lumière/obscurité de 14/10h.

## *Hybridation in situ*

Après la ponte, les œufs sont déchorionnés par traitement enzymatique à la pronase (0,01 g/mL, Sigma). Les embryons sont placés en boîte de Pétri contenant du milieu E2 (875 mg/L NaCl ; 37,5 mg/L MgSO<sub>4</sub> ; 20,5 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 6 mg/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 145 mg/L CaCl<sub>2</sub> ; 60 mg/L NaHCO<sub>3</sub>) et 0,0045% de 1-phényl-2-thiourea (PTU, Sigma) afin d'inhiber la formation des pigments chez les embryons. Les embryons sont placés à 28°C, jusqu'au stade de développement souhaité, puis sont fixés au paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant une nuit. Le lendemain, les larves sont déshydratées en méthanol 100% puis stockées à -20°C.

La synthèse des sondes ARN antisens a été réalisée à partir d'ARNm préalablement extraits de larves de poisson zèbre à 5 jpf à l'aide du kit RNeasy Mini (Quiagen). Ces ARNm sont ensuite rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit Invitrogen Superscript III (11752-050, ThermoFisher). Le mix de réaction comprenant 1 µg d'ARN dans un tampon contenant 1 U d'enzyme est chauffé à 25°C pendant 10 min, puis à 50°C pendant 30 min. La réaction est ensuite arrêtée par une incubation à 85°C pendant 5 min. Un traitement à la RNase H est effectué pendant 30 min à 37°C. L'ADNc ainsi obtenu est amplifié par PCR à l'aide d'amorces couplées à la séquence T7 pour les amorces directes et à la séquence SP6 pour les amorces inverses. Cette PCR est réalisée avec 2,5 µL d'ADNc et 17,5 µL de tampon PCR (1mM MgCl<sub>2</sub> ; 4mM dNTPS ; 0,5 µM d'amorce sens et 0,5 µM d'amorce antisens ; 1 U de Taq Polymérase).

La réaction comprend une phase de dénaturation de 4 min à 95°C, puis 35 cycles de : 45s à 95°C ; 45 s à 55°C ; 1 min à 72°C, puis une phase finale d'élongation à 72°C durant 10 min. Afin de vérifier la qualité de l'amplification, l'amplicon est chargé sur un gel d'agarose 1%. L'amplicon est alors purifié à l'aide du kit MinElute Gel Extraction (28606, Qiagen).

Après l'étape de purification, les sondes sont synthétisées in vitro à partir du promoteur SP6 du plasmide en présence d'un nucléotide modifié, l'uridine-5'-triphosphate digoxigénine (DIG RNA Labeling Kit ; 11175025910, Roche). La réaction de polymérisation de la sonde a lieu pendant 2 h à 37°C. Le produit est purifié à l'aide du Kit RNeasy Mini (74104, Qiagen) et repris dans 40 µL d'eau traitée contre les RNases. La concentration de la sonde est déterminée à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop Multiskan Go. Après l'ajout de 38 µL de formamide 100%, les sondes sont stockées à - 20°C. Les amorces utilisées pour la génération de sondes sont :

ISH_her4.1_F:	TAATACGACTCACTATAGGGTGGGAGAAGAATTGCCTGTACTCT
ISH_her4.1_R:	GATTTAGGTGACACTATAGGTGCTTCCATTGTTGCTTGATTGT
ISH_olig2_F:	TAATACGACTCACTATAGGGATGGACTCTGACACGAGC
ISH_olig2_R:	GATTTAGGTGACACTATAGGGGCTGAGGAAGGTTTGCCAT
ISH_sox10_F:	TAATACGACTCACTATAGGGACCTACCGAAGTCACCTGTGG
ISH_sox10_R:	GATTTAGGTGACACTATAGGTTTGTGTCGATTGTGGTGC
ISH_mag_F:	TAATACGACTCACTATAGGGCCGTGAGGGTGTTTCAGTGTGTGT
ISH_mag_R:	GATTTAGGTGACACTATAGCGTCTCCCGTGCCTTCCTCT
ISH_mpz_F:	TAATACGACTCACTATAGGGGTGGTGCTCTTGGGCATAGCCTCTC
ISH_mpz_R:	GATTTAGGTGACACTATAGGGAGCCCGTTATCACACCAGCC
ISH_pcna_F:	TAATACGACTCACTATAGGGGGCAACATCAAGCTCTCACA
ISH_pcna_R:	GATTTAGGTGACACTATAGAAATCCCACAGATGACAGGC
ISH_ccna2_F:	TAATACGACTCACTATAGGGGGAAGGATGTCAACACAAGGAAG
ISH_ccna2_R:	GATTTAGGTGACACTATAGGAGAGAACTGTCAGCACCAGATG
ISH_atoh1a_F:	TAATACGACTCACTATAGGGCCAACGTCGTGCAGAAA
ISH_atoh1a_R:	GATTTAGGTGACACTATAGAACCATTACAAAGCCCAGATA
ISH_atoh1c_F:	TAATACGACTCACTATAGGGTTTCTCAGCGCACACGACCCT
ISH_atoh1c_R:	GATTTAGGTGACACTATAGTTTGGTCTCTTCGGTCATAGGCAAC
ISH_ptf1a_F:	TAATACGACTCACTATAGGGCACAGGCTTAGACTCTTTCTCC
ISH_ptf1a_R:	GATTTAGGTGACACTATAGCCCGTAGTCTGGGTCATTTG

ISH\_neurod1\_F: TAATACGACTCACTATAGGGTTCGAGACGCTCCGACTAGCCAA  
 ISH\_neurod1\_R: GATTTAGGTGACACTATAGGCGTCGAGCCCGCGTAAAGA  
 ISH\_vglut1\_F: TAATACGACTCACTATAGGGTGCCAGGGACTTGTGGAGGG  
 ISH\_vglut1\_R: GATTTAGGTGACACTATAGCTGGCGTAGCGTGGTGCGA  
 ISH\_pvalb7\_F: TAATACGACTCACTATAGGGTTATCCGTCTCTCACCTCCAGCCA  
 ISH\_pvalb7\_R: GATTTAGGTGACACTATAGCGTGTTCCGGTGGCTCTATCACAA  
 ISH\_foxp2\_F: TAATACGACTCACTATAGGGGGTATGGGGCAGCTCTTA  
 ISH\_foxp2\_R: GATTTAGGTGACACTATAGCACTTCAGTTCGGTGAGCCT  
 ISH\_foxp4\_F: TAATACGACTCACTATAGGGGCTACAGCAGCAACACATTC  
 ISH\_foxp4\_R: GATTTAGGTGACACTATAGGCGTGTTCACTATTCAGGTG  
 ISH\_skor1b\_F: TAATACGACTCACTATAGGGCACGGCAATAAACACACGAC  
 ISH\_skor1b\_R: GATTTAGGTGACACTATAGGACGGGGAGTCAGCATCTTA  
 ISH\_skor2\_F: TAATACGACTCACTATAGGGCCTCACAGAAAGCCCATCTC  
 ISH\_skor2\_R: GATTTAGGTGACACTATAGGCTTGGGAAGGAGGCTAGTT  
 ISH\_ntn1a\_F: TAATACGACTCACTATAGGGCATCTGTAACTCTCTGGGCACTGG  
 ISH\_ntn1a\_R: GATTTAGGTGACACTATAGCCCGAAAGACCACTGTTTCACCAC  
 ISH\_gad1b\_F: TAATACGACTCACTATAGGGTGAGCGGCATTGAGAGGGCA  
 ISH\_gad1b\_R: GATTTAGGTGACACTATAGCGTAGGCGACCACTGAGCC  
 ISH\_slc18a2\_F: TAATACGACTCACTATAGGGGCACTGGGAGGACTAGCAATGGG  
 ISH\_slc18a2\_R: GATTTAGGTGACACTATAGGTTGGCGGGAGGATTTCCGAG  
 ISH\_tph2\_F: TAATACGACTCACTATAGGGCGGACACCTGCCATGAACTGCTT  
 ISH\_tph2\_R: GATTTAGGTGACACTATAGTGAGTAAGTCGATGCTCTGCGTGT  
 ISH\_th\_F: TAATACGACTCACTATAGGGCCTGTCGGATGTTAGCACGCTGG  
 ISH\_th\_R: GATTTAGGTGACACTATAGGGCCTCAACTGAAATCCTGTGCGT  
 ISH\_dla\_F: TAATACGACTCACTATAGGGGTTTCAGCAGCGACGACGGGA  
 ISH\_dla\_R: GATTTAGGTGACACTATAGCACCACTGCCTGCGCCTCTT  
 ISH\_nfia\_F: TAATACGACTCACTATAGGGCCTGTACTTGGCCTACTTCG  
 ISH\_nfia\_R: GATTTAGGTGACACTATAGGGAAATGAAGACTTGACGGC  
 ISH\_hey1\_F: TAATACGACTCACTATAGGGATCGAGAAGCGCCGGAGGGA  
 ISH\_hey1\_R: GATTTAGGTGACACTATAGTCCCGCTCAACCTGGGCTCT

Les sondes ARN pour *bmi1a* ont été synthétisées avec le kit de marquage d'ARN DIG (SP6/T7)

(Roche) sur 1 µg de clone d'ADNc linéarisé MGC:56403 IMAGE:5605189 (imaGenes GmbH, Berlin, Allemagne).

L'HIS est ensuite réalisée conformément au protocole publié par Thisse et Thisse (2008). Les larves fixées sont réhydratées et perméabilisées avec 10 µg/mL de protéinase K pendant 30 min à température ambiante. 50 larves issues de croisements *ezh2<sup>+/-</sup>* sont hybridées avec des sondes d'ARN antisens marquées à la digoxigénine à 70 °C. Après un lavage intensif, les sondes sont détectées avec un fragment Fab anti-digoxigénine-AP (Roche Diagnostics, 1093274, dilué au 1:10 000), puis la coloration est réalisée dans une solution qui contient 175,5 ng NBT et 122,5 ng BCIP en tampon Tris- Alcalin. À l'issue de l'HIS les larves sont imagées à l'aide d'un stéréomicroscope Leica MZ10F équipé d'une caméra numérique Leica DFC295. Après imagerie, les larves colorées sont génotypées.

### *Génotypage*

Pour le génotypage, l'ADN des larves est extrait à l'aide d'hydroxyde de sodium et de Tris (Dupret et al., 2018). Les larves sont individuellement placées dans des tubes à microcentrifugation contenant 20 µL de NaOH 50 mM et chauffées pendant 20 min à 95 °C. Les tubes sont ensuite refroidis à 4 °C puis 2 µL de Tris-HCl 1 M, pH 7,4, sont ajoutés pour neutraliser la solution basique. L'analyse génotypique est alors réalisée par PCR sur 2,5 µL d'échantillons en utilisant les amorces TAL\_ezh2\_En\_5' (AAATCGGAGAAGGGTCCTG) et TAL\_ezh2\_En\_3' (ACACACATGCAACTGGACTC), suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 2,5 %. L'insertion de 22 pb dans l'allèle mutant permet de distinguer les génotypes (+/+), (+/-) et (-/-).

### *Mesure de l'activité locomotrice*

Les tests de locomotion ont été réalisés sur des larves issues de croisements entre *ezh2<sup>+/-</sup>* à 5 jpf. Ces larves sont individuellement déposées dans des plaques 48 puits qui seront placées dans la chambre d'une ZebraBox (ViewPoint Life Sciences, Lyon, France). La ZebraBox est équipée d'une caméra infrarouge permettant l'enregistrement vidéo d'une plaque multi-puits dans des conditions de lumière et d'obscurité. La mesure de l'activité locomotrice des larves est réalisée selon un protocole comprenant une période initiale d'acclimatation de 10 minutes à l'obscurité, suivie de six phases alternées de 10 minutes à la lumière et à l'obscurité, à l'aide du logiciel ZebraLab avec un seuil de détection fixé à 35 et une valeur xmin fixée à 3 (ViewPoint

Life Sciences). Après l'enregistrement, les larves sont euthanasiées et leur génotype est déterminé comme indiqué précédemment. Les mesures de l'activité locomotrice ont été réalisées 5 fois, sur 3 croisements *ezh2<sup>+/-</sup>* indépendants.

### *Analyse statistique*

L'analyse des données a été réalisée à l'aide des logiciels de calcul statistique R/RStudio (Posit Software, PBC, Boston, MA, États-Unis ; <http://www.posit.co/>). Pour chaque plaque enregistrée, la normalité des données a été testée par un test de Shapiro-Wilk. Les différences entre les groupes ont ensuite été calculées par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn (\*,  $p < 0,01$  ; \*\*,  $p < 0,05$  ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Les données issues des 5 plaques enregistrées ont ensuite été regroupées, en indiquant la plaque d'origine de chaque larve. L'analyse statistique de l'ensemble des plaques a été réalisée en appliquant un test par permutation de type Fisher-Pitman, stratifié par plaque. Des comparaisons post-hoc entre génotypes pour chaque condition lumineuse ont été réalisées en utilisant un test de Wilcoxon suivi d'un ajustement de la p-valeur par la méthode de Holm (\*,  $p < 0,01$  ; \*\*,  $p < 0,05$  ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).



# Résultats

## 1. Effets de la mutation *ezh2* sur le développement neuronal

Afin d'examiner les conséquences de l'inactivation zygotique d'*ezh2* sur le développement cérébral chez le poisson zèbre, j'ai analysé, par HIS, l'expression de gènes impliqués dans divers aspects du développement neuronal. Mon étude a couvert plusieurs niveaux de différenciation cellulaire, des cellules souches neurales aux lignées gliales et neuronales matures. Dans un premier temps, j'ai évalué l'effet de la mutation d'*ezh2* sur les cellules souches neurales, en examinant l'expression de gènes associés à leur auto-renouvellement et au maintien de leur identité. J'ai ensuite étudié l'impact potentiel de cette mutation sur les oligodendrocytes ainsi que sur les cellules en prolifération afin de déterminer si l'inactivation d'*ezh2* perturbe le développement ou le maintien de ces populations. Pour approfondir ces premières observations, j'ai conduit une analyse ciblée du développement du cervelet, une structure particulièrement sensible aux altérations épigénétiques. Par ailleurs, j'ai exploré l'effet de la mutation sur le développement de différentes populations neuronales caractérisées par leurs neurotransmetteurs ainsi que sur l'expression de gènes clés de la voie Notch, connue pour son rôle dans la régulation de la différenciation neuronale. Pour finir, j'ai vérifié si les défauts développementaux constatés pouvaient entraîner des effets fonctionnels, en mesurant l'impact de la perte de fonction d'*ezh2* sur l'activité locomotrice des larves.

### 1.1 Cellules souches neurales

Les CSN sont essentielles au développement du système nerveux central, assurant à la fois l'expansion du tissu neural et la génération des différentes lignées cellulaires. Leur capacité d'auto-renouvellement et leur maintien dans un état indifférencié reposent sur des régulations transcriptionnelles et épigénétiques précises. Au cours du développement précoce, Ezh2 est fortement exprimé dans les cellules souches neurales et est impliqué dans la régulation de la balance entre auto-renouvellement et différenciation (Pereira et al., 2010 ; Kunoh et al., 2024).

BMI1 (PCGF4) est une PcG qui participe à la formation de certains complexes PRC1 ([Figure 2](#)) et est impliquée dans l'auto-renouvellement des CSN (Shi et al., 2008). Chez le poisson zèbre, l'orthologue *bmi1a* est exprimé au cours du développement précoce (Dupret et al.,

2016), ce qui en fait un marqueur pertinent pour l'étude des CSN. Afin de déterminer si la perte de fonction d'*ezh2* affecte le maintien des CSN, j'ai analysé par HIS l'expression de *bmi1a* chez les larves *ezh2* mutantes (Figure 26).

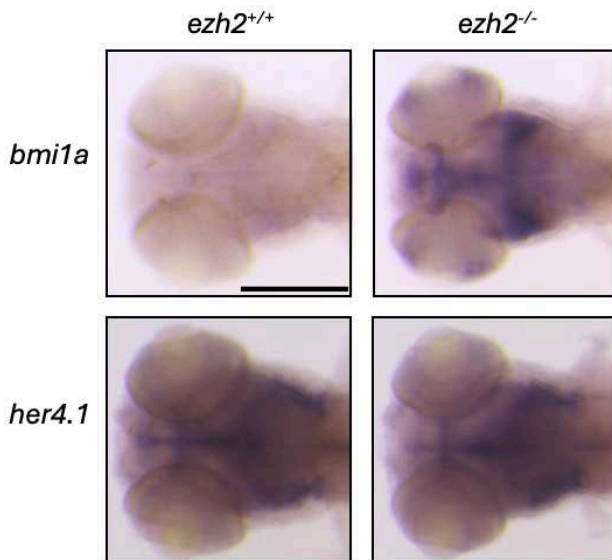


Figure 26. Marquage par hybridation *in situ* de l'expression de marqueurs des cellules souches neurales chez les larves *ezh2<sup>+/+</sup>* et *ezh2<sup>-/-</sup>* à 5 jpf.

Marquage de l'expression des gènes *bmi1a* et *her4.1*. Barre d'échelle : 200µm.

Les profils d'expression obtenus révèlent une très forte augmentation du signal associé à l'expression de ce gène dans le cerveau des larves *ezh2<sup>-/-</sup>* par rapport aux larves sauvages. L'augmentation du signal *bmi1a* peut s'interpréter de plusieurs façons. D'une part, il est possible que cette augmentation soit le reflet de l'élargissement du nombre de CSN dans le cerveau des larves *ezh2* mutante. La perte de fonction d'*ezh2* favoriserait alors l'auto-renouvellement des CSN et les maintiendrait dans un état indifférencié. D'autre part, l'augmentation du signal associé à *bmi1a* peut être le reflet direct d'une augmentation de la transcription de ce gène, qui suggère une réponse adaptative visant à renforcer l'activité des PRC1nc afin de maintenir la répression génique malgré la perte d'activité du PRC2.

Afin de déterminer si l'augmentation du signal *bmi1a* est associée à une augmentation de la population de CSN, j'ai marqué par HIS l'expression du gène *her4.1*, dont l'expression est associée au maintien de l'identité des CSN pendant les étapes tardives du développement (Takke et al., 1999) (Figure 26). Les profils d'expression obtenus avec la sonde *her4.1* révèlent que ce gène est exprimé dans toutes les zones de prolifération cellulaire du cerveau des larves

sauvages à 5 jpf. Aucune différence d'expression n'est observée pour ce gène entre les larves sauvages et *ezh2* mutantes, ce qui suggère que la mutation *ezh2* n'a pas d'effet visible sur le développement ou le maintien des populations de CSN chez le poisson zèbre. Ainsi, l'augmentation du signal associé à l'expression de *bmi1a* observée chez les larves *ezh2*<sup>-/-</sup> n'est probablement pas la conséquence d'une augmentation du nombre de CSN dans le cerveau des larves, mais est potentiellement liée à la mise en place de mécanismes compensatoires médiée par les complexes PRC1nc.

## 1.2 Oligodendrocytes

Ezh2 est impliqué dans la régulation et la prolifération des précurseurs des oligodendrocytes (OPC) ainsi que dans la différenciation et dans la maturation des oligodendrocytes (Sher et al., 2008). L'expression d'Ezh2 est détectée précocement dans les OPC et demeure jusqu'aux étapes tardives de la différenciation oligodendrocytaire, (Sher et al., 2012). Néanmoins, l'expression d'Ezh2 diminue progressivement au cours de la différenciation des oligodendrocytes ce qui semble correspondre à l'idée selon laquelle les complexes Polycomb régulent dynamiquement la hiérarchie des gènes lors du choix du destin cellulaire (Schuettengruber et Cavalli, 2009 ; Chou et al., 2011). Dans une étude réalisée sur un modèle murin par Wang et collaborateurs, les auteurs ont opéré une inactivation conditionnelle d'EZH2 dans les OPC (Wang et al., 2020). Leur étude met en évidence que la perte de fonction d'EZH2 n'affecte pas la génération des OPC mais retarde la différenciation et la maturation des oligodendrocytes. Je me suis donc demandé si l'inactivation zygotique d'*ezh2* chez le poisson produit un effet semblable sur le développement des oligodendrocytes.

Chez le poisson zèbre, le développement des oligodendrocytes débute vers 10,5 hpf (Ackerman & Monk, 2017). Les OPC proviennent de la partie ventrale du domaine pMN (progenitor domain of motoneurons). Ce domaine pMN est établi et défini par l'expression du FT *Olig2*, essentiel pour la génération des OPC. L'expression d'*olig2* est maintenue tout au long des étapes de développement des oligodendrocytes, y compris dans les oligodendrocytes matures (Emery et Lu, 2015 ; Sock et Wegner, 2021). Cependant, si le niveau d'expression d'*olig2* est très important dans les OPC, il diminue au cours de la différenciation ; les oligodendrocytes matures, n'expriment que des niveaux relativement modestes d'*Olig2* par rapport aux OPC (Meijer et al., 2012). Ainsi, l'expression d'*olig2* peut être utilisée comme un

marqueur constant de la lignée oligodendrocytaire (Park et al., 2007). J'ai donc marqué par HIS l'expression d'*olig2* sur des larves sauvages et *ezh2* mutantes à 2, 3 et 5 jpf (Figure 27).

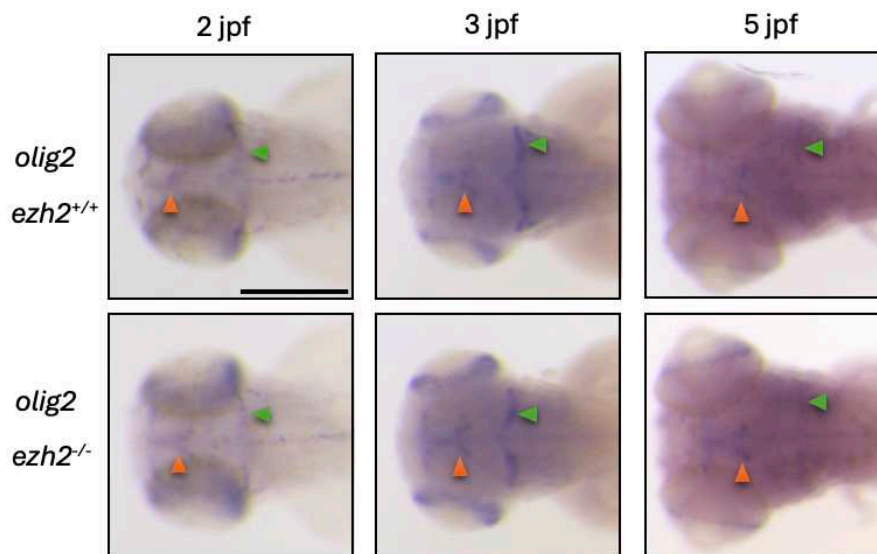


Figure 27. Marquage par hybridation *in situ* de l'expression du gène *olig2* chez les larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup> au cours du développement larvaire.

L'expression du gène *olig2* marque les oligodendrocytes dans le cerveau moyen (flèches orange) et le cervelet (flèches vertes). Barre d'échelle : 200µm.

A 2 jpf et 3 jpf, l'expression d'*olig2* est détectée dans le cerveau moyen et dans une région correspondant au cervelet en développement, conformément aux données de la littérature (Schebesta et Serluca, 2009). En revanche, à 5 jpf, on n'observe plus qu'un léger signal associé à *olig2* dans le cerveau moyen et dans le cervelet. Les profils d'expression obtenus sur les larves *ezh2* mutantes sont identiques à ceux provenant des larves sauvages. Ainsi, l'inactivation d'*ezh2* n'affecte pas visiblement l'expression d'*olig2* au cours du développement, ce qui suggère que la mutation n'a pas d'effet sur la génération des OPC.

Bien que l'expression d'*olig2* soit maintenue tout au long des étapes de formation des oligodendrocytes, elle diminue fortement au cours du développement. Les oligodendrocytes matures n'expriment que très faiblement *olig2* (Emery et al., 2015 ; Meijer et al., 2012) ce qui limite leur identification par HIS. En outre, l'expression d'*olig2* n'est pas exclusive aux oligodendrocytes. Ce gène est également exprimé dans les cellules eurydendroïdes, une population de neurones glutamatergiques localisée dans le cervelet (Bae et al., 2009). Ainsi,

le marquage de l'expression d'*olig2* ne suffit pas à déterminer l'effet de l'inactivation zygotique d'*ezh2* sur le développement des oligodendrocytes matures.

Pour obtenir plus d'informations sur l'effet de l'inactivation d'*ezh2* au cours du développement des oligodendrocytes, j'ai marqué par HIS des gènes dont l'expression est maintenue dans les oligodendrocytes matures : *sox10*, *mag* et *mpz* (Figure 28). Le gène *sox10* est exprimé à la fois dans les OPC en prolifération et dans les oligodendrocytes matures (Kuhlbrodt et al., 1998) ; les gènes *mag* et *mpz* codent pour des protéines entrant dans la composition des gaines de myéline et sont donc exclusivement exprimés dans les oligodendrocytes pré-myélinisants et myélinisants (Siems et al., 2021).

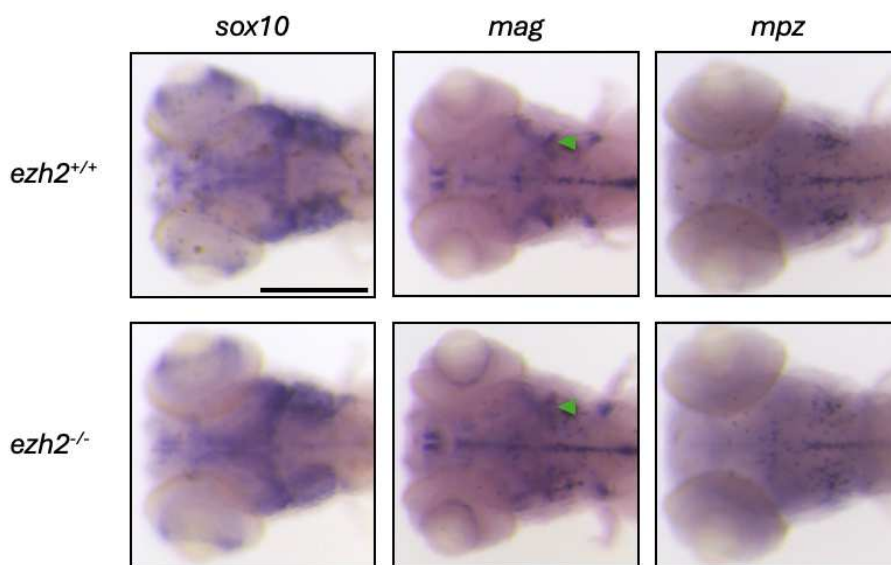


Figure 28. Marquage par hybridation *in situ* des gènes exprimés dans les oligodendrocytes matures chez les larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup> à 5 jpf.

Marquage de l'expression des gènes *sox10*, *mag* et *mpz*. Les flèches vertes indiquent le cervelet. Barre d'échelle : 200µm.

Les profils d'expression obtenus avec la sonde *sox10* révèlent que ce gène est exprimé dans les zones de prolifération cellulaire du cerveau chez les larves sauvages et *ezh2* mutantes à 5 jpf. Aucune différence n'est observée entre les deux groupes, ce qui indique que la mutation *ezh2* n'affecte pas le développement des cellules exprimant *sox10*. En outre, les gènes *mag* et *mpz* sont exprimés au niveau de la ligne médiale et de part et d'autre de celle-ci, dans le cerveau postérieur, chez le poisson zèbre à 5 jpf. On observe également le signal associé à *mag* au niveau du cervelet. Les profils d'expression obtenus sur les larves *ezh2*

mutantes sont identiques à ceux provenant de larves sauvages, ce qui indique que la mutation *ezh2* n'affecte pas le développement des oligodendrocytes myélinisants. Ensemble, les profils d'expressions des gènes *olig2*, *sox10*, *mag* et *mpz* révèlent que la perte de fonction d'*ezh2* n'affecte pas les OPC et n'a d'effet ni sur la différenciation ni sur la maturation des oligodendrocytes.

### 1.3 Prolifération cellulaire

Au cours du développement du SNC, une période de prolifération extensive est nécessaire pour générer un nombre suffisant de cellules progénitrices permettant d'assurer la formation correcte des tissus (Hardwick et al., 2015). L'expression du gène *pcna* est classiquement utilisé pour identifier les zones de prolifération cellulaire dans le cerveau du poisson zèbre au cours du développement (Wullmann et Knipp, 2000). La prolifération cellulaire est ubiquitaire dans tout le tube neural avant 24 hpf puis de plus en plus restreinte au fur et à mesure du développement cérébral. Afin de questionner l'effet de l'inactivation d'*ezh2* sur la prolifération des cellules cérébrales, j'ai marqué l'expression du gène *pcna* par HIS sur des larves sauvages et *ezh2* mutantes à 2, 3 et 5 jpf ([Figure 29](#)).

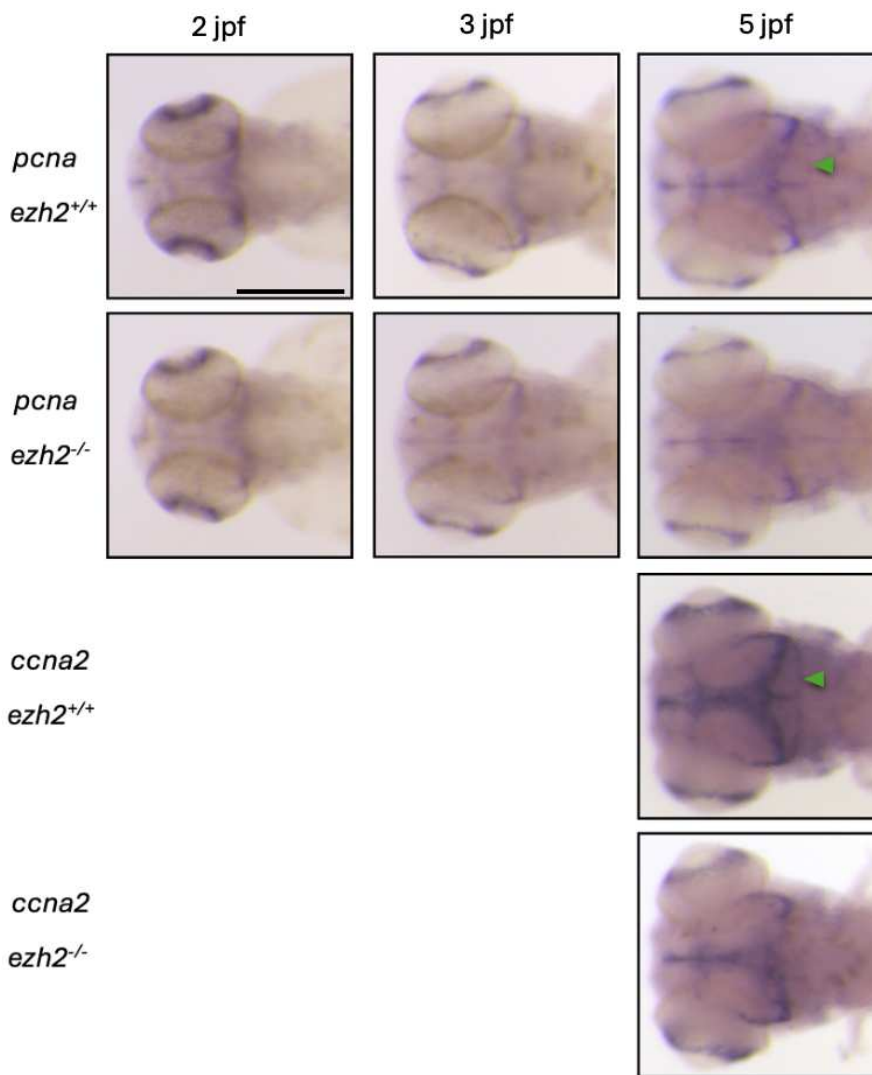


Figure 29. Hybridation *in situ* des marqueurs de la prolifération chez les larves *ezh2<sup>+/+</sup>* et *ezh2<sup>-/-</sup>* au cours du développement.

Marquage de l'expression des gènes *pcna* à 2, 3 et 5 jpf et *ccna2* à 5 jpf. Les flèches vertes indiquent le cervelet. Barre d'échelle : 200µm.

Les profils d'expression obtenus révèlent l'émergence de zones de prolifération distinctes à 2 jpf. L'activité proliférative est concentrée au niveau ventriculaire chez les larves sauvages comme chez les larves *ezh2* mutantes. On observe également le signal associé à *pcna* dans la rétine et dans le cerveau antérieur, au niveau du pallium et du subpallium. L'intensité de ce signal semble légèrement réduite chez les larves *ezh2<sup>-/-</sup>* par rapport aux larves sauvages. Cependant, l'HIS a été utilisée ici comme un outil principalement qualitatif, permettant de visualiser l'expression et la localisation des transcrits ciblés dans le cerveau en développement. Cette technique ne permet pas une quantification absolue de l'expression génique, il n'est donc pas possible de déterminer avec certitude si la différence observée dans

l'intensité du signal associé à *pcna* entre les larves *ezh2* mutantes et les larves sauvages est significative. A 3 jpf, les profils d'expression révèlent que le signal *pcna* est localisé à la marge du toit optique et dans les rétines. On observe également un léger signal dans le cerveau antérieur. Aucune différence n'est observée entre les larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup>. A 5 jpf, le signal associé à *pcna* se concentre toujours au niveau de la marge du toit optique et dans la rétine, ainsi que, de façon plus modérée, dans le cerveau antérieur à la fois chez les larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup>. On observe également l'apparition du signal associé à *pcna* dans le cervelet des larves sauvages. En revanche, les larves *ezh2* mutantes ne semblent pas exprimer *pcna* au niveau du cervelet.

Dans le but de confirmer la présence d'un défaut de prolifération spécifique aux cellules du cervelet chez les larves *ezh2* mutantes, j'ai également effectué un marquage de l'expression du gène *ccna2* (Figure 29). Ce gène code pour une cycline et son expression est associée à la division cellulaire (Cheng et al., 2020), il peut donc être utilisé comme un marqueur des cellules prolifératives. Les profils d'expression obtenus avec la sonde *ccna2* indiquent la présence d'un signal dans la marge du toit optique, la rétine et le cervelet des larves sauvages. En revanche, les larves *ezh2* mutantes ne présentent pas de signal associé à *ccna2* dans le cervelet.

Ensemble, ces résultats révèlent que l'inactivation d'*ezh2* n'affecte pas la prolifération des cellules cérébrales au cours des étapes précoces du développement. En revanche, celle-ci entraîne une réduction des signaux associés à l'expression des gènes *pcna* et *ccna2* dans les cellules du cervelet, à 5 jpf. Cela suggère que la perte de fonction d'Ezh2 affecte spécifiquement le maintien de la prolifération cellulaire dans le cervelet des larves de poisson zèbre à 5 jpf. Dans le cervelet, les marqueurs associés à la prolifération cellulaire tels que *pcna* et *ccna2* sont exprimés dans les cellules progénitrices neurales (Kaslin et al., 2013). Ainsi, la réduction des signaux associés à ces marqueurs suggère que l'inactivation zygotique d'*ezh2* pourrait affecter la formation ou le maintien des progéniteurs des neurones du cervelet.

## 1.4 Cellules du cervelet

### 1.4.1 Cellules progénitrices du cervelet

Les cellules progénitrices du cervelet sont localisées dans deux régions distinctes dans le cerveau du poisson zèbre en développement : la lèvre rhombique supérieure l'URL et la VZ.

Afin d'investiguer l'effet de la mutation *ezh2* sur les cellules progénitrices du cervelet, j'ai réalisé par HIS le marquage de l'expression de gènes spécifiquement exprimés dans les cellules progénitrices du cervelet : *atoh1a*, *atoh1c* et *ptf1a*.

Le gène *atoh1a* code pour un FT de la famille des bHLH, exprimé spécifiquement dans l'URL durant les stades précoces du développement (Adolf et al., 2004). Chez le poisson zèbre, *atoh1a* est impliqué dans la spécification des précurseurs des neurones excitateurs, notamment les granulaires du cervelet (Kidwell et al., 2018). Par ailleurs, le gène *atoh1c*, paralogue de *atoh1a*, code également pour un FT de la famille bHLH exprimé dans l'URL, mais avec une dynamique spatio-temporelle légèrement décalée. *atoh1c* marque une population complémentaire de cellules progénitrices, également à l'origine des cellules granulaires. Les gènes *atoh1a* et *atoh1c* sont exprimés dans des domaines d'expression distincts mais chevauchants, dans l'URL, et ont une fonction équivalente dans la génération des progéniteurs des cellules granulaires (Kani et al., 2010 ; Kidwell et al., 2018). L'analyse conjointe de l'expression de ces gènes permet ainsi d'identifier les cellules progénitrices des cellules granulaires et de détecter d'éventuels défauts de maintenance de ces progéniteurs chez les larves *ezh2* mutantes. En outre, le gène *ptf1a* code également pour un FT bHLH, initialement décrit comme étant impliqué dans la différenciation des cellules de la lignée pancréatique (Kawaguchi et al., 2002 ; Krapp et al., 1998). *ptf1a* est également exprimé dans le cervelet en développement, dans les cellules progénitrices localisées dans la VZ (Hoshino et al., 2005). L'expression de *ptf1a* dans les cellules progénitrices du cervelet est essentielle à la spécification des lignées neuronales inhibitrices du cervelet, en particulier les cellules de Purkinje et certains interneurons GABAergiques (Hoshino et al., 2005 ; Yamada et al., 2007). Ainsi, l'analyse de l'expression du gène *ptf1a* permet d'évaluer l'effet de la mutation du gène *ezh2* sur le développement des lignées de neurones inhibiteurs, en complément de l'analyse des lignées excitatrices dérivées des progéniteurs exprimant les gènes *atoh1*. Le marquage de l'expression de ces gènes a été réalisée sur des larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup> à 2 et 5 jpf ([Figure 30](#)).

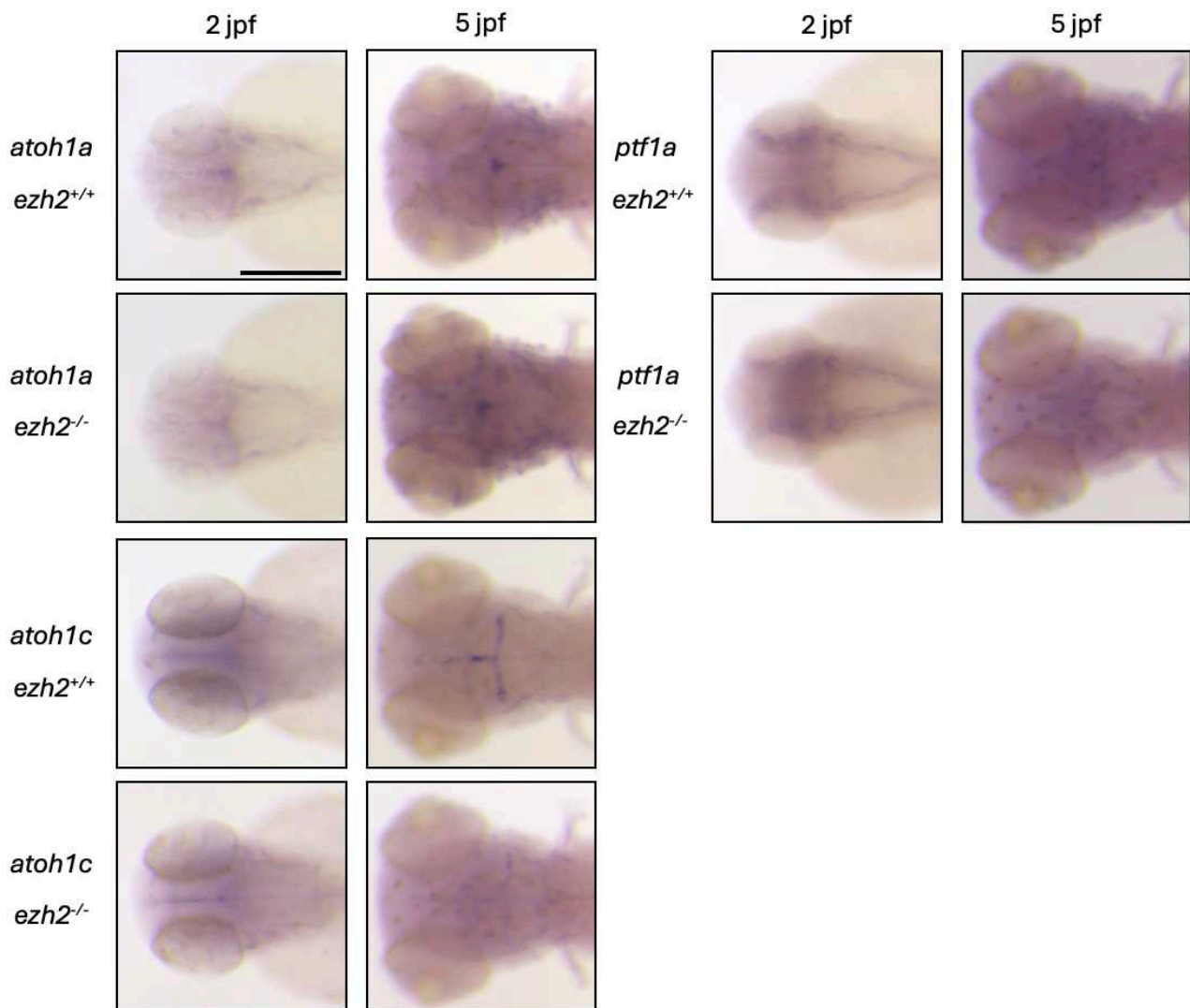


Figure 30. Hybridation *in situ* des marqueurs des progéniteurs du cervelet sur les larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup> au cours du développement.

Marquage de l'expression des gènes *atoh1a* et *atoh1c* et du gène *ptf1a* à 2 et 5 jpf. Barre d'échelle : 200µm

A 2 jpf, *atoh1a* et *atoh1c* sont exprimés dans l'URL chez les larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup>, conformément aux données issues de la littérature (Kani et al, 2010). A 5 jpf, l'expression d'*atoh1a* est restreinte à la partie rostro-médiale du cervelet, qui correspond à la Va, chez les larves sauvages comme chez les larves mutantes. En outre, *atoh1c* est exprimé niveau de la ligne médiane du Cc ainsi que dans le LCa et l'EG chez les larves *ezh2*<sup>+/+</sup> à 5 jpf. En revanche, l'expression d'*atoh1c* est fortement réduite dans les différents lobes du cervelet chez les larves *ezh2*<sup>-/-</sup>. Les profils d'expression obtenus avec la sonde *ptf1a* indiquent que ce gène est exprimé dans la VZ, conformément aux données de la littérature (Kani et al., 2010), chez les larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup> à 2 jpf. A 5jpf, le signal associé à *ptf1a* est détecté dans le cervelet des

larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup>. Cependant, les profils d'expression obtenus présentent un fort bruit de fond qui empêche de comparer l'intensité du signal et de déterminer s'il existe une différence entre les profils d'expression associés à la sonde *ptf1a*. En outre, le gène *ptf1a* est également connu pour être exprimé dans les cellules du pancréas chez le poisson zèbre (Lin et al., 2004). Lors de l'observation du marquage réalisé avec la sonde *ptf1a* sur les larves sauvages et *ezh2* mutantes à 5 jpf, j'ai également pris des images des larves de façon à pouvoir regarder le pancréas ([Figure 31](#)).

L'analyse des profils d'expression met en évidence que le gène *ptf1a* est fortement exprimé dans le pancréas des larves sauvages et *ezh2* mutantes à 5 jpf. En revanche, la taille du pancréas des larves *ezh2* mutantes apparaît réduite par rapport aux larves sauvages. Ce résultat est similaire à celui observé précédemment chez les mutants *ezh2* (Dupret et al., 2017) et *eed* (Raby et al., 2021) et suggère que la perte de fonction d'*ezh2* affecte le développement du pancréas exocrine chez le poisson zèbre.

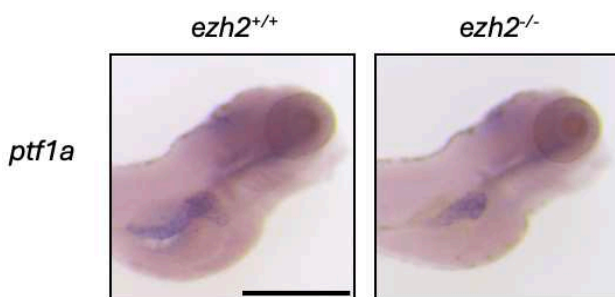


Figure 31. Profils d'expression du gène *ptf1a* dans le pancréas des larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup> à 5 jpf.

Images des larves marquées avec la sonde *ptf1a* en vue latérale de façon à permettre l'observation du pancréas. Barre d'échelle : 200µm.

Ainsi, il apparaît que l'inactivation d'Ezh2 n'a pas d'effet sur les progéniteurs du cervelet lors des étapes précoces du développement. La mutation ne semble pas non plus affecter le développement des cellules progénitrices exprimant *atoh1a*. En revanche, l'inactivation d'*ezh2* induit une réduction du signal associé à l'expression du gène *atoh1c* à 5 jpf, ce qui suggère que la mutation affecte le maintien des progéniteurs *atoh1c*<sup>+</sup> du cervelet chez le poisson zèbre. Au cours du développement, les cellules progénitrices *atoh1c*<sup>+</sup> donnent naissance aux cellules granulaires, les principaux neurones excitateurs du cervelet (Kani et al., 2010). L'altération du maintien des progéniteurs *atoh1c*<sup>+</sup> est donc susceptible de compromettre le développement de ces neurones.

#### 1.4.2 Cellules granulaires et des cellules de Purkinje

Les cellules granulaires représentent la population de neurones glutamatergiques majoritaire dans le cervelet et sont produites à partir des progéniteurs *atoh1+*. En aval d'*atoh1*, l'activation progressive du gène proneural *neurod1* dans les cellules granulaires post-mitotiques marque leur entrée dans un programme de différenciation neuronal (Butts et al., 2011). Les cellules granulaires matures sont caractérisées par l'expression du gène *vglut1*. La réduction du signal associé à l'expression d'*atoh1c* observée chez les larves *ezh2* mutantes suggère l'inactivation zygotique d'*ezh2* affecte le maintien de cette population de cellules progénitrices des cellules granulaires. Cependant, l'expression d'*atoh1a* n'est pas affectée chez les larves *ezh2* mutantes. Ces résultats amènent à se demander si la génération des cellules granulaires est affectée par l'inactivation d'*ezh2*. En outre, les cellules progénitrices exprimant *ptf1a* sont à l'origine de la production des cellules de Purkinje. Comme le marquage de l'expression de *ptf1a* n'a pas permis de déterminer si la mutation du gène *ezh2* affecte le maintien des cellules progénitrices *ptf1a+*, il n'est pas exclu que la mutation ait un effet sur le développement des cellules de Purkinje. Afin de déterminer si la mutation du gène *ezh2* a un effet sur la production de ces neurones, j'ai marqué par HIS l'expression de marqueurs des cellules granulaires, *neurod1* et *vglut1*, et des cellules de Purkinje, *pvalb7*.

Le gène *neurod1* code pour un FT de la famille bHLH, exprimé précocement dans les précurseurs des cellules granulaires engagés dans la différenciation (Kani et al., 2010). Chez le poisson zèbre, *neurod1* est détecté dès 2 jpf dans les régions neurogéniques du cervelet en développement (Mueller et Wullmann, 2002). Ce gène est spécifiquement exprimé dans les cellules neuronales post-mitotique, récemment engagées dans la différenciation et n'est pas exprimé par les neurones au cours des étapes plus tardives de la différenciation. Ainsi, l'expression de *neurod1* permet d'identifier les cellules engagées mais non différenciées, dans un état intermédiaire entre l'identité progénitrice *atoh1+* et la différenciation neuronale terminale caractérisée par l'expression de marqueurs fonctionnels. L'analyse de l'expression de *neurod1* permet donc de déterminer si l'inactivation d'*ezh2* interfère avec la capacité des cellules progénitrices à s'engager dans le programme neurogénique. En revanche, le gène *vglut1* code pour un transporteur vésiculaire du glutamate et est exprimé plus tardivement, dans les cellules granulaires matures (Bae et al., 2009). L'analyse du profil d'expression de ce gène permet donc d'évaluer si les cellules granulaires formées à partir des progéniteurs

*atoh1+* atteignent une maturité fonctionnelle dans le contexte de l'inactivation d'*ezh2* et complète ainsi les informations apportées par le marquage du gène *neurod1*. Cette analyse peut être complétée par le marquage de l'expression de *pvalb7*, codant pour une isoforme de parvalbumine, une protéine présente dans les neurones GABAergiques. Chez le poisson zèbre, il existe au moins neuf gènes de parvalbumine, mais *pvalb7* possède la particularité d'être exclusivement exprimé par les cellules de Purkinje et non par l'ensemble des neurones GABAergiques (Bae et al., 2009). L'expression de *pvalb7* est détectable dès 3 jpf dans les régions latérales du cervelet et permet d'identifier les cellules de Purkinje ayant acquis leur identité terminale. Le marquage de l'expression de ce gène permet d'évaluer si l'inactivation d'*ezh2* affecte la génération des cellules de Purkinje dans le cervelet des larves. Ainsi, l'analyse conjointe des profils d'expression de ces trois gènes permet de couvrir l'ensemble du processus de différenciation et offre une lecture fine des stades de différenciation affectés ou non par l'inactivation d'*ezh2*. Le marquage de l'expression de ces gènes a donc été réalisé sur des larves *ezh2* mutantes et des larves sauvages, à 3 et 5 jpf ([Figure 32](#)).

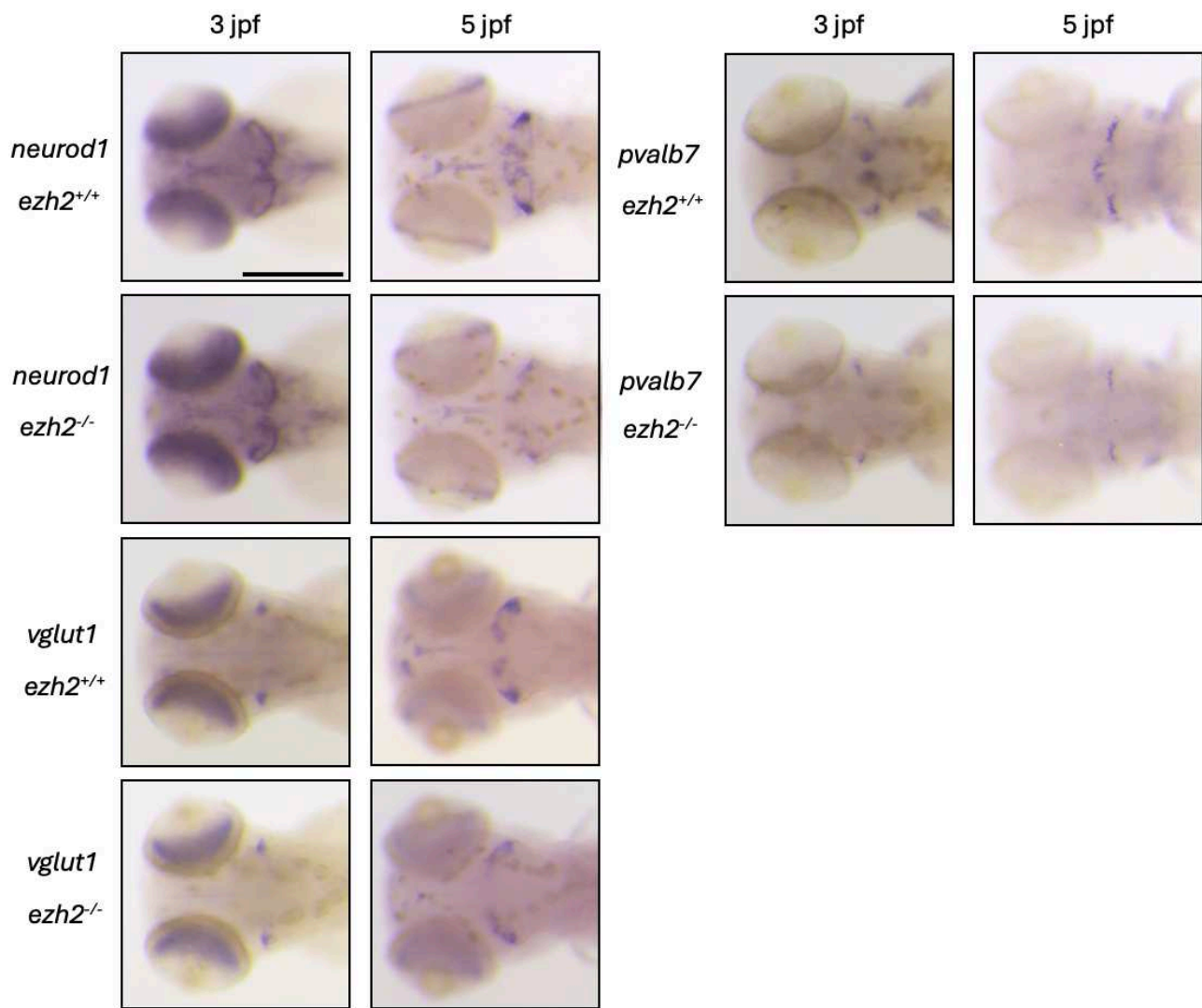


Figure 32. Hybridation *in situ* des marqueurs des cellules granulaires et des cellules de Purkinje sur les larves *ezh2<sup>+/+</sup>* et *ezh2<sup>-/-</sup>* au cours du développement.

Marquage de l'expression des gènes *neurod1*, *vglut1* et *pvalb7* à 3 et 5 jpf. Barre d'échelle : 200µm.

Les profils d'expression obtenus avec la sonde *neurod1* à 3 jpf indiquent que ce gène est exprimé dans le cervelet en développement, dans l'ensemble des structures correspondant aux futurs lobes du cervelet. L'expression de *neurod1* est identique entre les larves sauvages et *ezh2* mutantes à ce stade développemental. A 5 jpf, *neurod1* est exprimé dans la rétine et dans l'ensemble des lobes du cervelet chez les larves sauvages. En revanche, on observe une réduction du signal associé à *neurod1* dans le cervelet des larves mutantes. Le signal est uniquement maintenu dans la rétine et dans l'EG. De la même façon, l'expression de *vglut1* est détectée à 3 jpf dans les régions latérales du cervelet, qui correspondent à la future EG (Bae et al., 2009), chez les larves *ezh2<sup>+/+</sup>* et *ezh2<sup>-/-</sup>*. A 5 jpf, l'expression de *vglut1* est détectée

dans l'ensemble des lobes du cervelet chez les larves *ezh2<sup>+/+</sup>*. En revanche, les larves *ezh2<sup>-/-</sup>*, présentent un signal *vglut1* uniquement dans les parties latérales du cervelet, correspondant à l'EG. Le signal associé à l'expression du gène *vglut1* est réduit dans les autres lobes du cervelet chez les larves *ezh2* mutantes. Ainsi, il apparaît que la mutation *ezh2* affecte le développement des cellules exprimant les gènes *neurod1* et *vglut1* à 5 jpf, mais pas à 3 jpf. Cela suggère que l'inactivation d'*ezh2* impacte les étapes tardives du développement des cellules granulaires localisées dans le LCa et le CCe ; ces cellules semblent être correctement spécifiées mais échouer à se différencier en cellules granulaires mature. En revanche, la mutation ne semble pas affecter la différenciation des cellules granulaires de l'EG.

Les profils d'expression obtenus avec la sonde *pvalb7* indiquent que ce gène est exprimé dans l'ensemble des structures correspondant aux futurs lobes du cervelet chez les larves sauvages à 3 jpf. En revanche, chez les larves *ezh2* mutantes, seules les régions latérales du cervelet présentent un signal associé à *pvalb7*. De la même façon, les profils d'expression obtenus sur les larves *ezh2<sup>+/+</sup>* à 5 jpf mettent en évidence la présence d'un signal associé à *pvalb7* au niveau du CCe et de l'EG. Chez les larves *ezh2<sup>-/-</sup>*, le signal associé à *pvalb7* est uniquement détecté dans l'EG. Il semble donc que l'inactivation d'*ezh2* affecte le développement des cellules de Purkinje localisées dans la partie médiale du cervelet dès 3 jpf mais ne perturbe pas le développement des cellules de Purkinje localisées dans les régions latérales. L'ensemble de ces données indiquent d'une part que l'inactivation du gène *ezh2* affecte la génération des cellules granulaires et des cellules de Purkinje et d'autre part que la production de ces neurones dans l'EG ne semble pas être perturbée par la mutation.

Conjointement, l'analyse des profils d'expressions associés aux gènes *pcna*, *ccna2*, *atoh1a/c*, *ptf1a*, *neurod1* et *vglut1* mettent en évidence que l'inactivation du gène *ezh2* affecte les étapes tardives du développement du cervelet. En effet, le marquage par HIS de l'expression de ces gènes suggère que l'inactivation d'*ezh2* réduit la prolifération cellulaire et affecte le maintien de l'identité des progéniteurs des cellules granulaires *atoh1c<sup>+</sup>* à 5 jpf, ce qui résulte en une réduction de l'expression des marqueurs spécifiques des cellules granulaires. De façon surprenante, le marquage de l'expression de *pvalb7* met en évidence un effet plus précoce de l'inactivation d'*ezh2* sur le développement des cellules de Purkinje. Ainsi, la perte de fonction d'Ezh2 semble affecter spécifiquement le développement du cervelet chez le poisson zèbre et impacter différemment le développement des cellules granulaires et des cellules de Purkinje. L'effet de l'inactivation d'*ezh2* semble également différer en fonction

de la localisation des neurones ; les cellules granulaires et les cellules de Purkinje localisés dans l'EG semblent se développer normalement dans le contexte de l'inactivation d'*ezh2*.

#### 1.4.3 Migration des neurones du cervelet

La migration des cellules progénitrices est une étape essentielle dans le développement du cervelet et conditionne la différenciation correcte des cellules granulaires et des cellules de Purkinje. Les cellules granulaires dérivent des progéniteurs exprimant *atoh1*, qui migrent tangentiellement vers la surface dorsale du cervelet pour former la couche granulaire externe (EGL), où elles prolifèrent avant de migrer radialement vers l'intérieur et de se différencier (Butts et al., 2014). La migration des progéniteurs est finement régulée par des signaux moléculaires. En particulier, la nétrine-1 possède un rôle chimiotrope et attire les cellules dérivant des progéniteurs de l'URL vers leurs lieux de maturation (Gilthorpe et al., 2002). Chez la souris, EZH2 est requis pour restreindre l'expression de *Ntn1* aux progéniteurs ventraux et contribue au maintien de la position neuronale pendant la migration (Di Meglio et al., 2013). Chez le poisson zèbre, la nétrine-1 est codée par les gènes *ntn1a* et *ntn1b* (Lauderdale et al., 1997 ; Strähle et al., 1997) et on peut supposer qu'*Ezh2* joue un rôle dans la régulation de l'expression de ces gènes, à l'instar de son rôle chez la souris. Ainsi, la perte de fonction d'*ezh2* pourrait déréguler l'expression des gènes *ntn1a/b* et affecter la migration des progéniteurs des cellules granulaires, bloquant ainsi la différenciation des cellules granulaires. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai marqué par HIS l'expression du gène *ntn1a* chez des larves sauvages et *ezh2* mutantes à 2 et 5 jpf ([Figure 33](#)).

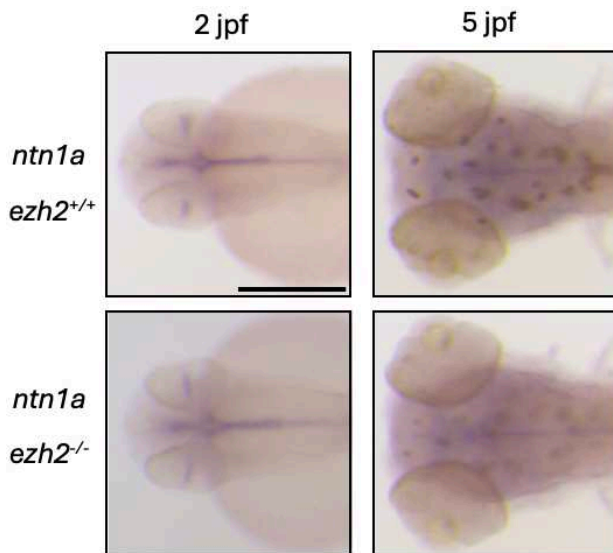


Figure 33. Hybridation *in situ* du gène *ntn1a* sur les larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup> au cours du développement.

Marquage de l'expression du gène *ntn1a* à 2 et 5 jpf. Barre d'échelle : 200µm.

Les profils d'expression obtenus avec la sonde *ntn1a* mettent en évidence que ce gène est exprimé dans la rétine et le long de la ligne médiale chez les larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup> à 2 jpf. A 5 jpf, *ntn1a* est légèrement exprimé dans les zones de prolifération cellulaire du cerveau ainsi qu'au niveau de la ligne médiale, chez les larves sauvages et *ezh2* mutantes. Aucune différence d'expression n'est observée entre les deux groupes de larves, la perte de fonction d'*ezh2* ne semble donc pas affecter l'expression du gène *ntn1a* chez le poisson zèbre. Ces résultats suggèrent donc que l'inactivation d'*ezh2* n'affecte pas la migration des cellules granulaire guidée par la nétrine 1.

#### 1.4.4 Facteurs de transcription FOXP/SKOR

L'analyse de l'expression de *pvalb7* a permis d'interroger l'effet de l'inactivation zygotique d'*ezh2* sur la différenciation terminale des cellules de Purkinje et a révélé une réduction du signal associé à l'expression de ce gène chez les larves *ezh2* mutantes. La réduction du signal *pvalb7* chez les larves *ezh2*<sup>-/-</sup> est détectable dès 3 jpf, alors que les autres marqueurs étudiés (*atoh1c*, *pcna*, *vglut1*...) ne présentent d'altérations qu'à 5 jpf. Cette observation suggère que les cellules de Purkinje pourraient constituer une population particulièrement sensible à la perte de fonction d'*ezh2* et présenter des altérations transcriptionnelles précoces pouvant précéder les défauts visibles dans les autres lignées neuronales du cervelet. Afin d'explorer plus finement l'impact potentiel de cette mutation sur la différenciation des cellules de

Purkinje, j'ai élargi mon analyse à une sélection de FT impliqués dans la maturation des cellules de Purkinje et dans la formation des circuits neuronaux du cervelet.

Une étude récente a identifié le rôle de certains gènes de la famille des Forkhead box et de la famille Ski/Sno dans le développement des cellules de Purkinje (Itoh et al., 2024). En particulier, les gènes appartenant à la famille des Forkhead Box *foxp2* et *foxp4* sont exprimés dans le cervelet chez le poisson zèbre et sont associés à la régulation des processus tardifs de différenciation des cellules de Purkinje. FOXP2 joue un rôle essentiel dans la maturation neuronale, la plasticité synaptique et la régulation des circuits moteurs et vocaux. Des mutations de FOXP2 chez l'humain sont associées à des troubles du langage, et chez la souris, sa perte de fonction entraîne des défauts moteurs fins et des anomalies de l'organisation des cellules de Purkinje (Shu et al., 2005). FOXP4 possède une fonction partiellement redondante avec celle de FOXP2 dans la différenciation des cellules de Purkinje (Itoh et al., 2024). En outre, les corépresseurs de la famille Ski/Sno, SKOR1 et SKOR2 sont impliqués dans la régulation de la maturation et de la migration des cellules des neurones GABAergiques du cervelet. Chez la souris, *Skor2* est fortement exprimé dans les cellules de Purkinje, où il est indispensable à leur positionnement correct, leur différenciation terminale, et leur connectivité avec les noyaux cérébelleux (Nakatani et al., 2014). Outre *Skor2*, *Skor1* est également exprimé dans les cellules de Purkinje mais son rôle dans leur différenciation reste incertain (Itoh et al., 2024 ; Nakatani et al., 2014). Chez le poisson zèbre, les gènes *skor1b* et *skor2*, orthologues aux gènes *Skor1* et *Skor2* des mammifères, sont exprimés dans les cellules de Purkinje en développement et semble avoir des fonctions similaires (Takeuchi et al., 2017). En complément du marquage de l'expression du gène *pvlab7*, l'analyse de l'expression des gènes *foxp2/4* et *skor1b/2* permet ainsi d'interroger plus précisément l'effet de la perte de fonction d'Ezh2 sur le développement des cellules de Purkinje ([Figure 34](#)).

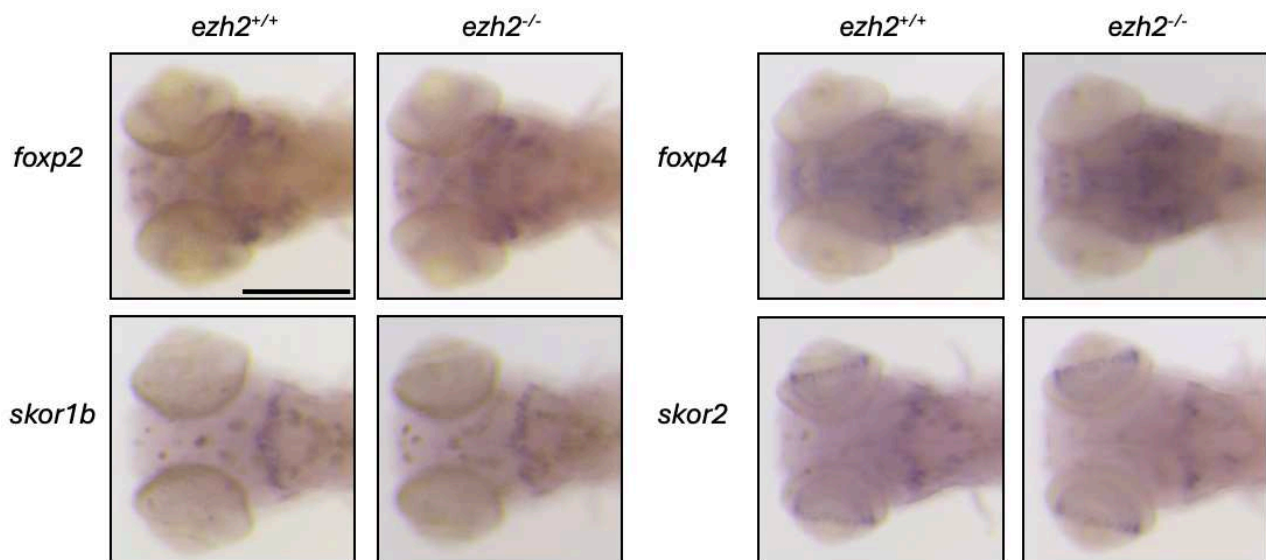


Figure 34. Hybridation *in situ* des régulateurs impliqués dans la différenciation des cellules de Purkinje sur les larves *ezh2<sup>+/+</sup>* et *ezh2<sup>-/-</sup>* à 5 jpf.

Marquage de l'expression des gènes *foxp2*, *foxp4*, *skor1b* et *skor2* à 5 jpf. Barre d'échelle : 200µm

Les profils d'expression obtenus avec les sondes *foxp2* et *foxp4* indiquent que ces gènes sont exprimés dans différentes régions cérébrales chez le poisson zèbre à 5 jpf, notamment dans le pallium et le subpallium et dans le toit optique. On observe également l'expression de ces gènes au niveau du cervelet. Le signal associé à l'expression de *foxp2* semble toutefois être limité aux régions latérales du cervelet, qui correspondent probablement à l'EG. Ces profils sont comparables entre les deux groupes de larves, sans différence visible. De même, les profils d'expression obtenus avec les sondes *skor1b* et *skor2* montrent une expression localisée dans le cervelet des larves de poisson zèbre à 5 jpf. Le signal associé à *skor1b* révèle que ce gène est exprimé dans l'ensemble des lobes du cervelet. En revanche, le signal associé à *skor2* semble être davantage concentré dans les régions latérales du cervelet. La comparaison des profils d'expression obtenus chez les larves *ezh2<sup>+/+</sup>* et *ezh2<sup>-/-</sup>* ne met pas en évidence de différences notables entre les deux groupes. Ainsi, bien que l'expression de *pvalb7* soit significativement réduite dans le cervelet des larves *ezh2<sup>-/-</sup>*, aucune différence notable n'est observée dans l'expression des gènes *foxp2*, *foxp4*, *skor1b* et *skor2*, pourtant connus pour leur rôle dans la spécification et la maturation des cellules de Purkinje. Cela suggère que la perte de fonction d'*ezh2* n'affecte pas directement l'initiation des programmes transcriptionnels définissant l'identité des cellules de Purkinje, c'est-à-dire l'activation des FT nécessaires à l'engagement des cellules dans la voie de différenciation relative aux cellules de

Purkinje. Ces résultats semblent plutôt indiquer que l'inactivation zygotique d'*ezh2* a un effet lors des étapes finales de la différenciation des cellules de Purkinje, lors de l'acquisition des caractéristiques fonctionnelles telles que l'arborisation dendritique ou l'intégration synaptique, ce qui se traduit par la réduction de l'expression de marqueurs tardifs comme *pvalb7*.

L'ensemble de ces résultats met en évidence le rôle central d'Ezh2 dans le contrôle épigénétique du développement du cervelet. Alors que les étapes précoces de spécification des cellules semblent relativement épargnées, la perte d'*ezh2* affecte la capacité des progéniteurs à poursuivre leur différenciation et altère sévèrement la génération des cellules de Purkinje et des cellules granulaires.

### 1.5 Neurotransmetteurs

Le système nerveux des vertébrés utilise une variété de neurotransmetteurs pour médier différentes fonctions, de la perception sensorielle au contrôle de comportements complexes. Chaque type neuronal joue un rôle spécifique au sein des circuits neuronaux et peut être caractérisé en fonction des neurotransmetteurs qu'il utilise pour moduler les autres neurones dans le circuit. Par exemple, le cervelet contient relativement peu de types cellulaires et ceux-ci sont majoritairement GABAergiques ou glutamatergiques. Les résultats issus des différents marquages par HIS a mis en évidence que l'inactivation d'*ezh2* affecte le développement de ces deux types de neurones dans le cervelet. Cependant, le cervelet n'est pas la seule structure cérébrale à contenir des neurones GABAergiques ou glutamatergiques. En outre, d'autres types neuronaux, utilisant d'autres neurotransmetteurs, peuplent les autres structures cérébrales. Ces éléments amènent à se demander si la perte de fonction d'*ezh2* affecte le développement de l'ensemble des neurones GABAergiques et glutamatergiques du cerveau et si la mutation impacte également le développement des neurones utilisant d'autres neurotransmetteurs.

Les neurotransmetteurs peuvent être identifiés en ciblant des marqueurs spécifiques impliqués dans leur synthèse. Classiquement, ces marqueurs sont des gènes codant pour une enzyme indispensable à la biosynthèse du neurotransmetteur ou codant pour une protéine de transport spécifique au neurotransmetteur. Afin d'obtenir une vue d'ensemble du développement neuronal chez les larves *ezh2* mutantes, j'ai synthétisé des sondes ciblant des gènes essentiels pour la synthèse du glutamate, du GABA, de la catécholamine, de la

sérotonine et de la dopamine ([Table 7](#)). J'ai ensuite réalisé des HIS avec chacune de ces sondes sur des larves sauvages et *ezh2* mutantes à 5 jpf ([Figure 35](#)).

Table 7. Récapitulatif des sondes utilisées pour marquer les neurones en fonction de leurs neurotransmetteurs.

<b>Neurotransmetteur</b>	<b>Marqueur</b>
<b>Glutamate</b>	<i>vglut1</i>
<b>GABA</b>	<i>gad1b</i>
<b>Catécholamine</b>	<i>slc18a2</i>
<b>Sérotonine</b>	<i>tph2</i>
<b>Dopamine</b>	<i>th</i>

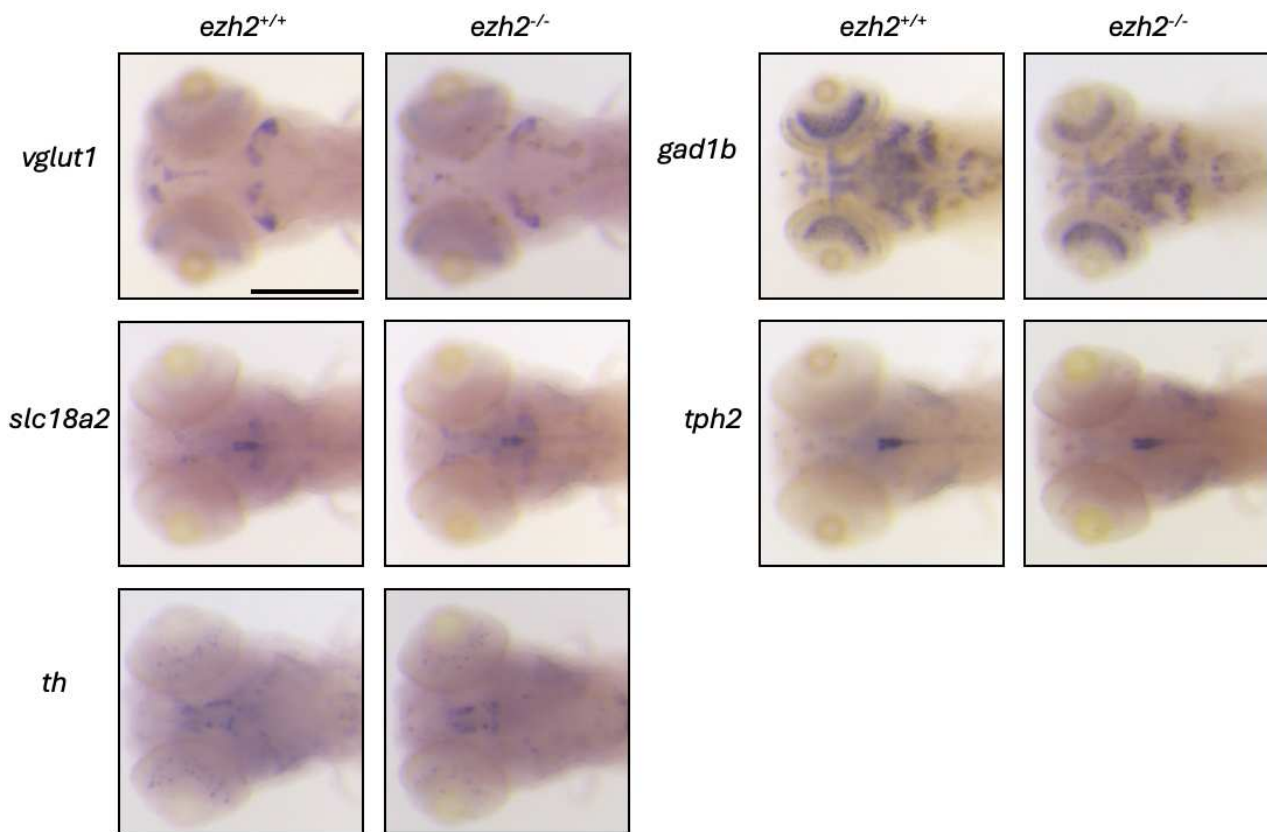


Figure 35. Hybridation *in situ* des marqueurs des principaux neurotransmetteurs sur les larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup> à 5 jpf.

Marquage de l'expression des gènes *vglut1*, *gad1b*, *slc18a2*, *tph2* et *th* à 5 jpf. Barre d'échelle : 200µm.

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur principal du système nerveux central et joue un rôle central dans les processus fonctionnels tels que l'apprentissage ou la mémoire. Les neurones glutamatergiques expriment des transporteurs du glutamate dont les transporteurs de glutamate vésiculaires (VGLUTs). Le gène *vglut1* code pour le transporteur de glutamate VGLUT1 et est classiquement utilisé comme marqueur des cellules glutamatergiques. A 5 jpf, *vglut1* est exprimé dans les cellules granulaires du cervelet chez les larves sauvages, au niveau du CCe et de l'EG. Des cellules *vglut1*<sup>+</sup> sont également détectées dans le torus longitudinalis (TL) et les noyaux de l'habenula. En revanche, les larves *ezh2* mutantes présentent une perte du signal associé à *vglut1* dans ces régions, seul le signal présent dans l'EG est maintenu. Il semble donc que la mutation *ezh2* affecte le développement des cellules granulaires dans le cervelet mais également des neurones glutamatergiques localisées dans le TL et les noyaux de l'habenula.

Chez les mammifères comme chez le poisson zèbre, les neurones GABAergiques expriment deux isoformes de la glutamate décarboxylase (Gad1 et Gad2), qui convertissent le glutamate

en GABA (Bae et al., 2009). Le poisson zèbre possède deux copies du gène codant pour Gad1, *gad1a* et *gad1b*, dont les profils d'expression sont similaires (Lüffe et al., 2021). A 5 jpf, le gène *gad1b* est exprimé dans plusieurs régions cérébrales dont la rétine, le subpallium, le toit optique et le cervelet. Les profils d'expression obtenus avec la sonde *gad1b* sont semblable entre les larves sauvages et *ezh2<sup>-/-</sup>*, ce qui suggère que la mutation *ezh2* n'affecte pas le développement des neurones GABAergiques qui ne sont pas des cellules de Purkinje.

Les catécholamines sont des composés organiques synthétisés à partir de la tyrosine et jouant le rôle de neurotransmetteur dont les plus courantes sont l'adrénaline, la noradrénaline et la dopamine. Les neurones catécholaminergiques peuvent être identifiés grâce au marquage du gène *vmat2 (slc18a2)* chez le poisson zèbre (Wen et al., 2008). A 5 jpf, le gène *slc18a2* est exprimé dans un cluster de cellules localisé dans le diencephale ainsi que dans les noyaux du raphé et l'hypothalamus chez les larves sauvages comme chez les larves *ezh2* mutantes. Ainsi, l'inactivation du gène *ezh2* ne semble pas affecter le développement des neurones catécholaminergiques.

La sérotonine est un neurotransmetteur jouant un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions physiologiques. La biosynthèse de la sérotonine met en jeu les enzymes Tph pour catalyser l'hydroxylation du tryptophan en 5HT. Le gène *tph2* (ou *tphR*) code pour l'enzyme Tph et est exprimé dans les neurones sérotoninergiques du raphé, dans le tronc cérébral (Teraoka et al., 2004). Les profils d'expression obtenus avec la sonde *tph2* présentent un signal au niveau des neurones du raphé, ce qui correspond au profil d'expression attendu. Il n'y a pas de différence visible entre les profils d'expression obtenus chez les larves sauvages et les larves *ezh2* mutantes, il semble donc que la mutation n'affecte pas le développement des neurones sérotoninergiques.

Les neurones dopaminergiques contrôlent différentes fonctions telles que l'initiation du mouvement ou les systèmes de la récompense. Ces neurones sont répartis en plusieurs clusters, localisés dans différentes structures cérébrales, et sont caractérisés par leur expression de la tyrosine hydroxylase (TH). Chez le poisson zèbre, les neurones dopaminergiques ont été identifiés dans le bulbe olfactif, le subpallium, la région préoptique, le prétectum, le thalamus, l'hypothalamus, le locus coeruleus et la medulla oblongata. Le marquage par HIS du gène *th*, codant pour la TH, met en évidence ces différents clusters chez les larves sauvages comme *ezh2* mutantes à 5 jpf, sans différences entre les profils d'expression.

L'ensemble de ces résultats met en évidence que la mutation *ezh2* perturbe le développement des neurones glutamatergiques dans le cervelet mais également dans le TL et les noyaux de l'habenula. En revanche, les neurones exprimant des gènes associés à d'autres neurotransmetteurs ne semblent pas être affectés par la mutation. Les profils d'expression obtenus avec les sondes *pvalb7* ([Figure 32](#)), marquant les cellules de Purkinje, et *gad1b*, marquant l'ensemble des cellules GABAergiques ([Figure 35](#)), mettent en évidence que la mutation *ezh2* n'entraîne pas une diminution globale du nombre de cellules GABAergiques chez les larves à 5 jpf mais impacte exclusivement les cellules de Purkinje localisées dans le cervelet.

### 1.6 Gènes de la voie Notch

Le développement du cervelet est orchestré par de nombreuses voies de signalisation telles que Wnt, BMP, Shh ou encore Notch. En particulier, la voie Notch est impliquée dans la régulation de la maintenance et de la différenciation des progéniteurs de l'URL au cours du développement (Machold et al., 2007). La dérégulation de la voie Notch est impliquée dans certains cancers et des études récentes ont mis en évidence qu'Ezh2 régule l'expression de Notch à travers l'interaction directe avec son promoteur (Batoool et al., 2019). L'existence d'une voie de signalisation Ezh2-Notch ainsi que l'implication de Notch au cours du développement neuronal fait de cette voie de signalisation un bon candidat pour expliquer les altérations observées dans le cerveau des larves *ezh2* mutantes. Ainsi, j'ai réalisé par HIS le marquage de différents gènes jouant un rôle en amont ou en aval de la voie de signalisation Notch ([Figure 36](#)).

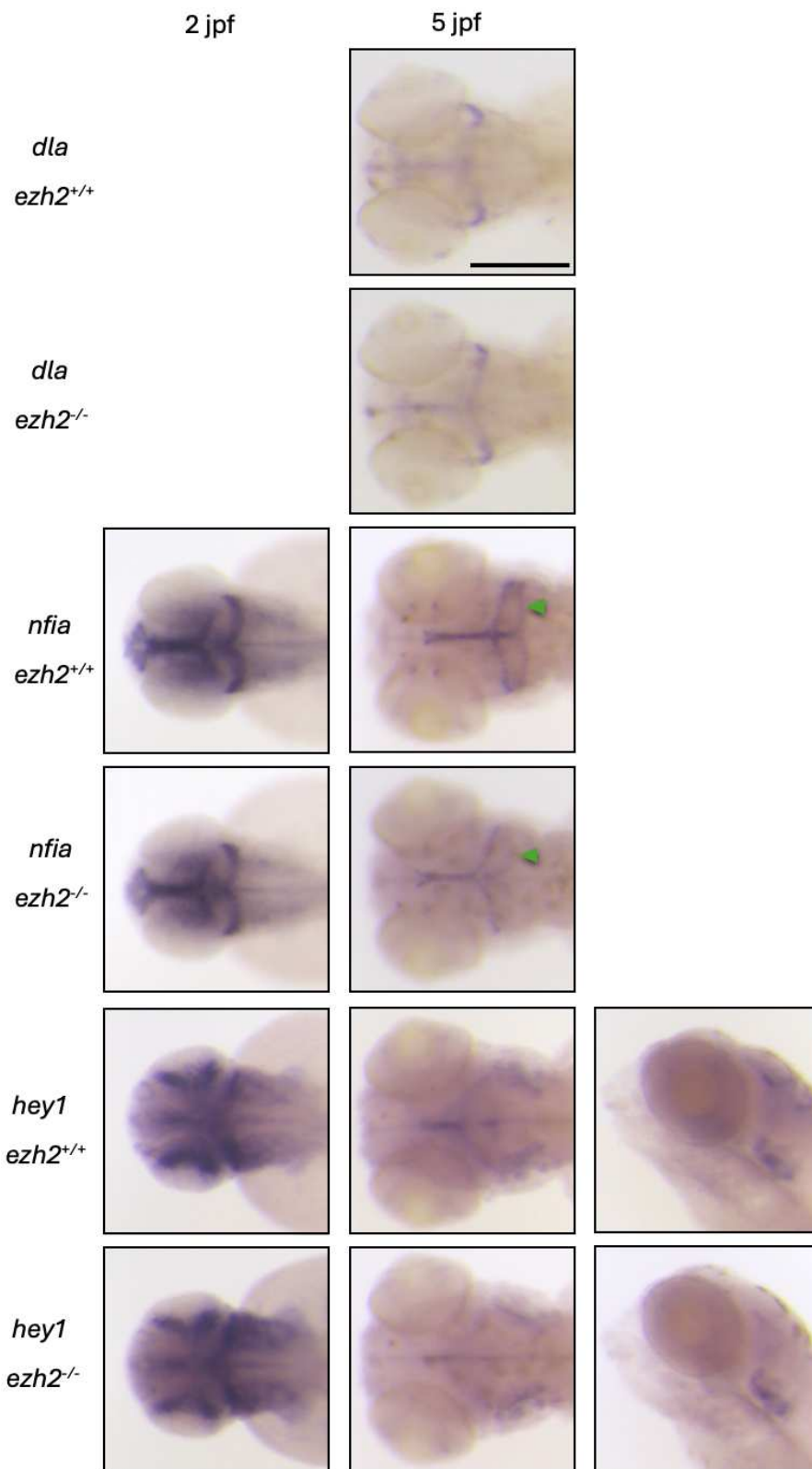


Figure 36. Hybridation *in situ* des marqueurs des gènes de la voie de signalisation Notch sur les larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup> à 2 et 5 jpf.

Marquage de l'expression du gène *dla* à 5 jpf et des gènes *nfia*, *hey1* et *ascl1b* à 2 et 5 jpf. Les flèches vertes indiquent le cervelet. Barre d'échelle : 200µm.

L'activation de la voie Notch dépend de la liaison d'un ligand transmembranaire tel que les ligands Delta. Le poisson zèbre possède quatre gènes codant pour ces ligands, dont trois sont exprimés dans les régions neurogéniques : *deltaA*, *deltaB* et *deltaD* (également nommés *dla*, *dlb* et *dld*) (Haddon et al., 1998). La distribution de l'ARNm et des protéines Dla dans le système nerveux du poisson zèbre est particulièrement bien documenté (Tallafuss et al., 2009), j'ai donc sélectionné ce gène pour identifier les précurseurs neuronaux exprimant les ligands Notch. A 5 jpf, les profils d'expression obtenus avec la sonde *dla* révèlent que ce gène est exprimé dans les zones prolifératives du cerveau. Les profils sont similaires entre les larves *ezh2<sup>+/+</sup>* et *ezh2<sup>-/-</sup>*, ce qui indique que la perte de fonction d'*ezh2* n'affecte pas les niveaux d'expression du ligand Dla.

Une fois activée, la voie Notch induit l'expression de gènes effecteurs de la famille Hes/Hey, dont *hey1*. L'expression de *hey1* entraîne la répression de l'expression des gènes proneuraux, ce qui contribue au maintien de l'identité des cellules progénitrices neurales (Sakamoto et al., 2003). A 2 jpf, *hey1* est exprimé dans les régions prolifératives du cerveau en développement chez les larves sauvages. Les larves *ezh2* mutantes présentent des profils d'expression identiques. A 5 jpf, le gène *hey1* est exprimé au niveau de la ligne médiale et du cervelet chez les larves sauvages. En revanche, les profils d'expression obtenus sur les larves *ezh2<sup>-/-</sup>* mettent en évidence une réduction du signal associé à *hey1* dans ces deux régions. Cette réduction est davantage visible lorsqu'on observe les larves latéralement. Ainsi, il semble que la mutation *ezh2* affecte l'expression du gène cible de la voie Notch *hey1* au cours des étapes tardives du développement.

NFIA est un facteur de transcription nécessaire pour l'expression de certains gènes cibles de la voie Notch. En particulier, l'induction de NFIA par la voie Notch entraîne sa liaison aux promoteurs des gènes astrocytaires et confère ainsi un potentiel de différenciation aux cellules progénitrices neurales (Namihira et al., 2009). En outre, le gène *nfia* est exprimé à la fois dans les cellules progénitrices des cellules granulaires et dans les cellules granulaires matures et favorise respectivement leur migration et leur maturation (Fraser et al., 2017). Les profils d'expression obtenus avec la sonde *nfia* révèlent que ce gène est exprimé de façon identique chez les larves *ezh2<sup>+/+</sup>* et *ezh2<sup>-/-</sup>* à 2 jpf. Le signal associé à *nfia* est localisé dans le cerveau antérieur, le toit optique et le cervelet. A 5 jpf, le signal associé à *nfia* est localisé dans le toit optique et le cervelet des larves sauvages. En revanche, les larves *ezh2* mutantes présentent une réduction du signal *nfia* dans ces régions. Cette réduction est particulièrement

marquée dans le cervelet. Ainsi, la mutation *ezh2* semble affecter l'expression du gène *nfia* au cours des étapes tardives du développement.

L'ensemble des résultats obtenus semblent mettre en évidence que la perte de fonction d'Ezh2 affecte l'expression de gènes situés en aval de la voie de signalisation Notch. En effet, les niveaux d'expression de *dla* sont identiques entre les larves sauvages et *ezh2* mutantes, suggérant ainsi que la mutation *ezh2* n'affecte pas l'expression des ligand Notch. En revanche, on observe une réduction de l'expression des gènes *hey1* et *nfia*, lesquels sont normalement induits par la signalisation Notch. Ainsi, on peut supposer que l'inactivation d'*ezh2* affecte la transcription de certains facteurs nécessaires pour l'activation des gènes cibles de la voie Notch. Cependant, le marquage par HIS seul ne permet pas de confirmer avec certitude ce mécanisme. En effet, la perte de signal associé aux gènes *hey1* et *nfia* dans le cervelet des larves pourrait également résulter de la diminution du nombre de cellules exprimant normalement ces gènes. Ainsi, des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour approfondir l'effet de la perte de fonction d'*ezh2* dans la signalisation Notch au cours du développement du poisson zèbre.



## 2. Effets de la mutation *ezh2* sur l'activité locomotrice

L'analyse de l'effet de la perte de fonction d'*ezh2* au cours du développement cérébral chez le poisson zèbre met en évidence le rôle central d'Ezh2 dans le contrôle épigénétique du développement du cervelet. Le cervelet est impliqué dans le contrôle moteur, notamment dans la régulation de la posture et de l'activité locomotrice à travers l'activité des cellules de Purkinje (Auer et al., 2025 ; Chang et al., 2020). L'inactivation d'Ezh2 affecte le niveau d'expression de *pvalb7* dans le cerveau des larves, ce qui suggère que la mutation impacte le développement des cellules de Purkinje. La réduction du nombre de neurones cérébelleux pourrait avoir des conséquences fonctionnelles et entraîner l'apparition de phénotypes locomoteurs chez les larves *ezh2* mutantes. Afin de questionner l'implication d'*ezh2* dans la régulation de l'activité locomotrice des larves, j'ai tout d'abord réalisé un test de thigmotactisme puis j'ai mesuré et comparé l'activité locomotrice des larves sauvages et *ezh2* mutantes, à 5 jpf. Ces tests ont été réalisés dans une chambre d'observation Zebrabox (ViewPoint Life Sciences), équipée d'une caméra infrarouge permettant l'enregistrement vidéo d'une plaque multi-puit dans des conditions de lumière et d'obscurité.

Le test de thigmotactisme consiste à évaluer la tendance des larves de poisson zèbre à rester à proximité des limites de leur environnement plutôt qu'à explorer librement son centre. Ce comportement est conservé chez de nombreuses espèces dont le rat (Treit et Fundytus, 1988), l'humain (Kallai et al., 2007) et le poisson zèbre (Champagne et al., 2010) et sert de marqueur d'anxiété ou de stress. La réalisation d'un test de thigmotactisme préalablement à la mesure de l'activité locomotrice est essentiel pour s'assurer que l'inactivation d'*ezh2* n'induit pas chez les larves mutantes une anxiété accrue, ce qui pourrait ensuite biaiser les mesures de locomotion. Pour ce test, les larves ont été disposées dans une plaque 24 puits qui a ensuite été placée dans la chambre d'observation de la Zebrabox. Chaque puit est virtuellement divisé en deux zones, externe et interne, de surface équivalente (Figure 37, A). La phase de test comprend un enregistrement de 10 minutes puis la mesure de la distance parcourue et du temps passé par chaque larve dans chacune des zones du puit. A l'issue de l'enregistrement, les larves ont été génotypées afin de pouvoir analyser le thigmotactisme des larves en fonction de leur génotype. Les données obtenues ont ensuite été informatiquement traitées pour obtenir une représentation graphique des résultats (Figure 37 C, D), avec le logiciel R. Les résultats du test de thigmotactisme indiquent qu'il n'y

a pas de différence significative, ni dans la distance parcourue dans la zone externe, ni dans le temps passé dans la zone externe, entre les larves *ezh2<sup>+/+</sup>* et *ezh2<sup>-/-</sup>*. Ainsi, la mutation *ezh2* n'influence pas le niveau d'anxiété des larves à 5 jpf.

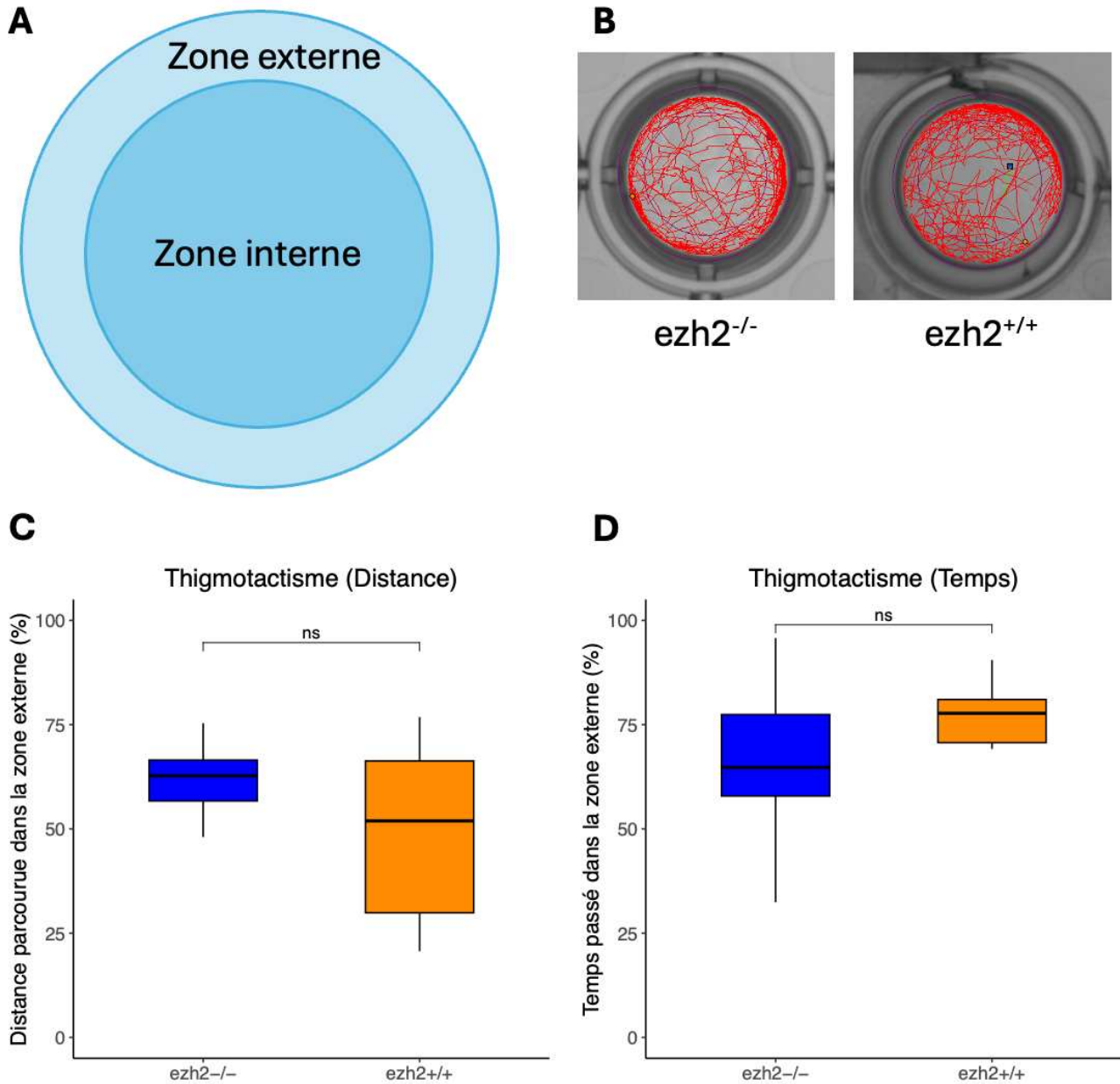


Figure 37. Analyse du comportement de thigmotactisme chez les larves sauvages et *ezh2* mutantes à 5 jpf.

(A) Représentation schématique d'un puit de la plaque. (B) Tracé du déplacement d'une larve *ezh2<sup>-/-</sup>* et d'une larve *ezh2<sup>+/+</sup>* pendant l'enregistrement. (C) Distance parcourue par les larves *ezh2<sup>-/-</sup>* (bleu, n = 9), *ezh2<sup>+/+</sup>* (orange, n = 6) dans la zone externe en pourcentage de la distance totale parcourue. (D) Temps passé dans la zone externe par les larves en pourcentage du temps total de la session. Analyses statistiques réalisées par un test de Wilcoxon. ns : non-significatif.

L'analyse de l'activité locomotrice est un des outils comportementaux les plus utilisés chez le poisson zèbre. Contrairement aux études comportementales qui se concentrent généralement sur le contrôle moteur et la biomécanique de la nage, les tests d'activité locomotrice s'intéressent aux caractéristiques globales de la locomotion telles que la distance parcourue ou le temps de nage (Widrick et al., 2023). Afin de déterminer si la mutation du gène *ezh2* affecte l'activité locomotrice des larves, des enregistrements ont été réalisés sur des larves issues de croisements entre poisson zèbre *ezh2*<sup>+/-</sup>. Les larves ont été individuellement disposées dans des plaques 48 puits puis l'enregistrement de l'activité locomotrice a été réalisée selon un protocole comprenant une période d'acclimatation initiale de 10 minutes dans l'obscurité, suivie de six phases alternées de 10 minutes de lumière et d'obscurité. Comme décrit précédemment (MacPhail et al., 2009), le passage de l'obscurité à la lumière diminue considérablement l'activité larvaire, tandis que le retour à l'obscurité est associé à une augmentation de l'activité locomotrice. Un premier test de locomotion a été réalisé sur un lot de larves âgées de 5 jpf et disposées dans une plaque 48 puits. A l'issue de l'enregistrement, les larves ont été génotypées afin de pouvoir analyser le comportement locomoteur des larves en fonction de leur génotype.

L'enregistrement avec la ZebraBox permet d'obtenir pour chaque larve la mesure de la distance parcourue sur deux minutes. Cette mesure est répétée toutes les deux minutes, pendant les 70 minutes de la session. On obtient donc pour chaque larve 35 valeurs, correspondant aux 35 plages de 2 minutes. Pour traiter les données, j'ai dans un premier temps regroupé les valeurs dans un tableau et associé à chaque larve son génotype. J'ai ensuite importé ce tableau de données brutes dans le logiciel R afin de réaliser les tests statistiques et les représentations graphiques. J'ai codé un script R complet me permettant de traiter les données issues des différents enregistrements de manière uniformisée. Le suivi temporel de l'activité locomotrice des larves ([Figure 38, A](#)) révèle une oscillation marquée de la locomotion, reflétant l'alternance des phases lumineuses et obscures, avec une amplitude globalement plus élevée chez les larves mutantes. En effet, en dehors de la phase d'acclimatation (de 0 à 10 minutes), la distance moyenne des larves *ezh2* mutante se situe toujours 100 à 200mm au-dessus de celle des larves sauvages. Cette tendance est particulièrement marquée au cours des phases d'obscurité. Afin de déterminer si la différence observée est statistiquement significative, j'ai réalisé pour chaque larve la moyenne de la distance parcourue pendant les phases sombres et pendant les phases lumineuses. J'ai ainsi

pu réaliser un graphique en boîte à moustache représentant la distance moyenne parcourue par chaque larve en fonction de la phase de lumière et de son génotype (Figure 38, B). Les résultats indiquent que les larves *ezh2* mutantes ont une activité locomotrice significativement supérieure à celle des larves sauvages à la fois pendant les phases de lumière et d'obscurité.

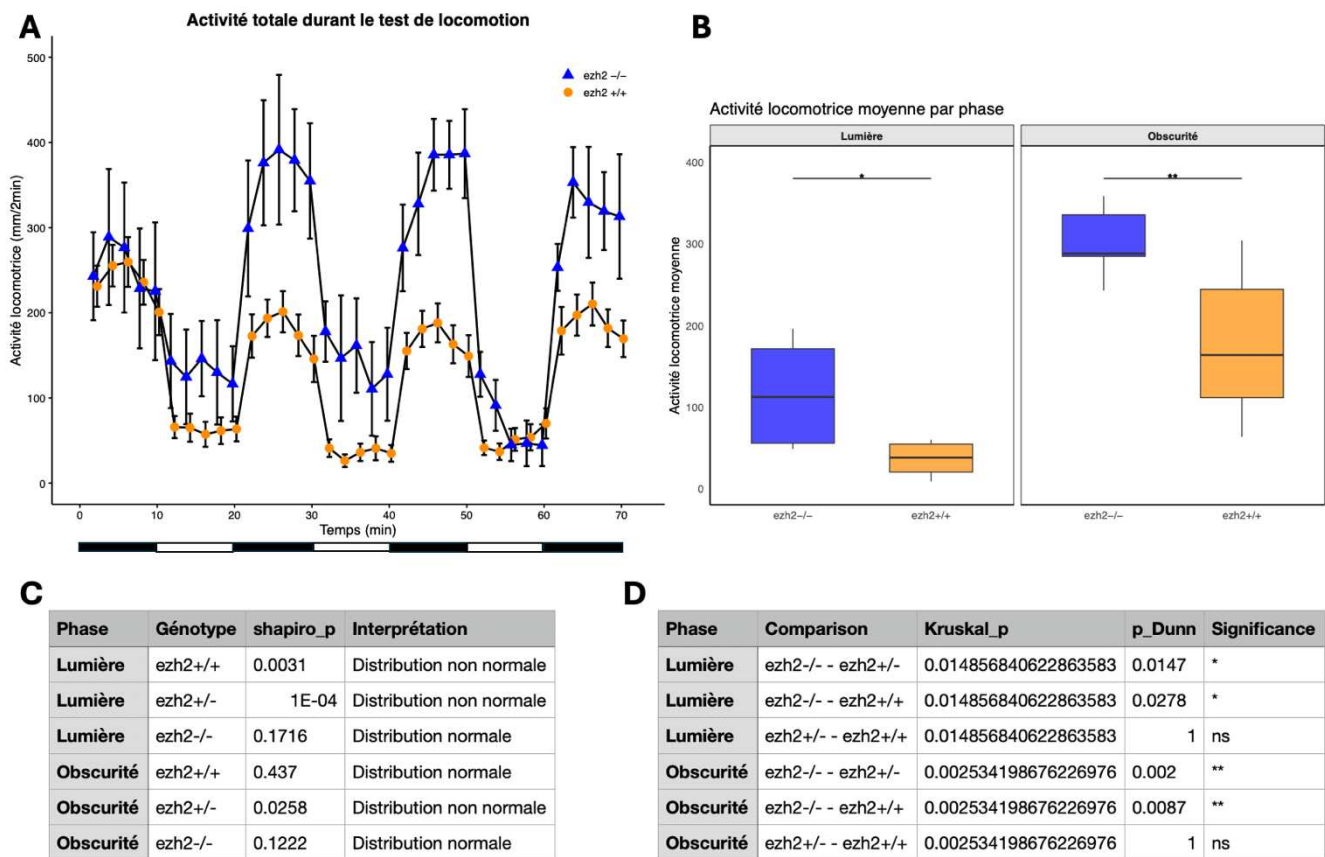
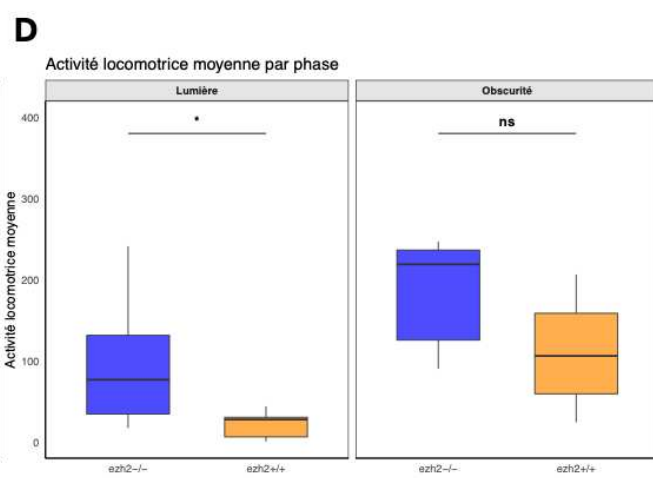
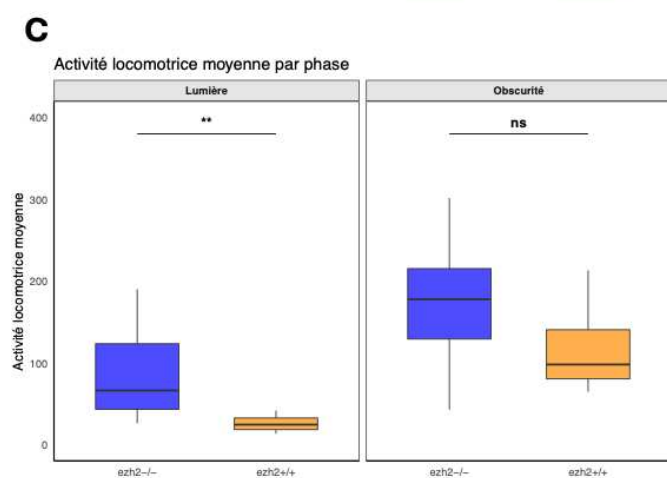
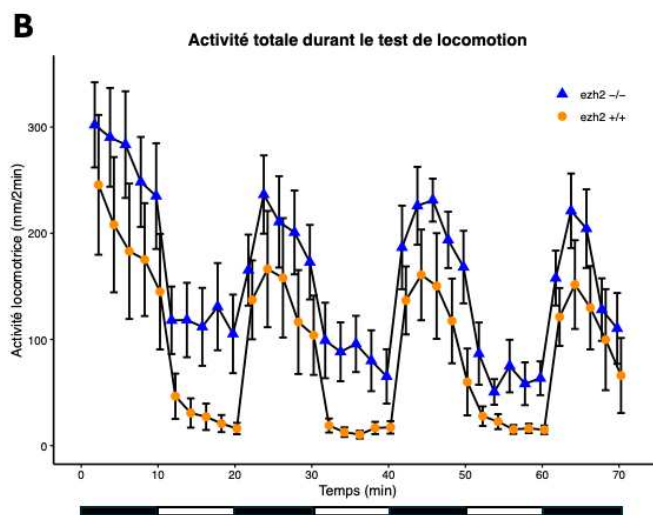
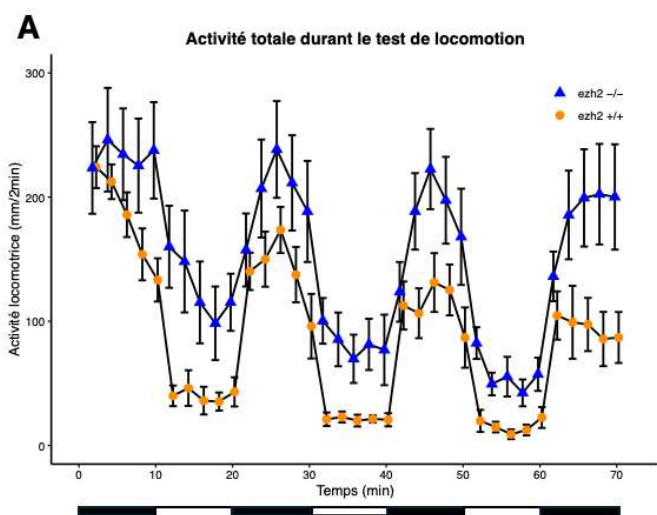


Figure 38. Analyse de l'activité locomotrice chez les larves de poisson zèbre *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup>.

(A) Activité locomotrice totale (en mm/2min) au cours du test de locomotion. Les courbes représentent l'activité locomotrice moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM) pour chaque génotype : *ezh2*<sup>-/-</sup> (triangles bleus, n = 6) et *ezh2*<sup>+/+</sup> (cercles orange, n = 15). Les barres noires et blanches sous l'axe des abscisses indiquent les phases d'obscurité (noir) et de lumière (blanc). (B) Activité locomotrice moyenne selon la phase (lumière ou obscurité) pour chaque génotype. Les boîtes représentent les distributions des valeurs individuelles, avec la médiane indiquée par une ligne horizontale. (C) Résultats du test de Shapiro-Wilk. La distribution des valeurs ne suit pas une loi normale dans tous les groupes testés. Il convient donc d'utiliser des tests statistiques non paramétriques. (D) Résultats des tests de Kruskal-Wallis suivis de tests post-hoc de Dunn (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* < 0.001).

L'analyse de l'activité locomotrice globale des larves au cours de la première session d'enregistrement suggère donc l'apparition d'un phénotype d'hyperactivité locomotrice chez les larves *ezh2* mutantes à 5 jpf, à la fois pendant les phases de lumière et les phases d'obscurité. Afin d'évaluer la robustesse de ce résultat, j'ai reproduit ce test deux fois, sur deux plaques 48 puits à chaque fois ([Figure 39](#) et [Figure 40](#)) et j'ai traité les données en réutilisant mon script R.



**E**

Phase	Génotype	shapiro_p	Interprétation
Lumière	ezh2+/+	0.6413	Distribution normale
Lumière	ezh2+/-	0	Distribution non normale
Lumière	ezh2-/-	0.0887	Distribution normale
Obscurité	ezh2+/+	0.2559	Distribution normale
Obscurité	ezh2+/-	0.0131	Distribution non normale
Obscurité	ezh2-/-	0.7635	Distribution normale

**F**

Phase	Génotype	shapiro_p	Interprétation
Lumière	ezh2+/+	0.418	Distribution normale
Lumière	ezh2+/-	0.5385	Distribution normale
Lumière	ezh2-/-	0.1797	Distribution normale
Obscurité	ezh2+/+	0.2778	Distribution normale
Obscurité	ezh2+/-	0.0693	Distribution normale
Obscurité	ezh2-/-	0.0609	Distribution normale

**G**

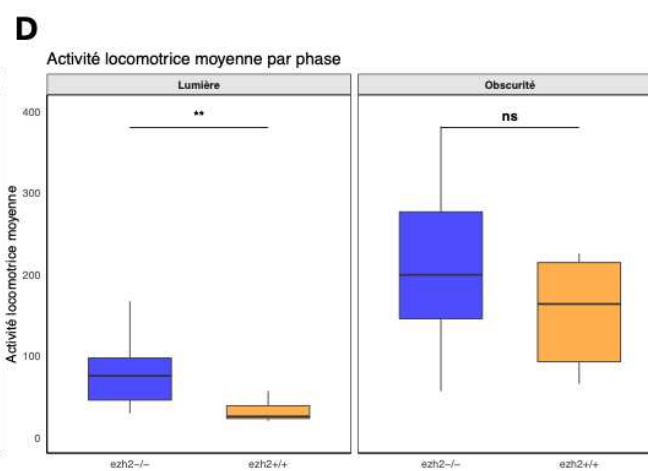
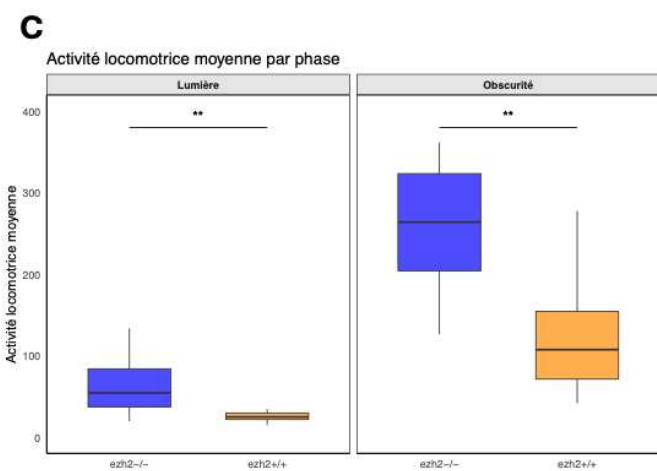
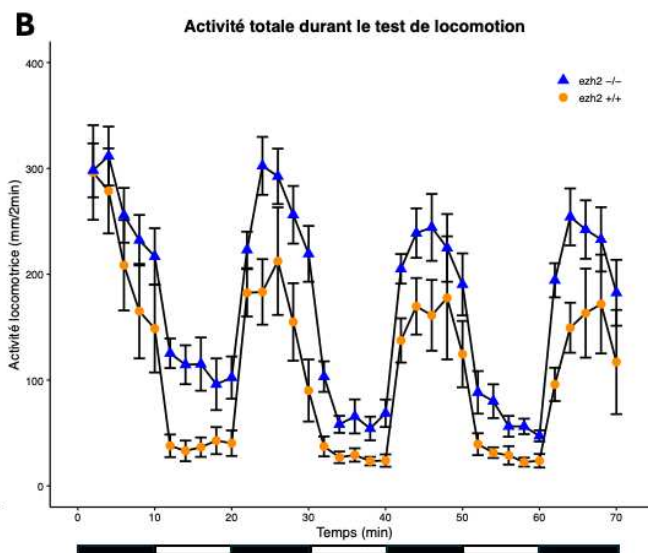
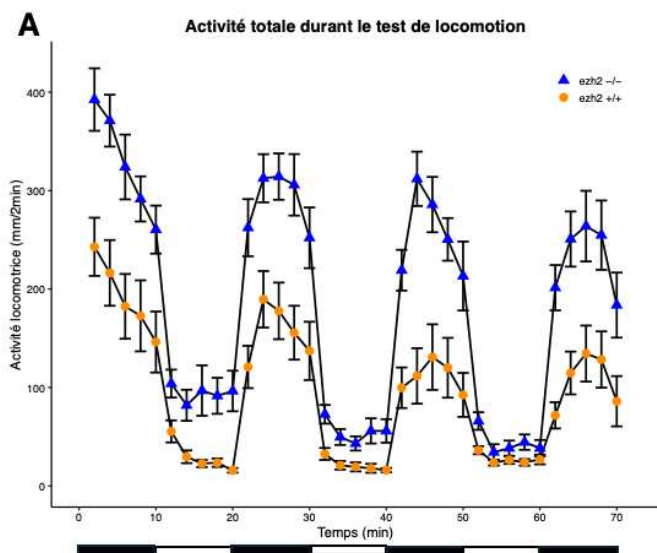
Phase	Comparison	Kruskal_p	p_Dunn	Significance
Lumière	ezh2-/- - ezh2+/-	9.20378146289044e-5	1E-04	***
Lumière	ezh2-/- - ezh2+/+	9.20378146289044e-5	0.0031	**
Lumière	ezh2+/- - ezh2+/+	9.20378146289044e-5	1	ns
Obscurité	ezh2-/- - ezh2+/-	0.05576840705395173	NA	ns
Obscurité	ezh2-/- - ezh2+/+	0.05576840705395173	NA	ns
Obscurité	ezh2+/- - ezh2+/+	0.05576840705395173	NA	ns

**H**

Phase	Comparison	Kruskal_p	p_Dunn	Significance
Lumière	ezh2-/- - ezh2+/-	0.006855307681486054	0.0139	*
Lumière	ezh2-/- - ezh2+/+	0.006855307681486054	0.0168	*
Lumière	ezh2+/- - ezh2+/+	0.006855307681486054	1	ns
Obscurité	ezh2-/- - ezh2+/-	0.048133433566929534	0.0541	ns
Obscurité	ezh2-/- - ezh2+/+	0.048133433566929534	0.1627	ns
Obscurité	ezh2+/- - ezh2+/+	0.048133433566929534	1	ns

Figure 39. Analyse de l'activité locomotrice chez les larves de poisson zèbre *ezh2<sup>+/+</sup>* et *ezh2<sup>-/-</sup>*.

(A et B) Activité locomotrice totale (en mm/2min) au cours du test de locomotion. Les courbes représentent l'activité locomotrice moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM) pour chaque génotype : *ezh2<sup>-/-</sup>* (triangles bleus) et *ezh2<sup>+/+</sup>* (cercles orange). Les barres noires et blanches sous l'axe des abscisses indiquent les phases d'obscurité (noir) et de lumière (blanc). Les graphiques (A) et (B) représentent chacun l'enregistrement d'une plaque 48 puits. Les deux plaques ont été enregistrées consécutivement, dans les mêmes conditions expérimentales. (C et D) Activité locomotrice moyenne selon la phase (lumière ou obscurité) pour chaque génotype, par plaque. Les boîtes représentent les distributions des valeurs individuelles, avec la médiane indiquée par une ligne horizontale. (E et F) Résultats du test de Shapiro-Wilk. La distribution des valeurs ne suit pas une loi normale dans tous les groupes testés. Il convient donc d'utiliser des tests statistiques non paramétriques. (G et H) Résultats des tests de Kruskal-Wallis suivis de tests post-hoc de Dunn (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $< 0.001$ ). (A et C) *ezh2<sup>-/-</sup>* n = 13, *ezh2<sup>+/+</sup>* n = 8 / (B et D) *ezh2<sup>-/-</sup>* n = 9, *ezh2<sup>+/+</sup>* n = 7.



**E**

Phase	Génotype	shapiro_p	Interprétation
Lumière	ezh2+/+	0.6563	Distribution normale
Lumière	ezh2+/-	0	Distribution non normale
Lumière	ezh2-/-	0.0288	Distribution non normale
Obscurité	ezh2+/+	0.1677	Distribution normale
Obscurité	ezh2+/-	0.0607	Distribution normale
Obscurité	ezh2-/-	0.4655	Distribution normale

**F**

Phase	Génotype	shapiro_p	Interprétation
Lumière	ezh2+/+	0.1157	Distribution normale
Lumière	ezh2+/-	0.0087	Distribution non normale
Lumière	ezh2-/-	0.0233	Distribution non normale
Obscurité	ezh2+/+	0.2597	Distribution normale
Obscurité	ezh2+/-	0.7339	Distribution normale
Obscurité	ezh2-/-	0.6683	Distribution normale

**G**

Phase	Comparison	Kruskal_p	p_Dunn	Significace
Lumière	ezh2-/- - ezh2+/-	1.769676803193946e-4	8E-04	***
Lumière	ezh2-/- - ezh2+/+	1.769676803193946e-4	0.0014	**
Lumière	ezh2+/- - ezh2+/+	1.769676803193946e-4	1	ns
Obscurité	ezh2-/- - ezh2+/-	8.153687140521605e-5	3E-04	***
Obscurité	ezh2-/- - ezh2+/+	8.153687140521605e-5	0.0011	**
Obscurité	ezh2+/- - ezh2+/+	8.153687140521605e-5	1	ns

**H**

Phase	Comparison	Kruskal_p	p_Dunn	Significace
Lumière	ezh2-/- - ezh2+/-	1.4957854184899773e-4	0.0013	**
Lumière	ezh2-/- - ezh2+/+	1.4957854184899773e-4	0.0045	**
Lumière	ezh2+/- - ezh2+/+	1.4957854184899773e-4	1	ns
Obscurité	ezh2-/- - ezh2+/-	0.07393382564228154	NA	ns
Obscurité	ezh2-/- - ezh2+/+	0.07393382564228154	NA	ns
Obscurité	ezh2+/- - ezh2+/+	0.07393382564228154	NA	ns

Figure 40. Analyse de l'activité locomotrice chez les larves de poisson zèbre *ezh2<sup>+/-</sup>* et *ezh2<sup>-/-</sup>*.

(A et B) Activité locomotrice totale (en mm/2min) au cours du test de locomotion. Les courbes représentent l'activité locomotrice moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM) pour chaque génotype : *ezh2<sup>-/-</sup>* (triangles bleus) et *ezh2<sup>+/-</sup>* (cercles orange). Les barres noires et blanches sous l'axe des abscisses indiquent les phases d'obscurité (noir) et de lumière (blanc). Les graphiques (A) et (B) représentent chacun l'enregistrement d'une plaque 48 puits. Les deux plaques ont été enregistrées consécutivement, dans les mêmes conditions expérimentales. (C et D) Activité locomotrice moyenne selon la phase (lumière ou obscurité) pour chaque génotype, par plaque. Les boîtes représentent les distributions des valeurs individuelles, avec la médiane indiquée par une ligne horizontale. (E et F) Résultats du test de Shapiro-Wilk. La distribution des valeurs ne suit pas une loi normale dans tous les groupes testés. Il convient donc d'utiliser des tests statistiques non paramétriques. (G et H) Résultats des tests de Kruskal-Wallis suivis de tests post-hoc de Dunn (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $< 0.001$ ). (A et C) *ezh2<sup>-/-</sup>* n = 16, *ezh2<sup>+/-</sup>* n = 11 / (B et D) *ezh2<sup>-/-</sup>* n = 25, *ezh2<sup>+/-</sup>* n = 6.

Dans les deux réplicas, les courbes d'activité temporelle révèlent une tendance constante : les larves *ezh2<sup>-/-</sup>* présentent une activité globalement plus élevée que les larves sauvages, en particulier lors des phases d'obscurité, même si cette différence varie en intensité selon les expériences. On note également une bonne reproductibilité du profil oscillatoire de l'activité en fonction de l'alternance des phases lumineuses et obscures. En revanche, l'analyse quantitative de l'activité locomotrice moyenne par phase met en évidence une variabilité inter-réplicas concernant la significativité des différences entre génotypes. Il est intéressant de constater que cette variabilité s'observe également entre les plaques d'un même réplica, alors que celles-ci ont été enregistrées dans les mêmes conditions expérimentales. Cela suggère qu'au-delà de l'effet du génotype, des facteurs expérimentaux non contrôlés peuvent influencer les mesures comportementales. La différence de taille d'échantillon entre les réplicas, et notamment la différence entre le nombre de larves sauvages et *ezh2* mutantes pourrait également expliquer les différences observées entre les différentes expériences. Toutefois, il est intéressant de constater que, pour l'ensemble des plaques testées, l'analyse statistique ne révèle aucune différence significative entre l'activité locomotrices des larves *ezh2<sup>+/-</sup>* et *ezh2<sup>+/+</sup>* (Figure 38, D ; Figure 39, G et H ; Figure 40, G et H). Les larves hétérozygotes pour le gène *ezh2* présentent une activité locomotrice similaire à celle des larves sauvages, ce qui indique que l'augmentation de l'activité locomotrice chez les larves *ezh2<sup>-/-</sup>* est associée à la perte de fonction d'Ezh2.

Afin de consolider l'interprétation biologique des résultats, il est pertinent de regrouper les données issues des trois expériences et d'effectuer une analyse statistique intégrée. Cette approche permet d'augmenter la puissance statistique et de tester la robustesse de l'effet du génotype en contrôlant les effets aléatoires liés à la plaque ou au lot expérimental. Concrètement, un modèle linéaire mixte (LMM) peut être utilisé avec l'activité locomotrice moyenne comme variable dépendante, le génotype comme effet fixe et la plaque comme effet aléatoire. Ce type de modèle permet de tenir compte de la structure hiérarchique des données (plusieurs larves par plaques, plusieurs plaques par expérience) tout en testant l'effet du génotype de manière plus robuste. En cas de non-normalité des résidus, il convient d'employer une approche non paramétrique. J'ai donc regroupé l'ensemble des données issues des tests d'activité locomotrice, en indiquant pour chaque larve sa plaque d'origine. J'ai appliqué un test de normalité de Shapiro-Wilk sur mes données, qui a révélé une distribution non normale des moyennes d'activité locomotrice (Figure 41, A). J'ai donc dû recourir à l'utilisation d'un test non paramétrique par permutation de type Fisher-Pitman, stratifié par plaque. Cette stratification garantit que les permutations sont restreintes aux individus issus d'une même plaque, ce qui permet de neutraliser les éventuelles variations inter-plaques tout en testant l'effet du génotype de manière robuste. J'ai ensuite réalisé des comparaisons post-hoc entre génotypes pour chaque condition lumineuse en appliquant le test de Wilcoxon suivi d'un ajustement de la p-valeur par la méthode de Holm (Figure 41, B). Les résultats ont ensuite été visualisés sous forme de boîtes à moustache (Figure 41, C). Cette approche permet de conclure que la mutation *ezh2* a un effet significatif sur l'activité locomotrice des larves. En effet, les larves *ezh2*<sup>-/-</sup> présentent une activité locomotrice significativement supérieure à celle des larves sauvages à la fois pendant les phases sombres et les phases lumineuses. En revanche, les larves *ezh2* hétérozygotes ne présentent pas de différence d'activité locomotrice par rapport aux larves sauvages. La perte de fonction d'*ezh2* induit donc l'apparition d'un phénotype d'hyperactivité locomotrice chez les larves de poisson zèbre. Il semble donc que les altérations développementales observées au niveau des neurones du cervelet chez les larves *ezh2* mutantes aient des conséquences fonctionnelles quantifiables par la mesure de leur activité locomotrice.

**A**

shapiro\_resultats\_AllPlaqa

W	p_value	normalité
0.8538	0.01969	non

**B**

Pairwise\_AllPlaques\_phases

Phase	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif	p.signif
Lumière	ezh2+/+	ezh2+/-	47	116	2604	0.656	0.656	ns	ns
Lumière	ezh2+/+	ezh2-/-	47	69	445	3.75e-11	7.5e-11	****	***
Lumière	ezh2+/-	ezh2-/-	116	69	1163	7.7e-16	2.31e-15	****	***
Obscurité	ezh2+/+	ezh2+/-	47	116	2674	0.85	0.85	ns	ns
Obscurité	ezh2+/+	ezh2-/-	47	69	798	3.69e-6	7.38e-6	****	***
Obscurité	ezh2+/-	ezh2-/-	116	69	1791	3.48e-10	1.04e-9	****	***

**C**

Activité locomotrice moyenne par phase

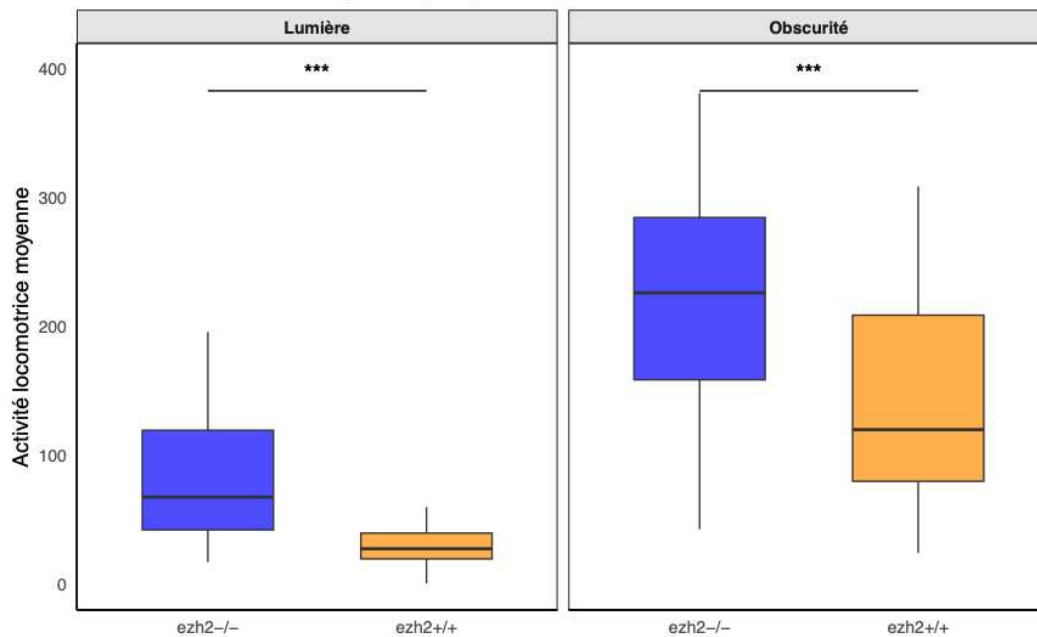


Figure 41. Analyse de l'activité locomotrice moyenne des larves *ezh2<sup>-/-</sup>* et *ezh2<sup>+/-</sup>* en fonction de la phase lumineuse.

(A) Résultats du test de Shapiro-Wilk. La distribution des valeurs ne suit pas une loi normale dans tous les groupes testés. Il convient donc d'utiliser des tests statistiques non paramétriques. (B) Résultats des tests de Wilcoxon entre les génotypes pour chaque phase. Les p-valeurs brutes (p), ajustées (p.adj, méthode de Holm) et leurs significativités correspondantes (notation : ns = non significatif, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ ) sont présentées. Les comparaisons incluant les larves *ezh2<sup>+/-</sup>* sont présentées à titre informatif mais n'ont pas été représentées graphiquement. (C) Activité locomotrice moyenne (en mm) mesurée pendant les phases de lumière (gauche) et d'obscurité (droite) chez les larves *ezh2<sup>-/-</sup>* (bleu) et *ezh2<sup>+/-</sup>* (orange). Chaque boîte représente la médiane, les quartiles et les valeurs extrêmes, calculées pour les individus regroupés par plaque. Les comparaisons statistiques entre génotypes ont été réalisées à l'aide d'un test de permutation de type Fisher-Pitman stratifié par plaque (*ezh2<sup>-/-</sup>* n = 116, *ezh2<sup>+/-</sup>* n = 47) suivi de tests de Wilcoxon, avec annotations des niveaux de significativité (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).



## Discussion

L'objectif de mon travail de thèse est d'interroger le rôle de la sous-unité catalytique du PRC2, Ezh2, dans le développement cérébral du poisson zèbre. Bien que l'implication du PRC2 dans la régulation du développement soit largement documentée dans plusieurs modèles, son rôle précis au cours du développement cérébral reste encore mal compris. Chez la souris, l'inactivation conditionnelle d'EZH2 dans des lignées neuronales a révélé son implication dans le contrôle de la prolifération des progéniteurs et la différenciation des neurones corticaux et cérébelleux (Pereira et al., 2010 ; Di Meglio et al., 2013). Cependant, les études réalisées sur modèle murin ciblent généralement des étapes tardives du développement ou des régions cérébrales spécifiques, ce qui limite notre compréhension de la contribution d'EZH2 pendant le développement du cerveau. Contrairement à la souris, l'inactivation zygotique d'Ezh2 est viable chez le poisson après la gastrulation (Dupret et al., 2017). Dans ce contexte, le poisson zèbre offre un modèle d'étude complémentaire particulièrement adapté à l'étude du développement cérébral *in vivo*. L'analyse de profils d'expression génique réalisée chez les larves *ezh2* mutantes a permis de dresser un état des lieux détaillé de l'impact de la mutation sur différentes lignées neuronales, en s'appuyant sur un large panel de sondes ciblant les cellules souches, les cellules progénitrices et les cellules différenciées. Ces données ont ensuite été croisées avec une analyse de l'activité locomotrice des larves afin de déterminer si les altérations développementales sont reliées à un phénotype fonctionnel. L'ensemble de ces résultats offre un cadre cohérent pour explorer le rôle d'Ezh2 dans le développement cérébral et pour mieux comprendre comment les perturbations de l'activité épigénétique peuvent compromettre la mise en place des circuits neuronaux.

L'implication du PRC2 au cours du développement a été précédemment étudié par Raby et collaborateurs (Raby et al, 2021), à travers la caractérisation de phénotypes associés à l'inactivation du gène *eed* chez le poisson zèbre. Eed est un composant essentiel du PRC2, dont la présence est requise pour permettre l'activité catalytique d'Ezh2 (Margueron et al., 2009). Afin de questionner l'effet de la perte de fonction d'*eed* sur le développement cérébral des larves de poisson zèbre, Raby et collaborateurs ont réalisé une série de marquage par HIS ciblant des gènes exprimés dans la région située à la limite entre le cerveau moyen et le cerveau postérieur. Au cours de mon étude, j'ai marqué l'expression de certains gènes qui avaient été testés précédemment sur les larves *eed* mutantes (*bmi1a*, *pcna*, *ccna2*, *neurod1*

et *mag*) sur les larves *ezh2* mutantes. La comparaison entre les profils d'expression obtenus chez les larves sauvages et *eed*<sup>-/-</sup> a mis en évidence une augmentation du signal associé à l'expression de *bmi1a* ainsi qu'une réduction des signaux associés à *ccna2* et *neurod1* (Raby et al., 2021). Ces observations coïncident avec celles issues des marquages de l'expression de *bmi1a*, *ccna2* et *neurod1* réalisés sur les larves *ezh2* mutantes. Ainsi, il semble que la perte d'activité du PRC2 consécutive à l'inactivation zygotique d'*eed* ou d'*ezh2* induise des phénotypes similaires lors du développement cérébral chez le poisson zèbre. De la même manière, les résultats obtenus sur les larves *eed*<sup>-/-</sup> ont mis en évidence une réduction de la taille du pancréas chez les larves mutantes par rapport aux larves sauvages (Raby et al., 2021). Ce phénotype est également présent chez les larves *ezh2* mutantes, comme l'atteste le marquage réalisé avec la sonde *ptf1a* (Figure 31). Ces éléments indiquent que la perte de fonction d'*ezh2* affecte le développement du cerveau et du pancréas de façon similaire à l'inactivation d'*eed*. Cela nous permet de supposer que les anomalies développementales identifiées chez les larves *ezh2* sont consécutives à la perte d'activité du PRC2 et non des activités d'Ezh2 indépendantes du PRC2.

EED est également nécessaire à l'activité catalytique d'EZH1, l'autre sous-unité méthyltransférase du complexe PRC2 (Shen et al., 2008). EZH1 partage une forte homologie de séquence avec EZH2 mais leurs fonctions sont partiellement distinctes (Margueron et al., 2008). Chez les mammifères, EZH1 peut, dans certains contextes, compenser partiellement la perte d'EZH2 et contribuer au maintien de la marque H3K27me3, en particulier dans les cellules différenciées (Shen et al., 2008 ; Margueron et al., 2008). Ainsi, une question importante est de savoir si, chez le poisson zèbre, la perte d'Ezh2 pourrait être atténuée par l'activité d'Ezh1. Dans cette perspective, l'étude du mutant *eed* apporte un élément clé : en l'absence d'Eed, le complexe PRC2 est inactif, quelle que soit sa sous-unité catalytique. Les phénotypes observés chez les larves *eed*<sup>-/-</sup> reflètent donc la perte complète d'activité méthyltransférase du PRC2, sans possibilité de compensation par Ezh1. Ainsi, la concordance entre les phénotypes observés chez les larves *eed*<sup>-/-</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup> indique que l'activité d'Ezh1 ne compense pas de manière significative la perte d'Ezh2 lors du développement du cerveau et des organes digestifs. Ces éléments nous permettent donc de conclure que les phénotypes observés chez les larves *ezh2* mutantes résultent bien de la perte globale de l'activité du PRC2.

## 1. Effets de la perte de fonction d'*ezh2* sur le développement cérébral

L'ensemble des résultats obtenus au cours de mon étude montrent que la perte de fonction d'Ezh2 n'affecte pas uniformément l'ensemble des types cellulaires du cerveau. Cela suggère une sensibilité différentielle des lignées cellulaires à la répression épigénétique médiée par Ezh2. Tout d'abord, les analyses menées sur les CSN ont révélé une forte augmentation de l'expression de *bmi1a* chez les larves *ezh2*<sup>-/-</sup> par rapport aux larves sauvages (Figure 26). BMI1 est un composant du complexe PRC1, impliqué dans l'auto-renouvellement des CSN (Molofsky et al., 2003). Cette surexpression pourrait refléter une augmentation de la population des CSN, comme cela a été supposé chez les larves *eed* mutantes (Raby et al., 2021). Cependant, l'analyse complémentaire de l'expression de *her4.1*, un marqueur du maintien de l'identité des CSN au cours du développement (Takke et al., 1999), n'a pas mis en évidence de différence notable entre les larves *ezh2* mutantes et les larves sauvages. Ces résultats suggèrent que le maintien de la population de CSN n'est pas affecté par l'inactivation d'*ezh2* à 5 jpf, malgré l'augmentation du signal associé à *bmi1a*. Cette augmentation pourrait donc refléter une compensation par le complexe PRC1 de la perte d'activité du PRC2. Ce phénomène a été observé dans d'autres systèmes modèles. D'une part, une étude publiée par Hernández-Muñoz et collaborateurs a mis en évidence que l'association de BMI1 aux corps Polycomb dans les noyaux dépend en partie de l'intégrité du PRC2 (Hernández-Muñoz et al., 2005). En effet, l'absence d'EZH2 ou d'EED modifie la distribution subnucléaire de BMI1. D'autre part, plusieurs travaux récents suggèrent que le PRC1 peut fonctionner de façon autonome dans certains contextes développementaux. Chez la souris, le PRC1 est capable de maintenir l'identité neuronale post-mitotique en l'absence du PRC2, en assurant la compaction de la chromatine et la répression des gènes Hox (Sawai et al., 2022). Cela peut s'expliquer par la capacité de certains complexes PRC1nc à se lier à leurs loci cibles indépendamment de la marque H3K27me3, parmi lesquels le PRC1.4, contenant la sous-unité BMI1 (Tavares et al., 2012). Ainsi, l'augmentation du signal associé à l'expression de *bmi1a* observée chez les larves *ezh2* mutantes pourrait résulter soit d'un mécanisme de compensation transcriptionnelle soit d'un rééquilibrage fonctionnel entre PRC1 et PRC2, les deux complexes partageant des cibles communes dans le contrôle des états cellulaires.

Par ailleurs, Ezh2 joue un rôle clé dans le contrôle épigénétique de la prolifération et de la différenciation des OPC. Les OPC constituent la population cellulaire d'origine présumée des

DMG, une tumeur cérébrale pédiatrique caractérisée par une perte globale de la marque H3K27me3, comparable à celle observée chez les mutants *ezh2* (Anderson et al., 2017 ; Monje et al., 2011). L'analyse de l'impact de l'inactivation d'*ezh2* sur le développement des oligodendrocytes chez le poisson zèbre est donc particulièrement pertinente car elle permet non seulement d'interroger l'implication de la régulation Polycomb dans le développement des lignées gliales, mais aussi de fournir des données comparatives utiles à la compréhension des processus tumoraux impliquant une dérégulation d'Ezh2. Dans cette optique, j'ai donc marqué par HIS l'expression de différents marqueurs de la lignée oligodendrocytaire. Mes résultats indiquent que, jusqu'à 5 jpf, la perte de fonction d'*ezh2* n'affecte ni la génération ni la maturation des oligodendrocytes chez le poisson zèbre ([Figure 27](#) et [Figure 28](#)). Ce constat contraste avec les observations réalisées chez la souris. En effet, dans ce modèle, l'inactivation conditionnelle d'EZH2 dans les cellules d'origine des oligodendrocytes n'affecte pas la génération des OPC mais retarde leur différenciation en oligodendrocytes matures. De plus, la surexpression d'Ezh2 dans les OPC augmente leur prolifération, tandis que son inactivation la réduit (Wang et al., 2020). Ces données indiquent que, chez la souris, le PRC2 n'est pas requis pour l'initiation du programme oligodendrocytaire mais joue un rôle important dans la transition vers les étapes de différenciation tardives et de maturation. Chez le poisson zèbre, plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence de phénotype oligodendrocytaire détectable entre 2 et 5 jpf. D'une part, la fonction d'Ezh2 pourrait être moins critique dans le développement de la lignée oligodendrocytaire chez le poisson zèbre que chez la souris, du moins aux stades précoces. D'autre part, il est possible que les phénotypes oligodendrocytaires apparaissent plus tard chez le poisson zèbre, après 5 jpf. Finalement, on peut également envisager la mise en place de mécanismes compensatoires chez le poisson zèbre, permettant de maintenir un développement oligodendrocytaire normal malgré la perte d'Ezh2.

L'effet de la perte de fonction d'*ezh2* sur la prolifération des cellules cérébrales a également été questionné dans cette étude. Le marquage de l'expression des gènes *pcna* et *ccna2*, tous deux associés à la prolifération cellulaire, a révélé que l'inactivation d'*ezh2* n'affecte pas la prolifération cellulaire de manière globale dans le cerveau en développement mais semble avoir un effet spécifique sur la prolifération des cellules du cervelet ([Figure 29](#)). Pourtant, plusieurs études mettent en évidence un rôle clé du PRC2, via EZH2, dans le maintien de la prolifération cellulaires dans différentes régions du cerveau. Par exemple, chez la souris,

l'inactivation d'Ezh2 dans les cellules progénitrices rétiniennes (RPC) a permis de montrer qu'Ezh2 est nécessaire au maintien de la prolifération des RPC et à la régulation du timing de différenciation des cellules rétiniennes (Zhang et al., 2015). Ces résultats coïncident avec ceux publiés sur le modèle xénope (Aldiri et al., 2013). Les RPC se différencient en cellules neuronales et gliales selon un ordre temporel conservé parmi de nombreuses espèces (Graw, 2010). Chez la souris comme chez le xénope, l'inactivation d'Ezh2 réduit significativement la prolifération des cellules de la rétine, ce qui ne semble pas être le cas chez le poisson zèbre. Cette différence pourrait s'expliquer par la mise en place chez le poisson zèbre de mécanismes compensatoires impliquant le PRC1 dans certaines régions cérébrales. En effet, chez le poisson zèbre, le marquage de l'expression d'*ezh2* par HIS (Dupret et al., 2017) révèle que ce gène est exprimé dans des régions cérébrales qui correspondent aux zones de prolifération cellulaires détectées grâce au marquage de l'expression de *pcna* (Figure 29), ce qui suggère qu'Ezh2 est impliqué dans la prolifération des progéniteurs neuraux. De surcroît, l'augmentation de l'expression de *bmi1a* observée chez les larves *ezh2* mutantes est également localisée dans les régions de prolifération cellulaire. Ainsi, bien que la perte d'activité d'Ezh2 devrait affecter la prolifération des cellules cérébrales, la surexpression de *bmi1a* dans ces mêmes cellules suggère la présence d'un mécanisme compensatoire impliquant le PRC1, lequel serait suffisant pour maintenir les cellules progénitrices neurales dans un état prolifératif. Cette hypothèse de compensation semble refléter une particularité du poisson zèbre et ne pas se retrouver dans les modèles murins. En effet, la perte d'activité du PRC2 entraîne une létalité précoce chez la souris, avant la gastrulation (O'Carroll et al, 2001 ; Faust et al., 1995 ; Pasini et al., 2004), ce qui pourrait empêcher l'émergence de mécanismes adaptatifs à moyen terme. De plus, le poisson zèbre hérite d'importantes quantités d'ARNm et de protéines maternelles codant pour les composants clés des complexes Polycomb (Chrispijn et al., 2018). La MZT, qui marque l'activation du génome zygotiques, est relativement tardive chez le poisson zèbre, vers le 10<sup>e</sup> cycle de clivage (Tadros et Lipshitz, 2009), prolongeant ainsi la période pendant laquelle ces dépôts maternels peuvent maintenir la répression transcriptionnelle. En revanche, chez la souris, la MZT survient au 1<sup>er</sup> cycle de clivage (Tadros et Lipshitz, 2009), ce qui réduit considérablement la contribution maternelle lors de la mise en place de la répression Polycomb chez cette espèce. Ainsi, l'activation tardive du génome zygotique chez le poisson zèbre pourrait favoriser l'installation de mécanismes compensatoires, incluant l'activation accrue du PRC1.

Pour questionner le rôle de ces mécanismes compensatoires chez le poisson zèbre, une perspective expérimentale pertinente consisterait en la génération d'une lignée de larves *ezh2<sup>-/-</sup>; bmi1a<sup>-/-</sup>*. La caractérisation de ces mutants permettrait d'une part d'évaluer si la double inactivation renforce les défauts observés au niveau du cervelet et de la prolifération cellulaire et d'autre part si elle entraîne l'apparition de nouveaux phénotypes, par exemple d'un phénotype oligodendrocytaire. Cette approche permettrait ainsi de mieux caractériser la plasticité du système Polycomb et ses mécanismes de compensation dans le contexte du développement cérébral chez le poisson zèbre.

## 2. Effets de la perte de fonction d'*ezh2* sur le développement du cervelet

Mes résultats révèlent que, chez le poisson zèbre, l'inactivation d'*ezh2* n'induit pas de perturbations globales du développement cérébral mais affecte spécifiquement des sous-populations neuronales localisées dans le cervelet. En effet, parmi toutes les sondes testées dans cette étude, nombreuses sont celles présentant un signal à la fois dans le cervelet et dans d'autres régions cérébrales. Par exemple, les profils d'expression associés aux sondes *pcna*, *ccna2*, *neurod1* et *vglut1* montrent que ces gènes sont exprimés dans le cervelet mais aussi dans la rétine des larves. Alors que les signaux associés à chacune de ces sondes sont réduits dans le cervelet des larves *ezh2* mutantes, les signaux localisés dans la rétine sont identiques entre les larves sauvages et mutantes. Ces observations appuient l'idée selon laquelle l'inactivation zygotique d'*ezh2* affecte spécifiquement le développement du cervelet. Il semble donc que le cervelet présente une dépendance particulière à l'activité du PRC2.

Compte tenu du rôle fondamental joué par le PRC2 au cours du développement et en particulier durant la neurogenèse, il est étonnant que l'inactivation d'*Ezh2* ne montre d'effet que sur le développement du cervelet. Ce résultat pourrait également s'expliquer par la mise en place de mécanismes compensatoires impliquant les complexes PRC1. En effet, des études récentes ont montré que PRC1 peut exercer une répression transcriptionnelle indépendante de PRC2 dans certains contextes neuronaux (Sawai et al., 2022 ; Tavares et al., 2012) mais cette capacité semble fortement contexte-dépendante. Ainsi, l'effet spécifique de la mutation *ezh2* sur le cervelet suggère une dépendance accrue à l'activité d'*Ezh2* par rapport aux autres régions cérébrales, qui ne permettrait pas aux complexes PRC1 de compenser l'absence

d'activité du PRC2 dans cette région. Celle-ci pourrait être liée au rôle crucial que jouent les promoteurs bivalents dans le développement du cervelet, en particulier dans la régulation temporelle de la différenciation des cellules granulaires. Les promoteurs bivalents sont caractérisés par la coexistence des marques d'histone H3K4me3 (activatrice) et H3K27me3 (répressive) sur un même promoteur. L'activité du PRC2 est nécessaire à l'établissement de la bivalence des promoteurs. Cela a notamment été mis en évidence par l'inactivation conditionnelle d'Eed dans les cellules  $\beta$  du pancréas chez la souris, qui résulte en une dérégulation de l'expression des gènes bivalents (Lu et al., 2018). Les promoteurs bivalents sont particulièrement abondants dans les progéniteurs des cellules granulaires chez la souris et sont dynamiquement remodelés au cours du développement (Mätlik et al., 2023). Les résultats de cette étude suggèrent en outre un rôle d'EZH1 et d'EZH2 dans la régulation de la bivalence dans les neurones en développement. Bien que les promoteurs bivalents soient présents dans d'autres régions du cerveau comme le cortex, leur rôle dans le cervelet semble particulièrement prononcé. Par exemple, les facteurs de transcription clés pour l'identité des cellules granulaires tels que *Atoh1*, *Mycn*, *Pax6*, *Gli1* et *Neurod1* présentent des promoteurs bivalents durant le développement, soulignant l'importance de cette régulation dans le cervelet. Il est intéressant de constater que les facteurs de transcription *Atoh1* et *Neurod1* présentent des profils d'expression réduits chez les larves *ezh2* mutantes ([Figure 30](#) et [Figure 32](#)). Ainsi, ces éléments permettent de poser l'hypothèse que l'inactivation d'*ezh2* affecte l'acquisition de la bivalence sur des promoteurs associés à des facteurs de transcription clé du développement du cervelet ce qui empêche la génération correcte des différentes cellules du cervelet, en particulier les cellules granulaires.

En outre, l'analyse détaillée du cervelet des larves *ezh2* mutantes révèle une atteinte conjointe des cellules granulaires et des cellules de Purkinje. L'analyse de l'expression des marqueurs des cellules progénitrices au cours des étapes précoces du développement (2 jpf) ne révèle pas de différence d'expression entre les larves sauvages et *ezh2* mutantes, ce qui suggère que les progéniteurs cérébelleux sont correctement spécifiés en absence d'Ezh2 fonctionnel ([Figure 30](#)). En revanche, l'expression du gène *atoh1c* est significativement réduite à 5 jpf chez les larves *ezh2*<sup>-/-</sup>. Cette réduction coïncide avec une diminution des signaux associés à l'expression de *neurod1* et de *vglut1*, deux gènes exprimés dans les cellules granulaires différenciées ([Figure 32](#)). Ces résultats suggèrent un défaut de transition entre état progéniteur et différencié, probablement lié à l'incapacité des progéniteurs *atoh1c*<sup>+</sup> à

maintenir une prolifération suffisante ou à initier un programme de différenciation complet. Par ailleurs, dans les cellules de Purkinje, le signal associé au marqueur *pvalb7* est réduit dès 3 jpf dans le cervelet des larves *ezh2<sup>-/-</sup>* par rapport aux larves sauvages ([Figure 32](#)). Ainsi, ces résultats indiquent qu'Ezh2 est nécessaire pour le maintien des cellules progénitrices *atoh1c+* et pour la différenciation des deux lignées neuronales majeures du cervelet. De plus, l'analyse des profils d'expression met en évidence que les lobes du cervelet présentent une sensibilité différente à l'inactivation d'*ezh2*. En effet, la réduction des signaux associés à *neurod1*, *vglut1* et *pvalb7* est uniquement observée dans la Va et le Cce, le lobe vestibulo-latéral semble en revanche épargné. Ce résultat pourrait s'expliquer par les différences structurelles existantes entre les différents lobes du cervelet du poisson zèbre. En effet, la Va et le Cce présentent la même structure à trois couches tandis que le lobe vestibulo-latéral ne contient que la CCG. Les cellules granulaires de la Va et du Cce se situent sous la CCP alors que celles du lobe vestibulo-latéral sont localisées superficiellement (Volkman et al., 2008). Les cellules granulaires de l'EG et du Cce ont par ailleurs des fonctions, des profils d'expression géniques et des itinéraires de migration distincts et proviennent de populations de cellules progénitrices différentes (Hibi et Shimizu, 2012). Cela suggère que les cellules granulaires localisées dans le lobe vestibulo-latérales pourraient présenter une moindre dépendance à l'activité du PRC2 par rapport aux cellules granulaires du Cce et de la Va pour assurer leur différenciation.

Par ailleurs, les profils d'expression obtenus avec la sonde *pvalb7* révèlent un effet précoce de l'inactivation d'*ezh2* sur la différenciation des cellules de Purkinje, dès 3 jpf, alors que les cellules granulaires ne montrent d'altérations qu'à un stade plus tardif, à 5 jpf ([Figure 32](#)). Ce phénomène pourrait être expliqué par la différence de temporalité existant entre le développement de ces deux lignées neuronales. Les cellules de Purkinje dérivent des progéniteurs *ptf1a+* localisés dans la VZ et débutent leur différenciation précocement, dès 2 jpf chez le poisson zèbre. Ces neurones atteignent ainsi leur maturité rapidement, comme l'indique la présence de cellules exprimant *pvalb7*, le marqueur des cellules de Purkinje matures, à 3 jpf ([Figure 32](#); Kani et al., 2010). En revanche, les cellules granulaires dérivent des progéniteurs *atoh1+* de l'URL et se différencient en plusieurs étapes. Les cellules granulaires immatures expriment *neurod1* et prolifèrent entre 3 et 5 jpf (Kani et al., 2010). Entre 5 et 7 jpf, ces cellules *neurod1+* migrent vers la CCG, où elles deviennent des cellules granulaires matures. La perte de fonction d'*ezh2* pourrait donc affecter la différenciation des cellules

granulaires et des cellules de Purkinje de la même façon, mais cet effet ne serait visible qu'au moment où ces types cellulaires entrent en différenciation, soit dès 2 jpf pour les cellules de Purkinje et à partir de 5 jpf pour les cellules granulaires.

Finalement, l'ensemble des résultats de cette étude a montré que les structures cérébrales localisées dans les régions antérieures et moyennes du cerveau ne sont pas affectées par la mutation *ezh2*. Pourtant, le marquage par HIS de l'expression du gène *vglut1*, spécifique aux cellules glutamatergiques, révèle une réduction du signal associé à ce gène dans les neurones peuplant le torus longitudinalis (TL) et les noyaux de l'habenula à 5 jpf ([Figure 35](#)), alors que ces régions se situent respectivement dans le cerveau moyen et antérieur. Localisé en dessous du toit optique, le TL est une structure de type cérébelleux (Bell, 2002) spécifique des actinoptérygiens, les poissons à nageoires rayonnées, dont fait partie le poisson zèbre (Northmore, 2017). Présentes chez la plupart des vertébrés, les structures de type cérébelleux présentent des architectures différentes mais partagent des caractéristiques développementales et histologiques. Ainsi, on peut supposer que les cellules d'origines des cellules granulaires du cervelet et des neurones glutamatergiques du TL présentent la même sensibilité à l'inactivation zygotique d'*ezh2*, bien qu'elles se développent dans des régions cérébrales distinctes. L'autre structure concernée par la réduction du signal associé à *vglut1* est l'habenula, une structure composée de noyaux bilatéraux situés dans le diencephale dorsal et conservés chez tous les vertébrés (Turner et al., 2016). En particulier, des études ont mis en évidence que des caractéristiques anatomiques, moléculaires et transcriptionnelles homologues existent entre l'habenula des souris et des poissons zèbres (Hashikawa et al., 2020). L'habenula est majoritairement constitué de neurones glutamatergiques, qui expriment les gènes *vglut1* et *vglut2* (Bae et al., 2009 ; Huang et al., 2024). L'habenula et le cervelet contiennent donc tous deux des cellules glutamatergiques, qui présentent des analogies fonctionnelles. Cependant, ces neurones sont situés dans des régions cérébrales distinctes et ne semblent pas partager d'origine développementales. On peut donc supposer que l'inactivation zygotique d'*ezh2* affecte globalement le développement des neurones glutamatergiques dans le cerveau du poisson zèbre, indépendamment de leur structure d'appartenance. Afin d'obtenir davantage d'information concernant l'effet de la mutation *ezh2* dans développement des neurones glutamatergiques, il serait intéressant de réaliser un marquage par HIS de l'expression du gène *vglut2*, lequel est exprimé dans d'autres populations de neurones glutamatergiques, localisées dans d'autres structures cérébrales.

L'analyse conjointe des profils d'expression des gènes *vglut1* et *vglut2* permettrait ainsi de déterminer si l'inactivation d'*ezh2* affecte effectivement l'ensemble des neurones glutamatergiques ou si son effet est limité aux cellules du cervelet, du TL et de l'habenula.

L'analyse des profils d'expression des marqueurs des cellules du cervelet obtenus par HIS a permis de mettre en évidence la réduction de certains signaux dans le cervelet des larves *ezh2* mutantes par rapport aux larves sauvages. Cependant, bien que l'utilisation de cette technique soit appropriée pour visualiser la distribution spatiale des transcrits, elle présente plusieurs limites. Tout d'abord, cette technique est semi-quantitative. Elle permet de détecter des changements marqués d'expression mais est peu sensible aux variations plus modérées, ce qui peut conduire à ne pas identifier les différences fines entre les profils d'expressions. Par ailleurs, le bruit de fond, parfois élevé selon les sondes, peut masquer des différences entre les groupes expérimentaux, comme observé dans le cas du marquage *ptf1a* (Figure 30). En outre, l'HIS fournit une photographie ponctuelle de l'état d'expression d'un gène à un stade donné du développement, sans permettre de distinguer si les altérations transcriptionnelles observées résultent d'un défaut d'initiation ou de stabilité des transcrits. Ainsi, les observations obtenues par HIS devraient idéalement être complétées par d'autres approches telles que la quantification globale des transcrits par RT-qPCR ou RNA-seq, la détection de protéines par immunohistochimie ou l'utilisation de lignées transgéniques.

Cette étude met ainsi en lumière le rôle essentiel d'Ezh2 dans le développement du cervelet chez le poisson zèbre et souligne son implication dans la prolifération des progéniteurs cérébelleux et la différenciation des neurones du cervelet. En effet, l'inactivation zygotique d'*ezh2* n'altère pas le développement global du cerveau mais entraîne des défauts marqués lors du développement du cervelet. Ces défauts touchent à la fois les cellules granulaires et les cellules de Purkinje et compromettent l'établissement des circuits cérébelleux fonctionnels. Le modèle de poisson zèbre *ezh2* mutant présente donc un intérêt marqué pour la compréhension des mécanismes épigénétiques agissant lors du développement du cervelet et met en évidence la vulnérabilité particulière de certaines lignées neuronales à la perte d'activité du PRC2.

### 3. Effets de la perte de fonction d'*ezh2* sur le comportement locomoteur

L'observation des défauts de développement des cellules du cervelet chez les larves *ezh2* mutantes m'a amené à me questionner sur leurs possibles conséquences fonctionnelles, notamment concernant l'activité locomotrice des larves. J'ai ainsi réalisé des mesures de l'activité locomotrices de larves sauvages et *ezh2* mutantes, à 5 jpf (Figures [38](#), [39](#) et [40](#)). Ces mesures ont été réalisés dans une chambre d'observation Zebrabox équipée d'une caméra infrarouge permettant l'enregistrement vidéo d'une plaque multi-puit dans des conditions de lumière et d'obscurité. Cette approche présente plusieurs avantages. D'une part, elle est simple à mettre en œuvre et permet de tester un grand nombre d'individus en parallèle, ce qui assure la sensibilité et la reproductibilité de l'expérience. D'autre part, cette méthode est quantitative et fournit des valeurs objectives qui peuvent être analysées statistiquement et comparées entre les expériences, ce qui limite les biais d'observation. Toutefois, cette technique comporte également des limites. Si la comparaison de l'activité locomotrice entre deux groupes de larves permet de mettre en lumière une différence comportementale, ce test ne permet pas d'identifier le mécanisme qui en est responsable. La modification de l'activité locomotrice d'un groupe de larve peut en effet résulter d'une atteinte motrice, sensorielle ou cognitive. De plus, l'interprétation des résultats repose sur des tests statistiques adaptés à la distribution des données (normalité) et à l'effectif étudié. Pour traiter les données de locomotion, j'ai majoritairement utilisé le test de Kruskal-Wallis, un test non paramétrique. Le recours à ce test se justifie par la nature des données comportementales, marquées par une forte variabilité interindividuelle et des distributions non normales et par des effectifs de tailles restreintes. Ces tests sont moins puissants que les tests paramétriques mais présentent l'avantage de pouvoir être appliqués sur des échantillons de petite taille et de ne pas être conditionnés à la distribution normale des données. En revanche, leur utilisation augmente le risque de ne pas détecter de différences entre les échantillons (faux négatifs). Dans le cadre de cette étude, le recours à des tests non paramétriques ne pose cependant pas de problème car les différences entre les groupes sont suffisamment importantes pour être détectées.

Les résultats des tests de locomotion ont mis en évidence l'apparition d'un phénotype d'hyperactivité locomotrice chez les larves *ezh2* mutantes (Figures [38](#), [39](#) et [40](#)). Ce phénotype s'accompagne d'une réduction du signal d'HIS associé à l'expression du gène *pvalb7*, un

marqueur des cellules de Purkinje, dans le cervelet des larves mutantes ([Figure 32](#)). Les cellules de Purkinje sont régulièrement actives pendant la locomotion (Chang et al., 2020) ; les défauts de différenciation ou de maintien de ces neurones pourraient donc être à l'origine du phénotype locomoteur observé chez les larves *ezh2* mutantes. Cette hypothèse est soutenue par une étude récente publiée par Pose-Méndez et collaborateurs qui indique qu'à 2 jpf, l'ablation ciblée des cellules de Purkinje induit également l'apparition d'un phénotype d'hyperactivité locomotrice chez les larves de poisson zèbre (Pose-Méndez et al., 2023b). De plus, l'absence de différence de thigmotactisme entre les larves *ezh2*<sup>+/+</sup> et *ezh2*<sup>-/-</sup> ([Figure 37](#)) suggère que cette hyperactivité ne résulte pas d'une majoration de l'anxiété des larves ni d'un biais d'exploration. Ainsi, le phénotype locomoteur observé pourrait être la conséquence fonctionnelle des altérations du développement cérébelleux mise en évidence chez les larves *ezh2* mutantes et en particulier d'une réduction de la population de cellules de Purkinje *pvalb7+*. Néanmoins, cette interprétation repose sur une corrélation entre les résultats obtenus par HIS et ceux provenant de la mesure de l'activité locomotrice mais n'a pas été démontrée expérimentalement. D'autres circuits neuronaux, au sein du cervelet ou dans d'autres régions cérébrales impliquées dans le contrôle moteur, pourraient également contribuer au phénotype d'hyperactivité locomotrice. Pour valider cette hypothèse et affiner l'interprétation fonctionnelles, plusieurs approches complémentaires pourraient être envisagées. Tout d'abord, la quantification des cellules de Purkinje serait nécessaire pour déterminer avec certitude si l'inactivation zygotique d'*ezh2* entraîne une réduction de cette population neuronale dans le cervelet des larves de poisson zèbre. Pour cela, on peut envisager une approche d'immunohistofluorescence pour localiser les cellules de Purkinje à l'aide d'anticorps anti-Parvalbumin et anti-Zebrin II et les quantifier directement à partir des images de fluorescence obtenues (Bae et al., 2009 ; Coolen et al., 2022). Par ailleurs, des expériences de sauvetage phénotypique ciblant les cellules de Purkinje, en restaurant l'expression d'*ezh2* sous contrôle d'un promoteur spécifique aux cellules de Purkinje tel que *aldoca* (Kawakami et al., 2016 ; Takeuchi et al., 2017) permettraient d'établir si la perte d'activité d'Ezh2 dans cette lignée cellulaire est suffisante pour induire l'apparition du phénotype d'hyperactivité locomotrice.

## 4. Pertinence du modèle *ezh2* mutant pour l'étude des DMG et des MB

Au-delà de son intérêt pour l'étude du développement cérébral, notre modèle de poisson zèbre *ezh2* mutant présente également un fort potentiel pour étudier les mécanismes impliqués dans le développement de certaines tumeurs cérébrales pédiatriques, telles que les DMG et les MB. En effet, les avancées récentes dans l'étude des cancers pédiatriques ont révélé des distinctions entre les tumeurs de l'enfant et celles apparaissant chez l'adulte. La principale différence entre ces cancers est l'origine des cellules initiatrices (Behjati et al., 2021). Les cancers de l'adulte surviennent principalement dans les cellules épithéliales consécutivement à l'âge ou à l'exposition à des mutagènes. En revanche, les cancers pédiatriques surviennent principalement dans les tissus en développement et leur incidence démontre des fenêtres d'âge restreintes liées au développement des tissus. Pour les cancers originaires des mêmes tissus, les mécanismes moléculaires associés à leur développement diffère en fonction de l'âge. Par exemple, les mutations des gènes codant pour les variants d'histone H3.3 et H3.1 fréquemment identifiées dans les HGG pédiatriques sont quasiment inexistantes dans les HGG de l'adulte. En outre, les tumeurs pédiatriques sont formées de diverses populations de cellules dans des états de différenciation différents (cellules souches, cellules progénitrices, cellules différenciées). L'identification des cellules d'origine des tumeurs mais également des processus développementaux altérés dans les cancers pédiatriques est fondamental afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques. L'étude du développement cérébral au sein d'un système reproduisant le paysage épigénétique dans lequel se forment les tumeurs cérébrales pédiatriques constitue donc une approche pertinente afin mieux comprendre les mécanismes à l'origine des tumeurs et de générer des alternatives thérapeutiques.

### 4.1 Gliome diffus de la ligne médiane

Les DMG sont des tumeurs pédiatriques très agressives caractérisées par la présence d'une mutation dans les gènes codant pour l'histone H3 (*H3F3A*, *HIST1H3B*). La mutation la plus fréquemment observée est la mutation H3K27M, qui résulte en la substitution de la lysine K27 en une méthionine et inhibe l'activité du PRC2. Cette inhibition conduit à une perte globale de la marque répressive H3K27me3, dont la présence est essentielle à la régulation

transcriptionnelle pendant le développement cérébral (Lewis et al., 2013). Cette altération épigénétique perturbe la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes cibles. En particulier, la réduction de la marque H3K27me3 affecte la mise en place de programmes de différenciation et favorise un état cellulaire indifférencié, propice à la prolifération tumorale (Silveira et al., 2019). A l'instar des DMG, l'inactivation zygotique d'*ezh2* chez le poisson zèbre résulte en une diminution drastique de la marque H3K27me3 (Dupret et al., 2017). Cela suggère que la lignée de poisson *ezh2* mutants peut être employée pour l'étude des DMG. Je me suis donc interrogé sur la validité et les limites de l'utilisation de cette lignée comme modèle pour étudier les mécanismes des DMG.

Tout d'abord, l'utilisation de lignées cellulaires pour modéliser les DMG a mis en évidence que l'expression du transgène H3K27M dans des cellules sauvages entraîne l'augmentation de l'expression de BMI1 (Balakrishnan et al., 2020). Le marquage par HIS de l'expression du gène *bmi1a* révèle que les larves *ezh2* mutantes présentent également une augmentation de l'expression de Bmi1 (Figure 26). Cette similarité suggère que l'inactivation zygotique d'*ezh2* reproduit la surexpression de BMI1 observée dans les DMG. Dans le contexte des DMG H3K27M, l'inhibition de l'activité du PRC2 entraîne une réorganisation du paysage épigénétique qui ne conduit pas à une disparition complète de la répression Polycomb. Au contraire, une étude récente suggère que le PRC1, en particulier sa forme canonique contenant CBX4/BMI1, conserve un rôle essentiel dans la répression de certains gènes cibles. En effet, la présence de H3K27M entraîne une redistribution des complexes PRC1c et une accumulation de PRC1c-CBX/BMI1 dans les îlots CpG enrichis en H3K27me3 (Lagan et al., 2025). Par ailleurs, plusieurs travaux indiquent que PRC1 peut maintenir l'ubiquitination H2AK119 et la répression transcriptionnelle indépendamment du PRC2 ou de la marque H3K27me3 (Tavares et al., 2012 ; Gao et al., 2012 ; Rose et al., 2016). Dans les DMG, la capacité du PRC1 à fonctionner de manière autonome pourrait permettre de préserver un noyau de gènes réprimés malgré la perte de H3K27me3 induite par H3K27M. Ainsi, l'augmentation de BMI1 observée à la fois dans les DMG et chez les larves *ezh2* mutantes pourrait refléter un mécanisme compensatoire visant à renforcer l'activité du PRC1 pour compenser la perte d'activité du PRC2. Le fait que le mutant *ezh2* du poisson zèbre semble reproduire ce mécanisme compensatoire ouvre une opportunité unique d'étudier, dans un contexte *in vivo* et développemental, comment le rééquilibrage PRC1/PRC2 influence la mise en place des

circuits neuronaux, et pourrait ainsi fournir des clés pour mieux comprendre certaines vulnérabilités thérapeutiques des DMG.

D'autre part, chez la souris, l'expression de la mutation H3K27M dans des modèles spontanés de DMG induit une perte globale de H3K27me3 associée à la dérégulation sélective de gènes à promoteurs bivalents, en particulier des gènes du développement normalement réprimés par PRC2 (Larson et al., 2019). Des observations concordantes ont été réalisées chez l'humain : l'analyse transcriptomique de tumeurs pédiatriques H3K27M montre que la perte de H3K27me3 s'accompagne d'une activation aberrante de gènes cibles de PRC2, souvent impliqués dans des programmes neurodéveloppementaux (Bender et al., 2013), ce qui est compatible avec une dérégulation de gènes à promoteurs bivalents. Ainsi, bien que le terme de « promoteur bivalent » ne soit pas employé dans les papiers cliniques, il est probable que la dérégulation de gènes à promoteurs bivalents soit également à l'œuvre dans les DMG chez l'Homme. La mise en évidence d'un effet spécifique de la mutation *ezh2* sur les cellules du cervelet, dans lesquelles les promoteurs bivalents jouent un rôle crucial, suggère un effet similaire entre l'inactivation zygotique d'*ezh2* chez le poisson zèbre et l'expression de la mutation H3K27M chez la souris sur les promoteurs bivalents, bien que cette supposition n'ait pas été clairement démontrée expérimentalement. Ainsi, les phénotypes observés suggèrent que la lignée *ezh2* mutante pourrait mimer certains aspects clés du DMG liés à la perte d'activité du PRC2, renforçant l'intérêt de ce modèle pour étudier les mécanismes épigénétiques à l'origine de la tumorigenèse pédiatrique. Cependant, l'atteinte ciblée du cervelet chez les larves *ezh2* mutantes contraste avec les caractéristiques des DMG humains, qui siègent principalement dans le pont, une région du tronc cérébral, et impliquent des cellules progénitrices gliales, et non des cellules du cervelet ou des lignées neuronales différenciées. En effet, de nombreuses études suggèrent que les oligodendrocytes seraient les cellules d'origine des DMG (Anderson et al., 2017 ; Monje et al., 2011), or mes résultats montrent que la mutation *ezh2* n'impacte pas significativement les cellules de la lignée oligodendrocytaire ([Figure 27](#) et [Figure 28](#)). Ainsi, bien que la lignée *ezh2* mutante semble mimer les altérations épigénétiques observées dans les DMG, ce modèle ne reproduit pas les altérations gliales caractéristiques du DMG. La lignée *ezh2* mutante offre des informations précieuses concernant l'implication du PRC2 dans le développement cérébral mais présente des limites importantes pour la modélisation directe des DMG. Son utilisation devrait donc être envisagée en complément d'autres approches. On peut par exemple envisager l'induction

ciblée de la mutation *ezh2* dans des lignées gliales, notamment dans les OPC, via des promoteurs spécifiques (*sox10*) afin de reproduire l'effet de la perte de fonction du PRC2 dans les cellules d'origine suspectées des DMG. De surcroît, la mutation H3K27M est la mutation initiatrice des DMG mais sa seule présence ne suffit pas à induire la tumorigenèse. En effet, des mutations touchant les gènes *PDGFRA*, *ACVR1* ou *TP53* sont fréquemment associées à l'expression de H3K27M dans les DMG (Schwartzentruber et al., 2012 ; Buczkowicz et al., 2014 ; Taylor et al., 2014). Dans une étude publiée en 2017, Pathania et collaborateurs ont entrepris de générer un modèle murin récapitulant les caractéristiques histologiques et moléculaires des DMG H3K27M. Leurs résultats suggèrent que la présence conjointe de la mutation H3K27M et d'une mutation perte de fonction du gène *Trp53*, l'orthologue murin du gène *TP53* humain, sont suffisantes pour initier la tumorigenèse (Pathania et al., 2017). Ainsi, la génération d'un modèle de poisson zèbre combinant l'inactivation zygotique d'*ezh2* et de *tp53* serait particulièrement pertinent afin de reproduire les cascades oncogéniques spécifiques des DMG.

Finalement, les données obtenues par HIS dans cette étude ont permis de caractériser l'effet de l'inactivation zygotique d'*ezh2* sur un groupe restreint de gènes liés au développement cérébral mais ne renseignent pas sur l'ensemble des programmes transcriptionnels potentiellement affectés par la perte de fonction d'Ezh2. Il n'est donc pas possible, à ce stade, de déterminer si les altérations géniques observées chez les larves *ezh2* mutantes recouvrent celles induites par la mutation H3K27M dans les DMG. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de réaliser une analyse transcriptomique globale des larves *ezh2* mutantes et comparer directement les profils obtenus avec ceux disponibles pour les DMG H3K27M. Ce type d'approche permettrait de déterminer dans quelle mesure les programmes géniques se recoupent et d'identifier les signatures spécifiques au contexte tumoral par rapport à celles propres à la perte de fonction d'Ezh2 au cours du développement.

#### 4.2 Médulloblastome

En parallèle, le modèle de poisson zèbre *ezh2* mutant pourrait également s'avérer pertinent pour l'étude des MB pédiatriques. Les MB sont des tumeurs cérébrales malignes se développant dans le cervelet, à partir des progéniteurs des cellules granulaires dans 25% des cas (Gibson et al., 2010). La classification moléculaire fait apparaître quatre principaux groupes de MB, chacun présentant des caractéristiques transcriptionnelles, génomiques et

cliniques spécifiques : Wnt, Shh, Groupe 3 et Groupe 4 (Taylor et al., 2012). Le séquençage du génome de ces tumeurs a permis d'identifier la présence de mutations récurrentes dans de nombreux gènes, dont des gènes codant pour des composants de la machinerie épigénétique (Robinson et al., 2012). Additionnellement, on observe une expression différentielle de H3K27me3 parmi les sous-groupes de MB. Certains MB des groupes 3 et 4 présentent des taux relativement élevés de H3K27me3 (Robinson et al., 2012), d'autres tumeurs provenant de ces mêmes groupes ou du groupe Shh présentent au contraire une diminution d'H3K27me3 (Dubuc et al., 2013 ; Gabriel et al., 2022). De plus, la réduction de H3K27me3 dans les MB est associée à un phénotype de radiorésistance, ce qui rend le traitement de ces tumeurs particulièrement complexe (Gabriel et al., 2022). Cependant, les mécanismes expliquant cette expression différentielle de H3K27me3 en fonction des MB restent à élucider. Par ailleurs, bien que les mutations d'EZH2 soient rares dans ces cancers, EZH2 est fréquemment surexprimé dans tous les groupes de MB (Smits et al. 2012 ; Robinson et al., 2012 ; Zhang et al., 2020). Dans les modèles cellulaires et murins, l'inhibition pharmacologique d'EZH2 entraîne une réactivation des gènes suppresseurs de tumeur, une diminution de la prolifération et finalement l'inhibition de la croissance tumorale (Zhang et al., 2020). Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques d'EZH2 semble être prometteuse pour le traitement de certains MB, mais ne règlent pas le problème du traitement des MB présentant des niveaux de H3K27me3 bas.

Dans ce contexte, le modèle de poisson zèbre *ezh2* mutant utilisé dans mon étude présente un intérêt particulier. En effet, l'inactivation zygotique d'*ezh2* conduit d'une part à une perte marquée de H3K27me3 (Dupret et al., 2017), reproduisant ainsi la caractéristique épigénétique de certains MB. D'autre part, mes données montrent une augmentation de l'expression de *bmi1a* dans le cerveau des larves *ezh2* mutantes (Figure 26), un phénomène également observé dans les lignées cellulaires de MB (Leung et al., 2004 ; Behesti et al., 2012). De plus, l'inactivation zygotique d'*ezh2* a un effet sur le développement ou la maintenance des progéniteurs des cellules granulaires *atoh1c*+ (Figure 30), lesquelles sont les cellules à l'origine des MB dans 25% des cas (Gibson et al., 2010). Le parallélisme existant entre la lignée de poisson zèbre *ezh2* mutants et certains MB laisse envisager que ce modèle puisse servir de modèle *in vivo* pour étudier les conséquences fonctionnelles de la réduction de la triméthylation H3K27me3 sur les programmes de différenciation et la prolifération des neurones du cervelet. Ce modèle pourrait également permettre de tester des stratégies

thérapeutiques dans le contexte de la réduction d'H3K27me3, lesquels sont fondamentales pour contourner la radiorésistance observée dans les MB déficients en H3K27me3. Toutefois, mes résultats reposants sur des HIS ne permettent pas, à ce stade, de déterminer si les programmes géniques affectés sont identiques à ceux des MB humains. Une analyse transcriptomique globale de la lignée de poisson zèbre *ezh2* mutants serait donc nécessaire pour pouvoir établir une comparaison avec les profils transcriptomiques décrits dans les MB humains (Cho et al., 2011 ; Cavalli et al., 2017) et ainsi valider la pertinence du modèle pour l'étude des MB. Le modèle pourrait également être enrichi par la génération de combinaisons génétiques mimant des altérations observées dans les MB. Par exemple, l'inactivation du gène *ptch1*<sup>-/-</sup> chez le poisson zèbre conduit au développement rapide de tumeurs qui ressemblent au MB du groupe Shh aux niveaux cellulaire et génomique (Casey et al., 2024). La génération d'une lignée de poisson zèbre présentant à la fois l'inactivation de *ptch1* et d'*ezh2* pourrait permettre de tester si la perte d'activité du PRC2 agit comme un facteur de coopération oncogénique. Enfin, le poisson zèbre présente l'avantage unique de permettre un suivi *in vivo* de la neurogenèse et de la différenciation neuronale grâce à des lignées rapporteurs telles que *atoh1a:EGFP* (Kani et al., 2010), *neurod1:EGFP* (Zhu et al., 2020) ou *vglut2a:EGFP* (Bae et al., 2009). L'utilisation de ces lignées sur un fond génétique *ezh2*<sup>-/-</sup> permettrait de suivre en temps réel la dynamique des populations neuronales affectées, et d'évaluer si la perte d'Ezh2 reproduit les défauts de différenciation neuronale observés dans les MB.

## 5. Utilisation du modèle *ezh2* mutant pour les criblages pharmacologiques

Le développement de stratégies thérapeutiques ciblant les altérations épigénétiques, en particulier la perte de la marque répressive H3K27me3, repose encore largement sur des modèles cellulaires *in vivo*. Bien que ces systèmes permettent de tester l'efficacité des molécules pour inhiber la croissance ou la prolifération des cellules tumorales, ils ne reflètent pas la complexité d'un organisme entier et ne permettent pas d'estimer l'effet des molécules dans un contexte développemental et fonctionnel. Les modèles animaux et notamment le poisson zèbre offrent une alternative pour les criblages pharmacologiques *in vivo*. Dans ce contexte, l'identification d'un phénotype mesurable est essentielle pour établir des tests de criblages rapides et pertinents.

Le modèle de poisson zèbre *ezh2* mutant présente plusieurs caractéristiques qui le rendent particulièrement adapté pour les criblages pharmacologiques. D'une part, ce modèle présente une réduction de la triméthylation H3K27me3 facilement quantifiable par Western Blot (Dupret et al., 2017), offrant ainsi la possibilité d'estimer directement la capacité d'une molécule à rétablir les niveaux de cette marque épigénétique. D'autre part, les larves *ezh2* mutantes présentent un phénotype fonctionnel clair : une hyperactivité locomotrice détectable à 5 jpf (Figures [38](#), [39](#) et [40](#)). Dans le cadre d'un criblage pharmacologique, un tel phénotype comportemental peut servir de marqueur rapide et quantitatif pour évaluer l'efficacité de composé visant à moduler les voies de signalisation ou les altérations transcriptionnelles associées à la perte d'activité de PRC2. Les similitudes observées entre la lignée de poissons zèbres *ezh2* mutants et les tumeurs DMG et MB déficientes en H3K27me3 couplée à ce phénotype d'hyperactivité locomotrice offrent ainsi la possibilité d'évaluer rapidement et facilement des molécules d'intérêt thérapeutique *in vivo*. De nouvelles molécules ciblant les tumeurs DMG ou MB sont actuellement testées *in vitro* et ont montré des capacités de rétablissement de la marque H3K27me3 (Grasso et al., 2015 ; Deng et al., 2022). Ces molécules ont également montré leur efficacité dans des modèles murins. Par exemple, l'inhibition des déméthylases H3K27 chez des souris portant des xénogreffes sous-cutanées SF8628 K27M traitées avec la molécule GSKJ4 a permis une restauration partielle de H3K27me3 et une amélioration des symptômes neurologiques (Hashizume et al., 2014). Chez le poisson zèbre, l'étude de Bao et al. (2017) a démontré que le traitement par GSKJ4 (7  $\mu$ M ou 10  $\mu$ M) restaure la marque H3K27me3, réduit la prolifération cellulaire et augmente l'apoptose dans un contexte de régénération neurosensorielle. Cette étude valide non seulement la pénétration et l'activité de GSKJ4 chez le poisson zèbre, mais suggère également que des effets mesurables peuvent être obtenus sur des fenêtres de traitement relativement courtes. En combinant des analyses comportementales, histologiques et moléculaires, le modèle *ezh2*<sup>-/-</sup> permettrait d'aller plus loin en corrélant directement la restauration des marques épigénétiques avec une récupération fonctionnelle mesurable, telle que le retour à un comportement locomoteur normal. Par conséquent, le modèle de poisson zèbre *ezh2* mutant constitue un outil prometteur pour le criblage rapide et à haut débit de molécules d'intérêt thérapeutique ciblant les altérations épigénétiques associées à une perte de fonction de PRC2.



## Conclusion générale

L'objectif de mon travail de thèse était de mieux comprendre le rôle d'Ezh2 dans le développement cérébral à travers l'étude d'un modèle de poisson zèbre présentant une inactivation zygotique d'*ezh2*. Ce modèle offre une opportunité unique d'analyser le développement cérébral dans le contexte d'une réduction de la triméthylation H3K27me3, depuis les étapes les plus précoces jusqu'à 12 jours post-fécondation.

Mes résultats montrent que l'inactivation zygotique d'*ezh2* n'affecte pas la mise en place initiale des cellules souches et progénitrices neurales, ni le développement des cellules de la lignée oligodendrocytaire. En revanche, la perte de fonction d'*ezh2* entraîne des altérations spécifiques au niveau du cervelet. Sur le plan fonctionnel, ces altérations s'accompagnent d'un phénotype d'hyperactivité locomotrice, vraisemblablement lié aux défauts de développement du cervelet et en particulier des cellules de Purkinje. Mon étude identifie donc Ezh2 comme étant un régulateur épigénétique clé nécessaire à la prolifération des progéniteurs du cervelet et à la différenciation des neurones cérébelleux chez le poisson zèbre. Par ailleurs, mon travail suggère également l'existence de mécanismes compensatoires entre le PRC1 et le PRC2. L'augmentation de l'expression de *bmi1a* observée chez les larves *ezh2* mutantes appuie l'hypothèse selon laquelle le PRC1 pourrait partiellement pallier la perte d'activité du PRC2. Cette compensation illustre la plasticité des mécanismes épigénétiques impliqués dans le développement et souligne la pertinence de l'utilisation du modèle poisson zèbre pour leur exploration. Enfin, les parallèles établis entre le modèle *ezh2* mutant et certaines tumeurs cérébrales pédiatriques, notamment les DMG et les MB, soulignent la valeur translationnelle de mon travail. D'une part, l'utilisation de la lignée de poissons zèbres *ezh2* mutants comme modèle d'étude présente un intérêt pour approfondir la compréhension des mécanismes reliant la perte d'activité du PRC2 et la réduction de la triméthylation H3K27me3 au développement tumoral. D'autre part, ce modèle peut servir de plateforme de criblage pharmacologique *in vivo* pour l'identification de molécules susceptibles de restaurer les niveaux des différentes marques épigénétiques et d'atténuer les phénotypes développementaux et fonctionnels associés.

L'ensemble des résultats présentés dans cette étude repose sur l'utilisation de HIS, une technique permettant de visualiser avec précision la localisation spatiale de l'expression génique et ainsi d'identifier les lignées cellulaires affectées par la mutation du gène *ezh2*.

Cette approche a ainsi permis de dresser un état des lieux de l'effet de la mutation sur la génération des différents types de cellules cérébrales et d'identifier le cervelet comme étant une région présentant une dépendance accrue à l'activité du PRC2. Cependant, cette technique ne permet pas de quantifier finement les variations d'expression génique et doit donc être complétée par des approches complémentaires.

En conclusion, mon travail de thèse met en lumière l'importance d'Ezh2 dans le développement du cervelet chez le poisson zèbre et dans la mise en place des circuits locomoteurs tout en ouvrant la voie à de nouvelles explorations sur les mécanismes de compensation entre le PRC1 et le PRC2. Mon étude met également en avant l'intérêt de l'utilisation du modèle poisson zèbre *ezh2* mutant pour l'étude des DMG et des MB, notamment dans le cadre de criblage de molécules d'intérêt thérapeutique.

## Références bibliographiques

A, P., Xu, X., Wang, C., Yang, J., Wang, S., Dai, J., & Ye, L. (2018). EZH2 promotes DNA replication by stabilizing interaction of POL $\delta$  and PCNA via methylation-mediated PCNA trimerization. *Epigenetics & Chromatin*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0213-1>

Acharyya, S., Sharma, S. M., Cheng, A. S., Ladner, K. J., He, W., Kline, W., Wang, H., Ostrowski, M. C., Huang, T. H., & Guttridge, D. C. (2010). TNF Inhibits Notch-1 in Skeletal Muscle Cells by Ezh2 and DNA Methylation Mediated Repression : Implications in Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS ONE*, 5(8), e12479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012479>

Ackerman, S. D., & Monk, K. R. (2016). The scales and tales of myelination : Using zebrafish and mouse to study myelinating glia. *Brain Research*, 1641, 79-91. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.011>

Adolf, B., Bellipanni, G., Huber, V., & Bally-Cuif, L. (2004). Atoh1.2 and beta3.1 are two new bHLH-encoding genes expressed in selective precursor cells of the zebrafish anterior hindbrain. *Gene Expression Patterns*, 5(1), 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2004.06.009>

Agger, K., Cloos, P. A. C., Christensen, J., Pasini, D., Rose, S., Rappsilber, J., Issaeva, I., Canaani, E., Salcini, A. E., & Helin, K. (2007). UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature*, 449(7163), 731-734. <https://doi.org/10.1038/nature06145>

Aharon, D., & Marlow, F. L. (2022). Sexual determination in zebrafish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(1). <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04066-4>

Akasaka, T., Kanno, M., Balling, R., Mieza, M. A., Taniguchi, M., & Koseki, H. (1996). A role for mel-18 , a Polycomb group-related vertebrate gene, during the anteroposterior specification of the axial skeleton. *Development*, 122(5), 1513-1522. <https://doi.org/10.1242/dev.122.5.1513>

Alam El Din, D.-M., Shin, J., Lysinger, A., Roos, M. J., Johnson, E. C., Shafer, T. J., Hartung, T., & Smirnova, L. (2024). Organoid intelligence for developmental neurotoxicity testing. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1480845>

Aldiri, I., Moore, K. B., Hutcheson, D. A., Zhang, J., & Vetter, M. L. (2013). Polycomb repressive complex PRC2 regulates *Xenopus* retina development downstream of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Development*, 140(14), 2867-2878. <https://doi.org/10.1242/dev.088096>

Alekseyenko, A. A., Gorchakov, A. A., Kharchenko, P. V., & Kuroda, M. I. (2014). Reciprocal interactions of human C10orf12 and C17orf96 with PRC2 revealed by BioTAP-XL cross-linking and affinity purification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(7), 2488-2493. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400648111>

Allende, M. L., & Weinberg, E. S. (1994). The Expression Pattern of Two Zebrafish achaete-scute Homolog (ash) Genes Is Altered in the Embryonic Brain of the cyclops Mutant. *Developmental Biology*, 166(2), 509-530. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1334>

Almeida, M., Pintacuda, G., Masui, O., Koseki, Y., Gdula, M., Cerase, A., Brown, D., Mould, A., Innocent, C., Nakayama, M., Schermelleh, L., Nesterova, T. B., Koseki, H., & Brockdorff, N. (2017). PCGF3/5-PRC1 initiates Polycomb recruitment in X chromosome inactivation. *Science*, 356(6342), 1081-1084. <https://doi.org/10.1126/science.aal2512>

Amatruda, J. F., Shepard, J. L., Stern, H. M., & Zon, L. I. (2002). Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell*, 1(3), 229-231. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00052-1](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00052-1)

Amores, A., Force, A., Yan, Y.-L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R. K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.-L., Westerfield, M., Ekker, M., & Postlethwait, J. H. (1998). Zebrafish hox Clusters and Vertebrate Genome Evolution. *Science*, 282(5394), 1711-1714. <https://doi.org/10.1126/science.282.5394.1711>

Anderson, J. L., Muraleedharan, R., Oatman, N., Klotter, A., Sengupta, S., Waclaw, R. R., Wu, J., Drissi, R., Miles, L., Raabe, E. H., Weirauch, M. L., Fouladi, M., Chow, L. M., Hoffman, L., DeWire, M., & Dasgupta, B. (2017). The transcription factor Olig2 is important for the biology of diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro-Oncology*, 19(8), 1068-1078. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now299>

Andricovich, J., Kai, Y., Peng, W., Foudi, A., & Tzatsos, A. (2016). Histone demethylase KDM2B regulates lineage commitment in normal and malignant hematopoiesis. *Journal of Clinical Investigation*, 126(3), 905-920. <https://doi.org/10.1172/jci84014>

Appel, B., & Chitnis, A. (2002). Neurogenesis and Specification of Neuronal Identity. In L. Solnica-Krezel (Éd.), *Pattern Formation in Zebrafish* (Vol. 40, p. 237-251). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-46041-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-540-46041-1_12)

Ardehali, M. B., Anselmo, A., Cochrane, J. C., Kundu, S., Sadreyev, R. I., & Kingston, R. E. (2017). Polycomb Repressive Complex 2 Methylates Elongin A to Regulate Transcription. *Molecular Cell*, 68(5), 872-884.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.025>

Arrigoni, R., Alam, S. L., Wamstad, J. A., Bardwell, V. J., Sundquist, W. I., & Schreiber-Agus, N. (2006). The Polycomb-associated protein Rybp is a ubiquitin binding protein. *FEBS Letters*, 580(26), 6233-6241. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.027>

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., & Lake, R. J. (1999). Notch Signaling : Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science*, 284(5415), 770-776. <https://doi.org/10.1126/science.284.5415.770>

Aso, T., Lane, W. S., Conaway, J. W., & Conaway, R. C. (1995). Elongin (SIII) : A Multisubunit Regulator of Elongation by RNA Polymerase II. *Science*, 269(5229), 1439-1443. <https://doi.org/10.1126/science.7660129>

Astell, K. R., & Sieger, D. (2020). Zebrafish In Vivo Models of Cancer and Metastasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(8), a037077. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037077>

Auer, F., Nardone, K., Matsuda, K., Hibi, M., & Schoppik, D. (2025). Cerebellar Purkinje cells control posture in larval zebrafish (*Danio rerio*). *eLife*, 13, RP97614. <https://doi.org/10.7554/eLife.97614>

Aziz-Bose, R., & Monje, M. (2019). Diffuse intrinsic pontine glioma : Molecular landscape and emerging therapeutic targets. *Current Opinion in Oncology*, 31(6), 522-530. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000577>

Azulara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jørgensen, H. F., John, R. M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merckenschlager, M., & Fisher, A. G. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nature Cell Biology*, 8(5), 532-538. <https://doi.org/10.1038/ncb1403>

Bae, W. K., Kang, K., Yu, J. H., Yoo, K. H., Factor, V. M., Kaji, K., Matter, M., Thorgeirsson, S., & Helmighausen, L. (2015). The methyltransferases enhancer of zeste homolog (EZH) 1 and EZH2 control hepatocyte homeostasis and regeneration. *The FASEB Journal*, 29(5), 1653-1662. <https://doi.org/10.1096/fj.14-261537>

Bae, Y.-K., Kani, S., Shimizu, T., Tanabe, K., Nojima, H., Kimura, Y., Higashijima, S., & Hibi, M. (2009). Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Developmental Biology*, 330(2), 406-426. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.013>

Balakrishnan, I., Danis, E., Pierce, A., Madhavan, K., Wang, D., Dahl, N., Sanford, B., Birks, D. K., Davidson, N., Metselaar, D. S., Meel, M. H., Lemma, R., Donson, A., Vijmasi, T., Katagi, H., Sola, I., Fosmire, S., Alimova, I., Steiner, J., ... Venkataraman, S. (2020). Senescence Induced by BMI1 Inhibition Is a Therapeutic Vulnerability in H3K27M-Mutant DIPG. *Cell Reports*, 33(3), 108286. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108286>

Bao, B., He, Y., Tang, D., Li, W., & Li, H. (2017). Inhibition of H3K27me3 Histone Demethylase Activity Prevents the Proliferative Regeneration of Zebrafish Lateral Line Neuromasts. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00051>

Barman, R. P. (1991). A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio* (Zoological Survey of India).

Batool, A., Jin, C., & Liu, Y.-X. (2019). Role of EZH2 in cell lineage determination and relative signaling pathways. *Frontiers in Bioscience*, 24(5), 947-960. <https://doi.org/10.2741/4760>

Behesti, H., Bhagat, H., Dubuc, A. M., Taylor, M. D., & Marino, S. (2012). Bmi1 overexpression in the cerebellar granule cell lineage of mice affects cell proliferation and survival without initiating medulloblastoma formation. *Disease Models & Mechanisms*, dmm.009506. <https://doi.org/10.1242/dmm.009506>

Behjati, S., Gilbertson, R. J., & Pfister, S. M. (2021). Maturation Block in Childhood Cancer. *Cancer Discovery*, 11(3), 542-544. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0926>

Bell, C. C. (2002). Evolution of Cerebellum-Like Structures. *Brain, Behavior and Evolution*, 59(5-6), 312-326. <https://doi.org/10.1159/000063567>

Belousov, L. V. (2011). Scott F. Gilbert—Developmental Biology, 2010, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA Ninth Edition. Russian Journal of Developmental Biology, 42(5), 349-349. <https://doi.org/10.1134/S1062360411050043>

Bender, S., Tang, Y., Lindroth, A. M., Hovestadt, V., Jones, D. T. W., Kool, M., Zapatka, M., Northcott, P. A., Sturm, D., Wang, W., Radlwimmer, B., Højfeldt, J. W., Truffaux, N., Castel, D., Schubert, S., Ryzhova, M., Şeker-Cin, H., Gronych, J., Johann, P. D., ... Pfister, S. M. (2013). Reduced H3K27me3 and DNA Hypomethylation Are Major Drivers of Gene Expression in K27M Mutant Pediatric High-Grade Gliomas. *Cancer Cell*, 24(5), 660-672. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.10.006>

Beringer, M., Pisano, P., Di Carlo, V., Blanco, E., Chammas, P., Vizán, P., Gutiérrez, A., Aranda, S., Payer, B., Wierer, M., & Di Croce, L. (2016). EPOP Functionally Links Elongin and Polycomb in Pluripotent Stem Cells. *Molecular Cell*, 64(4), 645-658. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.018>

Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S. L., & Lander, E. S. (2006). A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*, 125(2), 315-326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>

Bertin, A., & Mangenot, S. (2008). Structure et dynamique de la particule cœur de nucléosome. *médecine/sciences*, 24(8-9), 715-719. <https://doi.org/10.1051/medsci/20082489715>

Betancur-R, R., Wiley, E. O., Arratia, G., Acero, A., Bailly, N., Miya, M., Lecointre, G., & Ortí, G. (2017). Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0958-3>

Bieluszewski, T., Xiao, J., Yang, Y., & Wagner, D. (2021). PRC2 activity, recruitment, and silencing: A comparative perspective. *Trends in Plant Science*, 26(11), 1186-1198. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.06.006>

Blackledge, N. P., Farcas, A. M., Kondo, T., King, H. W., McGouran, J. F., Hanssen, L. L. P., Ito, S., Cooper, S., Kondo, K., Koseki, Y., Ishikura, T., Long, H. K., Sheahan, T. W., Brockdorff, N., Kessler, B. M., Koseki, H., & Klose, R. J. (2014). Variant PRC1 Complex-Dependent H2A

Ubiquitylation Drives PRC2 Recruitment and Polycomb Domain Formation. *Cell*, 157(6), 1445-1459. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.004>

Blackledge, N. P., & Klose, R. J. (2021). The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(12), 815-833. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00398-y>

Blackledge, N. P., Zhou, J. C., Tolstorukov, M. Y., Farcas, A. M., Park, P. J., & Klose, R. J. (2010). CpG Islands Recruit a Histone H3 Lysine 36 Demethylase. *Molecular Cell*, 38(2), 179-190. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.04.009>

Blader, P., Fischer, N., Gradwohl, G., Guillemot, F., & Strähle, U. (1997). The activity of Neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Development*, 124(22), 4557-4569. <https://doi.org/10.1242/dev.124.22.4557>

Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M. K., Bell, G. W., Otte, A. P., Vidal, M., Gifford, D. K., Young, R. A., & Jaenisch, R. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, 441(7091), 349-353. <https://doi.org/10.1038/nature04733>

Bracken, A. P., Brien, G. L., & Verrijzer, C. P. (2019). Dangerous liaisons : Interplay between SWI/SNF, NuRD, and Polycomb in chromatin regulation and cancer. *Genes & Development*, 33(15-16), 936-959. <https://doi.org/10.1101/gad.326066.119>

Brand, M., Nakka, K., Zhu, J., & Dilworth, F. J. (2019). Polycomb/Trithorax Antagonism : Cellular Memory in Stem Cell Fate and Function. *Cell Stem Cell*, 24(4), 518-533. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.005>

Brennan, C., Amacher, S. L., & Currie, P. D. (2002). Somitogenesis. In L. Solnica-Krezel (Éd.), *Pattern Formation in Zebrafish* (Vol. 40, p. 271-297). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-46041-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-540-46041-1_14)

Brown, Z. Z., Müller, M. M., Jain, S. U., Allis, C. D., Lewis, P. W., & Muir, T. W. (2014). Strategy for “Detoxification” of a Cancer-Derived Histone Mutant Based on Mapping Its Interaction with the Methyltransferase PRC2. *Journal of the American Chemical Society*, 136(39), 13498-13501. <https://doi.org/10.1021/ja5060934>

Brożko, N., Baggio, S., Lipiec, M. A., Jankowska, M., Szewczyk, Ł. M., Gabriel, M. O., Chakraborty, C., Ferran, J. L., & Wiśniewska, M. B. (2022). Genoarchitecture of the Early Postmitotic Pretectum and the Role of Wnt Signaling in Shaping Pretectal Neurochemical Anatomy in Zebrafish. *Frontiers in Neuroanatomy*, 16, 838567. <https://doi.org/10.3389/fnana.2022.838567>

Brunet, F. G., Crollius, H. R., Paris, M., Aury, J.-M., Gibert, P., Jaillon, O., Laudet, V., & Robinson-Rechavi, M. (2006). Gene Loss and Evolutionary Rates Following Whole-Genome Duplication in Teleost Fishes. *Molecular Biology and Evolution*, 23(9), 1808-1816. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl049>

Buczkwicz, P., Hoeman, C., Rakopoulos, P., Pajovic, S., Letourneau, L., Dzamba, M., Morrison, A., Lewis, P., Bouffet, E., Bartels, U., Zuccaro, J., Agnihotri, S., Ryall, S., Barszczyk, M., Chornenkyy, Y., Bourgey, M., Bourque, G., Montpetit, A., Cordero, F., ... Hawkins, C. (2014). Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nature Genetics*, 46(5), 451-456. <https://doi.org/10.1038/ng.2936>

Bunt, J., Hasselt, N. A., Zwijnenburg, D. A., Koster, J., Versteeg, R., & Kool, M. (2013). OTX2 sustains a bivalent-like state of OTX2-bound promoters in medulloblastoma by maintaining their H3K27me3 levels. *Acta Neuropathologica*, 125(3), 385-394. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1069-2>

Burgold, T., Spreafico, F., De Santa, F., Totaro, M. G., Prosperini, E., Natoli, G., & Testa, G. (2008). The histone H3 lysine 27-specific demethylase Jmjd3 is required for neural commitment. *PloS One*, 3(8), e3034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003034>

Butts, T., Chaplin, N., & Wingate, R. J. T. (2011). Can Clues from Evolution Unlock the Molecular Development of the Cerebellum? *Molecular Neurobiology*, 43(1), 67-76. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8160-2>

Butts, T., Green, M. J., & Wingate, R. J. T. (2014). Development of the cerebellum : Simple steps to make a 'little brain'. *Development*, 141(21), 4031-4041. <https://doi.org/10.1242/dev.106559>

Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R. S., & Zhang, Y. (2002). Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing. *Science*, 298(5595), 1039-1043. <https://doi.org/10.1126/science.1076997>

Cao, R., & Zhang, Y. (2004). SUZ12 Is Required for Both the Histone Methyltransferase Activity and the Silencing Function of the EED-EZH2 Complex. *Molecular Cell*, 15(1), 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.020>

Cao, Y., Li, L., & Fan, Z. (2021). The role and mechanisms of polycomb repressive complex 2 on the regulation of osteogenic and neurogenic differentiation of stem cells. *Cell Proliferation*, 54(5), e13032. <https://doi.org/10.1111/cpr.13032>

Cardoso, C., Mignon, C., Hetet, G., Grandchamps, B., Fontes, M., & Colleaux, L. (2000). The human EZH2 gene : Genomic organisation and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders. *European Journal of Human Genetics*, 8(3), 174-180. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200439>

Casey, M. J., Chan, P. P., Li, Q., Zu, J.-F., Jette, C. A., Kohler, M., Myers, B. R., & Stewart, R. A. (2024). A simple and scalable zebrafish model of Sonic hedgehog medulloblastoma. *Cell Reports*, 44(7), 114559. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114559>

Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R. T., Van Cruchten, S., & Zon, L. I. (2020). Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 33(1), 95-118. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00335>

Castel, D., Kergrohen, T., Tauziède-Espariat, A., Mackay, A., Ghermaoui, S., Lechapt, E., Pfister, S. M., Kramm, C. M., Boddaert, N., Blauwblomme, T., Puget, S., Beccaria, K., Jones, C., Jones, D. T. W., Varlet, P., Grill, J., & Debily, M.-A. (2020). Histone H3 wild-type DIPG/DMG overexpressing EZHIP extend the spectrum diffuse midline gliomas with PRC2 inhibition beyond H3-K27M mutation. *Acta Neuropathologica*, 139(6), 1109-1113. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02142-w>

Castel, D., Philippe, C., Calmon, R., Le Dret, L., Truffaux, N., Boddaert, N., Pagès, M., Taylor, K. R., Saulnier, P., Lacroix, L., Mackay, A., Jones, C., Sainte-Rose, C., Blauwblomme, T., Andreiuolo, F., Puget, S., Grill, J., Varlet, P., & Debily, M.-A. (2015). Histone H3F3A and

HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathologica*, 130(6), 815-827. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1478-0>

Cavalli, F. M. G., Remke, M., Rampasek, L., Peacock, J., Shih, D. J. H., Luu, B., Garzia, L., Torchia, J., Nor, C., Morrissy, A. S., Agnihotri, S., Thompson, Y. Y., Kuzan-Fischer, C. M., Farooq, H., Isaev, K., Daniels, C., Cho, B.-K., Kim, S.-K., Wang, K.-C., ... Taylor, M. D. (2017). Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell*, 31(6), 737-754.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.005>

Champagne, D. L., Hoefnagels, C. C. M., De Kloet, R. E., & Richardson, M. K. (2010). Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. *Behavioural Brain Research*, 214(2), 332-342. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.06.001>

Chan, K. M., Han, J., Fang, D., Gan, H., & Zhang, Z. (2013). A lesson learned from the H3.3K27M mutation found in pediatric glioma: A new approach to the study of the function of histone modifications in vivo? *Cell Cycle*, 12(16), 2546-2552. <https://doi.org/10.4161/cc.25625>

Chang, W., Pedroni, A., Hohendorf, V., Giacomello, S., Hibi, M., Köster, R. W., & Ampatzis, K. (2020). Functionally distinct Purkinje cell types show temporal precision in encoding locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(29), 17330-17337. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005633117>

Chapouton, P., & Godinho, L. (2010). Neurogenesis. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 100, p. 72-126). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384892-5.00004-9>

Chase, A., & Cross, N. C. P. (2011). Aberrations of EZH2 in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(9), 2613-2618. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2156>

Cheng, A. S. L., Lau, S. S., Chen, Y., Kondo, Y., Li, M. S., Feng, H., Ching, A. K., Cheung, K. F., Wong, H. K., Tong, J. H., Jin, H., Choy, K. W., Yu, J., To, K. F., Wong, N., Huang, T. H.-M., & Sung, J. J. Y. (2011). EZH2-Mediated Concordant Repression of Wnt Antagonists Promotes  $\beta$ -Catenin-Dependent Hepatocarcinogenesis. *Cancer Research*, 71(11), 4028-4039. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3342>

Cheng, Y., Liao, S., Xu, G., Hu, J., Guo, D., Du, F., Contreras, A., Cai, K. Q., Peri, S., Wang, Y., Corney, D. C., Noronha, A. M., Chau, L. Q., Zhou, G., Wiest, D. L., Bellacosa, A., Wechsler-Reya, R. J., Zhao, Y., & Yang, Z. (2020). NeuroD1 Dictates Tumor Cell Differentiation in Medulloblastoma. *Cell Reports*, 31(12), 107782. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107782>

Cho, Y.-J., Tsherniak, A., Tamayo, P., Santagata, S., Ligon, A., Greulich, H., Berhoukim, R., Amani, V., Goumnerova, L., Eberhart, C. G., Lau, C. C., Olson, J. M., Gilbertson, R. J., Gajjar, A., Delattre, O., Kool, M., Ligon, K., Meyerson, M., Mesirov, J. P., & Pomeroy, S. L. (2011). Integrative Genomic Analysis of Medulloblastoma Identifies a Molecular Subgroup That Drives Poor Clinical Outcome. *Journal of Clinical Oncology*, 29(11), 1424-1430. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.5148>

Chou, R.-H., Yu, Y.-L., & Hung, M.-C. (2011). The roles of EZH2 in cell lineage commitment. *American Journal of Translational Research*, 3(3), 243-250.

Chouly, M., & Bally-Cuif, L. (2024). Generating neurons in the embryonic and adult brain : Compared principles and mechanisms. *Comptes Rendus. Biologies*, 347(G1), 199-221. <https://doi.org/10.5802/crbior.167>

Chrispijn, N. D., Andralojc, K. M., Castenmiller, C., & Kamminga, L. M. (2018). Gene expression profile of a selection of Polycomb Group genes during zebrafish embryonic and germ line development. *PLOS ONE*, 13(7), e0200316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200316>

Chrispijn, N. D., Elurbe, D. M., Mickoleit, M., Aben, M., De Bakker, D. E. M., Andralojc, K. M., Huisken, J., Bakkers, J., & Kamminga, L. M. (2019). Loss of the Polycomb group protein Rnf2 results in derepression of tbx-transcription factors and defects in embryonic and cardiac development. *Scientific Reports*, 9(1), 4327. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40867-1>

Clevers, H. (2006). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, 127(3), 469-480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>

Connelly, K. E., & Dykhuizen, E. C. (2017). Compositional and functional diversity of canonical PRC1 complexes in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(2), 233-245. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.12.006>

Conway, E., Healy, E., & Bracken, A. P. (2015). PRC2 mediated H3K27 methylations in cellular identity and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 37, 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.10.003>

Conway, E., Jerman, E., Healy, E., Ito, S., Holoch, D., Oliviero, G., Deevy, O., Glancy, E., Fitzpatrick, D. J., Mucha, M., Watson, A., Rice, A. M., Chammas, P., Huang, C., Pratt-Kelly, I., Koseki, Y., Nakayama, M., Ishikura, T., Streubel, G., ... Bracken, A. P. (2018). A Family of Vertebrate-Specific Polycombs Encoded by the LCOR/LCORL Genes Balance PRC2 Subtype Activities. *Molecular Cell*, 70(3), 408-421.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.005>

Coolen, M., Altin, N., Rajamani, K., Pereira, E., Siquier-Pernet, K., Puig Lombardi, E., Moreno, N., Barcia, G., Yvert, M., Laquerrière, A., Pouliet, A., Nitschké, P., Boddaert, N., Rausell, A., Razavi, F., Afenjar, A., Billette De Villemeur, T., Al-Maawali, A., Al-Thihli, K., ... Cantagrel, V. (2022). Recessive PRDM13 mutations cause fatal perinatal brainstem dysfunction with cerebellar hypoplasia and disrupt Purkinje cell differentiation. *The American Journal of Human Genetics*, 109(5), 909-927. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2022.03.010>

Coré, N., Bel, S., Gaunt, S. J., Aurrand-Lions, M., Pearce, J., Fisher, A., & Djabali, M. (1997). Altered cellular proliferation and mesoderm patterning in Polycomb-M33-deficient mice. *Development*, 124(3), 721-729. <https://doi.org/10.1242/dev.124.3.721>

Cowden, J., Padnos, B., Hunter, D., MacPhail, R., Jensen, K., & Padilla, S. (2012). Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retino-tectal projection area in zebrafish embryos. *Reproductive Toxicology*, 33(2), 165-173. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.11.111>

Cunliffe, V. T. (2016). Histone modifications in zebrafish development. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 135, p. 361-385). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.05.005>

D'Amora, M., & Giordani, S. (2018). The Utility of Zebrafish as a Model for Screening Developmental Neurotoxicity. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 976. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00976>

Dasgupta, M., Dermawan, J. K. T., Willard, B., & Stark, G. R. (2015). STAT3-driven transcription depends upon the dimethylation of K49 by EZH2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(13), 3985-3990. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503152112>

De Napoles, M., Mermoud, J. E., Wakao, R., Tang, Y. A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T. B., Silva, J., Otte, A. P., Vidal, M., Koseki, H., & Brockdorff, N. (2004). Polycomb Group Proteins Ring1A/B Link Ubiquitylation of Histone H2A to Heritable Gene Silencing and X Inactivation. *Developmental Cell*, 7(5), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.005>

Deng, H., Guo, X., Feng, N., Luo, Y., Liu, B., Liu, S., Wu, J. I., & Shi, X. (2022). Targeting H3K27me3 demethylase to inhibit Shh signaling and cholesterol metabolism in medulloblastoma growth. *Frontiers in Oncology*, 12, 1057147. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1057147>

Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D., & Staudt, L. M. (1997). Control of Inflammation, Cytokine Expression, and Germinal Center Formation by BCL-6. *Science*, 276(5312), 589-592. <https://doi.org/10.1126/science.276.5312.589>

Di Croce, L., & Helin, K. (2013). Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(10), 1147-1155. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2669>

Di Meglio, T., Kratochwil, C. F., Vilain, N., Loche, A., Vitobello, A., Yonehara, K., Hrycaj, S. M., Roska, B., Peters, A. H. F. M., Eichmann, A., Wellik, D., Ducret, S., & Rijli, F. M. (2013). Ezh2 Orchestrates Topographic Migration and Connectivity of Mouse Precerebellar Neurons. *Science*, 339(6116), 204-207. <https://doi.org/10.1126/science.1229326>

Dottermusch, M., Uksul, N., Knappe, U. J., Erdlenbruch, B., & Wefers, A. K. (2022). An H3F3A K27M-mutation in a sonic hedgehog medulloblastoma. *Brain Pathology*, 32(3), e13024. <https://doi.org/10.1111/bpa.13024>

Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C. F., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y. R., Zwartkuis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., & Boggs, C. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, 123(1), 37-46. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.37>

Dubuc, A. M., Remke, M., Korshunov, A., Northcott, P. A., Zhan, S. H., Mendez-Lago, M., Kool, M., Jones, D. T. W., Unterberger, A., Morrissy, A. S., Shih, D., Peacock, J., Ramaswamy, V., Rolider, A., Wang, X., Witt, H., Hielscher, T., Hawkins, C., Vibhakar, R., ... Taylor, M. D.

(2013). Aberrant patterns of H3K4 and H3K27 histone lysine methylation occur across subgroups in medulloblastoma. *Acta Neuropathologica*, 125(3), 373-384. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1070-9>

Dupret, B., Völkel, P., Follet, P., Le Bourhis, X., & Angrand, P.-O. (2018). Combining genotypic and phenotypic analyses on single mutant zebrafish larvae. *MethodsX*, 5, 244-256. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.03.002>

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158700>

Dupret, B., Völkel, P., Vennin, C., Toillon, R.-A., Le Bourhis, X., & Angrand, P.-O. (2017). The histone lysine methyltransferase Ezh2 is required for maintenance of the intestine integrity and for caudal fin regeneration in zebrafish. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(10), 1079-1093. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.08.011>

Dutta, S. (1993). Food and feeding habits of *Danio rerio* (Ham. Buch) inhabiting Gadigarh Stream, Jammu. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:90948213>

Eaton, R. C., & Farley, R. D. (1974a). Growth and the Reduction of Depensation of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, Reared in the Laboratory. *Copeia*, 1974(1), 204. <https://doi.org/10.2307/1443024>

Eaton, R. C., & Farley, R. D. (1974b). Spawning Cycle and Egg Production of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the Laboratory. *Copeia*, 1974(1), 195. <https://doi.org/10.2307/1443023>

El-Hashash, A. H. K. (2021). Histone H3K27M Mutation in Brain Tumors. In D. Fang & J. Han (Éds.), *Histone Mutations and Cancer* (Vol. 1283, p. 43-52). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5_3)

Emery, B., & Lu, Q. R. (2015). Transcriptional and Epigenetic Regulation of Oligodendrocyte Development and Myelination in the Central Nervous System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), a020461. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020461>

Endoh, M., Endo, T. A., Shinga, J., Hayashi, K., Farcas, A., Ma, K.-W., Ito, S., Sharif, J., Endoh, T., Onaga, N., Nakayama, M., Ishikura, T., Masui, O., Kessler, B. M., Suda, T., Ohara, O., Okuda, A., Klose, R., & Koseki, H. (2017). PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by regulating germ cell-related genes. *eLife*, 6, e21064. <https://doi.org/10.7554/eLife.21064>

Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A., & Parichy, D. M. (2007). Zebrafish in The Wild : A Review of Natural History And New Notes from The Field. *Zebrafish*, 4(1), 21-40. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9997>

Ernst, T., Chase, A. J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C. E., Bryant, C., Jones, A. V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F. M., Reiter, A., Hochhaus, A., Drexler, H. G., Duncombe, A., Cervantes, F., Oscier, D., Boulwood, J., Grand, F. H., & Cross, N. C. P. (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature Genetics*, 42(8), 722-726. <https://doi.org/10.1038/ng.621>

Espanola, S. G., Song, H., Ryu, E., Saxena, A., Kim, E.-S., Manegold, J. E., Nasamran, C. A., Sahoo, D., Oh, C.-K., Bickers, C., Shin, U., Grainger, S., Park, Y. H., Pandolfo, L., Kang, M.-S., Kang, S., Myung, K., Cooper, K. L., Yelon, D., ... Lee, Y. (2020). Haematopoietic stem cell-dependent Notch transcription is mediated by p53 through the Histone chaperone Supt16h. *Nature Cell Biology*, 22(12), 1411-1422. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-00604-7>

Ezhkova, E., Lien, W.-H., Stokes, N., Pasolli, H. A., Silva, J. M., & Fuchs, E. (2011). EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair. *Genes & Development*, 25(5), 485-498. <https://doi.org/10.1101/gad.2019811>

Fan, C.-Y., Cowden, J., Simmons, S. O., Padilla, S., & Ramabhadran, R. (2010). Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening. *Neurotoxicology and Teratology*, 32(1), 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.04.065>

Fang Fang. (2003). Phylogenetic Analysis of the Asian Cyprinid Genus *Danio* (Teleostei, Cyprinidae). *Copeia*, 2003(4), 714-728. JSTOR.

Farcas, A. M., Blackledge, N. P., Sudbery, I., Long, H. K., McGouran, J. F., Rose, N. R., Lee, S., Sims, D., Cerase, A., Sheahan, T. W., Koseki, H., Brockdorff, N., Ponting, C. P., Kessler, B. M., & Klose, R. J. (2012). KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. *eLife*, 1, e00205. <https://doi.org/10.7554/eLife.00205>

Faust, C., Schumacher, A., Holdener, B., & Magnuson, T. (1995). The *eed* mutation disrupts anterior mesoderm production in mice. *Development*, 121(2), 273-285. <https://doi.org/10.1242/dev.121.2.273>

FC3R. (s. d.). Définition du principe des 3R. <https://www.fc3r.com/principe-des-3R.php>

Feng, G., & Sun, Y. (2022). The Polycomb group gene *rnf2* is essential for central and enteric neural system development in zebrafish. *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.960149>

Feng, X., Juan, A. H., Wang, H. A., Ko, K. D., Zare, H., & Sartorelli, V. (2016). Polycomb *Ezh2* controls the fate of GABAergic neurons in the embryonic cerebellum. *Development*, dev.132902. <https://doi.org/10.1242/dev.132902>

Feng, X., Wang, A. H., Juan, A. H., Ko, K. D., Jiang, K., Riparini, G., Ciuffoli, V., Kaba, A., Lopez, C., Naz, F., Jarnik, M., Aliberti, E., Hu, S., Segalés, J., Khateb, M., Acevedo-Luna, N., Randazzo, D., Cheung, T. H., Muñoz-Cánoves, P., ... Sartorelli, V. (2023). Polycomb *Ezh1* maintains murine muscle stem cell quiescence through non-canonical regulation of Notch signaling. *Developmental Cell*, 58(12), 1052-1070.e10. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.04.005>

Fleming, A., Diekmann, H., & Goldsmith, P. (2013). Functional Characterisation of the Maturation of the Blood-Brain Barrier in Larval Zebrafish. *PLoS ONE*, 8(10), e77548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077548>

Folgueira, M., Bayley, P., Navratilova, P., Becker, T. S., Wilson, S. W., & Clarke, J. D. (2012). Morphogenesis underlying the development of the everted teleost telencephalon. *Neural Development*, 7(1), 212. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-7-32>

Forzati, F., Federico, A., Pallante, P., Abbate, A., Esposito, F., Malapelle, U., Sepe, R., Palma, G., Troncone, G., Scarfò, M., Arra, C., Fedele, M., & Fusco, A. (2012). *CBX7* is a tumor suppressor in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation*, 122(2), 612-623. <https://doi.org/10.1172/jci58620>

Forzati, F., Federico, A., Pallante, P., Colamaio, M., Esposito, F., Sepe, R., Gargiulo, S., Luciano, A., Arra, C., Palma, G., Bon, G., Bucher, S., Falcioni, R., Brunetti, A., Battista, S., Fedele, M., & Fusco, A. (2014). CBX7 gene expression plays a negative role in adipocyte cell growth and differentiation. *Biology Open*, 3(9), 871-879. <https://doi.org/10.1242/bio.20147872>

Fraser, J., Essebier, A., Gronostajski, R. M., Boden, M., Wainwright, B. J., Harvey, T. J., & Piper, M. (2017). Cell-type-specific expression of NFIX in the developing and adult cerebellum. *Brain Structure and Function*, 222(5), 2251-2270. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1340-8>

Fritsch, C., Lesley Brown, J., Kassis, J. A., & Müller, J. (1999). The DNA-binding Polycomb group protein Pleiohomeotic mediates silencing of a *Drosophila* homeotic gene. *Development*, 126(17), 3905-3913. <https://doi.org/10.1242/dev.126.17.3905>

Fürthauer, M., Thisse, C., & Thisse, B. (1997). A role for FGF-8 in the dorsoventral patterning of the zebrafish gastrula. *Development*, 124(21), 4253-4264. <https://doi.org/10.1242/dev.124.21.4253>

Gabriel, N., Balaji, K., Jayachandran, K., Inkman, M., Zhang, J., Dahiya, S., & Goldstein, M. (2022). Loss of H3K27 Trimethylation Promotes Radiotherapy Resistance in Medulloblastoma and Induces an Actionable Vulnerability to BET Inhibition. *Cancer Research*, 82(10), 2019-2030. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-0871>

Gao, Z., Lee, P., Stafford, J. M., Von Schimmelmann, M., Schaefer, A., & Reinberg, D. (2014). An AUTS2–Polycomb complex activates gene expression in the CNS. *Nature*, 516(7531), 349-354. <https://doi.org/10.1038/nature13921>

Gao, Z., Zhang, J., Bonasio, R., Strino, F., Sawai, A., Parisi, F., Kluger, Y., & Reinberg, D. (2012). PCGF Homologs, CBX Proteins, and RYBP Define Functionally Distinct PRC1 Family Complexes. *Molecular Cell*, 45(3), 344-356. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.002>

Garcia, E. (1999). RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1. *The EMBO Journal*, 18(12), 3404-3418. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.12.3404>

Garcia-Lopez, J., Kumar, R., Smith, K. S., & Northcott, P. A. (2021). Deconstructing Sonic Hedgehog Medulloblastoma : Molecular Subtypes, Drivers, and Beyond. *Trends in Genetics*, 37(3), 235-250. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.11.001>

Geng, Z., & Gao, Z. (2020). Mammalian PRC1 Complexes : Compositional Complexity and Diverse Molecular Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8594. <https://doi.org/10.3390/ijms21228594>

Gerhard, G. S., Kauffman, E. J., Wang, X., Stewart, R., Moore, J. L., Kasales, C. J., Demidenko, E., & Cheng, K. C. (2002). Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Experimental Gerontology*, 37(8-9), 1055-1068. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(02\)00088-8](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(02)00088-8)

Gibson, P., Tong, Y., Robinson, G., Thompson, M. C., Currele, D. S., Eden, C., Kranenburg, T. A., Hogg, T., Poppleton, H., Martin, J., Finkelstein, D., Pounds, S., Weiss, A., Patay, Z., Scoggins, M., Ogg, R., Pei, Y., Yang, Z.-J., Brun, S., ... Gilbertson, R. J. (2010). Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*, 468(7327), 1095-1099. <https://doi.org/10.1038/nature09587>

Gilthorpe, J. D., Papantoniou, E.-K., Chédotal, A., Lumsden, A., & Wingate, R. J. T. (2002). The migration of cerebellar rhombic lip derivatives. *Development*, 129(20), 4719-4728. <https://doi.org/10.1242/dev.129.20.4719>

Glancy, E., Ciferri, C., & Bracken, A. P. (2021). Structural basis for PRC2 engagement with chromatin. *Current Opinion in Structural Biology*, 67, 135-144. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.10.017>

Goldstone, J. V., McArthur, A. G., Kubota, A., Zanette, J., Parente, T., Jönsson, M. E., Nelson, D. R., & Stegeman, J. J. (2010). Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. *BMC Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-643>

Gonzalez, M. E., Moore, H. M., Li, X., Toy, K. A., Huang, W., Sabel, M. S., Kidwell, K. M., & Kleer, C. G. (2014). EZH2 expands breast stem cells through activation of NOTCH1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(8), 3098-3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308953111>

Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(10), 777-788. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>

Goyama, S., & Kitamura, T. (2017). Epigenetics in normal and malignant hematopoiesis : An overview and update 2017. *Cancer Science*, 108(4), 553-562. <https://doi.org/10.1111/cas.13168>

Grasso, C. S., Tang, Y., Truffaux, N., Berlow, N. E., Liu, L., Debily, M.-A., Quist, M. J., Davis, L. E., Huang, E. C., Woo, P. J., Ponnuswami, A., Chen, S., Johung, T. B., Sun, W., Kogiso, M., Du, Y., Qi, L., Huang, Y., Hütt-Cabezas, M., ... Monje, M. (2015). Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nature Medicine*, 21(6), 555-559. <https://doi.org/10.1038/nm.3855>

Graw, J. (2010). Eye Development. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 90, p. 343-386). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)90010-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)90010-0)

Griffin, K., Patient, R., & Holder, N. (1995). Analysis of FGF function in normal and no tail zebrafish embryos reveals separate mechanisms for formation of the trunk and the tail. *Development*, 121(9), 2983-2994. <https://doi.org/10.1242/dev.121.9.2983>

Grijzenhout, A., Godwin, J., Koseki, H., Gdula, M. R., Szumska, D., McGouran, J. F., Bhattacharya, S., Kessler, B. M., Brockdorff, N., & Cooper, S. (2016). Functional analysis of AEBP2, a PRC2 Polycomb protein, reveals a Trithorax phenotype in embryonic development and in ESCs. *Development*, 143(15), 2716-2723. <https://doi.org/10.1242/dev.123935>

Guillemot, F. (2007). Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development*, 134(21), 3771-3780. <https://doi.org/10.1242/dev.006379>

Gunawan, M., Venkatesan, N., Loh, J. T., Wong, J. F., Berger, H., Neo, W. H., Li, L. Y. J., La Win, M. K., Yau, Y. H., Guo, T., See, P. C. E., Yamazaki, S., Chin, K. C., Gingras, A. R., Shochat, S. G., Ng, L. G., Sze, S. K., Ginhoux, F., & Su, I. (2015). The methyltransferase Ezh2 controls cell adhesion and migration through direct methylation of the extranuclear regulatory protein talin. *Nature Immunology*, 16(5), 505-516. <https://doi.org/10.1038/ni.3125>

Guo, Y., Ying, L., Tian, Y., Yang, P., Zhu, Y., Wang, Z., Qiu, F., & Lin, J. (2013). miR-144 downregulation increases bladder cancer cell proliferation by targeting EZH2 and regulating Wnt signaling. *The FEBS Journal*, 280(18), 4531-4538. <https://doi.org/10.1111/febs.12417>

Haddon, C., Smithers, L., Schneider-Maunoury, S., Coche, T., Henrique, D., & Lewis, J. (1998). Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Development*, 125(3), 359-370. <https://doi.org/10.1242/dev.125.3.359>

Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., J. M. Van Eeden, F., Jiang, Y.-J., Heisenberg, C.-P., Kelsh, R. N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., & Nüsslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 123(1), 1-36. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.1>

Han, Z., Xing, X., Hu, M., Zhang, Y., Liu, P., & Chai, J. (2007). Structural Basis of EZH2 Recognition by EED. *Structure*, 15(10), 1306-1315. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.08.007>

Hanot, M., Raby, L., Völkel, P., Le Bourhis, X., & Angrand, P.-O. (2023). The Contribution of the Zebrafish Model to the Understanding of Polycomb Repression in Vertebrates. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2322. <https://doi.org/10.3390/ijms24032322>

Hansen, K. H., Bracken, A. P., Pasini, D., Dietrich, N., Gehani, S. S., Monrad, A., Rappsilber, J., Lerdrup, M., & Helin, K. (2008). A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nature Cell Biology*, 10(11), 1291-1300. <https://doi.org/10.1038/ncb1787>

Hardwick, L. J. A., Ali, F. R., Azzarelli, R., & Philpott, A. (2015). Cell cycle regulation of proliferation versus differentiation in the central nervous system. *Cell and Tissue Research*, 359(1), 187-200. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1895-8>

Harutyunyan, A. S., Krug, B., Chen, H., Papillon-Cavanagh, S., Zeinieh, M., De Jay, N., Deshmukh, S., Chen, C. C. L., Belle, J., Mikael, L. G., Marchione, D. M., Li, R., Nikbakht, H., Hu, B., Cagnone, G., Cheung, W. A., Mohammadnia, A., Bechet, D., Faury, D., ... Majewski, J. (2019). H3K27M induces defective chromatin spread of PRC2-mediated repressive H3K27me2/me3 and is essential for glioma tumorigenesis. *Nature Communications*, 10(1), 1262. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09140-x>

Hashikawa, Y., Hashikawa, K., Rossi, M. A., Basiri, M. L., Liu, Y., Johnston, N. L., Ahmad, O. R., & Stuber, G. D. (2020). Transcriptional and Spatial Resolution of Cell Types in the

Mammalian Habenua. Neuron, 106(5), 743-758.e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.03.011>

Hashimoto, M., & Hibi, M. (2012). Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Development, Growth & Differentiation*, 54(3), 373-389. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2012.01348.x>

Hashizume, R., Andor, N., Ihara, Y., Lerner, R., Gan, H., Chen, X., Fang, D., Huang, X., Tom, M. W., Ngo, V., Solomon, D., Mueller, S., Paris, P. L., Zhang, Z., Petritsch, C., Gupta, N., Waldman, T. A., & James, C. D. (2014). Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nature Medicine*, 20(12), 1394-1396. <https://doi.org/10.1038/nm.3716>

He, A., Shen, X., Ma, Q., Cao, J., Von Gise, A., Zhou, P., Wang, G., Marquez, V. E., Orkin, S. H., & Pu, W. T. (2012). PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. *Genes & Development*, 26(1), 37-42. <https://doi.org/10.1101/gad.173930.111>

Hennika, T., Hu, G., Olaciregui, N. G., Barton, K. L., Ehteda, A., Chitranjan, A., Chang, C., Gifford, A. J., Tsoi, M., Ziegler, D. S., Carcaboso, A. M., & Becher, O. J. (2017). Pre-Clinical Study of Panobinostat in Xenograft and Genetically Engineered Murine Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Models. *PLOS ONE*, 12(1), e0169485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169485>

Hernández-Muñoz, I., Taghavi, P., Kuijl, C., Neefjes, J., & van Lohuizen, M. (2005). Association of BMI1 with polycomb bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the maintenance DNA methyltransferase DNMT1. *Molecular and Cellular Biology*, 25(24), 11047-11058. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.24.11047-11058.2005>

Herranz, N., Pasini, D., Díaz, V. M., Francí, C., Gutierrez, A., Dave, N., Escrivà, M., Hernandez-Muñoz, I., Di Croce, L., Helin, K., García de Herreros, A., & Peiró, S. (2008). Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, 28(15), 4772-4781. <https://doi.org/10.1128/MCB.00323-08>

Hibi, M., & Shimizu, T. (2012). Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Developmental Neurobiology*, 72(3), 282-301. <https://doi.org/10.1002/dneu.20875>

Hidalgo, I., Herrera-Merchan, A., Ligos, J. M., Carramolino, L., Nuñez, J., Martinez, F., Dominguez, O., Torres, M., & Gonzalez, S. (2012). Ezh1 Is Required for Hematopoietic Stem

Cell Maintenance and Prevents Senescence-like Cell Cycle Arrest. *Cell Stem Cell*, 11(5), 649-662. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.08.001>

Hirabayashi, Y., & Gotoh, Y. (2010). Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(6), 377-388. <https://doi.org/10.1038/nrn2810>

Hirabayashi, Y., Suzuki, N., Tsuboi, M., Endo, T. A., Toyoda, T., Shinga, J., Koseki, H., Vidal, M., & Gotoh, Y. (2009). Polycomb Limits the Neurogenic Competence of Neural Precursor Cells to Promote Astrogenic Fate Transition. *Neuron*, 63(5), 600-613. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.021>

Hobert, O., Sures, I., Ciossek, T., Fuchs, M., & Ullrich, A. (1996). Isolation and developmental expression analysis of *Enx-1*, a novel mouse Polycomb group gene. *Mechanisms of Development*, 55(2), 171-184. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(96\)00499-6](https://doi.org/10.1016/0925-4773(96)00499-6)

Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J. S., & Meyer, A. (2004). Phylogenetic Timing of the Fish-Specific Genome Duplication Correlates with the Diversification of Teleost Fish. *Journal of Molecular Evolution*, 59(2), 190-203. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-2613-z>

Hori, K., Nagai, T., Shan, W., Sakamoto, A., Taya, S., Hashimoto, R., Hayashi, T., Abe, M., Yamazaki, M., Nakao, K., Nishioka, T., Sakimura, K., Yamada, K., Kaibuchi, K., & Hoshino, M. (2014). Cytoskeletal Regulation by *AUTS2* in Neuronal Migration and Neuriteogenesis. *Cell Reports*, 9(6), 2166-2179. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.045>

Horzmann, K. A., & Freeman, J. L. (2018). Making Waves : New Developments in Toxicology With the Zebrafish. *Toxicological Sciences*, 163(1), 5-12. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy044>

Hoshino, M., Nakamura, S., Mori, K., Kawauchi, T., Terao, M., Nishimura, Y. V., Fukuda, A., Fuse, T., Matsuo, N., Sone, M., Watanabe, M., Bito, H., Terashima, T., Wright, C. V. E., Kawaguchi, Y., Nakao, K., & Nabeshima, Y. (2005). *Ptf1a*, a bHLH Transcriptional Gene, Defines GABAergic Neuronal Fates in Cerebellum. *Neuron*, 47(2), 201-213. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.007>

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>

Huang, H., Liu, X., Wang, L., & Wang, F. (2024). Whole-brain connections of glutamatergic neurons in the mouse lateral habenula in both sexes. *Biology of Sex Differences*, 15(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13293-024-00611-5>

Hunkapiller, J., Shen, Y., Diaz, A., Cagney, G., McCleary, D., Ramalho-Santos, M., Krogan, N., Ren, B., Song, J. S., & Reiter, J. F. (2012). Polycomb-Like 3 Promotes Polycomb Repressive Complex 2 Binding to CpG Islands and Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *PLoS Genetics*, 8(3), e1002576. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002576>

Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J.-R. J., & Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3), 227-229. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>

Illingworth, R. S., Hölzenspies, J. J., Roske, F. V., Bickmore, W. A., & Brickman, J. M. (2016). Polycomb enables primitive endoderm lineage priming in embryonic stem cells. *eLife*, 5, e14926. <https://doi.org/10.7554/eLife.14926>

Isono, K., Endo, T. A., Ku, M., Yamada, D., Suzuki, R., Sharif, J., Ishikura, T., Toyoda, T., Bernstein, B. E., & Koseki, H. (2013). SAM Domain Polymerization Links Subnuclear Clustering of PRC1 to Gene Silencing. *Developmental Cell*, 26(6), 565-577. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.08.016>

Isono, K.-I., Fujimura, Y.-I., Shinga, J., Yamaki, M., O-Wang, J., Takihara, Y., Murahashi, Y., Takada, Y., Mizutani-Koseki, Y., & Koseki, H. (2005). Mammalian polyhomeotic homologues Phc2 and Phc1 act in synergy to mediate polycomb repression of Hox genes. *Molecular and Cellular Biology*, 25(15), 6694-6706. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.15.6694-6706.2005>

Itoh, T., Uehara, M., Yura, S., Wang, J. C., Fujii, Y., Nakanishi, A., Shimizu, T., & Hibi, M. (2024). Foxp and Skor family proteins control differentiation of Purkinje cells from Ptf1a- and

Neurog1-expressing progenitors in zebrafish. *Development*, 151(7), dev202546.  
<https://doi.org/10.1242/dev.202546>

Jain, S. U., Rashoff, A. Q., Krabbenhoft, S. D., Hoelper, D., Do, T. J., Gibson, T. J., Lundgren, S. M., Bondra, E. R., Deshmukh, S., Harutyunyan, A. S., Juretic, N., Jabado, N., Harrison, M. M., & Lewis, P. W. (2020). H3 K27M and EZHIP Impede H3K27-Methylation Spreading by Inhibiting Allosterically Stimulated PRC2. *Molecular Cell*, 80(4), 726-735.e7.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.09.028>

Jansen, A., & Verstrepen, K. J. (2011). Nucleosome positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 75(2), 301-320.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-10>

Jeong, J.-Y., Kwon, H.-B., Ahn, J.-C., Kang, D., Kwon, S.-H., Park, J. A., & Kim, K.-W. (2008). Functional and developmental analysis of the blood–brain barrier in zebrafish. *Brain Research Bulletin*, 75(5), 619-628. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.10.043>

Jolma, A., Yan, J., Whittington, T., Toivonen, J., Nitta, K. R., Rastas, P., Morgunova, E., Enge, M., Taipale, M., Wei, G., Palin, K., Vaquerizas, J. M., Vincentelli, R., Luscombe, N. M., Hughes, T. R., Lemaire, P., Ukkonen, E., Kivioja, T., & Taipale, J. (2013). DNA-Binding Specificities of Human Transcription Factors. *Cell*, 152(1-2), 327-339.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.009>

Juan, A. H., Wang, S., Ko, K. D., Zare, H., Tsai, P.-F., Feng, X., Vivanco, K. O., Ascoli, A. M., Gutierrez-Cruz, G., Krebs, J., Sidoli, S., Knight, A. L., Pedersen, R. A., Garcia, B. A., Casellas, R., Zou, J., & Sartorelli, V. (2016). Roles of H3K27me2 and H3K27me3 Examined during Fate Specification of Embryonic Stem Cells. *Cell Reports*, 17(5), 1369-1382.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.087>

Jung, H.-Y., Jun, S., Lee, M., Kim, H.-C., Wang, X., Ji, H., McCrea, P. D., & Park, J.-I. (2013). PAF and EZH2 Induce Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Hyperactivation. *Molecular Cell*, 52(2), 193-205. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.028>

Justin, N., Zhang, Y., Tarricone, C., Martin, S. R., Chen, S., Underwood, E., De Marco, V., Haire, L. F., Walker, P. A., Reinberg, D., Wilson, J. R., & Gamblin, S. J. (2016). Structural basis

of oncogenic histone H3K27M inhibition of human polycomb repressive complex 2. *Nature Communications*, 7(1), 11316. <https://doi.org/10.1038/ncomms11316>

Kalb, R., Latwiel, S., Baymaz, H. I., Jansen, P. W. T. C., Müller, C. W., Vermeulen, M., & Müller, J. (2014). Histone H2A monoubiquitination promotes histone H3 methylation in Polycomb repression. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(6), 569-571. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2833>

Kallai, J., Makany, T., Csatho, A., Karadi, K., Horvath, D., Kovacs-Labadi, B., Jarai, R., Nadel, L., & Jacobs, J. W. (2007). Cognitive and affective aspects of thigmotaxis strategy in humans. *Behavioral Neuroscience*, 121(1), 21-30. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.1.21>

Kamminga, L. M., Bystrykh, L. V., De Boer, A., Houwer, S., Douma, J., Weersing, E., Dontje, B., & De Haan, G. (2006). The Polycomb group gene Ezh2 prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood*, 107(5), 2170-2179. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3585>

Kani, S., Bae, Y.-K., Shimizu, T., Tanabe, K., Satou, C., Parsons, M. J., Scott, E., Higashijima, S., & Hibi, M. (2010). Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum. *Developmental Biology*, 343(1-2), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.03.024>

Kasinath, V., Faini, M., Poepsel, S., Reif, D., Feng, X. A., Stjepanovic, G., Aebersold, R., & Nogales, E. (2018). Structures of human PRC2 with its cofactors AEBP2 and JARID2. *Science*, 359(6378), 940-944. <https://doi.org/10.1126/science.aar5700>

Kaslin, J., Kroehne, V., Benato, F., Argenton, F., & Brand, M. (2013). Development and specification of cerebellar stem and progenitor cells in zebrafish : From embryo to adult. *Neural Development*, 8(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-9>

Katoh-Fukui, Y., Miyabayashi, K., Komatsu, T., Owaki, A., Baba, T., Shima, Y., Kidokoro, T., Kanai, Y., Schedl, A., Wilhelm, D., Koopman, P., Okuno, Y., & Morohashi, K. (2012). Cbx2, a Polycomb Group Gene, Is Required for Sry Gene Expression in Mice. *Endocrinology*, 153(2), 913-924. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1055>

Katoh-Fukui, Y., Tsuchiya, R., Shiroishi, T., Nakahara, Y., Hashimoto, N., Noguchi, K., & Higashinakagawa, T. (1998). Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature*, 393(6686), 688-692. <https://doi.org/10.1038/31482>

Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R. J., & Wright, C. V. E. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature Genetics*, 32(1), 128-134. <https://doi.org/10.1038/ng959>

Kawakami, K., Asakawa, K., Hibi, M., Itoh, M., Muto, A., & Wada, H. (2016). Gal4 Driver Transgenic Zebrafish. In *Advances in Genetics* (Vol. 95, p. 65-87). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.04.002>

Keenan, C. R. (2021). Heterochromatin and Polycomb as regulators of haematopoiesis. *Biochemical Society Transactions*, 49(2), 805-814. <https://doi.org/10.1042/BST20200737>

Keenan, C. R., & Allan, R. S. (2019). Epigenomic drivers of immune dysfunction in aging. *Aging Cell*, 18(1), e12878. <https://doi.org/10.1111/accel.12878>

Kennison, J. A. (1995). The Polycomb and Trithorax group proteins of *Drosophila*: Trans-regulators of homeotic gene function. *Annual Review of Genetics*, 29(1), 289-303. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.001445>

Kidwell, C. U., Su, C.-Y., Hibi, M., & Moens, C. B. (2018). Multiple zebrafish *atoh1* genes specify a diversity of neuronal types in the zebrafish cerebellum. *Developmental Biology*, 438(1), 44-56. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.03.004>

Kim, C. A., Gingery, M., Pilpa, R. M., & Bowie, J. U. (2002). The SAM domain of polyhomeotic forms a helical polymer. *Nature Structural Biology*, 9(6), 453-457. <https://doi.org/10.1038/nsb802>

Kim, E., Kim, M., Woo, D.-H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y. T., Kim, H., Rhee, J., Nakano, I., Lee, C., Joo, K. M., Rich, J. N., Nam, D.-H., & Lee, J. (2013). Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Cell*, 23(6), 839-852. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.008>

Kim, H., Kang, K., Ekram, M. B., Roh, T.-Y., & Kim, J. (2011). *Aebp2* as an Epigenetic Regulator for Neural Crest Cells. *PLoS ONE*, 6(9), e25174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025174>

Kim, H., Kang, K., & Kim, J. (2009). AEBP2 as a potential targeting protein for Polycomb Repression Complex PRC2. *Nucleic Acids Research*, 37(9), 2940-2950. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp149>

Kim, J., & Kingston, R. E. (2020). The CBX family of proteins in transcriptional repression and memory. *Journal of Biosciences*, 45(1), 16. <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9972-5>

Kim, J., Lee, Y., Lu, X., Song, B., Fong, K.-W., Cao, Q., Licht, J. D., Zhao, J. C., & Yu, J. (2018). Polycomb- and Methylation-Independent Roles of EZH2 as a Transcription Activator. *Cell Reports*, 25(10), 2808-2820.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.035>

Kim, S. S., Im, S. H., Yang, J. Y., Lee, Y.-R., Kim, G. R., Chae, J. S., Shin, D.-S., Song, J. S., Ahn, S., Lee, B. H., Woo, J. C., Ahn, J. H., Yun, C. S., Kim, P., Kim, H. R., Lee, K.-R., & Bae, M. A. (2017). Zebrafish as a Screening Model for Testing the Permeability of Blood–Brain Barrier to Small Molecules. *Zebrafish*, 14(4), 322-330. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1392>

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253-310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>

Klauke, K., Radulović, V., Broekhuis, M., Weersing, E., Zwart, E., Olthof, S., Ritsema, M., Bruggeman, S., Wu, X., Helin, K., Bystrykh, L., & De Haan, G. (2013). Polycomb Cbx family members mediate the balance between haematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Nature Cell Biology*, 15(4), 353-362. <https://doi.org/10.1038/ncb2701>

Kloet, S. L., Makowski, M. M., Baymaz, H. I., Van Voorthuijsen, L., Karemaker, I. D., Santanach, A., Jansen, P. W. T. C., Di Croce, L., & Vermeulen, M. (2016). The dynamic interactome and genomic targets of Polycomb complexes during stem-cell differentiation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(7), 682-690. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3248>

Komoike, Y., Kawamura, A., Shindo, N., Sato, C., Satoh, J., Shiurba, R., & Higashinakagawa, T. (2005). Zebrafish Polycomb group gene *ph2 $\alpha$*  is required for epiboly and tailbud formation acting downstream of FGF signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(4), 858-866. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.031>

Kool, M., Jones, D. T. W., Jäger, N., Northcott, P. A., Pugh, T. J., Hovestadt, V., Piro, R. M., Esparza, L. A., Markant, S. L., Remke, M., Milde, T., Bourdeaut, F., Ryzhova, M., Sturm, D., Pfaff,

E., Stark, S., Hutter, S., Şeker-Cin, H., Johann, P., ... Pfister, S. M. (2014). Genome Sequencing of SHH Medulloblastoma Predicts Genotype-Related Response to Smoothed Inhibition. *Cancer Cell*, 25(3), 393-405. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.004>

Koubi, M., Chabannon, C., & Duprez, E. (2017). Au cœur d'une complexité biologique : EZH2, une protéine du groupe Polycomb. *médecine/sciences*, 33(5), 499-505. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173305013>

Krapp, A., Knöfler, M., Ledermann, B., Bürki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbüchle, O., & Wellauer, P. K. (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes & Development*, 12(23), 3752-3763. <https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3752>

Ku, M., Koche, R. P., Rheinbay, E., Mendenhall, E. M., Endoh, M., Mikkelsen, T. S., Presser, A., Nusbaum, C., Xie, X., Chi, A. S., Adli, M., Kasif, S., Ptaszek, L. M., Cowan, C. A., Lander, E. S., Koseki, H., & Bernstein, B. E. (2008). Genomewide Analysis of PRC1 and PRC2 Occupancy Identifies Two Classes of Bivalent Domains. *PLoS Genetics*, 4(10), e1000242. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000242>

Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Hermans-Borgmeyer, I., & Wegner, M. (1998). Sox10, a Novel Transcriptional Modulator in Glial Cells. *The Journal of Neuroscience*, 18(1), 237-250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-01-00237.1998>

Kunoh, S., Nakashima, H., & Nakashima, K. (2024). Epigenetic Regulation of Neural Stem Cells in Developmental and Adult Stages. *Epigenomes*, 8(2), 22. <https://doi.org/10.3390/epigenomes8020022>

Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. : A literature review. *Journal of Fish Biology*, 10(2), 121-173. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04049.x>

Lagan, E., Gannon, D., Silva, A. J., Bibawi, P., Doherty, A. M., Nimmo, D., McCole, R., Monger, C., Genesi, G. L., Vanderlinden, A., Innes, J. A., Jones, C. L. E., Yang, L., Chen, B., Van Mierlo, G., Jansen, P. W. T. C., Pednekar, C., Von Kriegsheim, A., Wynne, K., ... Brien, G. L. (2025). A specific form of cPRC1 containing CBX4 is co-opted to mediate oncogenic gene

repression in diffuse midline glioma. *Molecular Cell*, 85(11), 2110-2127.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2025.04.026>

Lam, S. H., Chua, H. L., Gong, Z., Lam, T. J., & Sin, Y. M. (2004). Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio* : A gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Developmental & Comparative Immunology*, 28(1), 9-28. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(03\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00103-4)

Larson, J. D., Kasper, L. H., Paugh, B. S., Jin, H., Wu, G., Kwon, C.-H., Fan, Y., Shaw, T. I., Silveira, A. B., Qu, C., Xu, R., Zhu, X., Zhang, J., Russell, H. R., Peters, J. L., Finkelstein, D., Xu, B., Lin, T., Tinkle, C. L., ... Baker, S. J. (2019). Histone H3.3 K27M Accelerates Spontaneous Brainstem Glioma and Drives Restricted Changes in Bivalent Gene Expression. *Cancer Cell*, 35(1), 140-155.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.11.015>

Lauderdale, J. D., Davis, N. M., & Kuwada, J. Y. (1997). Axon Tracts Correlate with Netrin-1a Expression in the Zebrafish Embryo. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 9(4), 293-313. <https://doi.org/10.1006/mcne.1997.0624>

Lawrence, C. L., & Baldwin, A. S. (2016). Non-Canonical EZH2 Transcriptionally Activates RelB in Triple Negative Breast Cancer. *PLOS ONE*, 11(10), e0165005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165005>

Le Faou, P., Völkel, P., & Angrand, P.-O. (2011). The zebrafish genes encoding the Polycomb repressive complex (PRC) 1. *Gene*, 475(1), 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.12.012>

Lee, C.-H., Holder, M., Grau, D., Saldaña-Meyer, R., Yu, J.-R., Ganai, R. A., Zhang, J., Wang, M., LeRoy, G., Dobenecker, M.-W., Reinberg, D., & Armache, K.-J. (2018). Distinct Stimulatory Mechanisms Regulate the Catalytic Activity of Polycomb Repressive Complex 2. *Molecular Cell*, 70(3), 435-448.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.019>

Lee, C.-H., Yu, J.-R., Granat, J., Saldaña-Meyer, R., Andrade, J., LeRoy, G., Jin, Y., Lund, P., Stafford, J. M., Garcia, B. A., Ueberheide, B., & Reinberg, D. (2019). Automethylation of PRC2 promotes H3K27 methylation and is impaired in H3K27M pediatric glioma. *Genes & Development*, 33(19-20), 1428-1440. <https://doi.org/10.1101/gad.328773.119>

Lee, J. M., Lee, J. S., Kim, H., Kim, K., Park, H., Kim, J.-Y., Lee, S. H., Kim, I. S., Kim, J., Lee, M., Chung, C. H., Seo, S.-B., Yoon, J.-B., Ko, E., Noh, D.-Y., Kim, K. I., Kim, K. K., & Baek, S. H.

(2012). EZH2 Generates a Methyl Degron that Is Recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 Ubiquitin Ligase Complex. *Molecular Cell*, 48(4), 572-586. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.004>

Lee, S. C. W., Miller, S., Hyland, C., Kauppi, M., Lebois, M., Di Rago, L., Metcalf, D., Kinkel, S. A., Josefsson, E. C., Blewitt, M. E., Majewski, I. J., & Alexander, W. S. (2015). Polycomb repressive complex 2 component Suz12 is required for hematopoietic stem cell function and lymphopoiesis. *Blood*, 126(2), 167-175. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-615898>

Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., Chevalier, B., Johnstone, S. E., Cole, M. F., Isono, K., Koseki, H., Fuchikami, T., Abe, K., Murray, H. L., Zucker, J. P., Yuan, B., Bell, G. W., Herbolsheimer, E., Hannett, N. M., ... Young, R. A. (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, 125(2), 301-313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.043>

Lessard, J., Schumacher, A., Thorsteinsdottir, U., Van Lohuizen, M., Magnuson, T., & Sauvageau, G. (1999). Functional antagonism of the Polycomb-Group genes *eed* and *Bmi1* in hemopoietic cell proliferation. *Genes & Development*, 13(20), 2691-2703. <https://doi.org/10.1101/gad.13.20.2691>

Leung, C., Lingbeek, M., Shakhova, O., Liu, J., Tanger, E., Saremaslani, P., Van Lohuizen, M., & Marino, S. (2004). *Bmi1* is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature*, 428(6980), 337-341. <https://doi.org/10.1038/nature02385>

Lewis, P. W., Müller, M. M., Koletsky, M. S., Cordero, F., Lin, S., Banaszynski, L. A., Garcia, B. A., Muir, T. W., Becher, O. J., & Allis, C. D. (2013). Inhibition of PRC2 Activity by a Gain-of-Function H3 Mutation Found in Pediatric Glioblastoma. *Science*, 340(6134), 857-861. <https://doi.org/10.1126/science.1232245>

Li, H., Liefke, R., Jiang, J., Kurland, J. V., Tian, W., Deng, P., Zhang, W., He, Q., Patel, D. J., Bulyk, M. L., Shi, Y., & Wang, Z. (2017). Polycomb-like proteins link the PRC2 complex to CpG islands. *Nature*, 549(7671), 287-291. <https://doi.org/10.1038/nature23881>

Li, X., Gonzalez, M. E., Toy, K., Filzen, T., Merajver, S. D., & Klier, C. G. (2009). Targeted Overexpression of EZH2 in the Mammary Gland Disrupts Ductal Morphogenesis and Causes

Epithelial Hyperplasia. *The American Journal of Pathology*, 175(3), 1246-1254.  
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090042>

Li, X., Ji, G., Zhou, J., Du, J., Li, X., Shi, W., Hu, Y., Zhou, W., & Hao, A. (2021). Pcgf1 Regulates Early Neural Tube Development Through Histone Methylation in Zebrafish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.581636>

Li, Y., Mo, Y., Chen, C., He, J., & Guo, Z. (2024). Research advances of polycomb group proteins in regulating mammalian development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 12, 1383200. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1383200>

Liefke, R., Karwacki-Neisius, V., & Shi, Y. (2016). EPOP Interacts with Elongin BC and USP7 to Modulate the Chromatin Landscape. *Molecular Cell*, 64(4), 659-672.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.019>

Lin, J. W., Biankin, A. V., Horb, M. E., Ghosh, B., Prasad, N. B., Yee, N. S., Pack, M. A., & Leach, S. D. (2004). Differential requirement for ptf1a in endocrine and exocrine lineages of developing zebrafish pancreas. *Developmental Biology*, 270(2), 474-486.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.02.023>

Liu, B., Liu, Y.-F., Du, Y.-R., Mardaryev, A. N., Yang, W., Chen, H., Xu, Z.-M., Xu, C.-Q., Zhang, X.-R., Botchkarev, V. A., Zhang, Y., & Xu, G.-L. (2013). Cbx4 regulates the proliferation of thymic epithelial cells and thymus function. *Development*, 140(4), 780-788.  
<https://doi.org/10.1242/dev.085035>

Loh, C. H., Van Genesen, S., Perino, M., Bark, M. R., & Veenstra, G. J. C. (2021). Loss of PRC2 subunits primes lineage choice during exit of pluripotency. *Nature Communications*, 12(1), 6985. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27314-4>

Lorente, M. D. M., Marcos-Gutiérrez, C., Pérez, C., Schoorlemmer, J., Ramírezp, A., Magin, T., & Vidal, M. (2000). Loss- and gain-of-function mutations show a Polycomb group function for Ring1A in mice. *Development*, 127(23), 5093-5100.  
<https://doi.org/10.1242/dev.127.23.5093>

Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffiatti, R., Von Deimling, A., & Ellison, D. W.

(2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System : A summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231-1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>

Lovering, R., Hanson, I. M., Borden, K. L., Martin, S., O'Reilly, N. J., Evan, G. I., Rahman, D., Pappin, D. J., Trowsdale, J., & Freemont, P. S. (1993). Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(6), 2112-2116. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.6.2112>

Lowery, L. A., & Sive, H. (2004). Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mechanisms of Development*, 121(10), 1189-1197. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.04.022>

Lu, T. T.-H., Heyne, S., Dror, E., Casas, E., Leonhardt, L., Boenke, T., Yang, C.-H., Sagar, Arrigoni, L., Dalgaard, K., Teperino, R., Enders, L., Selvaraj, M., Ruf, M., Raja, S. J., Xie, H., Boenisch, U., Orkin, S. H., Lynn, F. C., ... Pospisilik, J. A. (2018). The Polycomb-Dependent Epigenome Controls  $\beta$  Cell Dysfunction, Dedifferentiation, and Diabetes. *Cell Metabolism*, 27(6), 1294-1308.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.04.013>

Lüffe, T. M., D'Orazio, A., Bauer, M., Gioga, Z., Schoeffler, V., Lesch, K.-P., Romanos, M., Drepper, C., & Lillesaar, C. (2021). Increased locomotor activity via regulation of GABAergic signalling in *foxp2* mutant zebrafish—Implications for neurodevelopmental disorders. *Translational Psychiatry*, 11(1), 529. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01651-w>

Luis, N. M., Morey, L., Mejetta, S., Pascual, G., Janich, P., Kuebler, B., Roma, G., Nascimento, E., Frye, M., Di Croce, L., & Benitah, S. A. (2011). Regulation of Human Epidermal Stem Cell Proliferation and Senescence Requires Polycomb- Dependent and -Independent Functions of Cbx4. *Cell Stem Cell*, 9(3), 233-246. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.07.013>

Machold, R. P., Kittell, D. J., & Fishell, G. J. (2007). Antagonism between Notch and bone morphogenetic protein receptor signaling regulates neurogenesis in the cerebellar rhombic lip. *Neural Development*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-2-5>

MacPhail, R. C., Brooks, J., Hunter, D. L., Padnos, B., Irons, T. D., & Padilla, S. (2009). Locomotion in larval zebrafish : Influence of time of day, lighting and ethanol. *NeuroToxicology*, 30(1), 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.09.011>

Majer, C. R., Jin, L., Scott, M. P., Knutson, S. K., Kuntz, K. W., Keilhack, H., Smith, J. J., Moyer, M. P., Richon, V. M., Copeland, R. A., & Wigle, T. J. (2012). A687V EZH2 is a gain-of-function mutation found in lymphoma patients. *FEBS Letters*, 586(19), 3448-3451. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.07.066>

Majewski, I. J., Ritchie, M. E., Phipson, B., Corbin, J., Pakusch, M., Ebert, A., Busslinger, M., Koseki, H., Hu, Y., Smyth, G. K., Alexander, W. S., Hilton, D. J., & Blewitt, M. E. (2010). Opposing roles of polycomb repressive complexes in hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 116(5), 731-739. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-260760>

Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M. L., Son, J., Drury lii, W. J., Voigt, P., Martin, S. R., Taylor, W. R., De Marco, V., Pirrotta, V., Reinberg, D., & Gamblin, S. J. (2009). Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature*, 461(7265), 762-767. <https://doi.org/10.1038/nature08398>

Margueron, R., Li, G., Sarma, K., Blais, A., Zavadil, J., Woodcock, C. L., Dynlacht, B. D., & Reinberg, D. (2008). Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms. *Molecular Cell*, 32(4), 503-518. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.004>

Margueron, R., & Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469(7330), 343-349. <https://doi.org/10.1038/nature09784>

Mätlik, K., Govek, E.-E., Paul, M. R., Allis, C. D., & Hatten, M. E. (2023). Histone bivalency regulates the timing of cerebellar granule cell development. *Genes & Development*, 37(13-14), 570-589. <https://doi.org/10.1101/gad.350594.123>

Mayeuf, A., & Relaix, F. (2011). La voie Notch : Du développement à la régénération du muscle squelettique. *médecine/sciences*, 27(5), 521-526. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011275018>

McCabe, M. T., Graves, A. P., Ganji, G., Diaz, E., Halsey, W. S., Jiang, Y., Smitheman, K. N., Ott, H. M., Pappalardi, M. B., Allen, K. E., Chen, S. B., Della Pietra, A., Dul, E., Hughes, A. M., Gilbert, S. A., Thrall, S. H., Tummino, P. J., Kruger, R. G., Brandt, M., ... Creasy, C. L. (2012). Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(8), 2989-2994. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116418109>

Meijer, D. H., Kane, M. F., Mehta, S., Liu, H., Harrington, E., Taylor, C. M., Stiles, C. D., & Rowitch, D. H. (2012). Separated at birth? The functional and molecular divergence of OLIG1 and OLIG2. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(12), 819-831. <https://doi.org/10.1038/nrn3386>

Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.-K., Koche, R. P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., ... Bernstein, B. E. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 448(7153), 553-560. <https://doi.org/10.1038/nature06008>

Miller, F. D., & Gauthier, A. S. (2007). Timing Is Everything : Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex. *Neuron*, 54(3), 357-369. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.019>

Min, J., Zhang, Y., & Xu, R.-M. (2003). Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes & Development*, 17(15), 1823-1828. <https://doi.org/10.1101/gad.269603>

Mochizuki-Kashio, M., Aoyama, K., Sashida, G., Oshima, M., Tomioka, T., Muto, T., Wang, C., & Iwama, A. (2015). Ezh2 loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an Ezh1-dependent manner. *Blood*, 126(10), 1172-1183. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-634428>

Mohammad, F., Weissmann, S., Leblanc, B., Pandey, D. P., Højfeldt, J. W., Comet, I., Zheng, C., Johansen, J. V., Rapin, N., Porse, B. T., Tvardovskiy, A., Jensen, O. N., Olaciregui, N. G., Lavarino, C., Suñol, M., De Torres, C., Mora, J., Carcaboso, A. M., & Helin, K. (2017). EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas. *Nature Medicine*, 23(4), 483-492. <https://doi.org/10.1038/nm.4293>

Mohn, F., Weber, M., Rebhan, M., Roloff, T. C., Richter, J., Stadler, M. B., Bibel, M., & Schübeler, D. (2008). Lineage-Specific Polycomb Targets and De Novo DNA Methylation Define Restriction and Potential of Neuronal Progenitors. *Molecular Cell*, 30(6), 755-766. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.007>

Molofsky, A. V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I.-K., Clarke, M. F., & Morrison, S. J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature*, 425(6961), 962-967. <https://doi.org/10.1038/nature02060>

Monje, M., Mitra, S. S., Freret, M. E., Raveh, T. B., Kim, J., Masek, M., Attema, J. L., Li, G., Haddix, T., Edwards, M. S. B., Fisher, P. G., Weissman, I. L., Rowitch, D. H., Vogel, H., Wong, A. J., & Beachy, P. A. (2011). Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(11), 4453-4458. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101657108>

Morey, L., Aloia, L., Cozzuto, L., Benitah, S. A., & Di Croce, L. (2013). RYBP and Cbx7 Define Specific Biological Functions of Polycomb Complexes in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Reports*, 3(1), 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.11.026>

Morey, L., Santanach, A., Blanco, E., Aloia, L., Nora, E. P., Bruneau, B. G., & Di Croce, L. (2015). Polycomb Regulates Mesoderm Cell Fate-Specification in Embryonic Stem Cells through Activation and Repression Mechanisms. *Cell Stem Cell*, 17(3), 300-315. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.009>

Mueller, D. T. (2015). *Atlas of early zebrafish brain development : A tool for molecular neurogenetics*. Elsevier.

Mueller, T., & Wullimann, M. F. (2002). Expression domains of neuroD (nrd) in the early postembryonic zebrafish brain. *Brain Research Bulletin*, 57(3-4), 377-379. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(01\)00694-3](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00694-3)

Müller, J., & Kassis, J. A. (2006). Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(5), 476-484. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.08.005>

Murzina, N. V., Pei, X.-Y., Zhang, W., Sparkes, M., Vicente-Garcia, J., Pratap, J. V., McLaughlin, S. H., Ben-Shahar, T. R., Verreault, A., Luisi, B. F., & Laue, E. D. (2008). Structural Basis for the Recognition of Histone H4 by the Histone-Chaperone RbAp46. *Structure*, 16(7), 1077-1085. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.05.006>

Nakatani, T., Minaki, Y., Kumai, M., Nitta, C., & Ono, Y. (2014). The c-Ski family member and transcriptional regulator Corl2/Skor2 promotes early differentiation of cerebellar Purkinje cells. *Developmental Biology*, 388(1), 68-80. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.01.016>

Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Sanosaka, T., Deneen, B., Taga, T., & Nakashima, K. (2009). Committed Neuronal Precursors Confer Astrocytic Potential on Residual Neural Precursor Cells. *Developmental Cell*, 16(2), 245-255. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.12.014>

Nasevicius, A., & Ekker, S. C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature Genetics*, 26(2), 216-220. <https://doi.org/10.1038/79951>

Nasiadka, A., & Clark, M. D. (2012). Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. *ILAR Journal*, 53(2), 161-168. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.161>

Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., & Smith, T. F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 371(6495), 297-300. <https://doi.org/10.1038/371297a0>

Nekrasov, M., Klymenko, T., Fraterman, S., Papp, B., Oktaba, K., Köcher, T., Cohen, A., Stunnenberg, H. G., Wilm, M., & Müller, J. (2007). Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *The EMBO Journal*, 26(18), 4078-4088. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601837>

Nicoli, S., Ribatti, D., Cotelli, F., & Presta, M. (2007). Mammalian Tumor Xenografts Induce Neovascularization in Zebrafish Embryos. *Cancer Research*, 67(7), 2927-2931. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4268>

Nieuwenhuys, R. (2009). The forebrain of actinopterygians revisited. *Brain, Behavior and Evolution*, 73(4), 229-252. <https://doi.org/10.1159/000225622>

Nikoloski, G., Langemeijer, S. M. C., Kuiper, R. P., Knops, R., Massop, M., Tönnissen, E. R. L. T. M., Van Der Heijden, A., Scheele, T. N., Vandenberghe, P., De Witte, T., Van Der Reijden, B. A., & Jansen, J. H. (2010). Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics*, 42(8), 665-667. <https://doi.org/10.1038/ng.620>

Northcott, P. A., Buchhalter, I., Morrissy, A. S., Hovestadt, V., Weischenfeldt, J., Ehrenberger, T., Gröbner, S., Segura-Wang, M., Zichner, T., Rudneva, V. A., Warnatz, H.-J., Sidiropoulos, N., Phillips, A. H., Schumacher, S., Kleinheinz, K., Waszak, S. M., Erkek, S., Jones, D. T. W., Worst, B. C., ... Lichter, P. (2017). The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature*, 547(7663), 311-317. <https://doi.org/10.1038/nature22973>

Northmore, D. P. M. (2017). Holding visual attention for 400 million years : A model of tectum and torus longitudinalis in teleost fishes. *Vision Research*, 131, 44-56. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2016.12.001>

O'Brown, N. M., Pfau, S. J., & Gu, C. (2018). Bridging barriers : A comparative look at the blood–brain barrier across organisms. *Genes & Development*, 32(7-8), 466-478. <https://doi.org/10.1101/gad.309823.117>

O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S. C., Surani, M. A., & Jenuwein, T. (2001). The Polycomb -Group Gene *Ezh2* Is Required for Early Mouse Development. *Molecular and Cellular Biology*, 21(13), 4330-4336. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.13.4330-4336.2001>

Oppel, F., Ki, D. H., Zimmermann, M. W., Ross, K. N., Tao, T., Shi, H., He, S., Aster, J. C., & Look, A. T. (2020). *Suz12* inactivation in *p53* and *nf1* deficient zebrafish accelerates the onset of MPNSTs and expands the spectrum of tumor types to include adenocarcinoma, leukemia, and soft tissue sarcoma. *Disease Models & Mechanisms*, dmm.042341. <https://doi.org/10.1242/dmm.042341>

Ougolkov, A. V., Bilim, V. N., & Billadeau, D. D. (2008). Regulation of Pancreatic Tumor Cell Proliferation and Chemoresistance by the Histone Methyltransferase Enhancer of Zeste Homologue 2. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6790-6796. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1013>

Park, H., Shin, J., Roberts, R. K., & Appel, B. (2007). An *olig2* reporter gene marks oligodendrocyte precursors in the postembryonic spinal cord of zebrafish. *Developmental Dynamics*, 236(12), 3402-3407. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21365>

Park, I., Qian, D., Kiel, M., Becker, M. W., Pihalja, M., Weissman, I. L., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). *Bmi-1* is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*, 423(6937), 302-305. <https://doi.org/10.1038/nature01587>

Pasini, D., Bracken, A. P., Hansen, J. B., Capillo, M., & Helin, K. (2007). The Polycomb Group Protein Suz12 Is Required for Embryonic Stem Cell Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(10), 3769-3779. <https://doi.org/10.1128/MCB.01432-06>

Pasini, D., Bracken, A. P., Jensen, M. R., Denchi, E. L., & Helin, K. (2004). Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *The EMBO Journal*, 23(20), 4061-4071. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600402>

Pathania, M., De Jay, N., Maestro, N., Harutyunyan, A. S., Nitarska, J., Pahlavan, P., Henderson, S., Mikael, L. G., Richard-Londt, A., Zhang, Y., Costa, J. R., Hébert, S., Khazaei, S., Ibrahim, N. S., Herrero, J., Riccio, A., Albrecht, S., Ketteler, R., Brandner, S., ... Salomoni, P. (2017). H3.3K27M Cooperates with Trp53 Loss and PDGFRA Gain in Mouse Embryonic Neural Progenitor Cells to Induce Invasive High-Grade Gliomas. *Cancer Cell*, 32(5), 684-700.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.09.014>

Pengelly, A. R., Copur, Ö., Jäckle, H., Herzig, A., & Müller, J. (2013). A Histone Mutant Reproduces the Phenotype Caused by Loss of Histone-Modifying Factor Polycomb. *Science*, 339(6120), 698-699. <https://doi.org/10.1126/science.1231382>

Pereira, J. D., Sansom, S. N., Smith, J., Dobenecker, M.-W., Tarakhovskiy, A., & Livesey, F. J. (2010). Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(36), 15957-15962. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002530107>

Peterson, R. T., Link, B. A., Dowling, J. E., & Schreiber, S. L. (2000). Small molecule developmental screens reveal the logic and timing of vertebrate development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 12965-12969. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.24.12965>

Pinheiro, D., & Heisenberg, C.-P. (2020). Zebrafish gastrulation : Putting fate in motion. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 136, p. 343-375). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.10.009>

Pirity, M. K., Locker, J., & Schreiber-Agus, N. (2005). Rybp/DEDAF Is Required for Early Postimplantation and for Central Nervous System Development. *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), 7193-7202. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7193-7202.2005>

Pirrotta, V., & Li, H.-B. (2012). A view of nuclear Polycomb bodies. *Current Opinion in Genetics & Development*, 22(2), 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.11.004>

Piunti, A., Hashizume, R., Morgan, M. A., Bartom, E. T., Horbinski, C. M., Marshall, S. A., Rendleman, E. J., Ma, Q., Takahashi, Y., Woodfin, A. R., Misharin, A. V., Abshiru, N. A., Lulla, R. R., Saratsis, A. M., Kelleher, N. L., James, C. D., & Shilatifard, A. (2017). Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Nature Medicine*, 23(4), 493-500. <https://doi.org/10.1038/nm.4296>

Piunti, A., & Shilatifard, A. (2021). The roles of Polycomb repressive complexes in mammalian development and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(5), 326-345. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00341-1>

Piunti, A., Smith, E. R., Morgan, M. A. J., Ugarenko, M., Khaltyan, N., Helmin, K. A., Ryan, C. A., Murray, D. C., Rickels, R. A., Yilmaz, B. D., Rendleman, E. J., Savas, J. N., Singer, B. D., Bulun, S. E., & Shilatifard, A. (2019). CATACOMB: An endogenous inducible gene that antagonizes H3K27 methylation activity of Polycomb repressive complex 2 via an H3K27M-like mechanism. *Science Advances*, 5(7). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax2887>

Pose-Méndez, S., Schramm, P., Valishetti, K., & Köster, R. W. (2023a). Development, circuitry, and function of the zebrafish cerebellum. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 80(8), 227. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04879-5>

Pose-Méndez, S., Schramm, P., Winter, B., Meier, J. C., Ampatzis, K., & Köster, R. W. (2023b). Lifelong regeneration of cerebellar Purkinje cells after induced cell ablation in zebrafish. *eLife*, 12, e79672. <https://doi.org/10.7554/eLife.79672>

Qin, J., Whyte, W. A., Anderssen, E., Apostolou, E., Chen, H.-H., Akbarian, S., Bronson, R. T., Hochedlinger, K., Ramaswamy, S., Young, R. A., & Hock, H. (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), 319-332. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.06.002>

Raby, L., Völkel, P., Hasanpour, S., Cicero, J., Toillon, R.-A., Adriaenssens, E., Van Seuning, I., Le Bourhis, X., & Angrand, P.-O. (2021). Loss of Polycomb Repressive Complex 2 Function Alters Digestive Organ Homeostasis and Neuronal Differentiation in Zebrafish. *Cells*, 10(11), 3142. <https://doi.org/10.3390/cells10113142>

Ragazzini, R., Pérez-Palacios, R., Baymaz, I. H., Diop, S., Ancelin, K., Zielinski, D., Michaud, A., Givelet, M., Borsos, M., Aflaki, S., Legoix, P., Jansen, P. W. T. C., Servant, N., Torres-Padilla, M.-E., Bourc'his, D., Fouchet, P., Vermeulen, M., & Margueron, R. (2019). EZHIP constrains Polycomb Repressive Complex 2 activity in germ cells. *Nature Communications*, 10(1), 3858. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11800-x>

Ren, G., Baritaki, S., Marathe, H., Feng, J., Park, S., Beach, S., Bazeley, P. S., Beshir, A. B., Fenteany, G., Mehra, R., Daignault, S., Al-Mulla, F., Keller, E., Bonavida, B., De La Serna, I., & Yeung, K. C. (2012). Polycomb Protein EZH2 Regulates Tumor Invasion via the Transcriptional Repression of the Metastasis Suppressor RKIP in Breast and Prostate Cancer. *Cancer Research*, 72(12), 3091-3104. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-11-3546>

Ren, X., & Kerppola, T. K. (2011). REST interacts with Cbx proteins and regulates polycomb repressive complex 1 occupancy at RE1 elements. *Molecular and Cellular Biology*, 31(10), 2100-2110. <https://doi.org/10.1128/MCB.05088-11>

Robert, J. (2010). La voie Wnt. In J. Robert, *Signalisation cellulaire et cancer* (p. 103-110). Springer Paris. [https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0028-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0028-8_8)

Robinson, G., Parker, M., Kranenburg, T. A., Lu, C., Chen, X., Ding, L., Phoenix, T. N., Hedlund, E., Wei, L., Zhu, X., Chalhoub, N., Baker, S. J., Huether, R., Kriwacki, R., Curley, N., Thiruvankatam, R., Wang, J., Wu, G., Rusch, M., ... Gilbertson, R. J. (2012). Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature*, 488(7409), 43-48. <https://doi.org/10.1038/nature11213>

Rose, N. R., King, H. W., Blackledge, N. P., Fursova, N. A., Ember, K. J., Fischer, R., Kessler, B. M., & Klose, R. J. (2016). RYBP stimulates PRC1 to shape chromatin-based communication between Polycomb repressive complexes. *eLife*, 5, e18591. <https://doi.org/10.7554/eLife.18591>

Rothberg, J. L. M., Maganti, H. B., Jrade, H., Porter, C. J., Palidwor, G. A., Cafariello, C., Battaion, H. L., Khan, S. T., Perkins, T. J., Paulson, R. F., Ito, C. Y., & Stanford, W. L. (2018). Mtf2-PRC2 control of canonical Wnt signaling is required for definitive erythropoiesis. *Cell Discovery*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0022-5>

Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (avec Universities Federation for Animal Welfare). (1992). *The principles of humane experimental technique* (Special ed., [Nachdr. der Ausg.] London 1959). Universities Federation for Animal Welfare.

Sakamoto, M., Hirata, H., Ohtsuka, T., Bessho, Y., & Kageyama, R. (2003). The Basic Helix-Loop-Helix Genes *Hesr1/Hey1* and *Hesr2/Hey2* Regulate Maintenance of Neural Precursor Cells in the Brain. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44808-44815. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300448200>

San, B., Aben, M., Elurbe, D. M., Voeltzke, K., Den Broeder, M. J., Rougeot, J., Legler, J., & Kamminga, L. M. (2018). Genetic and Epigenetic Regulation of Zebrafish Intestinal Development. *Epigenomes*, 2(4), 19. <https://doi.org/10.3390/epigenomes2040019>

San, B., Chrispijn, N. D., Wittkopp, N., Van Heeringen, S. J., Lagendijk, A. K., Aben, M., Bakkers, J., Ketting, R. F., & Kamminga, L. M. (2016). Normal formation of a vertebrate body plan and loss of tissue maintenance in the absence of *ezh2*. *Scientific Reports*, 6(1), 24658. <https://doi.org/10.1038/srep24658>

Sánchez-Beato, M., Sánchez, E., González-Carreró, J., Morente, M., Díez, A., Sánchez-Verde, L., Martín, M. C., Cigudosa, J. C., Vidal, M., & Piris, M. A. (2006). Variability in the expression of polycomb proteins in different normal and tumoral tissues. A pilot study using tissue microarrays. *Modern Pathology*, 19(5), 684-694. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800577>

Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Sung, Z. R., & Calonje, M. (2008). RAWUL : A new ubiquitin-like domain in PRC1 Ring finger proteins that unveils putative plant and worm PRC1 orthologs. *BMC Genomics*, 9(1), 308. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-308>

Sanulli, S., Justin, N., Teissandier, A., Ancelin, K., Portoso, M., Caron, M., Michaud, A., Lombard, B., da Rocha, S. T., Offer, J., Loew, D., Servant, N., Wassef, M., Burlina, F., Gamblin, S. J., Heard, E., & Margueron, R. (2015). Jarid2 Methylation via the PRC2 Complex Regulates

H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation. *Molecular Cell*, 57(5), 769-783. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.020>

Sarma, K., Margueron, R., Ivanov, A., Pirrotta, V., & Reinberg, D. (2008). Ezh2 Requires PHF1 To Efficiently Catalyze H3 Lysine 27 Trimethylation In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 28(8), 2718-2731. <https://doi.org/10.1128/MCB.02017-07>

Sauvageau, M., & Sauvageau, G. (2010). Polycomb Group Proteins: Multi-Faceted Regulators of Somatic Stem Cells and Cancer. *Cell Stem Cell*, 7(3), 299-313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.002>

Sawai, A., Pfennig, S., Bulajić, M., Miller, A., Khodadadi-Jamayran, A., Mazzoni, E. O., & Dasen, J. S. (2022). PRC1 sustains the integrity of neural fate in the absence of PRC2 function. *eLife*, 11, e72769. <https://doi.org/10.7554/eLife.72769>

Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1412-1417. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>

Scelfo, A., Fernández-Pérez, D., Tamburri, S., Zanotti, M., Lavarone, E., Soldi, M., Bonaldi, T., Ferrari, K. J., & Pasini, D. (2019). Functional Landscape of PCGF Proteins Reveals Both RING1A/B-Dependent-and RING1A/B-Independent-Specific Activities. *Molecular Cell*, 74(5), 1037-1052.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.002>

Schebesta, M., & Serluca, F. C. (2009). Olig1 expression identifies developing oligodendrocytes in zebrafish and requires hedgehog and notch signaling. *Developmental Dynamics*, 238(4), 887-898. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21909>

Schinkel, A. H. (1999). P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36(2-3), 179-194. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(98\)00085-4](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(98)00085-4)

Schmidt, R., Strähle, U., & Scholpp, S. (2013). Neurogenesis in zebrafish – from embryo to adult. *Neural Development*, 8(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-3>

Schmitz, B., Papan, C., & Campos-Ortega, J. A. (1993). Neurulation in the anterior trunk region of the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 202(5), 250-259. <https://doi.org/10.1007/BF00363214>

Schoeftner, S., Sengupta, A. K., Kubicek, S., Mechtler, K., Spahn, L., Koseki, H., Jenuwein, T., & Wutz, A. (2006). Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *The EMBO Journal*, 25(13), 3110-3122. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601187>

Schuettengruber, B., Bourbon, H.-M., Di Croce, L., & Cavalli, G. (2017). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell*, 171(1), 34-57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.002>

Schuettengruber, B., & Cavalli, G. (2009). Recruitment of Polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development*, 136(21), 3531-3542. <https://doi.org/10.1242/dev.033902>

Schultz, L. E., Haltom, J. A., Almeida, M. P., Wierson, W. A., Solin, S. L., Weiss, T. J., Helmer, J. A., Sandquist, E. J., Shive, H. R., & McGrail, M. (2018). Epigenetic regulators Rbbp4 and Hdac1 are overexpressed in a zebrafish model of RB1 embryonal brain tumor, and are required for neural progenitor survival and proliferation. *Disease Models & Mechanisms*, 11(6), dmm034124. <https://doi.org/10.1242/dmm.034124>

Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D. T. W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A. M., Quang, D.-A. K., Tönjes, M., Hovestadt, V., Albrecht, S., Kool, M., Nantel, A., Konermann, C., Lindroth, A., Jäger, N., Rausch, T., Ryzhova, M., ... Jabado, N. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*, 482(7384), 226-231. <https://doi.org/10.1038/nature10833>

Sémon, M., & Wolfe, K. H. (2007). Reciprocal gene loss between Tetraodon and zebrafish after whole genome duplication in their ancestor. *Trends in Genetics*, 23(3), 108-112. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.01.003>

Sen, G. L., Webster, D. E., Barragan, D. I., Chang, H. Y., & Khavari, P. A. (2008). Control of differentiation in a self-renewing mammalian tissue by the histone demethylase JMJD3. *Genes & Development*, 22(14), 1865-1870. <https://doi.org/10.1101/gad.1673508>

Shan, Y., Liang, Z., Xing, Q., Zhang, T., Wang, B., Tian, S., Huang, W., Zhang, Y., Yao, J., Zhu, Y., Huang, K., Liu, Y., Wang, X., Chen, Q., Zhang, J., Shang, B., Li, S., Shi, X., Liao, B., ... Pan, G.

(2017). PRC2 specifies ectoderm lineages and maintains pluripotency in primed but not naïve ESCs. *Nature Communications*, 8(1), 672. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00668-4>

Shao, S., Zhao, X., Zhang, X., Luo, M., Zuo, X., Huang, S., Wang, Y., Gu, S., & Zhao, X. (2015). Notch1 signaling regulates the epithelial–mesenchymal transition and invasion of breast cancer in a Slug-dependent manner. *Molecular Cancer*, 14(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0295-3>

Shen, X., Liu, Y., Hsu, Y.-J., Fujiwara, Y., Kim, J., Mao, X., Yuan, G.-C., & Orkin, S. H. (2008). EZH1 Mediates Methylation on Histone H3 Lysine 27 and Complements EZH2 in Maintaining Stem Cell Identity and Executing Pluripotency. *Molecular Cell*, 32(4), 491-502. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.016>

Shen-Li, H., O'Hagan, R. C., Hou, H., Horner, J. W., Lee, H. W., & DePinho, R. A. (2000). Essential role for Max in early embryonic growth and development. *Genes & Development*, 14(1), 17-22.

Sher, F., Boddeke, E., Olah, M., & Copray, S. (2012). Dynamic Changes in Ezh2 Gene Occupancy Underlie Its Involvement in Neural Stem Cell Self-Renewal and Differentiation towards Oligodendrocytes. *PLoS ONE*, 7(7), e40399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040399>

Sher, F., Rößler, R., Brouwer, N., Balasubramaniyan, V., Boddeke, E., & Copray, S. (2008). Differentiation of Neural Stem Cells into Oligodendrocytes : Involvement of the Polycomb Group Protein Ezh2. *Stem Cells*, 26(11), 2875-2883. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0121>

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. (2007). Integration of Estrogen and Wnt Signaling Circuits by the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 27(14), 5105-5119. <https://doi.org/10.1128/MCB.00162-07>

Shi, Y., Sun, G., Zhao, C., & Stewart, R. (2008). Neural stem cell self-renewal. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 65(1), 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.06.004>

Shu, W., Cho, J. Y., Jiang, Y., Zhang, M., Weisz, D., Elder, G. A., Schmeidler, J., De Gasperi, R., Sosa, M. A. G., Rabidou, D., Santucci, A. C., Perl, D., Morrisey, E., & Buxbaum, J. D. (2005). Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the *Foxp2* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27), 9643-9648. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503739102>

Siems, S. B., Jahn, O., Hoodless, L. J., Jung, R. B., Hesse, D., Möbius, W., Czopka, T., & Werner, H. B. (2021). Proteome Profile of Myelin in the Zebrafish Brain. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 640169. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640169>

Silveira, A. B., Kasper, L. H., Fan, Y., Jin, H., Wu, G., Shaw, T. I., Zhu, X., Larson, J. D., Easton, J., Shao, Y., Yergeau, D. A., Rosencrance, C., Boggs, K., Rusch, M. C., Ding, L., Zhang, J., Finkelstein, D., Noyes, R. M., Russell, B. L., ... Baker, S. J. (2019). H3.3 K27M depletion increases differentiation and extends latency of diffuse intrinsic pontine glioma growth in vivo. *Acta Neuropathologica*, 137(4), 637-655. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01975-4>

Simon, J. A., & Kingston, R. E. (2009). Mechanisms of Polycomb gene silencing : Knowns and unknowns. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(10), 697-708. <https://doi.org/10.1038/nrm2763>

Smalley, M. J., & Dale, T. C. (1999). Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 18(2), 215-230. <https://doi.org/10.1023/a:1006369223282>

Smits, M., Van Rijn, S., Hulleman, E., Biesmans, D., Van Vuurden, D. G., Kool, M., Haberler, C., Aronica, E., Vandertop, W. P., Noske, D. P., & Würdinger, T. (2012). EZH2-Regulated DAB2IP Is a Medulloblastoma Tumor Suppressor and a Positive Marker for Survival. *Clinical Cancer Research*, 18(15), 4048-4058. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0399>

Sock, E., & Wegner, M. (2021). Using the lineage determinants *Olig2* and *Sox10* to explore transcriptional regulation of oligodendrocyte development. *Developmental Neurobiology*, 81(7), 892-901. <https://doi.org/10.1002/dneu.22849>

Sotelo, C. (2004). Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Progress in Neurobiology*, 72(5), 295-339. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.03.004>

Spence, R., Fatema, M. K., Ellis, S., Ahmed, Z. F., & Smith, C. (2007). Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 71(1), 304-309. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01492.x>

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.2007.00030.x>

St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. (2012). Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nature Genetics*, 44(3), 251-253. <https://doi.org/10.1038/ng.1102>

Stielow, B., Finkernagel, F., Stiewe, T., Nist, A., & Suske, G. (2018). MGA, L3MBTL2 and E2F6 determine genomic binding of the non-canonical Polycomb repressive complex PRC1.6. *PLOS Genetics*, 14(1), e1007193. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007193>

Stielow, C., Stielow, B., Finkernagel, F., Scharfe, M., Jarek, M., & Suske, G. (2014). SUMOylation of the polycomb group protein L3MBTL2 facilitates repression of its target genes. *Nucleic Acids Research*, 42(5), 3044-3058. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1317>

Stock, J. K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H., Brockdorff, N., Fisher, A. G., & Pombo, A. (2007). Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nature Cell Biology*, 9(12), 1428-1435. <https://doi.org/10.1038/ncb1663>

Strähle, U., Fischer, N., & Blader, P. (1997). Expression and regulation of a netrin homologue in the zebrafish embryo. *Mechanisms of Development*, 62(2), 147-160. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(97\)00657-6](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(97)00657-6)

Su, I., Basavaraj, A., Krutchinsky, A. N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B. T., & Tarakhovsky, A. (2003). Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nature Immunology*, 4(2), 124-131. <https://doi.org/10.1038/ni876>

Suurväli, J., Whiteley, A. R., Zheng, Y., Gharbi, K., Leptin, M., & Wiehe, T. (2020). The Laboratory Domestication of Zebrafish : From Diverse Populations to Inbred Substrains. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4), 1056-1069. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz289>

Tadros, W., & Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition : A play in two acts. *Development*, 136(18), 3033-3042. <https://doi.org/10.1242/dev.033183>

Takeuchi, M., Yamaguchi, S., Sakakibara, Y., Hayashi, T., Matsuda, K., Hara, Y., Tanegashima, C., Shimizu, T., Kuraku, S., & Hibi, M. (2017). Gene expression profiling of granule cells and Purkinje cells in the zebrafish cerebellum. *Journal of Comparative Neurology*, 525(7), 1558-1585. <https://doi.org/10.1002/cne.24114>

Takeuchi, T., Kojima, M., Nakajima, K., & Kondo, S. (1999). Jumonji gene is essential for the neurulation and cardiac development of mouse embryos with a C3H/He background. *Mechanisms of Development*, 86(1-2), 29-38. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(99\)00100-8](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(99)00100-8)

Takeuchi, T., Yamazaki, Y., Katoh-Fukui, Y., Tsuchiya, R., Kondo, S., Motoyama, J., & Higashinakagawa, T. (1995). Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes & Development*, 9(10), 1211-1222. <https://doi.org/10.1101/gad.9.10.1211>

Takahara, Y., Tomotsune, D., Shirai, M., Katoh-Fukui, Y., Nishii, K., Motaleb, Md. A., Nomura, M., Tsuchiya, R., Fujita, Y., Shibata, Y., Higashinakagawa, T., & Shimada, K. (1997). Targeted disruption of the mouse homologue of the *Drosophila* polyhomeotic gene leads to altered anteroposterior patterning and neural crest defects. *Development*, 124(19), 3673-3682. <https://doi.org/10.1242/dev.124.19.3673>

Takke, C., Dornseifer, P., Weizsäcker, E. V., & Campos-Ortega, J. A. (1999). Her4 , a zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *E(spl)* , is a target of NOTCH signalling. *Development*, 126(9), 1811-1821. <https://doi.org/10.1242/dev.126.9.1811>

Tallafuss, A., Trepman, A., & Eisen, J. S. (2009). DeltaA mRNA and protein distribution in the zebrafish nervous system. *Developmental Dynamics*, 238(12), 3226-3236. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22136>

Tam, W. Y., Leung, C. K. Y., Tong, K. K., & Kwan, K. M. (2011). Foxp4 is essential in maintenance of purkinje cell dendritic arborization in the mouse cerebellum. *Neuroscience*, 172, 562-571. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.023>

Tamburri, S., Lavarone, E., Fernández-Pérez, D., Conway, E., Zanotti, M., Manganaro, D., & Pasini, D. (2020). Histone H2AK119 Mono-Ubiquitination Is Essential for Polycomb-Mediated Transcriptional Repression. *Molecular Cell*, 77(4), 840-856.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.11.021>

Tao, R., Han, K., Wu, S. C., Friske, J. D., Roussel, M. F., & Northcott, P. A. (2024). Arrested development : The dysfunctional life history of medulloblastoma. *Genes & Development*, genesdev;gad.351936.124v1. <https://doi.org/10.1101/gad.351936.124>

Tavares, L., Dimitrova, E., Oxley, D., Webster, J., Poot, R., Demmers, J., Bezstarosti, K., Taylor, S., Ura, H., Koide, H., Wutz, A., Vidal, M., Elderkin, S., & Brockdorff, N. (2012). RYBP-PRC1 Complexes Mediate H2A Ubiquitylation at Polycomb Target Sites Independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell*, 148(4), 664-678. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.029>

Taylor, J. S., Van De Peer, Y., Braasch, I., & Meyer, A. (2001). Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 356(1414), 1661-1679. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0975>

Taylor, K. R., Mackay, A., Truffaux, N., Butterfield, Y. S., Morozova, O., Philippe, C., Castel, D., Grasso, C. S., Vinci, M., Carvalho, D., Carcaboso, A. M., De Torres, C., Cruz, O., Mora, J., Entz-Werle, N., Ingram, W. J., Monje, M., Hargrave, D., Bullock, A. N., ... Grill, J. (2014). Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nature Genetics*, 46(5), 457-461. <https://doi.org/10.1038/ng.2925>

Taylor, M. D., Northcott, P. A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y.-J., Clifford, S. C., Eberhart, C. G., Parsons, D. W., Rutkowski, S., Gajjar, A., Ellison, D. W., Lichter, P., Gilbertson, R. J., Pomeroy, S. L., Kool, M., & Pfister, S. M. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma : The current consensus. *Acta Neuropathologica*, 123(4), 465-472. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0922-z>

Teraoka, H., Russell, C., Regan, J., Chandrasekhar, A., Concha, M. L., Yokoyama, R., Higashi, K., Take-uchi, M., Dong, W., Hiraga, T., Holder, N., & Wilson, S. W. (2004). Hedgehog and Fgf signaling pathways regulate the development of tphR -expressing serotonergic raphe neurons

in zebrafish embryos. *Journal of Neurobiology*, 60(3), 275-288.  
<https://doi.org/10.1002/neu.20023>

Thisse, C., & Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature Protocols*, 3(1), 59-69. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.514>

Treit, D., & Fundytus, M. (1988). Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 31(4), 959-962. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(88\)90413-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(88)90413-3)

Trojer, P., Cao, A. R., Gao, Z., Li, Y., Zhang, J., Xu, X., Li, G., Losson, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Farnham, P. J., & Reinberg, D. (2011). L3MBTL2 Protein Acts in Concert with PcG Protein-Mediated Monoubiquitination of H2A to Establish a Repressive Chromatin Structure. *Molecular Cell*, 42(4), 438-450. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.004>

Tsou, P.-S., Campbell, P., Amin, M. A., Coit, P., Miller, S., Fox, D. A., Khanna, D., & Sawalha, A. H. (2019). Inhibition of EZH2 prevents fibrosis and restores normal angiogenesis in scleroderma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(9), 3695-3702. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813006116>

Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P., & Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, 439(7078), 811-816. <https://doi.org/10.1038/nature04433>

Turner, K. J., Hawkins, T. A., Yáñez, J., Anadón, R., Wilson, S. W., & Folgueira, M. (2016). Afferent Connectivity of the Zebrafish Habenulae. *Frontiers in Neural Circuits*, 10. <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00030>

Tyagi, M., Imam, N., Verma, K., & Patel, A. K. (2016). Chromatin remodelers : We are the drivers!! *Nucleus*, 7(4), 388-404. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1211217>

Ujhelly, O., Szabo, V., Kovacs, G., Vajda, F., Mallok, S., Prorok, J., Acsai, K., Hegedus, Z., Krebs, S., Dinnyes, A., & Pirity, M. K. (2015). Lack of Rybp in Mouse Embryonic Stem Cells Impairs Cardiac Differentiation. *Stem Cells and Development*, 24(18), 2193-2205. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0569>

Urrestizala-Arenaza, N., Cerchio, S., Cavaliere, F., & Magliaro, C. (2024). Limitations of human brain organoids to study neurodegenerative diseases : A manual to survive. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1419526>

Van Der Lugt, N. M., Domen, J., Linders, K., Van Roon, M., Robanus-Maandag, E., Te Riele, H., Van Der Valk, M., Deschamps, J., Sofroniew, M., & Van Lohuizen, M. (1994). Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes & Development*, 8(7), 757-769. <https://doi.org/10.1101/gad.8.7.757>

Van Der Velden, Y. U., Wang, L., Querol Cano, L., & Haramis, A.-P. G. (2013). The Polycomb Group Protein Ring1b/Rnf2 Is Specifically Required for Craniofacial Development. *PLoS ONE*, 8(9), e73997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073997>

Van Der Velden, Y. U., Wang, L., Van Lohuizen, M., & Haramis, A.-P. G. (2012). The Polycomb group protein Ring1b is essential for pectoral fin development. *Development*, 139(12), 2210-2220. <https://doi.org/10.1242/dev.077156>

Van Kemenade, F. J., Raaphorst, F. M., Blokzijl, T., Fieret, E., Hamer, K. M., Satijn, D. P. E., Otte, A. P., & Meijer, C. J. L. M. (2001). Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 97(12), 3896-3901. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.12.3896>

Van Mierlo, G., Veenstra, G. J. C., Vermeulen, M., & Marks, H. (2019). The Complexity of PRC2 Subcomplexes. *Trends in Cell Biology*, 29(8), 660-671. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.05.004>

Van Wijnen, A. J., Bagheri, L., Badreldin, A. A., Larson, A. N., Dudakovic, A., Thaler, R., Paradise, C. R., & Wu, Z. (2021). Biological functions of chromobox (CBX) proteins in stem cell self-renewal, lineage-commitment, cancer and development. *Bone*, 143, 115659. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115659>

Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., Ghosh, D., Pienta, K. J., Sewalt, R. G. A. B., Otte, A. P., Rubin, M. A., & Chinnaiyan, A. M. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 419(6907), 624-629. <https://doi.org/10.1038/nature01075>

Vasanthakumar, A., Xu, D., Lun, A. T., Kueh, A. J., Van Gisbergen, K. P., Iannarella, N., Li, X., Yu, L., Wang, D., Williams, B. R., Lee, S. C., Majewski, I. J., Godfrey, D. I., Smyth, G. K., Alexander, W. S., Herold, M. J., Kallies, A., Nutt, S. L., & Allan, R. S. (2017). A non-canonical function of Ezh2 preserves immune homeostasis. *EMBO Reports*, 18(4), 619-631. <https://doi.org/10.15252/embr.201643237>

Vizán, P., Gutiérrez, A., Espejo, I., García-Montolio, M., Lange, M., Carretero, A., Lafzi, A., De Andrés-Aguayo, L., Blanco, E., Thambyrajah, R., Graf, T., Heyn, H., Bigas, A., & Di Croce, L. (2020). The Polycomb-associated factor PHF19 controls hematopoietic stem cell state and differentiation. *Science Advances*, 6(32). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb2745>

Völkel, P., Bary, A., Raby, L., Chapart, A., Dupret, B., Le Bourhis, X., & Angrand, P.-O. (2019). Ezh1 arises from Ezh2 gene duplication but its function is not required for zebrafish development. *Scientific Reports*, 9(1), 4319. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40738-9>

Völkel, P., Dupret, B., Le Bourhis, X., & Angrand, P.-O. (2018). Le modèle poisson zèbre dans la lutte contre le cancer. *médecine/sciences*, 34(4), 345-353. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183404016>

Volkman, K., Rieger, S., Babaryka, A., & Köster, R. W. (2008). The zebrafish cerebellar rhombic lip is spatially patterned in producing granule cell populations of different functional compartments. *Developmental Biology*, 313(1), 167-180. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.024>

Voncken, J. W., Roelen, B. A. J., Roefs, M., De Vries, S., Verhoeven, E., Marino, S., Deschamps, J., & Van Lohuizen, M. (2003). Rnf2 ( Ring1b ) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2468-2473. <https://doi.org/10.1073/pnas.0434312100>

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S., & Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*, 431(7010), 873-878. <https://doi.org/10.1038/nature02985>

Wang, J., Huang, T. Y.-T., Hou, Y., Bartom, E., Lu, X., Shilatifard, A., Yue, F., & Saratsis, A. (2021). Epigenomic landscape and 3D genome structure in pediatric high-grade glioma. *Science Advances*, 7(23). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg4126>

Wang, J., & Wang, G. G. (2020). No Easy Way Out for EZH2 : Its Pleiotropic, Noncanonical Effects on Gene Regulation and Cellular Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9501. <https://doi.org/10.3390/ijms21249501>

Wang, L., Jin, Q., Lee, J.-E., Su, I., & Ge, K. (2010). Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), 7317-7322. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000031107>

Wang, Q., Geng, Z., Gong, Y., Warren, K., Zheng, H., Imamura, Y., & Gao, Z. (2018a). WDR68 is essential for the transcriptional activation of the PRC1-AUTS2 complex and neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Research*, 33, 206-214. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.10.023>

Wang, W., Cho, H., Kim, D., Park, Y., Moon, J. H., Lim, S. J., Yoon, S. M., McCane, M., Aicher, S. A., Kim, S., Emery, B., Lee, J. W., Lee, S., Park, Y., & Lee, S.-K. (2020). PRC2 Acts as a Critical Timer That Drives Oligodendrocyte Fate over Astrocyte Identity by Repressing the Notch Pathway. *Cell Reports*, 32(11), 108147. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108147>

Wang, X., Long, Y., Paucek, R. D., Gooding, A. R., Lee, T., Burdorf, R. M., & Cech, T. R. (2019). Regulation of histone methylation by automethylation of PRC2. *Genes & Development*, 33(19-20), 1416-1427. <https://doi.org/10.1101/gad.328849.119>

Wang, Z., Gearhart, M. D., Lee, Y.-W., Kumar, I., Ramazanov, B., Zhang, Y., Hernandez, C., Lu, A. Y., Neuenkirchen, N., Deng, J., Jin, J., Kluger, Y., Neubert, T. A., Bardwell, V. J., & Ivanova, N. B. (2018b). A Non-canonical BCOR-PRC1.1 Complex Represses Differentiation Programs in Human ESCs. *Cell Stem Cell*, 22(2), 235-251.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.12.002>

Washkowitz, A. J., Schall, C., Zhang, K., Wurst, W., Floss, T., Mager, J., & Papaioannou, V. E. (2015). Mga is essential for the survival of pluripotent cells during peri-implantation development. *Development*, 142(1), 31-40. <https://doi.org/10.1242/dev.111104>

Wen, L., Wei, W., Gu, W., Huang, P., Ren, X., Zhang, Z., Zhu, Z., Lin, S., & Zhang, B. (2008). Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Developmental Biology*, 314(1), 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.012>

White, R. J., Collins, J. E., Sealy, I. M., Wali, N., Dooley, C. M., Digby, Z., Stemple, D. L., Murphy, D. N., Billis, K., Hourlier, T., Füllgrabe, A., Davis, M. P., Enright, A. J., & Busch-Nentwich, E. M. (2017). A high-resolution mRNA expression time course of embryonic development in zebrafish. *eLife*, 6, e30860. <https://doi.org/10.7554/eLife.30860>

Widrick, J. J., Lambert, M. R., Kunkel, L. M., & Beggs, A. H. (2023). Optimizing assays of zebrafish larvae swimming performance for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 18(6), 629-641. <https://doi.org/10.1080/17460441.2023.2211802>

Wiese, M., Schill, F., Sturm, D., Pfister, S., Hulleman, E., Johnsen, S., & Kramm, C. (2016). No Significant Cytotoxic Effect of the EZH2 Inhibitor Tazemetostat (EPZ-6438) on Pediatric Glioma Cells with Wildtype Histone 3 or Mutated Histone 3.3. *Klinische Pädiatrie*, 228(03), 113-117. <https://doi.org/10.1055/s-0042-105292>

Wilson, C. A., High, S. K., McCluskey, B. M., Amores, A., Yan, Y., Titus, T. A., Anderson, J. L., Batzel, P., Carvan, M. J., Scharl, M., & Postlethwait, J. H. (2014). Wild Sex in Zebrafish : Loss of the Natural Sex Determinant in Domesticated Strains. *Genetics*, 198(3), 1291-1308. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.169284>

Wilson, S. W., Brand, M., & Eisen, J. S. (2002). Patterning the Zebrafish Central Nervous System. In L. Solnica-Krezel (Éd.), *Pattern Formation in Zebrafish* (Vol. 40, p. 181-215). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-46041-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-46041-1_10)

Witalisz-Siepracka, A., Klein, K., Zdársky, B., & Stoiber, D. (2022). The Multifaceted Role of STAT3 in NK-Cell Tumor Surveillance. *Frontiers in Immunology*, 13, 947568. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.947568>

Wong, S. J., Gearhart, M. D., Taylor, A. B., Nanyes, D. R., Ha, D. J., Robinson, A. K., Artigas, J. A., Lee, O. J., Demeler, B., Hart, P. J., Bardwell, V. J., & Kim, C. A. (2016). KDM2B Recruitment of the Polycomb Group Complex, PRC1.1, Requires Cooperation between PCGF1 and BCORL1. *Structure*, 24(10), 1795-1801. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.07.011>

Wullimann, M. F. (2009). Secondary neurogenesis and telencephalic organization in zebrafish and mice : A brief review. *Integrative Zoology*, 4(1), 123-133. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2008.00140.x>

Wullimann, M. F., & Knipp, S. (2000). Proliferation pattern changes in the zebrafish brain from embryonic through early postembryonic stages. *Anatomy and Embryology*, 202(5), 385-400. <https://doi.org/10.1007/s004290000115>

Wullimann, M. F., Rupp, B., & Reichert, H. (1996). *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain*. Birkhäuser Basel. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8979-7>

Xiao, L., Dang, Y., Hu, B., Luo, L., Zhao, P., Wang, S., & Zhang, K. (2022). Overlapping functions of RBBP4 and RBBP7 in regulating cell proliferation and histone H3.3 deposition during mouse preimplantation development. *Epigenetics*, 17(10), 1205-1218. <https://doi.org/10.1080/15592294.2021.1999006>

Xie, H., Xu, J., Hsu, J. H., Nguyen, M., Fujiwara, Y., Peng, C., & Orkin, S. H. (2014). Polycomb Repressive Complex 2 Regulates Normal Hematopoietic Stem Cell Function in a Developmental-Stage-Specific Manner. *Cell Stem Cell*, 14(1), 68-80. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.10.001>

Xu, C., Bian, C., Yang, W., Galka, M., Ouyang, H., Chen, C., Qiu, W., Liu, H., Jones, A. E., MacKenzie, F., Pan, P., Li, S. S.-C., Wang, H., & Min, J. (2010). Binding of different histone marks differentially regulates the activity and specificity of polycomb repressive complex 2 (PRC2). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), 19266-19271. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008937107>

Xu, K., Wu, Z. J., Groner, A. C., He, H. H., Cai, C., Lis, R. T., Wu, X., Stack, E. C., Loda, M., Liu, T., Xu, H., Cato, L., Thornton, J. E., Gregory, R. I., Morrissey, C., Vessella, R. L., Montironi, R., Magi-Galluzzi, C., Kantoff, P. W., ... Brown, M. (2012). EZH2 Oncogenic Activity in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Is Polycomb-Independent. *Science*, 338(6113), 1465-1469. <https://doi.org/10.1126/science.1227604>

Yamada, M., Terao, M., Terashima, T., Fujiyama, T., Kawaguchi, Y., Nabeshima, Y., & Hoshino, M. (2007). Origin of Climbing Fiber Neurons and Their Developmental Dependence on Ptf1a. *The Journal of Neuroscience*, 27(41), 10924-10934. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1423-07.2007>

Yamamoto, K., Sonoda, M., Inokuchi, J., Shirasawa, S., & Sasazuki, T. (2004). Polycomb Group Suppressor of Zeste 12 Links Heterochromatin Protein 1 $\alpha$  and Enhancer of Zeste 2. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 401-406. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307344200>

Yang, X., Zhou, W., Zhou, J., Li, A., Zhang, C., Fang, Z., Wang, C., Liu, S., Hao, A., & Zhang, M. (2024). Pcgf5 : An important regulatory factor in early embryonic neural induction. *Heliyon*, 10(6), e27634. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27634>

Ye, B. H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., Waard, R. D., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R. S. K., Rothman, P., Stall, A. M., Pandolfi, P.-P., & Dalla-Favera, R. (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nature Genetics*, 16(2), 161-170. <https://doi.org/10.1038/ng0697-161>

Yi, J., & Wu, J. (2018). Epigenetic regulation in medulloblastoma. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 87, 65-76. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.09.003>

You, J. S., & Jones, P. A. (2012). Cancer Genetics and Epigenetics : Two Sides of the Same Coin? *Cancer Cell*, 22(1), 9-20. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.008>

Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R., & Jove, R. (2014). Revisiting STAT3 signalling in cancer : New and unexpected biological functions. *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 736-746. <https://doi.org/10.1038/nrc3818>

Yu, J., Yu, J., Rhodes, D. R., Tomlins, S. A., Cao, X., Chen, G., Mehra, R., Wang, X., Ghosh, D., Shah, R. B., Varambally, S., Pienta, K. J., & Chinnaiyan, A. M. (2007). A Polycomb Repression Signature in Metastatic Prostate Cancer Predicts Cancer Outcome. *Cancer Research*, 67(22), 10657-10663. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2498>

Yu, M., Mazor, T., Huang, H., Huang, H.-T., Kathrein, K. L., Woo, A. J., Chouinard, C. R., Labadorf, A., Akie, T. E., Moran, T. B., Xie, H., Zacharek, S., Taniuchi, I., Roeder, R. G., Kim, C. F., Zon, L. I., Fraenkel, E., & Cantor, A. B. (2012). Direct recruitment of polycomb repressive complex 1 to chromatin by core binding transcription factors. *Molecular Cell*, 45(3), 330-343. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.032>

Yu, W., Zhang, F., Wang, S., Fu, Y., Chen, J., Liang, X., Le, H., Pu, W. T., & Zhang, B. (2017). Depletion of polycomb repressive complex 2 core component EED impairs fetal

hematopoiesis. *Cell Death & Disease*, 8(4), e2744-e2744.  
<https://doi.org/10.1038/cddis.2017.163>

Yue, P., & Turkson, J. (2009). Targeting STAT3 in cancer : How successful are we? *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(1), 45-56. <https://doi.org/10.1517/13543780802565791>

Zhang, H., Zhu, D., Zhang, Z., Kaluz, S., Yu, B., Devi, N. S., Olson, J. J., & Van Meir, E. G. (2020). EZH2 targeting reduces medulloblastoma growth through epigenetic reactivation of the BAI1/p53 tumor suppressor pathway. *Oncogene*, 39(5), 1041-1048.  
<https://doi.org/10.1038/s41388-019-1036-7>

Zhang, J., Taylor, R. J., La Torre, A., Wilken, M. S., Cox, K. E., Reh, T. A., & Vetter, M. L. (2015). Ezh2 maintains retinal progenitor proliferation, transcriptional integrity, and the timing of late differentiation. *Developmental Biology*, 403(2), 128-138.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.05.010>

Zhang, Y., Kinkel, S., Maksimovic, J., Bandala-Sanchez, E., Tanzer, M. C., Naselli, G., Zhang, J.-G., Zhan, Y., Lew, A. M., Silke, J., Oshlack, A., Blewitt, M. E., & Harrison, L. C. (2014). The polycomb repressive complex 2 governs life and death of peripheral T cells. *Blood*, 124(5), 737-749. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-544106>

Zhang, Y., Sun, Z., Jia, J., Du, T., Zhang, N., Tang, Y., Fang, Y., & Fang, D. (2021). Overview of Histone Modification. In D. Fang & J. Han (Éds.), *Histone Mutations and Cancer* (p. 1-16). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5_1)

Zhao, J., Lan, J., Wang, M., Liu, C., Fang, Z., Song, A., Zhang, T., Wang, L., Zhu, B., Chen, P., Yu, J., & Li, G. (2024). H2AK119ub1 differentially fine-tunes gene expression by modulating canonical PRC1- and H1-dependent chromatin compaction. *Molecular Cell*, 84(7), 1191-1205.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.02.017>

Zhao, J. C., Yu, J., Runkle, C., Wu, L., Hu, M., Wu, D., Liu, J. S., Wang, Q., Qin, Z. S., & Yu, J. (2012). Cooperation between Polycomb and androgen receptor during oncogenic transformation. *Genome Research*, 22(2), 322-331. <https://doi.org/10.1101/gr.131508.111>

Zheng, X., Pang, B., Gu, G., Gao, T., Zhang, R., Pang, Q., & Liu, Q. (2017). Melatonin Inhibits Glioblastoma Stem-like cells through Suppression of EZH2-NOTCH1 Signaling Axis.

International Journal of Biological Sciences, 13(2), 245-253.  
<https://doi.org/10.7150/ijbs.16818>

Zheng, Y., Zhang, F., Xu, S., & Wu, L. (2021). Advances in neural organoid systems and their application in neurotoxicity testing of environmental chemicals. *Genes and Environment*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/s41021-021-00214-1>

Zhu, J., Wang, H.-T., Chen, Y.-R., Yan, L.-Y., Han, Y.-Y., Liu, L.-Y., Cao, Y., Liu, Z.-Z., & Xu, H. A. (2020). The Joubert Syndrome Gene *arl13b* is Critical for Early Cerebellar Development in Zebrafish. *Neuroscience Bulletin*, 36(9), 1023-1034. <https://doi.org/10.1007/s12264-020-00554-y>

Zimmerman, S. M., Lin, P. N., & Souroullas, G. P. (2023). Non-canonical functions of EZH2 in cancer. *Frontiers in Oncology*, 13, 1233953. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1233953>

Zon, L. I., & Peterson, R. T. (2005). In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(1), 35-44. <https://doi.org/10.1038/nrd1606>

Zu, Y., Tong, X., Wang, Z., Liu, D., Pan, R., Li, Z., Hu, Y., Luo, Z., Huang, P., Wu, Q., Zhu, Z., Zhang, B., & Lin, S. (2013). TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nature Methods*, 10(4), 329-331. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2374>

# Annexes

## 1. Références Table 5

1. Arisan, S., Buyuktuncer, E.D., Palavan-Unsal, N., et al. (2005). Increased expression of EZH2, a polycomb group protein, in bladder carcinoma. *Urol. Int.* 75, 252–257.
2. Bachmann, I.M., Halvorsen, O.J., Collett, K., et al. (2006). 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.* 24, 268-273.
5. Bracken, A.P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., and Helin, K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* 22, 5323-5335.
8. Collett, K., Eide, G.E., Arnes, J., et al. (2006). Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 1168–1174.
10. Ernst, T., Chase, A.J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C.E., Bryant, C., Jones, A.V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F.M., Reiter, A., et al. (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat. Genet.* 42, 722-726.
12. Iwata, S., Takenobu, H., Kageyama, H., Koseki, H., Ishii, T., Nakazawa, A., Tatzaki, S., Nakagawara, A., and Kamijo, T. (2010). Polycomb group molecule PHC3 regulates polycomb complex composition and prognosis of osteosarcoma. *Cancer Sci.* 101, 1646-1652.
13. Karamitopoulou, E., Pallante, P., Zlobec, I., Tornillo, L., Carafa, V., Schaffner, T., et al. (2010). Loss of the CBX7 protein expression correlates with a more aggressive phenotype in pancreatic cancer. *Eur. J. Cancer*, 46, 1438-1444.
14. Kirmizis, A., Bartley, S.M., and Farnham, P.J. (2003). Identification of the polycomb group protein SU(Z)12 as a potential molecular target for human cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* 2, 113-121.

15. Kleer, C.G., Cao, Q., Varambally, S., et al. (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 11606–11611.

17. Kruzelock, R.P., Murphy, E.C., Strong, L.C., Naylor, S.L., and Hansen, M.F. (1997). Localization of a novel tumor suppressor locus on human chromosome 3q important in osteosarcoma tumorigenesis. *Cancer Res.* 57, 106-109.

18. Leung, C., Lingbeek, M., Shakhova, O., et al. (2004). Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature* 428, 337-341.

20. Martín-Pérez, D., Sánchez, E., Maestre, L., Suela, J., Vargiu, P., Di Lisio, L., Martínez, N., Alves, J., Piris, M.A., and Sánchez-Beato, M. (2010). Deregulated expression of the polycomb-group protein SUZ12 target genes characterizes mantle cell lymphoma. *Am. J. Pathol.* Epub ahead of print.

22. Mimori, K., Ogawa, K., Okamoto, M., et al. (2005). Clinical significance of enhancer of zeste homolog 2 expression in colorectal cancer cases. *Eur. J. Surg. Oncol.* 31, 376–380.

23. Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F., et al. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.* 42, 181-185.

25. Nikoloski, G., Langemeijer, S.M., Kuiper, R.P., Knops, R., Massop, M., Tönnissen, E.R., van der Heijden, A., Scheele, T.N., Vandenbergh, P., de Witte, T., et al. (2010). Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 42, 665-667.

26. Nowak, K., Kerl, K., Fehr, D., et al. (2006). BMI1 is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas. *Nucleic Acids Res.* 34, 1745-1754.

27. Raaphorst, F. M. et al. (2003). Poorly differentiated breast carcinoma is associated with increased expression of the human Polycomb group EZH2 gene. *Neoplasia* 5, 481–488.

28. Raaphorst, F.M., van Kemenade, F.J., Blokzijl, T., et al. (2000). Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* 157, 709-715.
29. Raman, J.D., Mongan, N.P., Tickoo, S.K., Boorjian, S.A., Scherr, D.S., and Gudas, L.J. (2005). Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin. Cancer Res.* 11, 8570-8576.
30. Sanchez-Beato, M., Sanchez, E., Gonzalez-Carrero, J., et al. (2006). Variability in the expression of polycomb proteins in different normal and tumoral tissues. A pilot study using tissue microarrays. *Mod. Pathol.* 19, 684-694.
31. Sawa, M., Yamamoto, K., Yokozawa, T., et al. (2005). BMI-1 is highly expressed in M0-subtype acute myeloid leukemia. *Int. J. Hematol.* 82, 42-47.
32. Scott, C.L., Gil, J., Hernando, E., et al. (2007). Role of the chromobox protein CBX7 in lymphomagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 5389-5394.
33. Sudo, T., Utsunomiya, T., Mimori, K., et al. (2005). Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 92, 1754-1758.
34. Tokimasa, S., Ohta, H., Sawada, A., et al. (2001). Lack of the Polycomb-group gene *rae28* causes maturation arrest at the early B-cell developmental stage. *Exp. Hematol.* 29, 93-103.
35. van Kemenade, F. J. et al. Coexpression of BMI-1 and EZH2 Polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 97, 3896-3901 (2001).
36. Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., et al. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419, 624-629.
37. Visser, H.P., Gunster, M.J., Kluin-Nelemans, H.C., et al. (2001). The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 112, 950-958.

38. Vonlanthen, S., Heighway, J., Altermatt, H.J., et al. (2001). The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression. *Br. J. Cancer* 84, 1372-1376.

39. Wang, S., Robertson, G.P., and Zhu, J. (2004). A novel human homologue of *Drosophila* polycomblike gene is up-regulated in multiple cancers. *Gene* 343, 69-78.

40. Wang, W., Yuasa, T., Tsuchiya, N., Ma, Z., Maita, S., Narita, S., Kumazawa, T., Inoue, T., Tsuruta, H., Horikawa, Y., et al., (2009). The novel tumor-suppressor Mel-18 in prostate cancer: its functional polymorphism, expression and clinical significance. *Int. J. Cancer* 125, 2836-2843.

41. Weikert, S., Christoph, F., Kollermann, J., et al. (2005). Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas. *Int. J. Mol. Med.* 16, 349–353.

42. Widschwendter, M., Fiegl, H., Egle, D., et al. (2007). Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat. Genet.* 39, 157–158.

## 2. Publications



Review

# The Contribution of the Zebrafish Model to the Understanding of Polycomb Repression in Vertebrates

Mariette Hanot, Ludivine Raby , Pamela Völkel , Xuefen Le Bourhis and Pierre-Olivier Angrand \*

University Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277-CANTHER—Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

\* Correspondence: pierre-olivier.angrand@univ-lille.fr; Tel.: +33-3-2033-6222

**Abstract:** Polycomb group (PcG) proteins are highly conserved proteins assembled into two major types of complexes, PRC1 and PRC2, involved in the epigenetic silencing of a wide range of gene expression programs regulating cell fate and tissue development. The crucial role of PRC1 and PRC2 in the fundamental cellular processes and their involvement in human pathologies such as cancer attracted intense attention over the last few decades. Here, we review recent advancements regarding PRC1 and PRC2 function using the zebrafish model. We point out that the unique characteristics of the zebrafish model provide an exceptional opportunity to increase our knowledge of the role of the PRC1 and PRC2 complexes in tissue development, in the maintenance of organ integrity and in pathology.

**Keywords:** zebrafish; epigenetics; PRC1; PRC2; morpholino; gene editing



**Citation:** Hanot, M.; Raby, L.; Völkel, P.; Le Bourhis, X.; Angrand, P.-O. The Contribution of the Zebrafish Model to the Understanding of Polycomb Repression in Vertebrates. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2322. <https://doi.org/10.3390/ijms24032322>

Academic Editor: Alina Scridon

Received: 29 December 2022

Revised: 20 January 2023

Accepted: 21 January 2023

Published: 24 January 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Polycomb group (PcG) genes were originally discovered in *Drosophila melanogaster*, where they were shown to be involved in the maintenance of homeotic (*Hox*) gene repression and body plan specification [1,2]. PcG genes were subsequently found to be conserved in vertebrates, including humans [3]. Extensive work over the past two decades has demonstrated that PcG proteins are not only involved in the silencing of *Hox* gene expression but indeed regulate a wide variety of gene expression programs controlling a plethora of cellular and developmental processes [4–6]. Furthermore, alterations in PcG gene function have been implicated in a number of human diseases, including cancer [7–11].

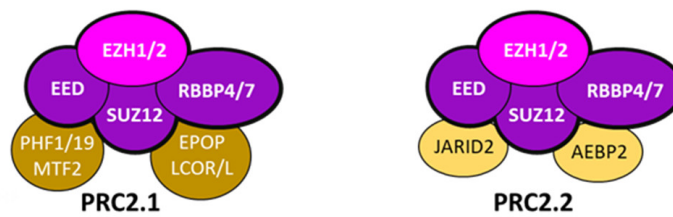
PcG proteins are typically organized as two main multiprotein complexes involved in transcriptional repression through the post-translational modification of histones. The Polycomb repressive complex 1 (PRC1) monoubiquitylates histone H2A at Lysine 119 (H2AK119ub1) [12,13], whereas the Polycomb repressive complex 2 (PRC2) catalyzes mono-, di- and trimethylation of Histone H3 at Lysine 27 (H3K27me1/2/3) [14–16]. PRC1 and PRC2 are recruited at the same genomic sites to form Polycomb chromatin domains where H2AK119ub1 and H3K27me3 epigenetic marks are enriched and gene expression is locally precluded [4–6,17,18].

Importantly, systematic biochemical characterization of Polycomb repressive complexes in *Drosophila* and mammalian cells has demonstrated that PRC1 and PRC2 are both organized as sets of diverse assemblies through the association with distinct auxiliary proteins [8,19,20]. Although the association with various accessory subunits does not change the histone-modifying activities of the two Polycomb repressive complexes, the auxiliary proteins play a role in the recruitment of the complexes to chromatin, their stabilization and/or the modulation of their activity.

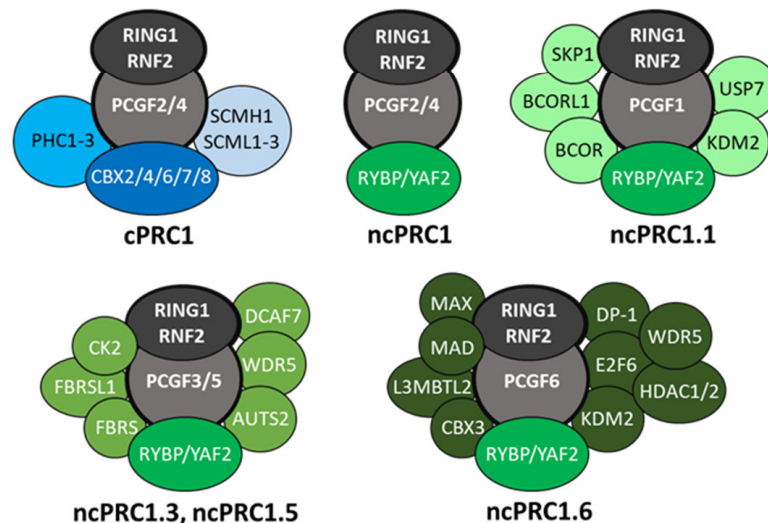
The mammalian PRC2 catalytic activity relies on the association of the histone lysine methyltransferase EZH2 (or its paralog EZH1) with the subunits EED, SUZ12 and RBBP4/7 [15]. In addition, this PRC2 core complex interacts with various auxiliary subunits

to define at least two distinct PRC2 complexes: PRC2.1 and PRC2.2 [21–24] (Figure 1A). PRC2.1 includes one of the three PCL proteins (PHF1, PHF19 or MTF2), together with EPOP, LCOR (PAL1) or LCORL (PAL2), while the auxiliary subunits of PRC2.2 are JARID2 and AEBP2. The auxiliary factors regulate PRC2.1 and PRC2.2 H3K27 methyltransferase activities in several ways: by increasing PRC2 binding to chromatin (e.g., PHF1, MTF2, JARID2, AEBP2), by interacting with histone post-translational modifications (e.g., PHF1, PHF19, JARID2) and/or by the regulation of the allosteric activation of the PRC2 core complex (e.g., PHF1/19, MTF2, LCOR/LCORL, JARID2). To complicate matters further, it has been reported that EZH2 could control gene expression in a PRC2-independent fashion [25].

**A**



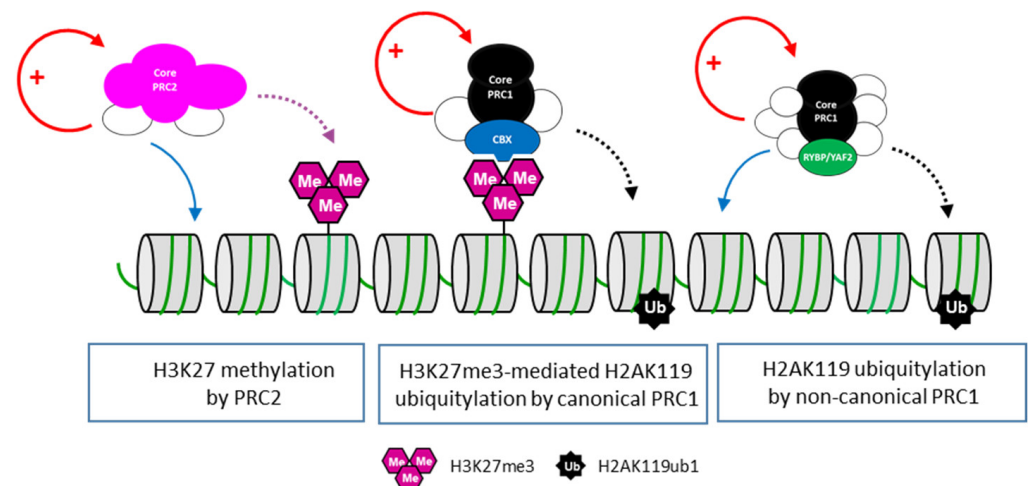
**B**



**Figure 1.** The mammalian Polycomb repressive complexes. (A) PRC2 is composed of four core subunits, EZH1/2, EED, SUZ12 and RBBP4/7, and is classified as two distinct complexes, PRC2.1 and PRC2.2 based on the auxiliary proteins associated. (B) The core PRC1 complex is composed of RING1 or RNF2 associated with one of the six PCGF proteins. Canonical PRC1 (cPRC1) includes PCGF2 or BMI1 (PCGF4), one of the chromobox proteins (CBX2, CBX4, CBX6–8), a polyhomeotic protein (PHC1/2/3) and eventually an SCM protein (SCMH1 or SCML1/2/3). In contrast, non-canonical PRC1 (ncPRC1) can include all PCGF proteins (PCGF1/2/3/4/5/6) associated with RYBP or YAF2. The identity of the PCGF subunit imposes the nature of the auxiliary proteins present in the assembly, thus defining diverse distinct ncPRC1 complexes.

The PRC1 core complex is composed of the E3 ubiquitin ligase RNF2 (or its paralog RING1) that catalyzes H2AK119ub1, associated in dimer with one of the six Polycomb group RING finger (PCGF) proteins. The binding of the PCGF protein stimulates the E3 ligase activity of RING1/RNF2 on one hand and imposes the choice of the auxiliary proteins incorporated into a given PRC1 assembly on the other hand. PRC1 complexes are usually classified as either canonical PRC1 (cPRC1) or non-canonical PRC1 (ncPRC1) [26–28]. In addition to the RING1/RNF2, cPRC1 complexes assemble PCGF2 or BMI1 (PCGF4)

together with one of the chromobox proteins (CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 and CBX8) that bind H3K27me<sub>3</sub>, one of the polyhomeotic proteins (PHC1/2/3) essential for Polycomb-mediated repression and eventually an SCM protein (SCMH1 or SCML1/2/3). In contrast, ncPRC1 can be assembled around all six PCGF proteins and include RYBP or its paralog YAF2, as well as various additional auxiliary proteins depending on the PCGF subunit present in the complex forming distinct ncPRC1 assemblies such as ncPRC1.1, ncPRC1.2/4, ncPRC1.3/5 and ncPRC1.6 (Figure 1B). It is well established that RYBP/YAF2 significantly stimulates the E3 ubiquitin ligase activity of RING1/RNF2 [29–31], but the function of the other auxiliary subunits is far less understood. However, some of these accessory proteins might be involved in the recruitment of ncPRC1 to chromatin. For instance, the H3K39me<sub>2</sub> demethylase KDM2 contributes to the targeting of ncPRC1.1 at unmethylated CpG islands, independent of its demethylase activity [32–34]. Similarly, the ncPRC1.6 auxiliary subunits MGA-MAX recognize the E-box DNA motif, whereas E2F6 heterodimerizes with DP-1 to bind to E2F recognition sequences [35–37]. Thus, a fundamental difference between cPRC1 and ncPRC1 relies on whether their recruitment to chromatin depends on PRC2-deposited H3K27me<sub>3</sub>. cPRC1 complexes are recruited to H3K27me<sub>3</sub> via the recognition of the marks by the CBX2, 4, 6–7 proteins, whereas ncPRC1 assemblies are recruited to chromatin by their auxiliary subunits, independently of H3K27me<sub>3</sub> (Figure 2).



**Figure 2.** Deposition of the Polycomb-associated histone marks. Targeting of the PRC2 complex through the action of auxiliary proteins (white circles) leads to methylation at H3K27 (purple dashed arrow). This post-translational modification is recognized by the CBX subunit (blue) of the cPRC1 complex, which in turn ubiquitinylates H2AK119 (black dashed arrow). The ncPRC1 complexes containing RYBP/YAF2 (green) are recruited to chromatin, irrespective of H3K27me<sub>3</sub>, by the means of auxiliary subunits (blue arrow). Within all PRC complexes, some auxiliary proteins are involved in the stimulation of the catalytic activity (red arrows).

Most of the studies aiming at the understanding of Polycomb repression are genetic and biochemical analyses performed in *Drosophila*, mouse and embryonic stem cells. More recently, the zebrafish model emerged as an additional system shedding light on the role of Polycomb repression in vertebrate development. The zebrafish (*Danio rerio*) is a small freshwater teleost (bony fish) native to Southeast Asia [38]. It emerged as a model for studying early development in the 1950s but was quickly used in broader research fields [39]. The success of zebrafish in research is due to its characteristics that make it an exceptional experimental model. In particular, (i) zebrafish are robust and easy to maintain at low husbandry costs; (ii) zebrafish have a high fecundity rate, producing around 100–200 embryos per clutch and per week; (iii) zebrafish embryos develop externally and are optically clear; (iv) the zebrafish genome is fully sequenced, and comparison to the human reference genome revealed that about 70% of human genes have a zebrafish ortholog [40]; (v) thou-

sands of zebrafish mutants coming from large scale mutagenesis screens are available [41]; and (vi) a variety of genetic engineering approaches, including transgenesis, morpholino-mediated gene expression knockdown and genome-editing technologies, can be applied to the zebrafish model [42–44].

Here, we describe the zebrafish genes coding for the PcG proteins and review the genetic data addressing the function of the PcG genes during zebrafish development. Additionally, we discuss how the zebrafish model offers new insights into the study of Polycomb repression in vertebrates.

## 2. The Zebrafish Genes Coding for the Components of the PRC1 and PRC2 Complexes

During evolution, a whole-genome duplication, known as the teleost genome duplication (TGD), occurred in the teleost lineage before the expansion of bony fish species [45,46]. Ohnologs produced by the TGD were presumably redundant, and a copy was subsequently lost randomly [47]. Nevertheless, around 15% to 20% of the genes remained duplicated in teleost fishes after the gene loss events [48]. Table 1 illustrates the status of genes encoding the subunits of the PRC1 and PRC2 complexes in the zebrafish genome.

A search for zebrafish orthologs of the PRC1 and PRC2 subunits revealed that 13 components out of 48 exist as pairs of ohnologs in the zebrafish genome. The genes retained duplicated code for subunits of the core PRC2 complex (*suz12a*, *suz12b*), auxiliary proteins of PRC2 (*jarid2a*, *jarid2b*), subunits of the core PRC1 complex (e.g., *bmi1a*, *bmi1b*), auxiliary proteins of cPRC1 (e.g., *phc2a*, *phc2b*) and auxiliary proteins of ncPRC1 (e.g., *rybpa*, *rybpb*).

**Table 1.** Zebrafish genes coding for the PRC2 and PRC1 subunits.

Complex	Complex Type	Subunit	Zebrafish Ortholog
PRC2	Core	EZH2	Ezh2
		EZH1	Ezh1
		EED	Eed
		SUZ12	Suz12a, Suz12b
		RBBP4	Rbbp4
		RBBP7	- <sup>1</sup>
		PRC2	PRC2.1
PAL1 (LCOR)	Lcor		
PAL2 (LCORL)	Lcorl		
PHF1	Phf1		
MTF2	Mtf2		
PH19	Phf19		
PRC2	PRC2.2	AEBP2	Aebp2
		JARID2	Jarid2a, Jarid2b
PRC1	Core	PCGF1	Pcgf1
		PCGF2	-
		PCGF3	-
		BMI1 (PCGF4)	Bmi1a, Bmi1b
		PCGF5	Pcgf5a, Pcgf5b
		PCGF6	Pcgf6
		RNF2	Rnf2
RING1	-		
PRC1	cPRC1	CBX2	Cbx2
		CBX4	Cbx4
		CBX6	Cbx6a, Cbx6b
		CBX7	Cbx7a, Cbx7b
		CBX8	Cbx8a, Cbx8b
		PHC1	Phc1
		PHC2	Phc2a, Phc2b
		PHC3	Phc3

**Table 1.** Cont.

Complex	Complex Type	Subunit	Zebrafish Ortholog
PRC1	ncPRC1	RYBP	Rybpa, Rybpb
		YAF2	Yaf2
		BCOR	Bcor
		BCORL1	Bcol1
		KDM2	Kdm2ba, Kdm2bb
		USP7	Usp7
		SKP1	Skp1
		AUTS2	Auts2a, Auts2b
		FBR5	Fbrs
		FBRSL1	Fbrsl1
		E2F6	E2f6
		CBX3	Cbx3a, Cbx3b
		HDAC1	Hdac1
		HDAC2	-
		L3MBTL2	L3mbtl2
		WDR5	Wdr5
		MAX	Max
MGA	Mga, Mgab		

<sup>1</sup> Indicates that the zebrafish genome does not contain an ortholog. <sup>2</sup> *SKIDA1* and *EPOP* are derived from a common ancestral gene that was duplicated in early vertebrate evolution, giving the related gene *SKIDA1L*. In zebrafish, both *skida1* and *skida1l* are present in the genome, while in mammals, *EPOP* is found but *SKIDA1L* does not exist [24]. This suggests that *skida1l* could be orthologous to *EPOP*.

Surprisingly, a number of genes, notably those coding for some PRC1 core subunits are absent in the zebrafish genome [49] (Table 1). These genes, likely lost during the rediploidization process responsible for a massive loss of duplicated genes having occurred after the TGD, include the catalytic subunit RING1 as well as the Polycomb group RING finger proteins PCGF2 and PCGF3. Hence, in zebrafish, PRC1-mediated monoubiquitination at H2A119K is solely accomplished by Rnf2. Loss of the *RING1* ortholog is also observed in other fishes, but it is not a general feature in teleost species (Table 2). For instance, the Japanese pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*) has lost *ring1*, while the gene is retained in the medaka (*Oryzias latipes*) genome.

**Table 2.** The genes encoding PRC1 core subunits in the zebrafish (*Danio rerio*), the medaka (*Oryzias latipes*) and the Japanese pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*).

Subunit	Zebrafish	Medaka	Japanese Pufferfish
RING1			
RNF2			
PCGF1			
PCGF2			
PCGF3	–	+	–
BMI1 (PCGF4)	+	+	+
PCGF5	–	+	+
PCGF6	–	+	–
	++	+	+
	++	+	+
	+	+	+

(–) Indicates that the gene is not found in the genome; (+) indicates that the gene is present in the genome as a singleton; (++) indicates that the corresponding subunit is encoded by two genes.

In the zebrafish genome, the Polycomb group RING finger protein genes *pcgf1* and *pcgf3* are present as singletons and *bmi1a/b* and *pcgf5a/b* are present as pairs, but *pcgf2* and *pcgf3* are both absent. Loss of *pcgf2* and *pcgf3* might not affect the diversity of the PRC1 complexes since the zebrafish c/ncPRC1.2/4 and ncPRC1.3/5 complexes would be assembled around *Bmi1a/b* and *Pcgf5a/b*, respectively. As for RING1/RNF2, the

status of the PCGF orthologs is variable from fish to fish. In medaka, *bmi1*, *pcgf2*, *pcgf3*, *pcgf5* and *pcgf6* are all present as singletons but *pcgf1* is absent, whereas in the Japanese pufferfish, *pcgf3* is the only gene lost (Table 2). This contrasts with the H3K27me3-binding component of the cPRC1 assemblies. Indeed, none of the Cbx subunits has been lost during fish evolution; rather, *cbx* genes are often retained as pairs in most fish species, including zebrafish [50] (Table 3). It is not known whether the strict maintenance of all paralogs, as well as many ohnologs, in fish reflects the absence of functional redundancy between the Cbx family members and contributes to a higher complexity of cPRC1 assemblies involved in the remarkable diversity of the teleost fishes or whether it is a consequence of a selection pressure applied to neighboring genes in the blocks of synteny.

**Table 3.** The genes coding for the CBX subunits of the cPRC1 complex in zebrafish (*Danio rerio*), medaka (*Oryzias latipes*) and Japanese pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*).

Subunit	Zebrafish	Medaka	Japanese Pufferfish
CBX2			
CBX4			
CBX6	+	++	++
CBX7	+	++	++
CBX8	++	+	+
	++	++	++
	++	++	++

(+) Indicates that the gene is present in the genome as a singleton; (++) indicates that the corresponding subunit is encoded by two genes.

The other genes encoding PRC components not found in zebrafish include the RBBP7 subunit of the PRC2 core complex and HDAC2, which is an auxiliary protein of ncPRC1.6. Retinoblastoma-binding proteins 4 and 7 (RBBP4 and RBBP7) are highly similar, sharing about 90% amino acid identity. These proteins are members of the WD40 repeat protein family folding into a  $\beta$ -propeller allowing simultaneous binding to the H3 and H4 histone dimer and the PRC2 complex [51]. In addition, the individual knockdown of *Rbbp4* or *Rbbp7* does not impair embryonic development, while the simultaneous knockdown of the two genes causes embryonic lethality during the morula-to-blastocyst transition [52]. To date, there is no known functional difference between RBBP4 and RBBP7 within PRC2, and consequently, the absence of RBBP7 orthologs in zebrafish is unlikely to affect PRC2 function. Histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 are auxiliary proteins found in the ncPRC1.6 complex [26,53] coupling H2A119ub1 ubiquitination to the deacetylation of histones H3 and H4. Because the inactivation of both *Hdac1* and *Hdac2* is required to generate a phenotype in mouse tissues, it is believed that the activity of HDAC1 and HDAC2 is mostly redundant [54,55]. Moreover, individual *Hdac1/2* disruption in embryonic stem cells (ESCs) is not associated with changes in chromatin modifications performed by the enzymes, such as histone H3 acetylation (H3ac) or H3K27ac [53,56]. Thus, the absence of an HDAC2 ortholog in zebrafish is not expected to change the conservation of ncPRC1.6 function or the H2A119ub1–H3/H4 deacetylation coupling.

Hence, an investigation into the zebrafish genes encoding PRC1 and PRC2 subunits reveals that in spite of the loss of several genes coding for PRC components, the diversity and complexity of the complexes are conserved in this organism. This makes the zebrafish a good model for studying Polycomb repression during development.

### 3. Genetic Approaches to Study Zebrafish Polycomb Group Gene Function

During the last two decades, the development of powerful reverse genetic approaches has propelled the investigation of gene function in zebrafish.

Morpholinos (morpholino phosphorodiamidate anti-sense oligonucleotides; MOs) are oligonucleotide analogs using morpholine rings to replace the ribose backbone [57]. MOs are resistant to nucleases and act through a stable base pairing with RNA interfering with mRNA splicing or protein synthesis and resulting in a penetrant gene knockdown

in zebrafish [58]. Although MO-mediated gene knockdown cannot be considered a real genetic manipulation because genomic DNA remains unchanged, MOs have proven to be a powerful tool for the assessment of gene function during zebrafish development. MOs, like other gene knockdown-based approaches, have a number of limitations. In particular, since MOs do not induce heritable genetic alterations, the degree of knockdown could be variable and the efficacy is limited to about 3 days post-injection in zebrafish embryos. Another drawback relies on potential off-target and toxicity effects. In particular, MOs tend to activate the Tp53 pathway leading to non-specific phenotypes of embryonic defects and neuronal apoptosis, although these effects could be partially limited through the co-injection of tp53-MOs [59]. In addition, as the generation of genetic mutations has become more important in zebrafish genetics, a number of studies pointed out discrepancies between MO-mediated and knockout-mediated phenotypes [60–63], even if in a number of cases, these differences could be due to a genetic compensation mechanism in the mutants [64]. Nevertheless, MO-based knockdown remains a precious tool for a rapid assessment of gene function during zebrafish development.

Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) was the first reverse genetic method applied in zebrafish in order to identify point mutations generated through N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) chemical mutagenesis, in a defined gene [65]. The approach has been applied at a large scale [41], and tens of thousands zebrafish mutants are available. However, in spite of being extremely powerful, TILLING suffers from several limitations. The method relies on random chemical mutagenesis, and it might statistically be more difficult to obtain mutants for small-size genes; some sequences could have a weak mutagenic potential, mutations in a given gene might not be located at a suitable position, and several other mutations might be present in the zebrafish genome in addition to the mutation of interest.

The implementation of the programmable site-specific endonucleases, as the most efficient and versatile tool to manipulate any genomic sequence, revolutionized reverse genetics in zebrafish and bypassed the limitations of the previous technologies [66,67]. These programmable site-specific endonucleases, the zinc-finger nucleases (ZFNs), the transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA-guided Cas9 nucleases (CRISPR/Cas9) allow a precise modification of the zebrafish genome at any gene and at a chosen position.

These different reverse genetic tools have been applied to study the molecular function of a number of genes coding for PRC1 and PRC2 components in zebrafish (Table 4).

**Table 4.** Genetic studies of zebrafish genes coding for PRC1 and PRC2 components.

Gene	Technique	Allele	References
<i>ezh1</i>	MO	-	[68]
	TALEN	ul3	[69]
	CRISPR/Cas9	b1394	[70]
<i>ezh2</i>	MO	-	[71]
	ENU	hu5670	[72]
	TALEN	ul2	[73]
	ENU	sa1199 <sup>2</sup>	[70,71,74]
	CRISPR/Cas9	b1392	[70]
<i>eed</i>	TALEN	ul4	[75]
<i>suz12a/b</i>	CRISPR/Cas9		[76]
<i>rbbp4</i>	MO	-	[77]
	CRISPR/Cas9	is60	[78]
<i>rnf2</i>	MO	-	[79]
	ZFN	ib131	[80]
	CRISPR/Cas9	f5, f8	[81]
<i>pcgf1</i>	MO	-	[82]
	TALEN	ul1	[83]

Table 4. Cont.

Gene	Technique	Allele	References
<i>bmi1a/b</i>	MO	-	[84,85]
<i>phc1</i>	MO	-	[86]
<i>phc2a</i>	MO	-	[87]
<i>yaf2</i>	MO	-	[88]
<i>bcor</i>	MO	-	[89,90]
<i>kdm2bb</i>	MO	-	[91]
<i>usp7</i>	MO	-	[92]
<i>skp1</i>	IM <sup>1</sup>	hi3970Tg	[93]
<i>wdr5</i>	CRISPR/Cas9	zju131	[94]
<i>auts2a</i>	TALEN	ncb104	[95]
<i>mgaa</i>	MO	-	[96]
	TALEN	ihb801	[97]
<i>max</i>	MO	-	[98]
<i>hdac1</i>	MO	-	[99]
	IM	hi1618Tg	[99]

<sup>1</sup> IM, insertional mutagenesis based on the random integration of mouse retroviral vectors [100]; <sup>2</sup> ezh2 (sa1199) is a hypomorphic allele capable of supporting near-normal development [70,74].

Complementary to gene knockdown and knockout experiments, pharmacological approaches to inactivate PRC1 and PRC2 function could be applied. PRC complexes have been reported to be involved in the growth of various tumors and are thus considered as targets for cancer therapy. Therefore, extensive searches for molecules that would inhibit PRC enzymatic activity or stability have been conducted. Several potent EZH2-specific inhibitors, including GSK126 [101], have been developed. These inhibitors bind to the catalytic domain of EZH2 and compete with S-adenosyl-methionine, the methyl donor of the methyltransferase activity. In addition to EZH2 catalytic inhibitors, other small molecules target the H3K27me3 binding pocket of EED and inhibit the allosteric activation of EZH2 by preventing the EED–H3K23me3 interactions [102,103]. Another approach to inhibit PRC2 activity is based on the disruption of the interaction between EED and EZH2 using peptide inhibitors, the drug astemizole or the natural compound wedelolactone [104–106]. Several PRC1 inhibitors have also been reported. In particular, RB-3 directly binds to RNF2-BMI1, blocks the association of RNF2-BMI1 with chromatin and inhibits H2AK119 ubiquitylation [107]. However, to date, only few studies have applied pharmacological approaches to study Polycomb repression in zebrafish [68,73,108].

#### 4. Polycomb Group Proteins Support the Development and Viability of Zebrafish

##### 4.1. Role of PRC1 in Zebrafish Development

Most of the experiments addressing the function of PcG genes in vivo have been conducted in mice, and both cPRC1 and ncPRC1 have important roles in mouse development [8]. Homozygous and heterozygous *Ring1* mutant mice are viable but present anterior transformations and other abnormalities of the axial skeleton [109], whereas *Rnf2* is essential for mouse embryogenesis as *Rnf2* loss of function results in lethality during gastrulation [110]. This difference indicates that *Ring1* and *Rnf2* have non-redundant functions during mouse development. The zebrafish has a single gene, *rnf2*, coding for the catalytic subunit of cPRC1/ncPRC1 complexes. Surprisingly, ZFN-mediated inactivation of *rnf2* generates embryonically viable zebrafish mutants allowing the study of *rnf2* in vertebrate development [80]. The mutants die at around 4–5 days post-fertilization (dpf) and exhibit developmental defects. In particular, *rnf2* mutants lack the pectoral fins, likely due to failure in the terminal differentiation dependent on Fgf signaling as the fin

developmental program initiates properly with the expression of *tbx5*. In addition, cranial neural crest-derived cartilage precursors migrate into the pharyngeal arches but fail to differentiate into chondrocytes, leading to severe craniofacial defects in *rnf2* zebrafish mutants at about 72 h post-fertilization (hpf) [111]. The reason why *rnf2*-deficient zebrafish mutants survive gastrulation, while *Rnf2* mutant mice do not, remains unclear. One possible explanation is that the maternally deposited *Rnf2* mRNA and protein are sufficient to allow early embryonic development. Indeed, in zebrafish, maternal products are expected to be degraded in the maternal-to-zygotic transition (MZT) which takes place at around cleavage cycle 10, whereas MZT occurs at cleavage cycle 1 in mice [112]. In this line, it has been shown that *Ring1* and *Rnf2* heterozygous embryos generated from double *Ring1*- and *Rnf2*-deficient oocytes and wild-type spermatozooids cannot develop after the 2twocell stage, demonstrating the essential contribution of the *Ring1/Rnf2* maternal products in the very early developmental stages [113].

From the Polycomb group RING finger genes, knockout mice have been generated for *Pcgf2* [114], *Bmi1* [115], *Pcgf3* and *Pcgf5* [116], and *Pcgf6* [117], whereas *pcgf1* is the only PCGF member for which a knockout zebrafish line has been described [83]. TALEN-mediated inactivation of *pcgf1* does not affect the viability nor the fertility of zebrafish. However, the growth rate in early developmental stages is reduced in the absence of *pcgf1* gene function, and a significant number of mutant fish show signs of premature aging. Since *pcgf1*-deficient fish are viable until adulthood, it might be deduced that ncPRC1.1 is dispensable in zebrafish. In this regard, it is worth noting that the *pcgf1* gene is absent from the genomes of the Tetraodontidae *Tetraodon nigroviridis* and *Takifugu rubripes* [49]. Alternatively, a genetic compensation mechanism could rescue the loss of ncPRC1.1 in the *pcgf1*-deficient fishes. Such a genetic compensation mechanism in the mutant zebrafish line could also explain the marked MO-*pcgf1* phenotype [82]. MO-*pcgf1* embryos have a small head, a reduced or even absent telencephalon and a reduced body size. MO-mediated *pcgf1* knockdown is responsible for an increase in the expression of neural marker genes such as *sox2*, *otx2* and *ngn1* leading to an abnormal activation of neural induction, together with a decrease in the expression of the pluripotent markers *oct4*, *hes1* and *nanog*. This abnormal neural induction and inhibition of neural stem cell self-renewal might then account for the morphant phenotype.

So far, the investigation of the individual contribution of each cPRC1 and ncPRC1 variant complex in the development remains challenging, in part because only a small number of mutants have been described, but also because PRC1 auxiliary proteins could be shared with cellular processes unrelated to the Polycomb repression. In zebrafish, *Rnf2* is the catalytic subunit common to all nPRC1 and ncPRC1 complexes, and its loss of function leads to the death of embryos at 4–5 dpf after the implementation of the body plan [80]. In contrast, *Yaf2* is a component of the ncPRC1 variant complexes but is absent in cPRC1 assemblies. Moreover, *Yaf2* is redundant in ncPRC1 since it could be replaced by one of its two paralogs *Rybpa* and *Rybpb*. However, MO-*yaf2* injection into embryos arrests zebrafish development before somatogenesis at around 16 hpf [88]. The fact that the phenotype of *yaf2* morphants is much stronger than the phenotype of the *rnf2* mutants indicates that *Yaf2* might have an ncPRC1-independent function in zebrafish development, in addition to its contribution to the ncPRC1 activity, and complicates the study of the function of the distinct PRC1 complexes. A comparable picture has been described in mice. *Pcgf6* and *L3mbtl* are two components of the ncPRC1.6 complex and while *Pcgf6* mutants survive to adulthood [117], *L3mbtl* mutants display a strong embryonic phenotype and die at around the time of gastrulation [118].

#### 4.2. Role of PRC2 in Zebrafish Development

PRC2 plays a crucial role in development as depletion of the core subunits *Ezh2*, *Eed* and *Suz12* in mice is embryonic lethal around gastrulation [119–121]. In zebrafish, mutants are also available for *ezh2*, *eed* and *suz12a/b* (Table 4), but in contrast to mice, mutants deficient for PRC2 function gastrulate and form their body plan normally but die between

8 and 12 dpf [72,73,75,76]. The presence of the maternally deposited products may explain the correct development of the zygotic mutants. The involvement of maternal PRC2 has been explored through the exposure of zebrafish embryos at the 1–2 cell stage to Ezh1/2 inhibitors [73,108,122]. Pharmacological inhibition of maternal PRC2 elicits additional developmental defects, but embryos survive gastrulation and develop, indicating that maternal PRC2 is not required for early development and global implementation of the body plan. Moreover, the generation of maternal zygotic (MZ) *ezh2* mutant embryos through germ cell transplantation revealed that MZ*ezh2* mutants gastrulate and form a normal body organization but die at around 2 dpf [72]. Thus, maternal PRC2 contributes to zebrafish development but is not required for the very early steps.

Rbbp4 and Ezh1 are two other subunits of the PRC2 core complex. Zebrafish mutants lacking *rbbp4* gene function are lethal between 5 and 10 dpf and show a severe neurogenic phenotype with microcephaly and micropthalmia [78,123]. However, this phenotype is not necessarily fully assigned to *rbbp4* loss of function since Rbbp4 has also PRC2-independent actions on chromatin metabolism, such as actions on histone deacetylation and chromatin assembly. In contrast to all other PRC2 core complex components, *ezh1*-deficient zebrafish mutants are viable, fertile and without obvious phenotype, indicating that Ezh1 is dispensable for zebrafish development [69], as is also the case in mice [124,125].

EZH1 and EZH2 are both able to monomethylate H3K27 *in vitro*, but the role of PRC2 in the deposition of H3K27me1 *in vivo* still remains a point of discussion [126–129]. Knock-out of *Eed* and *Suz12* in mouse ESC lines as well as PRC2 knockdown experiments in ESCs result in a global loss of H3K27me2 and H3K27me3 levels, but at best in a partial reduction of H3K27me1 [121,130,131]. The study of bulk histone modifications in *eed*-deficient zebrafish larvae at 9 dpf revealed a dramatic decrease in H3K27me2 and H3K27me3 marks, but unchanged global levels of H3K27me1, suggesting that monomethylation of H3K27 is independent of the PRC2 activity in the mutants [75]. Because EHMT1 (Glp) and EHMT2 (G9a) have been shown to be able to monomethylate H3K27, both *in vitro* and in mouse ESCs [132–134], their zebrafish orthologs Ehmt1a, Ehmt1b and Ehmt2 could be the histone methyltransferases responsible for the maintenance of H3K27me1 levels in the absence of PRC2 activity.

Investigations on histone modifications in TALEN-mediated *eed* zebrafish mutants revealed that global H2AK119ub levels are still maintained in the absence of PRC2 function at 9 dpf [75], presumably as a consequence of the H3K27me3-independent recruitment of ncPRC1 complexes. This parallels observations made in mouse ESCs where Ezh1/Esh2 double knockout does not impair H2AK119ub levels [127]. However, in another study using maternal–zygotic MZ*ezh2* mutants, it has been reported that loss of Ezh2 function from both maternal and zygotic origins results in the absence of H3K27me3 marks together with a dramatic loss of Rnf2 (cPRC1 and ncPRC1) recruitment to chromatin [135]. This puzzling study did not document whether H2AK119ub marks are also lost and contrasts with data from mouse ESCs where ncPRC1 has been shown to be recruited to chromatin independently of PRC2 [29,33]. One possible explanation could be that in *eed* mutants, the maternal PRC2 activity is sufficient to deposit enough H3K27me3 marks to initiate the recruitment of cPRC1 complexes in early developmental stages. Then, as development progresses, H2AK119ub modifications are propagated in a PRC2-independent manner through the action of ncPRC1 assemblies. Indeed, it has been shown that ncPRC1 could be recruited to chromatin through the binding of RYBP/YAF2 to H2AK119ub marks. This hypothesis would explain the absence of Rnf2 recruitment to chromatin in MZ*ezh2* mutants and would explain the more severe phenotype of the *rnf2* and MZ*ezh2* mutants in comparison to *eed* and *ezh2* mutants. This is also in agreement with the order of Polycomb complex recruitment in early zebrafish embryos [136]. Before zygotic genome activation (ZGA), H3K27me3 marks are low-absent while H2AK119ub is present in chromatin. Then, at the ZGA stage, H2AK119ub enables PRC2.2 recruitment and H3K27me3 deposition.

Altogether, it is remarkable that zebrafish harboring mutation in genes coding for PcG genes and deficient for PRC1 and PRC2 activities survive gastrulation and die after body

plan formation. This feature makes the zebrafish a particularly suitable model for studying the role of PRC1 and PRC2 in the formation and maintenance of various organs.

#### 4.3. Function of Polycomb Repression in Zebrafish Digestive Tissues

A striking phenotype of the PRC2-deficient mutants is observed at the level of the intestine [73,75,137]. At 9 dpf, both *ezh2* and *eed* mutants present a marked alteration of the intestinal wall, which is strongly reduced and lacks folds at the level of the bulb. The intestine defects might prevent food uptake and might account for the larval death at about 12 dpf since that moment corresponds to the death time of unfed zebrafish larvae [138]. Interestingly, at 5 dpf, there is no structural difference in the intestinal wall between *ezh2*- or *eed*-deficient mutants and wild-type fish, suggesting that loss of PRC2 function does not impair intestine development but PRC2 activity is required for intestine maintenance. Histological analysis of the liver also shows defects in the organs of *ezh2*- or *eed*-deficient mutants at around 10 dpf [73,75,137]. In particular, the liver of PRC2-deficient larvae is characterized by a smaller size, disorganization in the organ and signs of steatosis associated with an increase in lipids and macrovesicles in the liver. In addition, a delay in pancreas development is also observed in PRC2-deficient larvae [73,75]. Intestines, livers and pancreases of zebrafish larvae lacking PRC2 function are smaller and disorganized but still express the tissue-specific terminal differentiation markers *fabp2* (fatty acid-binding protein 2, intestinal), *fabp10a* (fatty acid-binding protein 10a, liver basic) and *prss1* (serine protease 1, trypsin), respectively. This indicates that terminal differentiation of the digestive organs is unaffected in the absence of zygotic PRC2 function, yet the differentiation tissues are not maintained over time in the mutants. At the level of the digestive organs, the phenotypes of *ezh2*- and *eed*-deficient larvae are undistinguishable [73,75], excluding that Ezh1 and/or PRC2-independent Ezh2 functions could play a critical role in the development of these organs, at least until 12 dpf.

The *rnf2* mutation leads to a pleiotropic phenotype in 3 dpf zebrafish embryos, including mobility defects, lack of pectoral fins, defects in craniofacial development and pronounced heart edemas [80]. Moreover, in situ hybridization on *rnf2*-deficient embryos at 3 dpf using the terminal differentiation markers *fabp2*, *fabp10a* and *prss1* shows that loss of PRC1 function is responsible for a smaller intestine, an absence of terminal intestinal differentiation in the liver and the absence of the pancreatic lobe [139]. Thus, both PRC1 and PRC2 are required to maintain the differentiation status of digestive organs during zebrafish development.

#### 4.4. Polycomb Repression in Cardiac Cell Identity and Function

*MZezh2* mutants develop a stringy heart as one of the most prominent phenotypes [72]. Morphologically, at 2 dpf, the heart of *MZezh2* mutant embryos fails to undergo cardiac looping and develops as a straight heart tube with a smaller ventricle. In situ hybridization analyses studying the expression of cardiac markers during the development coupled with time-lapse imaging on transgenic lines expressing GFP in the developing heart revealed that myocardial precursors are specified in the absence of maternal and zygotic Ezh2 function in early stages. In the mutant, at 1.5 dpf, the bending of the heart tube does not occur and some myocardial cells detach from the ventricle and the atrium to become dispersed over the regular heart tube over time. At 2 dpf, a partial loss of expression of the terminal differentiation marker *nppa* is observed in the mutants. Thus, in *MZezh2* mutants, it is likely that myocardial cells fail to maintain their cardiac identity, leading to structural instability of the heart [72].

Zygotic *rnf2* mutant zebrafish have also been reported to harbor similar defects in cardiac development [81,139]. At 3 dpf, the heart of *rnf2* mutants shows a tubular-shaped morphology. Using single-heart RNA-Seq analyses, Chrispijn et al. [139] showed that *tbx2/3* were upregulated in the heart of *rnf2*-deficient mutant at 2 and more importantly at 3 dpf. This loss of *tbx* gene repression could then be responsible for a reduction in chamber-specific gene expression, a misbalance in cardiac cell types and the absence of cardiac looping

observed in PRC1-deficient embryos. However, PRC1 may also be involved in regulating cardiac contraction at no later than 24 hpf [81]. Indeed, *rnf2* deficiency disorganizes the sarcomere assembly in the zebrafish heart and causes defects in the conduction system [81].

#### 4.5. Polycomb Repression in Zebrafish Developmental Hematopoiesis

To identify chromatin factors involved during developmental hematopoiesis, a large-scale MO-based screen targeting zebrafish orthologs of 425 human chromatin factors has been conducted [140]. This screen identified factors that affect the development of primitive erythroid progenitors or regulate the development of definitive hematopoietic stem and progenitor cells. These chromatin regulators involved in hematopoiesis are associated not only with chromatin remodeling complexes, acetyltransferase complexes or deacetylase complexes, but also with the Polycomb repressive complexes PRC1 and PRC2 [140]. The role of PRC2 in hematopoiesis was further demonstrated by showing that *ezh1* knockdown induces an increase in phenotypic hematopoietic stem and progenitor cells because of enhanced hemogenic endothelium commitment, occurring at the expense of arterial endothelium maintenance in the ventral wall of the dorsal aorta [68]. Moreover, in spite of an increased number of hemogenic endothelium cells transitioning to arterial-fated endothelium cells due to *ezh1* loss of expression, *Ezh2* activity is subsequently required to increase hematopoietic stem and progenitor cell formation. This indicates that *Ezh1* and *Ezh2* do not play redundant or antagonistic roles in hemogenic endothelium specification/hematopoietic stem and progenitor cell formation but rather act as sequential regulators [68].

#### 4.6. Polycomb Repression and Nervous System Development in Zebrafish

Whole-mount in situ hybridization experiments performed on *eed*-deficient larvae at 5 dpf revealed that the expression of some stemness, neuronal and glial markers is altered, suggesting that neuronal differentiation is impaired in the absence of functional PRC2 [75]. Interestingly, despite a ubiquitous expression of *eed* in the zebrafish brain, loss of *eed* function results in neuronal gene expression alterations in relatively discrete areas of the mutant brains. For instance, the expression of *neurod1*, a neuronal precursor marker, is specifically lost in a subset region of the hindbrain of *eed* mutants. Thus, the effects of the loss of PRC2 activity appear to be strictly cell-specific, context-dependent and differentially affecting cell fates [75]. PRC1 has also been shown to be involved in the development of the zebrafish neural system [82,141]. In particular, loss of *rnf2* function leads to abnormal migration and differentiation of neural crest cells and neural precursors [141]. The formation of 5-HT serotonin neurons and myelinating glial cells is also defective in *rnf2*-deficient zebrafish embryos [141]. In addition, ectopic expression of enteric nervous system markers is found in the forebrain of *rnf2* mutant embryos as well as in the retina of *ezh2* and *eed* mutant embryos [73,75,141]. Thus, both PRC1 and PRC2 are involved in the development of the enteric nervous and central nervous systems. Although the role of PcG proteins in nervous system development is not well studied, the zebrafish appears to be a suitable model for conducting these investigations.

#### 4.7. Polycomb Repression in Cancer

PcG proteins control many essential cellular and developmental programs, and the alteration of genes coding for subunits of PRC1 and PRC2 complexes has been largely reported to be involved in tumorigenesis [8,11,142]. Although the zebrafish has been proven to be an excellent model for studying cancer development [143–145], the involvement of PRC1 and PRC2 in cancer biology still remains largely underexplored in zebrafish. However, a relationship between PRC2 and cancer development has been clearly established [76]. Homozygous loss of *suz12a* and *suz12b* functions is lethal at around 10 dpf, but the loss of three *suz12* alleles out of four (*suz12a*<sup>-/-</sup> and *suz12b*<sup>+/-</sup>, or *suz12a*<sup>+/-</sup> and *suz12b*<sup>-/-</sup>) significantly accelerates the onset and increases the penetrance of malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs) in a *tp53*- and *nfl*-deficient zebrafish model of MPNSTs. In addition, *Suz12* deficiency expands the spectrum of tumor types in *tp53/nfl*-deficient fish,

as lymphoid leukemia, soft tissue sarcoma and pancreatic adenocarcinoma are found in addition to MPNSTs. Interestingly, these tumors are also identified in the human spectrum of *SUZ12*-deficient malignancies indexed in the AACR Project Genomics Evidence Neoplasia Information Exchange (GENIE) database, thus validating zebrafish as a relevant genetic model for studying the involvement of PcG genes in cancer [76].

A link between PcG genes and zebrafish cancers was further established with the study of the zebrafish *asx1* mutant [146,147]. *ASXL1* is one of the three human orthologs of the *Drosophila Asx* gene, which is highly conserved across various species [148]. *ASXL1* is a regulatory subunit of the Polycomb repressive-deubiquitinase (PR-DUB) complex that counteracts the PRC1 action through the removal of the H2AK119ub mark [149,150]. The *ASXL1* gene has been found altered in several malignant myeloid diseases such as myeloproliferative neoplasms, myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia and de novo or secondary cases of acute myeloid leukemia [151–156]. The TALEN-mediated homozygous inactivation of the zebrafish *asx1* gene results in larval death by 14 dpf, with defects in the liver and the intestine and muscular atrophy [146]. By contrast, heterozygous *asx1*<sup>+/-</sup> fish developed normally and were undistinguishable from their wild-type siblings but died prematurely starting at about 18 weeks of age. In addition, about half of the heterozygous *asx1*<sup>+/-</sup> fish developed myeloproliferative neoplasms at 5 months, supporting the use of zebrafish as a model for studying the role of Polycomb repression in cancer.

#### 4.8. Polycomb Repression and Behavior

The study of the locomotor activity of *eed*-deficient zebrafish larvae at 5 dpf during alternating light and dark phases revealed that the mutants are hyperactive compared to wild-type siblings. The hyperactive phenotype of PRC2-deficient mutants is particularly marked and significant during the dark cycles [75]. Interestingly, despite their hyperactive phenotype, the *eed* mutants do not present an increase in their exploration behavior in thigmotaxis assays. This observation shows that Polycomb repression and PRC2 function are involved in the control of zebrafish behavior, although the underlying neurological mechanism is still unknown.

Another insight into the involvement of the PRC2 complex in zebrafish behavior came from the study of the topoisomerase II $\alpha$  (Top2a) [157]. Inhibitors of Top2a activity such as sodium salicylate and MO-*top2a*, as well as mutations in the *can4* gene encoding Top2a, alter the robust social preference for age-matched conspecifics at 3 weeks of age. In addition, RNA-Seq analyses performed on *can4*-deficient fish at 3 dpf show that Top2a depletion in zebrafish regulates autism risk genes, while ChIP-Seq data suggest that PRC2 and H3K27me3 mediate Top2a-dependent gene regulation. The antagonistic relationship between Top2a and H3K27me3 was further demonstrated by the use of specific Ezh2 inhibitors. Thus, Top2a plays a crucial role in promoting the development of social behavior in zebrafish by the maintenance of a regulatory network that selectively controls the expression of a large subset of autism risk genes. Furthermore, Top2a likely functions by antagonizing PRC2 function and H3K27me3-mediated gene silencing [157].

## 5. Concluding Remarks and Perspectives

PRC1 and PRC2 are families of chromatin-modifying complexes, which have been the focus of intense attention because of their fundamental role in the control of gene expression programs that govern a large variety of cellular and developmental processes. Research on the function of PRC1 and PRC2 in vivo largely relies on studies in *Drosophila* and mice. However, the zebrafish has recently emerged as a powerful genetic model for investigating many vertebrate physiological and pathological processes. In this review, we discuss the study of the role of the PRC1 and PRC2 complexes from a zebrafish perspective. The efficacy of reverse genetic tools allows the generation of various zebrafish models harboring knockdown or knockout genes encoding subunits of the PRC1 and PRC2 complexes (Table A1). Strikingly, and in contrast to mice, zebrafish deficient for PRC1 or PRC2 activities

survive gastrulation and develop until the late embryonic or early larval stages, respectively. The implementation of the body plan together with the relative transparency of the zebrafish embryos allows an exceptional visualization of the development of the organs in the absence of PRC function. Hence, the zebrafish model allows light to be shed on the role of PRC1 and PRC2 in the maintenance of the differentiation state of the heart and the digestive organs, as well as in hematopoiesis and nervous system development. Furthermore, zebrafish mutants allow researchers to address the question of the involvement of PRC complexes in human pathologies, such as tumorigenesis, and generate models to study cancer development in humans. Going forward, research on Polycomb repressive complexes using the zebrafish model might hold great promise and present remarkable opportunities to unravel the function of PRC1 and PRC2 in various physiological and pathological processes in the coming years.

**Author Contributions:** Original draft preparation, M.H. and P.-O.A.; writing and editing, P.-O.A.; collection of data from the literature, M.H., L.R., P.V. and P.-O.A.; revision of the manuscript, M.H., L.R., P.V., X.L.B. and P.-O.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the CNRS, Inserm, the University of Lille and CHU Lille.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish it.

## Appendix A

**Table A1.** Phenotypes of the PRC1/PRC2 morphants and mutants.

Gene	Morphant/Mutant	Phenotype	References
<i>ezh1</i>	MO- <i>ezh1</i>	Mild decrease in primitive erythropoiesis	[140]
	MO- <i>ezh1</i>	Increase in hematopoietic stem and progenitor cells via enhanced commitment to hemogenic fate	[68]
	<i>ezh1</i> (ul3)	Viable, fertile, without obvious phenotype	[69]
	<i>ezh1</i> (b1394)	Viable, fertile, without obvious phenotype	[70]
<i>ezh2</i>	<i>ezh2</i> (hu5670)	Lethal around 9–12 dpf. Intestine and liver defects	[137]
	MZ <i>ezh2</i> (hu5670)	Lethal around 2 dpf. Heart, liver and pancreas defects	[72]
	<i>ezh2</i> (ul2)	Lethal around 12 dpf. Intestine defects, liver steatosis, smaller pancreas	[73]
	<i>ezh2</i> (sal1199)	Hypomorph allele. Viable with an open mouth phenotype (prominent lower jaw) and mild appendage patterning defects	[70,74]
	<i>ezh2</i> (b1392)	Lethal between 7 and 14 dpf. Craniofacial defects (reduced branchiostegal ray 3 length)	[70]
<i>eed</i>	MO- <i>eed</i>	Intermediate decrease in definitive hematopoietic stem cells	[140]
	<i>eed</i> (ul4)	Lethal around 10–12 dpf. Reduced size of the pancreas, hepatic steatosis and a loss of intestinal structures. Neuronal differentiation defects. Hyperactive behavior	[75]
<i>suz12a/b</i>	MO- <i>suz12b</i>	Intermediate decrease in primitive erythropoiesis and definitive hematopoietic stem cells	[140]
	<i>suz12a</i> ; <i>suz12b</i>	Lethal between 8 and 15 dpf ( <i>suz12a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>suz12b</i> <sup>-/-</sup> )	[76]
<i>rbbp4</i>	MO- <i>rbbp4</i>	Intermediate decrease in primitive erythropoiesis	[140]
	MO- <i>rbbp4</i>	Impaired fin regeneration	[77]
	<i>rbbp4</i> (is60)	Lethal between 5 and 10 dpf. Microcephaly and microphthalmia	[78]
<i>skp1</i>	<i>skp1</i> (hi3970Tg)	Small head and eyes, underdeveloped liver/gut	[93]
<i>jarid2a/b</i>	MO- <i>jarid2a</i>	Intermediate decrease in primitive erythropoiesis	[140]
	MO- <i>jarid2b</i>	Intermediate decrease in primitive erythropoiesis	[140]

Table A1. Cont.

Gene	Morphant/Mutant	Phenotype	References
rnf2	MO-rnf2	Reduction in definitive hematopoietic stem cells	[79]
	rnf2(ibl31)	Lethal at around 4–5 dpf. Absence of pectoral fins, craniofacial defects, smaller intestine, absence of terminal intestinal differentiation in the liver, absence of pancreatic lobe, heart defects	[80,111,139]
	rnf2(f5)–rnf2(f8)	Defective craniofacial structures, small eyes, absence of pectoral fins, pericardial edema. Disruption of cardiac sarcomere assembly. Abnormal development of central and enteric nervous systems	[81,141]
pcgf1	MO-pcgf1	Small head, reduced (or even absent) telencephalon, abnormal activation of the neural induction process	[82]
	pcgf1(ul1)	Viable, fertile, early signs of aging	[83]
bmi1a/b	MO-bmi1a/b	Microcephaly	[85]
	MO-bmi1a/b	Reduction in definitive hematopoietic stem cells	[79]
cbx2	MO-cbx2	Intermediate decrease in primitive erythropoiesis	[140]
cbx6a/b	MO-cbx6a	Mild decrease in primitive erythropoiesis and intermediate decrease in definitive hematopoietic stem cells	[140]
	MO-cbx6b	Strong decrease in definitive hematopoietic stem cells	[140]
cbx7a	MO-cbx7a	Mild decrease in primitive erythropoiesis	[140]
cbx8a/b	MO-cbx8a	Intermediate decrease in primitive erythropoiesis	[140]
	MO-cbx8b	Intermediate decrease in primitive erythropoiesis and strong decrease in definitive hematopoietic stem cells	[140]
phc2a	MO-phc2a	Abnormal epibolic movements and a thick tailbud or incomplete covering of the yolk plug	[87]
yaf2	MO-yaf2	Developmental arrest before the one-somite stage. Central nervous system degeneration	[88]
bcor	MO-bcor	Medial displacement of the eyes and severe colobomata. Abnormal neural tube development	[89,90]
kdm2bb	MO-kdm2bb	Early embryonic lethality at 24 hpf at high MO doses, and no phenotype at low MO doses	[91]
usp7	MO-usp7	Alteration in craniofacial development (mild changes on the branchial arches)	[92]
wdr5	MO-wdr5	Intermediate decrease in primitive erythropoiesis	[140]
	MO-wdr5	Small liver phenotype	[94]
	wdr5(zju131)	Lethal at around 8 dpf. Curved body and undeveloped liver	[94]
auts2a	auts2a(ncb104)	Viable and normal morphology. High variability and delayed escape behavior	[95]
mgaa	MO-mgaa	Severe brain abnormalities, small eyes, failure in heart tube looping with edema, lack of pigmentation, reduced levels of circulating erythrocytes	[96]
	mgaa(ihb801)	Reduction of ventral tail fin at 1 dpf	[97]

## References

- Kassis, J.A.; Kennison, J.A.; Tamkun, J.W. Polycomb and Trithorax Group Genes in *Drosophila*. *Genetics* **2017**, *206*, 1699–1725. [[CrossRef](#)]
- Lewis, E.B. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **1978**, *276*, 565–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Levine, S.S.; Weiss, A.; Erdjument-Bromage, H.; Shao, Z.; Tempst, P.; Kingston, R.E. The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 6070–6078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Boyer, L.A.; Plath, K.; Zeitlinger, J.; Brambrink, T.; Medeiros, L.A.; Lee, T.I.; Levine, S.S.; Wernig, M.; Tajonar, A.; Ray, M.K.; et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **2006**, *441*, 349–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bracken, A.P.; Dietrich, N.; Pasini, D.; Hansen, K.H.; Helin, K. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1123–1136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tolhuis, B.; de Wit, E.; Muijters, I.; Teunissen, H.; Talhout, W.; van Steensel, B.; van Lohuizen, M. Genome-wide profiling of PRC1 and PRC2 Polycomb chromatin binding in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 694–699. [[CrossRef](#)]

7. Varlet, E.; Ovejero, S.; Martinez, A.M.; Cavalli, G.; Moreaux, J. Role of Polycomb Complexes in Normal and Malignant Plasma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8047. [[CrossRef](#)]
8. Piunti, A.; Shilatifard, A. The roles of Polycomb repressive complexes in mammalian development and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 326–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Scholl, A.; De, S. Epigenetic Regulation by Polycomb Complexes from Drosophila to Human and Its Relation to Communicable Disease Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12285. [[CrossRef](#)]
10. Bölicke, N.; Albert, M. Polycomb-mediated gene regulation in human brain development and neurodevelopmental disorders. *Dev. Neurobiol.* **2022**, *82*, 345–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Dong, G.J.; Xu, J.L.; Qi, Y.R.; Yuan, Z.Q.; Zhao, W. Critical Roles of Polycomb Repressive Complexes in Transcription and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wang, H.; Wang, L.; Erdjument-Bromage, H.; Vidal, M.; Tempst, P.; Jones, R.S.; Zhang, Y. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **2004**, *431*, 873–878. [[CrossRef](#)]
13. de Napoles, M.; Mermoud, J.E.; Wakao, R.; Tang, Y.A.; Endoh, M.; Appanah, R.; Nesterova, T.B.; Silva, J.; Otte, A.P.; Vidal, M.; et al. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev. Cell* **2004**, *7*, 663–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Cao, R.; Wang, L.; Wang, H.; Xia, L.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Jones, R.S.; Zhang, Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **2002**, *298*, 1039–1043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Müller, J.; Hart, C.M.; Francis, N.J.; Vargas, M.L.; Sengupta, A.; Wild, B.; Miller, E.L.; O'Connor, M.B.; Kingston, R.E.; Simon, J.A. Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* **2002**, *111*, 197–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Schwartz, Y.B.; Kahn, T.G.; Nix, D.A.; Li, X.Y.; Bourgon, R.; Biggin, M.; Pirrotta, V. Genome-wide analysis of Polycomb targets in Drosophila melanogaster. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 700–705. [[CrossRef](#)]
18. Fursova, N.A.; Blackledge, N.P.; Nakayama, M.; Ito, S.; Koseki, Y.; Farcas, A.M.; King, H.W.; Koseki, H.; Klose, R.J. Synergy between Variant PRC1 Complexes Defines Polycomb-Mediated Gene Repression. *Mol. Cell* **2019**, *74*, 1020–1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Schuettengruber, B.; Bourbon, H.M.; Di Croce, L.; Cavalli, G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell* **2017**, *171*, 34–57. [[CrossRef](#)]
20. Blackledge, N.P.; Klose, R.J. The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 815–833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Van Mierlo, G.; Veenstra, G.J.C.; Vermeulen, M.; Marks, H. The Complexity of PRC2 Subcomplexes. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 660–671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yu, J.R.; Lee, C.H.; Oksuz, O.; Stafford, J.M.; Reinberg, D. PRC2 is high maintenance. *Genes Dev.* **2019**, *33*, 903–935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Glancy, E.; Ciferri, C.; Bracken, A.P. Structural basis for PRC2 engagement with chromatin. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2021**, *67*, 135–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fischer, S.; Weber, L.M.; Liefke, R. Evolutionary adaptation of the Polycomb repressive complex 2. *Epigenetics Chromatin* **2022**, *15*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wang, J.; Wang, G.G. No Easy Way Out for EZH2: Its Pleiotropic, Noncanonical Effects on Gene Regulation and Cellular Function. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gao, Z.; Zhang, J.; Bonasio, R.; Strino, F.; Sawai, A.; Parisi, F.; Kluger, Y.; Reinberg, D. PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol. Cell* **2012**, *45*, 344–356. [[CrossRef](#)]
27. Illingworth, R.S. Chromatin folding and nuclear architecture: PRC1 function in 3D. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2019**, *55*, 82–90. [[CrossRef](#)]
28. Geng, Z.; Gao, Z. Mammalian PRC1 Complexes: Compositional Complexity and Diverse Molecular Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Tavares, L.; Dimitrova, E.; Oxley, D.; Webster, J.; Poot, R.; Demmers, J.; Bezstarosti, K.; Taylor, S.; Ura, H.; Koide, H.; et al. RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell* **2012**, *148*, 664–678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Morey, L.; Aloia, L.; Cozzuto, L.; Benitah, S.A.; Di Croce, L. RYBP and Cbx7 define specific biological functions of polycomb complexes in mouse embryonic stem cells. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 60–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Rose, N.R.; King, H.W.; Blackledge, N.P.; Fursova, N.A.; Ember, K.J.; Fischer, R.; Kessler, B.M.; Klose, R.J. RYBP stimulates PRC1 to shape chromatin-based communication between Polycomb repressive complexes. *Elife* **2016**, *5*, e18591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Blackledge, N.P.; Zhou, J.C.; Tolstorukov, M.Y.; Farcas, A.M.; Park, P.J.; Klose, R.J. CpG islands recruit a histone H3 lysine 36 demethylase. *Mol. Cell* **2010**, *38*, 179–190. [[CrossRef](#)]
33. He, J.; Shen, L.; Wan, M.; Taranova, O.; Wu, H.; Zhang, Y. Kdm2b maintains murine embryonic stem cell status by recruiting PRC1 complex to CpG islands of developmental genes. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 373–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Farcas, A.M.; Blackledge, N.P.; Sudbery, I.; Long, H.K.; McGouran, J.F.; Rose, N.R.; Lee, S.; Sims, D.; Cerase, A.; Sheahan, T.W.; et al. KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. *Elife* **2012**, *1*, e00205. [[CrossRef](#)]
35. Jolma, A.; Yan, J.; Whittington, T.; Toivonen, J.; Nitta, K.R.; Rastas, P.; Morgunova, E.; Enge, M.; Taipale, M.; Wei, G.; et al. DNA-binding specificities of human transcription factors. *Cell* **2013**, *152*, 327–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gaubatz, S.; Wood, J.G.; Livingston, D.M. Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9190–9195. [[CrossRef](#)]
37. Stielow, B.; Finkernagel, F.; Stiewe, T.; Nist, A.; Suske, G. MGA, L3MBTL2 and E2F6 determine genomic binding of the non-canonical Polycomb repressive complex PRC1.6. *PLoS Genet.* **2018**, *14*, e1007193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Engeszer, R.E.; Patterson, L.B.; Rao, A.A.; Parichy, D.M. Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* **2007**, *4*, 21–40. [[CrossRef](#)]
39. Laale, H.W. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* **1977**, *10*, 121–173. [[CrossRef](#)]
40. Howe, K.; Clark, M.D.; Torroja, C.F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J.E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **2013**, *496*, 498–503. [[CrossRef](#)]
41. Kettleborough, R.N.; Busch-Nentwich, E.M.; Harvey, S.A.; Dooley, C.M.; de Bruijn, E.; van Eeden, F.; Sealy, I.; White, R.J.; Herd, C.; Nijman, I.J.; et al. A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature* **2013**, *496*, 494–497. [[CrossRef](#)]
42. Kawakami, K. Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev. Dyn.* **2005**, *234*, 244–254. [[CrossRef](#)]
43. Bedell, V.M.; Westcot, S.E.; Ekker, S.C. Lessons from morpholino-based screening in zebrafish. *Brief. Funct. Genom.* **2011**, *10*, 181–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Li, Y.; Jia, Z.; Zhang, S.; He, X. Progress in Gene-Editing Technology of Zebrafish. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Taylor, J.S.; Van de Peer, Y.; Braasch, I.; Meyer, A. Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2001**, *356*, 1661–1679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Hoegg, S.; Brinkmann, H.; Taylor, J.S.; Meyer, A. Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J. Mol. Evol.* **2004**, *59*, 190–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Sémon, M.; Wolfe, K.H. Reciprocal gene loss between Tetraodon and zebrafish after whole genome duplication in their ancestor. *Trends Genet.* **2007**, *23*, 108–112. [[CrossRef](#)]
48. Brunet, F.G.; Roest Crolius, H.; Paris, M.; Aury, J.-M.; Gibert, P.; Jaillon, O.; Laudet, V.; Robinson-Rechavi, M. Gene loss and evolutionary rates following whole-genome duplication in teleost fishes. *Mol. Biol. Evol.* **2006**, *23*, 1808–1816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Le Faou, P.; Völkel, P.; Angrand, P.O. The zebrafish genes encoding the Polycomb repressive complex (PRC) 1. *Gene* **2011**, *475*, 10–21. [[CrossRef](#)]
50. Raby, L.; Völkel, P.; Le Bourhis, X.; Angrand, P.O. The *Polycomb* Orthologues in Teleost Fishes and Their Expression in the Zebrafish Model. *Genes* **2020**, *11*, 362. [[CrossRef](#)]
51. Vizán, P.; Beringer, M.; Ballaré, C.; Di Croce, L. Role of PRC2-associated factors in stem cells and disease. *FEBS J.* **2015**, *282*, 1723–1735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Xiao, L.; Dang, Y.; Hu, B.; Luo, L.; Zhao, P.; Wang, S.; Zhang, K. Overlapping functions of RBBP4 and RBBP7 in regulating cell proliferation and histone H3.3 deposition during mouse preimplantation development. *Epigenetics* **2022**, *17*, 1205–1218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Liu, M.; Zhu, Y.; Xing, F.; Liu, S.; Xia, Y.; Jiang, Q.; Qin, J. The polycomb group protein PCGF6 mediates germline gene silencing by recruiting histone-modifying proteins to target gene promoters. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 9712–9724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Montgomery, R.L.; Hsieh, J.; Barbosa, A.C.; Richardson, J.A.; Olson, E.N. Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 7876–7881. [[CrossRef](#)]
55. Montgomery, R.L.; Davis, C.A.; Potthoff, M.J.; Haberland, M.; Fielitz, J.; Qi, X.; Hill, J.A.; Richardson, J.A.; Olson, E.N. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 1790–1802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Dovey, O.M.; Foster, C.T.; Cowley, S.M. Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 8242–8247. [[CrossRef](#)]
57. Summerton, J.; Weller, D. Morpholino antisense oligomers: Design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 187–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Bill, B.R.; Petzold, A.M.; Clark, K.J.; Schimmenti, L.A.; Ekker, S.C. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* **2009**, *6*, 69–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Robu, M.E.; Larson, J.D.; Nasevicius, A.; Beiraghi, S.; Brenner, C.; Farber, S.A.; Ekker, S.C. p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet.* **2007**, *3*, e78. [[CrossRef](#)]
60. Stainier, D.Y.R.; Kontarakis, Z.; Rossi, A. Making sense of anti-sense data. *Dev. Cell* **2015**, *32*, 7–8. [[CrossRef](#)]
61. Kok, F.O.; Shin, M.; Ni, C.W.; Gupta, A.; Grosse, A.S.; van Impel, A.; Kirchmaier, B.C.; Peterson-Maduro, J.; Kourkoulis, G.; Male, I.; et al. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev. Cell* **2015**, *32*, 97–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Morcos, P.A.; Vincent, A.C.; Moulton, J.D. Gene Editing Versus Morphants. *Zebrafish* **2015**, *12*, 319. [[CrossRef](#)]

63. Zimmer, A.M.; Pan, Y.K.; Chandrapalan, T.; Kwong, R.W.M.; Perry, S.F. Loss-of-function approaches in comparative physiology: Is there a future for knockdown experiments in the era of genome editing? *J. Exp. Biol.* **2019**, *222*, jeb175737. [[CrossRef](#)]
64. Salanga, C.M.; Salanga, M.C. Genotype to Phenotype: CRISPR Gene Editing Reveals Genetic Compensation as a Mechanism for Phenotypic Disjunction of Morphants and Mutants. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Wienholds, E.; Schulte-Merker, S.; Walderich, B.; Plasterk, R.H. Target-selected inactivation of the zebrafish rag1 gene. *Science* **2002**, *297*, 99–102. [[CrossRef](#)]
66. Gaj, T.; Gersbach, C.A.; Barbas, C.F., 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 397–405. [[CrossRef](#)]
67. Parant, J.M.; Yehn, J.R. Approaches to Inactivate Genes in Zebrafish. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *916*, 61–86. [[CrossRef](#)]
68. Soto, R.A.; Najia, M.A.T.; Hachimi, M.; Frame, J.M.; Yette, G.A.; Lummertz da Rocha, E.; Stankunas, K.; Daley, G.Q.; North, T.E. Sequential regulation of hemogenic fate and hematopoietic stem and progenitor cell formation from arterial endothelium by Ezh1/2. *Stem Cell Rep.* **2021**, *16*, 1718–1734. [[CrossRef](#)]
69. Völkel, P.; Bary, A.; Raby, L.; Chapart, A.; Dupret, B.; Le Bourhis, X.; Angrand, P.O. Ezh1 arises from Ezh2 gene duplication but its function is not required for zebrafish development. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Yette, G.A.; Stewart, S.; Stankunas, K. Zebrafish Polycomb repressive complex-2 critical roles are largely Ezh2- over Ezh1-driven and concentrate during early embryogenesis. *BioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
71. Zhong, Y.; Ye, Q.; Chen, C.; Wang, M.; Wang, H. Ezh2 promotes clock function and hematopoiesis independent of histone methyltransferase activity in zebrafish. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 3382–3399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. San, B.; Chrispijn, N.D.; Wittkopp, N.; van Heeringen, S.J.; Lagendijk, A.K.; Aben, M.; Bakkers, J.; Ketting, R.F.; Kamminga, L.M. Normal formation of a vertebrate body plan and loss of tissue maintenance in the absence of ezh2. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Dupret, B.; Völkel, P.; Vennin, C.; Toillon, R.A.; Le Bourhis, X.; Angrand, P.O. The histone lysine methyltransferase Ezh2 is required for maintenance of the intestine integrity and for caudal fin regeneration in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2017**, *1860*, 1079–1093. [[CrossRef](#)]
74. San, B.; Rougeot, J.; Voeltzke, K.; van Vegchel, G.; Aben, M.; Andralojc, K.M.; Flik, G.; Kamminga, L.M. The ezh2(sa1199) mutant zebrafish display no distinct phenotype. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Raby, L.; Völkel, P.; Hasanpour, S.; Cicero, J.; Toillon, R.A.; Adriaenssens, E.; Van Seuning, I.; Le Bourhis, X.; Angrand, P.O. Loss of Polycomb Repressive Complex 2 Function Alters Digestive Organ Homeostasis and Neuronal Differentiation in Zebrafish. *Cells* **2021**, *10*, 3142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Oppel, F.; Ki, D.H.; Zimmerman, M.W.; Ross, K.N.; Tao, T.; Shi, H.; He, S.; Aster, J.C.; Look, A.T. *suz12* inactivation in *p53*- and *nfl*-deficient zebrafish accelerates the onset of malignant peripheral nerve sheath tumors and expands the spectrum of tumor types. *Dis. Model Mech.* **2020**, *13*, dmm042341. [[CrossRef](#)]
77. Pfefferli, C.; Müller, F.; Jaźwińska, A.; Wicky, C. Specific NuRD components are required for fin regeneration in zebrafish. *BMC Biol.* **2014**, *12*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Schultz, L.E.; Haltom, J.A.; Almeida, M.P.; Wierson, W.A.; Solin, S.L.; Weiss, T.J.; Helmer, J.A.; Sandquist, E.J.; Shive, H.R.; McGrail, M. Epigenetic regulators Rbbp4 and Hdac1 are overexpressed in a zebrafish model of RB1 embryonal brain tumor, and are required for neural progenitor survival and proliferation. *Dis. Model Mech.* **2018**, *11*, dmm034124. [[CrossRef](#)]
79. Yu, M.; Mazor, T.; Huang, H.; Huang, H.T.; Kathrein, K.L.; Woo, A.J.; Chouinard, C.R.; Labadorf, A.; Akie, T.E.; Moran, T.B.; et al. Direct recruitment of polycomb repressive complex 1 to chromatin by core binding transcription factors. *Mol. Cell* **2012**, *45*, 330–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. van der Velden, Y.U.; Wang, L.; van Lohuizen, M.; Haramis, A.P. The Polycomb group protein Ring1b is essential for pectoral fin development. *Development* **2012**, *139*, 2210–2220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Peng, X.; Feng, G.; Zhang, Y.; Sun, Y. PRC1 Stabilizes Cardiac Contraction by Regulating Cardiac Sarcomere Assembly and Cardiac Conduction System Construction. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Li, X.; Ji, G.; Zhou, J.; Du, J.; Li, X.; Shi, W.; Hu, Y.; Zhou, W.; Hao, A. Pcgf1 Regulates Early Neural Tube Development Through Histone Methylation in Zebrafish. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *8*, 581636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Dupret, B.; Völkel, P.; Le Bourhis, X.; Angrand, P.O. The Polycomb Group Protein Pcgf1 Is Dispensable in Zebrafish but Involved in Early Growth and Aging. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Zhou, T.; Wang, L.; Zhu, K.Y.; Dong, M.; Xu, P.F.; Chen, Y.; Chen, S.J.; Chen, Z.; Deng, M.; Liu, T.X. Dominant-negative C/ebp $\alpha$  and polycomb group protein Bmi1 extend short-lived hematopoietic stem/progenitor cell life span and induce lethal dyserythropoiesis. *Blood* **2011**, *118*, 3842–3852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Ray, M.K.; Wiskow, O.; King, M.J.; Ismail, N.; Ergun, A.; Wang, Y.; Plys, A.J.; Davis, C.P.; Kathrein, K.; Sadreyev, R.; et al. CAT7 and cat7l Long Non-coding RNAs Tune Polycomb Repressive Complex 1 Function during Human and Zebrafish Development. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 19558–19572. [[CrossRef](#)]
86. Espanola, S.G.; Song, H.; Ryu, E.; Saxena, A.; Kim, E.S.; Manegold, J.E.; Nasamran, C.A.; Sahoo, D.; Oh, C.K.; Bickers, C.; et al. Haematopoietic stem cell-dependent Notch transcription is mediated by p53 through the Histone chaperone Supt16h. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *22*, 1411–1422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

87. Komoike, Y.; Kawamura, A.; Shindo, N.; Sato, C.; Satoh, J.; Shiurba, R.; Higashinakagawa, T. Zebrafish Polycomb group gene *ph2alpha* is required for epiboly and tailbud formation acting downstream of FGF signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *328*, 858–866. [[CrossRef](#)]
88. Stanton, S.E.; McReynolds, L.J.; Evans, T.; Schreiber-Agus, N. Yaf2 inhibits caspase 8-mediated apoptosis and regulates cell survival during zebrafish embryogenesis. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 28782–28793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Lee, J.; Lee, B.K.; Gross, J.M. Bcl6a function is required during optic cup formation to prevent p53-dependent apoptosis and colobomata. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 3568–3582. [[CrossRef](#)]
90. Ng, D.; Thakker, N.; Corcoran, C.M.; Donnai, D.; Perveen, R.; Schneider, A.; Hadley, D.W.; Tiffet, C.; Zhang, L.; Wilkie, A.O.; et al. Oculofaciocardiodental and Lenz microphthalmia syndromes result from distinct classes of mutations in BCOR. *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 411–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Balow, S.A.; Pierce, L.X.; Zentner, G.E.; Conrad, P.A.; Davis, S.; Sabaawy, H.E.; McDermott, B.M., Jr.; Scacheri, P.C. Knockdown of *fbx110/kdm2bb* rescues *chd7* morphant phenotype in a zebrafish model of CHARGE syndrome. *Dev. Biol.* **2013**, *382*, 57–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Tse, W.K.F. Importance of deubiquitinases in zebrafish craniofacial development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *487*, 813–819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Amsterdam, A.; Nissen, R.M.; Sun, Z.; Swindell, E.C.; Farrington, S.; Hopkins, N. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12792–12797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Ma, Z.; Zhu, P.; Shi, H.; Guo, L.; Zhang, Q.; Chen, Y.; Chen, S.; Zhang, Z.; Peng, J.; Chen, J. PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via *Upf3a* and COMPASS components. *Nature* **2019**, *568*, 259–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Jha, U.; Kondrychyn, I.; Korzh, V.; Thirumalai, V. High Behavioral Variability Mediated by Altered Neuronal Excitability in *auts2* Mutant Zebrafish. *eNeuro* **2021**, *8*, ENEURO.0493–20.2021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Rikin, A.; Evans, T. The *tbx/bHLH* transcription factor *mga* regulates *gata4* and organogenesis. *Dev. Dyn.* **2010**, *239*, 535–547. [[CrossRef](#)]
97. Sun, X.; Chen, J.; Zhang, Y.; Munisha, M.; Dougan, S.; Sun, Y. *Mga* Modulates *Bmpr1a* Activity by Antagonizing *Bs69* in Zebrafish. *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, 126. [[CrossRef](#)]
98. Chen, Y.Y.; Harris, M.P.; Levesque, M.P.; Nüsslein-Volhard, C.; Sonawane, M. Heterogeneity across the dorso-ventral axis in zebrafish *EVL* is regulated by a novel module consisting of *sox*, *snail1a* and *max* genes. *Mech. Dev.* **2012**, *129*, 13–23. [[CrossRef](#)]
99. Cunliffe, V.T. Histone deacetylase 1 is required to repress Notch target gene expression during zebrafish neurogenesis and to maintain the production of motoneurons in response to hedgehog signalling. *Development* **2004**, *131*, 2983–2995. [[CrossRef](#)]
100. Amsterdam, A.; Burgess, S.; Golling, G.; Chen, W.; Sun, Z.; Townsend, K.; Farrington, S.; Haldi, M.; Hopkins, N. A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 2713–2724. [[CrossRef](#)]
101. McCabe, M.T.; Ott, H.M.; Ganji, G.; Korenchuk, S.; Thompson, C.; Van Aller, G.S.; Liu, Y.; Graves, A.P.; Della Pietra, A., 3rd; Diaz, E.; et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* **2012**, *492*, 108–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. He, Y.; Selvaraju, S.; Curtin, M.L.; Jakob, C.G.; Zhu, H.; Comess, K.M.; Shaw, B.; The, J.; Lima-Fernandes, E.; Szweczyk, M.M.; et al. The EED protein-protein interaction inhibitor A-395 inactivates the PRC2 complex. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 389–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Qi, W.; Zhao, K.; Gu, J.; Huang, Y.; Wang, Y.; Zhang, H.; Zhang, M.; Zhang, J.; Yu, Z.; Li, L.; et al. An allosteric PRC2 inhibitor targeting the H3K27me3 binding pocket of EED. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 381–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Kim, W.; Bird, G.H.; Neff, T.; Guo, G.; Kerenyi, M.A.; Walensky, L.D.; Orkin, S.H. Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 643–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Kong, X.; Chen, L.; Jiao, L.; Jiang, X.; Lian, F.; Lu, J.; Zhu, K.; Du, D.; Liu, J.; Ding, H.; et al. Astemizole arrests the proliferation of cancer cells by disrupting the EZH2-EED interaction of polycomb repressive complex 2. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9512–9521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Chen, H.; Gao, S.; Li, J.; Liu, D.; Sheng, C.; Yao, C.; Jiang, W.; Wu, J.; Chen, S.; Huang, W. Wedelolactone disrupts the interaction of EZH2-EED complex and inhibits PRC2-dependent cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 13049–13059. [[CrossRef](#)]
107. Shukla, S.; Ying, W.; Gray, F.; Yao, Y.; Simes, M.L.; Zhao, Q.; Miao, H.; Cho, H.J.; González-Alonso, P.; Winkler, A.; et al. Small-molecule inhibitors targeting Polycomb repressive complex 1 RING domain. *Nat. Chem. Biol.* **2021**, *17*, 784–793. [[CrossRef](#)]
108. den Broeder, M.J.; Ballangby, J.; Kamminga, L.M.; Aleström, P.; Legler, J.; Lindeman, L.C.; Kamstra, J.H. Inhibition of methyltransferase activity of enhancer of zeste 2 leads to enhanced lipid accumulation and altered chromatin status in zebrafish. *Epigenetics Chromatin* **2020**, *13*, 5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. del Mar Lorente, M.; Marcos-Gutiérrez, C.; Pérez, C.; Schoorlemmer, J.; Ramírez, A.; Magin, T.; Vidal, M. Loss- and gain-of-function mutations show a polycomb group function for *Ring1A* in mice. *Development* **2000**, *127*, 5093–5100. [[CrossRef](#)]
110. Voncken, J.W.; Roelen, B.A.; Roefs, M.; de Vries, S.; Verhoeven, E.; Marino, S.; Deschamps, J.; van Lohuizen, M. *Rnf2* (*Ring1b*) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 2468–2473. [[CrossRef](#)]
111. van der Velden, Y.U.; Wang, L.; Querol Cano, L.; Haramis, A.P. The polycomb group protein *ring1b/rnf2* is specifically required for craniofacial development. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73997. [[CrossRef](#)]
112. Liu, C.; Ma, Y.; Shang, Y.; Huo, R.; Li, W. Post-translational regulation of the maternal-to-zygotic transition. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 1707–1722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

113. Posfai, E.; Kunzmann, R.; Brochard, V.; Salvaing, J.; Cabuy, E.; Roloff, T.C.; Liu, Z.; Tardat, M.; van Lohuizen, M.; Vidal, M.; et al. Polycomb function during oogenesis is required for mouse embryonic development. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 920–932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Akasaka, T.; Kanno, M.; Balling, R.; Mieza, M.A.; Taniguchi, M.; Koseki, H. A role for mel-18, a Polycomb group-related vertebrate gene, during theanterior-posterior specification of the axial skeleton. *Development* **1996**, *122*, 1513–1522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. van der Lugt, N.M.; Domen, J.; Linders, K.; van Roon, M.; Robanus-Maandag, E.; te Riele, H.; van der Valk, M.; Deschamps, J.; Sofroniew, M.; van Lohuizen, M.; 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*, 757–769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Almeida, M.; Pintacuda, G.; Masui, O.; Koseki, Y.; Gdula, M.; Cerase, A.; Brown, D.; Mould, A.; Innocent, C.; Nakayama, M.; et al. PCGF3/5-PRC1 initiates Polycomb recruitment in X chromosome inactivation. *Science* **2017**, *356*, 1081–1084. [[CrossRef](#)]
117. Endoh, M.; Endo, T.A.; Shinga, J.; Hayashi, K.; Farcas, A.; Ma, K.W.; Ito, S.; Sharif, J.; Endoh, T.; Onaga, N.; et al. PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by regulating germ cell-related genes. *Elife* **2017**, *6*, e21064. [[CrossRef](#)]
118. Qin, J.; Whyte, W.A.; Anderssen, E.; Apostolou, E.; Chen, H.H.; Akbarian, S.; Bronson, R.T.; Hochedlinger, K.; Ramaswamy, S.; Young, R.A.; et al. The polycomb group protein L3mbtl2 assembles an atypical PRC1-family complex that is essential in pluripotent stem cells and early development. *Cell Stem Cell* **2012**, *11*, 319–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. O'Carroll, D.; Erhardt, S.; Pagani, M.; Barton, S.C.; Surani, M.A.; Jenuwein, T. The polycomb-group gene Ezh2 is required for early mouse development. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 4330–4336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Faust, C.; Schumacher, A.; Holdener, B.; Magnuson, T. The eed mutation disrupts anterior mesoderm production in mice. *Development* **1995**, *121*, 273–285. [[CrossRef](#)]
121. Pasini, D.; Bracken, A.P.; Jensen, M.R.; Lazzerini Denchi, E.; Helin, K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J.* **2004**, *23*, 4061–4071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Ostrup, O.; Reiner, A.H.; Aleström, P.; Collas, P. The specific alteration of histone methylation profiles by DZNep during early zebrafish development. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1839*, 1307–1315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Schultz-Rogers, L.E.; Thayer, M.L.; Kambakam, S.; Wierson, W.A.; Helmer, J.A.; Wishman, M.D.; Wall, K.A.; Greig, J.L.; Forsman, J.L.; Puchhalapalli, K.; et al. Rbbp4 loss disrupts neural progenitor cell cycle regulation independent of Rb and leads to Tp53 acetylation and apoptosis. *Dev. Dyn.* **2022**, *251*, 1267–1290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Ezhkova, E.; Lien, W.H.; Stokes, N.; Pasolli, H.A.; Silva, J.M.; Fuchs, E. EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 485–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Bae, W.K.; Kang, K.; Yu, J.H.; Yoo, K.H.; Factor, V.M.; Kaji, K.; Matter, M.; Thorgeirsson, S.; Hennighausen, L. The methyltransferases enhancer of zeste homolog (EZH) 1 and EZH2 control hepatocyte homeostasis and regeneration. *FASEB J.* **2015**, *29*, 1653–1662. [[CrossRef](#)]
126. Margueron, R.; Li, G.; Sarma, K.; Blais, A.; Zavadil, J.; Woodcock, C.L.; Dynlacht, B.D.; Reinberg, D. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol. Cell* **2008**, *32*, 503–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Lavarone, E.; Barbieri, C.M.; Pasini, D. Dissecting the role of H3K27 acetylation and methylation in PRC2 mediated control of cellular identity. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1679. [[CrossRef](#)]
128. Shen, X.; Liu, Y.; Hsu, Y.J.; Fujiwara, Y.; Kim, J.; Mao, X.; Yuan, G.C.; Orkin, S.H. 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. [[CrossRef](#)]
129. Lee, C.H.; Holder, M.; Grau, D.; Saldaña-Meyer, R.; Yu, J.R.; Ganai, R.A.; Zhang, J.; Wang, M.; LeRoy, G.; Dobenecker, M.W.; et al. Distinct Stimulatory Mechanisms Regulate the Catalytic Activity of Polycomb Repressive Complex 2. *Mol. Cell* **2018**, *70*, 435–448. [[CrossRef](#)]
130. 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. [[CrossRef](#)]
131. Ferrari, K.J.; Scelfo, A.; Jammula, S.; Cuomo, A.; Barozzi, I.; Stützer, A.; Fischle, W.; Bonaldi, T.; Pasini, D. Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Mol. Cell* **2014**, *53*, 49–62. [[CrossRef](#)]
132. Tachibana, M.; Sugimoto, K.; Fukushima, T.; Shinkai, Y. Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 25309–25317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Tachibana, M.; Ueda, J.; Fukuda, M.; Takeda, N.; Ohta, T.; Iwanari, H.; Sakihama, T.; Kodama, T.; Hamakubo, T.; Shinkai, Y. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 815–826. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Wu, H.; Chen, X.; Xiong, J.; Li, Y.; Li, H.; Ding, X.; Liu, S.; Chen, S.; Gao, S.; Zhu, B. Histone methyltransferase G9a contributes to H3K27 methylation in vivo. *Cell Res.* **2011**, *21*, 365–367. [[CrossRef](#)]
135. Rougeot, J.; Chrispijn, N.D.; Aben, M.; Elurbe, D.M.; Andralojc, K.M.; Murphy, P.J.; Jansen, P.W.T.C.; Vermeulen, M.; Cairns, B.R.; Kamminga, L.M. Maintenance of spatial gene expression by Polycomb-mediated repression after formation of a vertebrate body plan. *Development* **2019**, *146*, dev178590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Hickey, G.J.; Wike, C.L.; Nie, X.; Guo, Y.; Tan, M.; Murphy, P.J.; Cairns, B.R. Establishment of developmental gene silencing by ordered polycomb complex recruitment in early zebrafish embryos. *Elife* **2022**, *11*, e67738. [[CrossRef](#)]

137. San, B.; Aben, M.; Elurbe, D.M.; Voeltzke, K.; Den Broeder, M.J.; Rougeot, J.; Legler, J.; Kamminga, L.M. Genetic and Epigenetic Regulation of Zebrafish Intestinal Development. *Epigenomes* **2018**, *2*, 19. [[CrossRef](#)]
138. Lucore, E.C.; Connaughton, V.P. Observational learning and irreversible starvation in first-feeding zebrafish larvae: Is it okay to copy from your friends? *Zoology* **2021**, *145*, 125896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Chrispijn, N.D.; Elurbe, D.M.; Mickoleit, M.; Aben, M.; de Bakker, D.E.M.; Andralojc, K.M.; Huisken, J.; Bakkers, J.; Kamminga, L.M. Loss of the Polycomb group protein Rnf2 results in derepression of tbx-transcription factors and defects in embryonic and cardiac development. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4327. [[CrossRef](#)]
140. Huang, H.T.; Kathrein, K.L.; Barton, A.; Gitlin, Z.; Huang, Y.H.; Ward, T.P.; Hofmann, O.; Dibiasi, A.; Song, A.; Tyekucheveva, S.; et al. A network of epigenetic regulators guides developmental haematopoiesis in vivo. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 1516–1525. [[CrossRef](#)]
141. Feng, G.; Sun, Y. The Polycomb group gene *rnf2* is essential for central and enteric neural system development in zebrafish. *Front. Neurosci.* **2022**, *16*, 960149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Chan, H.L.; Morey, L. Emerging Roles for Polycomb-Group Proteins in Stem Cells and Cancer. *Trends Biochem. Sci.* **2019**, *44*, 688–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Fazio, M.; Ablain, J.; Chuan, Y.; Langenau, D.M.; Zon, L.I. Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*, 263–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Raby, L.; Völkel, P.; Le Bourhis, X.; Angrand, P.O. Genetic Engineering of Zebrafish in Cancer Research. *Cancers* **2020**, *12*, 2168. [[CrossRef](#)]
145. Weiss, J.M.; Lumaquin-Yin, D.; Montal, E.; Suresh, S.; Leonhardt, C.S.; White, R.M. Shifting the focus of zebrafish toward a model of the tumor microenvironment. *Elife* **2022**, *11*, e69703. [[CrossRef](#)]
146. Gjini, E.; Jing, C.B.; Nguyen, A.T.; Reyon, D.; Gans, E.; Kesarsing, M.; Peterson, J.; Pozdnyakova, O.; Rodig, S.J.; Mansour, M.R.; et al. Disruption of *asxl1* results in myeloproliferative neoplasms in zebrafish. *Dis. Model Mech.* **2019**, *12*, dmm035790. [[CrossRef](#)]
147. Fang, X.; Xu, S.; Zhang, Y.; Xu, J.; Huang, Z.; Liu, W.; Wang, S.; Yen, K.; Zhang, W. Asxl1 C-terminal mutation perturbs neutrophil differentiation in zebrafish. *Leukemia* **2021**, *35*, 2299–2310. [[CrossRef](#)]
148. Fisher, C.L.; Randazzo, F.; Humphries, R.K.; Brock, H.W. Characterization of Asxl1, a murine homolog of Additional sex combs, and analysis of the Asx-like gene family. *Gene* **2006**, *369*, 109–118. [[CrossRef](#)]
149. Kolovos, P.; Nishimura, K.; Sankar, A.; Sidoli, S.; Cloos, P.A.; Helin, K.; Christensen, J. PR-DUB maintains the expression of critical genes through FOXK1/2- and ASXL1/2/3-dependent recruitment to chromatin and H2AK119ub1 deubiquitination. *Genome Res.* **2020**, *30*, 1119–1130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Reddington, C.J.; Fellner, M.; Burgess, A.E.; Mace, P.D. Molecular Regulation of the Polycomb Repressive-Deubiquitinase. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7837. [[CrossRef](#)]
151. Abdel-Wahab, O.; Pardanani, A.; Patel, J.; Wadleigh, M.; Lasho, T.; Heguy, A.; Beran, M.; Gilliland, D.G.; Levine, R.L.; Tefferi, A. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **2011**, *25*, 1200–1202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Boulwood, J.; Perry, J.; Pellagatti, A.; Fernandez-Mercado, M.; Fernandez-Santamaria, C.; Calasanz, M.J.; Larrayoz, M.J.; Garcia-Delgado, M.; Giagounidis, A.; Malcovati, L.; et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **2010**, *24*, 1062–1065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Gelsi-Boyer, V.; Trouplin, V.; Roquain, J.; Adélaïde, J.; Carbuccia, N.; Esterni, B.; Finetti, P.; Murati, A.; Arnoulet, C.; Zerazhi, H.; et al. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2010**, *151*, 365–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Gelsi-Boyer, V.; Brecqueville, M.; Devillier, R.; Murati, A.; Mozziconacci, M.J.; Birnbaum, D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J. Hematol. Oncol.* **2012**, *5*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Inoue, D.; Kitaura, J.; Togami, K.; Nishimura, K.; Enomoto, Y.; Uchida, T.; Kagiya, Y.; Kawabata, K.C.; Nakahara, F.; Izawa, K.; et al. Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering ASXL1 mutations. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 4627–4640. [[CrossRef](#)]
156. Gao, X.; You, X.; Droin, N.; Banaszak, L.G.; Churpek, J.; Padron, E.; Geissler, K.; Solary, E.; Patnaik, M.M.; Zhang, J. Role of ASXL1 in hematopoiesis and myeloid diseases. *Exp. Hematol.* **2022**, *115*, 14–19. [[CrossRef](#)]
157. Geng, Y.; Zhang, T.; Alonzo, I.G.; Godar, S.C.; Yates, C.; Pluimer, B.R.; Harrison, D.L.; Nath, A.K.; Yeh, J.J.; Drummond, I.A.; et al. Top2a promotes the development of social behavior via PRC2 and H3K27me3. *Sci. Adv.* **2022**, *8*, eabm7069. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Article

# Ezh2 Loss-of-Function Alters Zebrafish Cerebellum Development

Mariette Hanot , Pamela Völkel , Xuefen Le Bourhis , Chann Lagadec and Pierre-Olivier Angrand \*

Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277–CANTHER–Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France; mariette.hanot.etu@univ-lille.fr (M.H.); pamel.voelkel@univ-lille.fr (P.V.); xuefen.le-bourhis@univ-lille.fr (X.L.B.); chann.lagadec@inserm.fr (C.L.)

\* Correspondence: pierre-olivier.angrand@univ-lille.fr; Tel.: +33-3-20336222

## Abstract

EZH2, the catalytic subunit of polycomb repressive complex 2 (PRC2), plays a critical role in neural development by regulating gene expression through the trimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27me3), which promotes chromatin remodeling and transcriptional repression. Although PRC2 is known to regulate cell fate specification and gliogenesis, its *in vivo* functions during vertebrate neurodevelopment, particularly at the level of neuronal subtype differentiation, remain incompletely understood. Here, we investigated the consequences of *ezh2* loss-of-function during zebrafish brain development, focusing on oligodendrocyte differentiation, cerebellar neurogenesis, and the formation of neurotransmitter-specific neuronal populations. Using whole-mount *in situ* hybridization, we found that *ezh2* inactivation does not alter the expression of oligodendrocyte lineage markers, indicating that early oligodendrocyte precursor cell specification and myelination are preserved. However, a significant reduction in cerebellar proliferation was observed in *ezh2*-deficient larvae, as evidenced by the downregulation of *pcna* and *cyclin A2*, while other brain regions remained unaffected. Notably, the expression of *atoh1c*, a key marker of glutamatergic cerebellar progenitors, was strongly reduced at 5 days post fertilization, suggesting a selective role for *ezh2* in maintaining cerebellar progenitor identity. This was associated with impaired differentiation of both glutamatergic granule cells and GABAergic Purkinje cells in specific cerebellar subregions. In contrast, the expression of markers for other major neurotransmitter systems remained unaffected, indicating a region-specific requirement for *ezh2* in neuronal development. Finally, behavioral analysis revealed a hyperlocomotor phenotype in *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae, consistent with cerebellar dysfunction. Together, these findings identify *ezh2* as a key regulator of progenitor maintenance and neuronal differentiation in the cerebellum, highlighting its crucial role in establishing functional cerebellar circuits.



Academic Editor: Maurizio Battino

Received: 29 August 2025

Revised: 2 October 2025

Accepted: 4 October 2025

Published: 7 October 2025

**Citation:** Hanot, M.; Völkel, P.;

Le Bourhis, X.; Lagadec, C.;

Angrand, P.-O. Ezh2 Loss-of-Function

Alters Zebrafish Cerebellum

Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*,

9736. [https://doi.org/10.3390/](https://doi.org/10.3390/ijms26199736)

[ijms26199736](https://doi.org/10.3390/ijms26199736)

**Copyright:** © 2025 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article

distributed under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license

([https://creativecommons.org/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[licenses/by/4.0/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)).

**Keywords:** zebrafish; EZH2; brain development; cerebellum

## 1. Introduction

Polycomb repressive complex 2 (PRC2) is an essential chromatin-associated protein complex involved in the transcriptional silencing of gene expression programs during development and differentiation. EZH2 (or its paralog EZH1) is the PRC2 catalytic subunit trimethylating lysine 27 of histone H3 (H3K27me3). This epigenetic mark is responsible for heterochromatin formation, which in turn represses the expression of numerous genes

involved in various cellular and developmental processes, including nervous system development. In mouse, *Ezh2* is highly expressed in both embryonic and adult neural stem cells (NSCs); conditional *Ezh2* inactivation leads to a significant reduction in both embryonic and adult NSC proliferation, outlining its crucial role in the maintenance of the proliferative capacity of NSCs [1]. In addition, loss of *Ezh2* gene function in the embryonic cerebral cortex accelerates neurogenesis, with an early increase in the number of neurons and premature production of astrocytes, suggesting that *Ezh2* regulates the timing of neuronal differentiation [2]. Moreover, in the embryonic cerebellum, *Ezh2* controls the specification of GABAergic neurons by repressing genes that promote alternative differentiation, thereby ensuring the proper development of inhibitory circuits [3]. In addition to its role in neural differentiation and development, a link between *EZH2* dysregulation and brain tumorigenesis has been clearly established [4]. Diffuse midline gliomas (DMG) are one of the most aggressive pediatric brain cancers, characterized either by a lysine-to-methionine substitution at position 27 on certain histone H3 genes (*H3F3A*, *HIST1H3B* or *HIST1H3C*) or by the overexpression of *EZH1P* [5–7]. H3K27M mutation and *EZH1P* protein are both competitive inhibitors of PRC2 lysine methyltransferase activity, causing a global reduction in H3K27me3 levels in DMGs. The reduction in H3K27me3 levels impairs the establishment of differentiation programs and promotes an undifferentiated cellular state, fostering tumor formation in mice [8]. H3K27me3 levels are also affected in group 3 and 4 medulloblastoma, due to alterations in the function of *EZH2* or the corresponding histone demethylase *KDM6A* (*UTX*) [9]. Analyses of non-WNT/*SHH* medulloblastoma that include group 3 and 4 revealed that about 47% of these tumors are H3K27me3-deficient [10]. Strikingly, H3K27me3 loss is associated with high rates of recurrence and poor overall survival compared to H3K27me3-proficient tumors. Together, these findings illustrate the fundamental role that *EZH2* and H3K27me3 levels play in neural development and brain tumorigenesis.

PRC2-mediated gene control is evolutionarily conserved; genomic analyses have revealed that *Ezh2* recruitment at chromatin and H3K27me3 marks are conserved in zebrafish (*Danio rerio*) [11]. Numerous studies have demonstrated that the zebrafish model provides new insights into the understanding of Polycomb repression in vertebrates (reviewed in [12]). On the one hand, in contrast to mouse, where *Ezh2* loss-of-function causes early lethality at the implantation stage [13], *ezh2* zebrafish mutants survive up to 12 days post fertilization (dpf) [14,15]. On the other hand, in zebrafish, the neural tube is formed at about 17 h post fertilization (hpf), primary neurogenesis starts at around 2 dpf, and secondary neurogenesis at 3 dpf, leading to a mature nervous system by 4 dpf [16]. Thus, the zebrafish offers a unique opportunity to investigate the roles of *Ezh2* and H3Kme3 on brain development, and possibly in tumorigenesis, without the requirement of conditional mutagenesis strategies.

Here, we investigate the effects of zygotic *ezh2* loss-of-function on brain development using the zebrafish *ezh2*(ul2) mutant line we previously generated [15]. Our results indicate that *ezh2* is required for the proper development of a limited number of cerebellar cells. Furthermore, locomotor activity assays highlight the role of PRC2 in zebrafish larval behavior. Taken together, our findings demonstrate that the *ezh2*(ul2) zebrafish line is a valuable model for studying the impact of reduced H3K27me3 levels and PRC2 loss-of-function on brain development and shed light on the cellular defects that could be involved in medulloblastoma genesis.

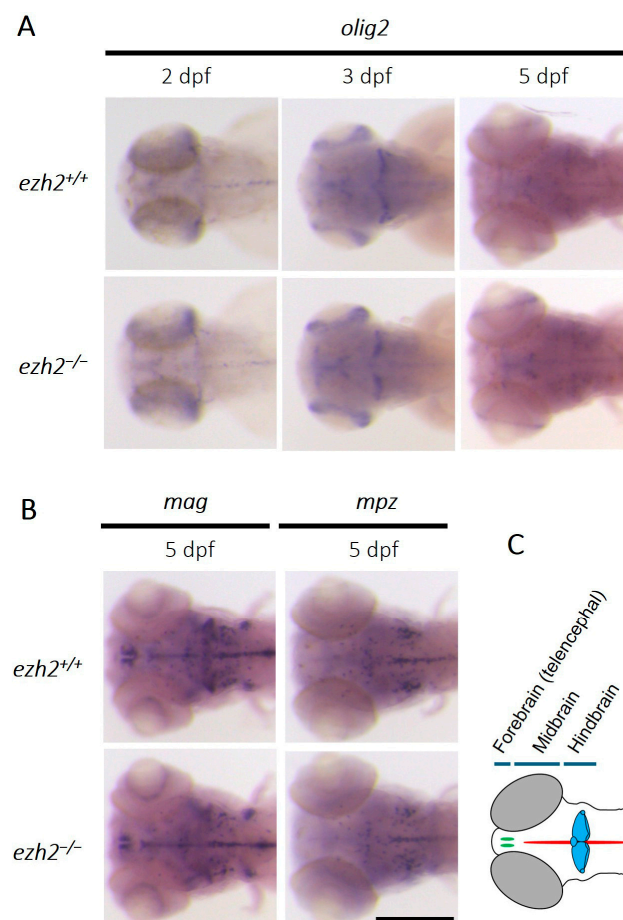
## 2. Results

### 2.1. Role of *Ezh2* in Oligodendrocyte Development

Studies on embryonic stem cells (ESCs) showed that PRC2 is involved in the maintenance of the balance between the self-renewal of neural progenitor cells and the onset

of neurogenesis, promoting the transition from neurogenesis to gliogenesis, as well as in regulating cell fate decisions during progenitor differentiation [17,18]. More precisely, in a murine neuronal stem cell (NSC) differentiation model, *Ezh2* was specifically implicated in oligodendrocyte lineage development, as demonstrated by its high expression in oligodendrocyte precursor cells (OPCs) compared to astrocytes and differentiating neurons. The overexpression of murine *Ezh2* in differentiating NSCs is associated with an increase in oligodendrocytes and a reduction in astrocytes, whereas the reduction in *Ezh2* expression leads to the opposite effects [19]. *Ezh2* remains expressed during the late stages of oligodendrocyte differentiation, suggesting a role for PRC2 not only in OPCs but also during oligodendrocyte maturation [20].

To further investigate the role of *Ezh2* in oligodendrocyte development, we analyzed the consequences of its inactivation in zebrafish. A previous study in mice demonstrated that the conditional inactivation of *Ezh2* in oligodendrocyte progenitors does not impair OPC specification but results in delayed oligodendrocyte maturation [21]. Given this, we sought to determine whether *ezh2* inactivation in zebrafish larvae similarly affects the development of oligodendrocyte lineage cells. In zebrafish, oligodendrocyte development begins at around 10.5 hpf [22], with OPCs characterized by the expression of the transcription factor *olig2* arising from the ventral progenitor domain of motor neurons (pMN). *Olig2* is required for OPC specification and remains expressed throughout oligodendrocyte development, including in mature cells, even if *Olig2* expression is reduced in later developmental stages [23]. Therefore, *olig2* serves as a robust marker of the oligodendrocyte lineage [24]. We performed in situ hybridization for *olig2* expression in wild-type and *ezh2* mutant zebrafish larvae at 2, 3 and 5 dpf (Figure 1A).



**Figure 1. Role of *ezh2* in oligodendrocyte development:** (A) whole-mount RNA in situ hybridization of the brain region of *ezh2*<sup>+/+</sup> and *ezh2*<sup>-/-</sup> siblings at 2, 3 or 5 dpf, as indicated, to detect *olig2* expression

as a marker of the oligodendrocyte lineage; **(B)** whole-mount RNA in situ hybridization of the brain region of *ezh2*<sup>+/+</sup> and *ezh2*<sup>-/-</sup> siblings at 5 dpf to detect *mag* or *mpz* expression, as markers of mature oligodendrocytes. Scale bar is 200  $\mu$ m; and **(C)** schematic representation of zebrafish brain organization at 5 dpf. Olfactory bulbs are shown in green, the midline in red, and the cerebellum in blue.

In both wild-type and *ezh2* mutant siblings, *olig2*-expressing cells are detected in the midbrain, hindbrain, and cerebellum at 2 dpf. At 3 dpf, *olig2* expression increases in the cerebellum before declining during later stages of oligodendrocyte differentiation, as expected. By 5 dpf, only a weak *olig2* signal is retained in the cerebellum (Supplementary Figure S3), probably corresponding to eurydendroid cells, a teleost-specific neuronal population known to express *olig2* [25–27]. The *olig2* expression patterns are indistinguishable between wild-type and mutant larvae, suggesting that *ezh2* loss-of-function does not affect *olig2* expression, the presence of eurydendroid cells, or the initial generation of oligodendrocyte lineage cells (Figure 1A,C). Since the loss of *ezh2* function does not visibly disrupt early oligodendrocyte lineage specification in zebrafish, a potential role of *ezh2* in later stages of oligodendrocyte maturation, rather than in progenitor specification, cannot be excluded.

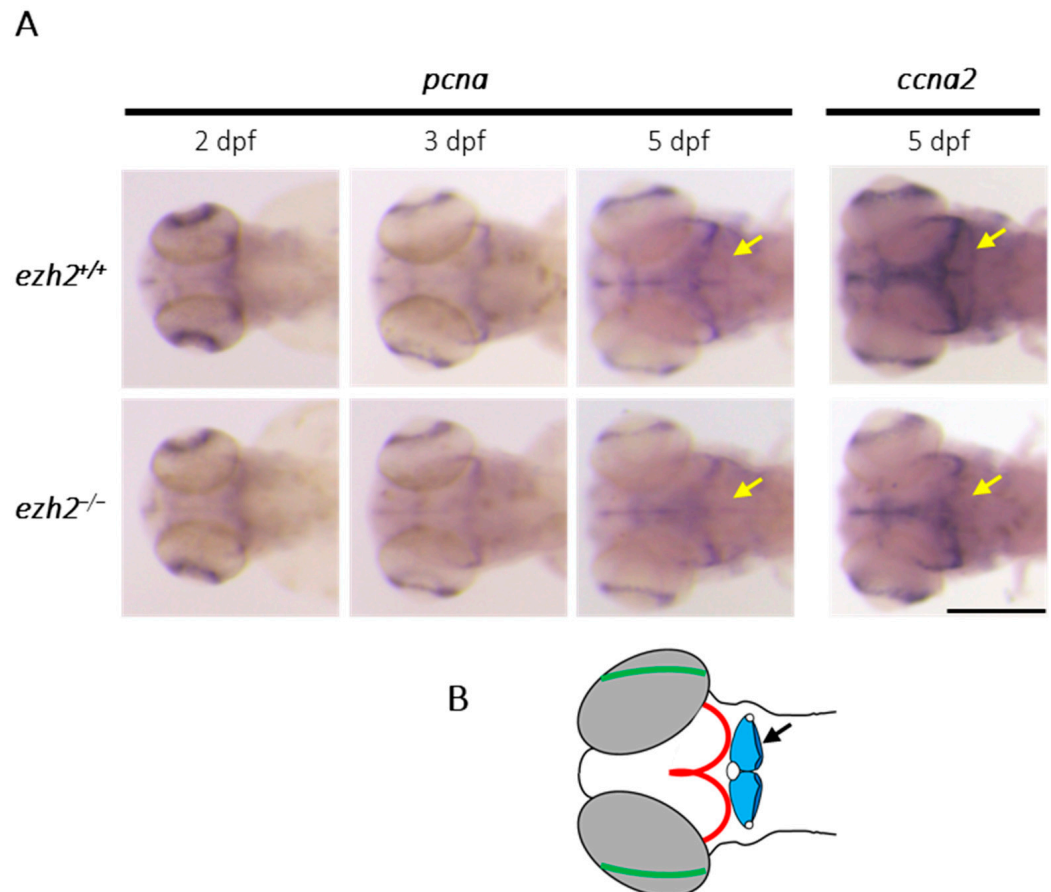
To gain more insight into the role of *ezh2* during oligodendrocyte development, we performed in situ hybridization experiments to label the expression of genes that are exclusively expressed in mature oligodendrocytes. The *mag* (myelin-associated glycoprotein) and *mpz* (myelin protein zero) genes code for proteins that are components of the myelin sheath. At 5 dpf, these genes are expressed in myelinating oligodendrocytes located in the midbrain and hindbrain. Cells expressing *mag* and *mpz* are observed in the hindbrain, along the midline, as well as on both sides of it. Additionally, a *mag*-associated signal is also detected in the cerebellum (Figure 1B,C). The expression patterns observed in *ezh2*-deficient larvae are identical to those seen in wild-type larvae, indicating that *ezh2* mutation does not notably affect oligodendrocyte development.

## 2.2. Loss of Ezh2 Function Selectively Impairs Cerebellar Progenitor Proliferation

In vitro studies on murine NSCs have shown that the inhibition of *Ezh2* expression reduces OPC proliferation and drastically decreases the number of oligodendrocytes [19]. In contrast, in zebrafish, zygotic loss of *ezh2* function does not show an obvious reduction in the number of oligodendrocytes as assessed by whole-mount in situ hybridization, suggesting that *ezh2* may not be necessary for oligodendrocyte differentiation in this model. However, the possibility that *ezh2* plays a role in regulating neural cell proliferation during zebrafish development is not excluded. To investigate this matter, we analyzed the expression of *pcna* (proliferating cell nuclear antigen), a well-established marker of proliferating cells in the developing zebrafish brain [28] using in situ hybridization at 2, 3 and 5 dpf (Figure 2A).

At 2 dpf, several proliferative zones emerge, with *pcna* expression predominantly localized in the ventricular regions, the retina and the forebrain, particularly in the pallial and subpallial regions of both wild-type and *ezh2* mutant larvae. At 3 dpf, *pcna* expression decreases in both *ezh2*<sup>+/+</sup> and *ezh2*<sup>-/-</sup> siblings and becomes restricted to the optic tectum and the retina, with a faint signal persisting in the forebrain. No differences in expression can be detected between wild-type and *ezh2* mutant larvae at this stage. At 5 dpf, *pcna* expression remains concentrated in the optic tectum and retina in wild-type and mutant larvae. A moderate signal is still detected in the forebrain in both groups. Notably, a robust *pcna* signal is observed in the cerebellum of wild-type larvae, whereas this signal is absent in *ezh2* mutants (Figure 2A,B). To confirm this difference, we examined the expression of *ccna2* (cyclin A2), another marker of cell proliferation, at 5 dpf (Figure 2A). In agreement with the

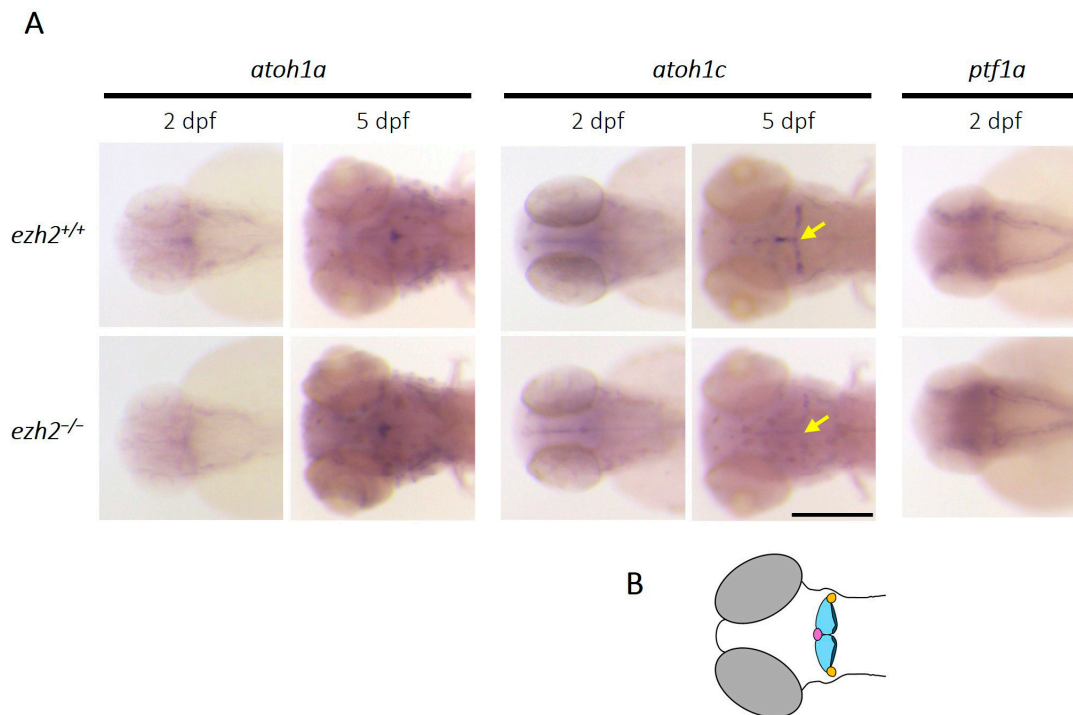
*pcna* expression profile, *ccna2* is expressed in the optic tectum, retina, and cerebellum of wild-type larvae. In contrast, *ezh2* mutant larvae show no detectable *ccna2* expression in the cerebellum. Together, our data indicate that *ezh2* inactivation leads to a specific reduction in cell proliferation within the cerebellum, without affecting proliferation in other brain regions. This suggests a role for *ezh2* in the development or maintenance of cerebellar progenitor cells during zebrafish neurodevelopment.



**Figure 2. Role of *ezh2* in cerebellar progenitor proliferation:** (A) whole-mount RNA in situ hybridization of the brain region of *ezh2*<sup>+/+</sup> and *ezh2*<sup>-/-</sup> siblings at 2, 3 or 5 dpf, as indicated, to detect the expression of the proliferation markers *pcna* and *ccna2*. The yellow arrows emphasize expression profile differences in the cerebellum between *ezh2*<sup>+/+</sup> and *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae. Scale bar is 200  $\mu$ m; and (B) schematic representation of zebrafish brain organization at 5 dpf. The retina is shown in green, the tectal proliferation region in red, and the cerebellum in blue with a black arrow.

### 2.3. Loss of *Ezh2* Function Selectively Affects *Atoh1c*-Expressing Cerebellar Progenitors

Like the mammalian cerebellum, the zebrafish cerebellum contains a diversity of neuronal subtypes that can be categorized according to the nature of their neurotransmitters; excitatory neurons are mainly glutamatergic and inhibitory neurons are mainly GABAergic. The glutamatergic population includes granule cells, unipolar brush cells, and eurydendroid cells, whereas the GABAergic population comprises Purkinje cells and local interneurons. These neurons originate from two distinct progenitor domains; glutamatergic neurons derive from progenitors expressing proneural *atoh1* genes, while GABAergic neurons derive from *ptf1a*-expressing progenitors [27]. To investigate the effect of *ezh2* loss-of-function on cerebellar neurogenesis, we analyzed the expression of key cerebellar progenitor markers in wild-type and *ezh2* mutant zebrafish larvae using in situ hybridization (Figure 3A).



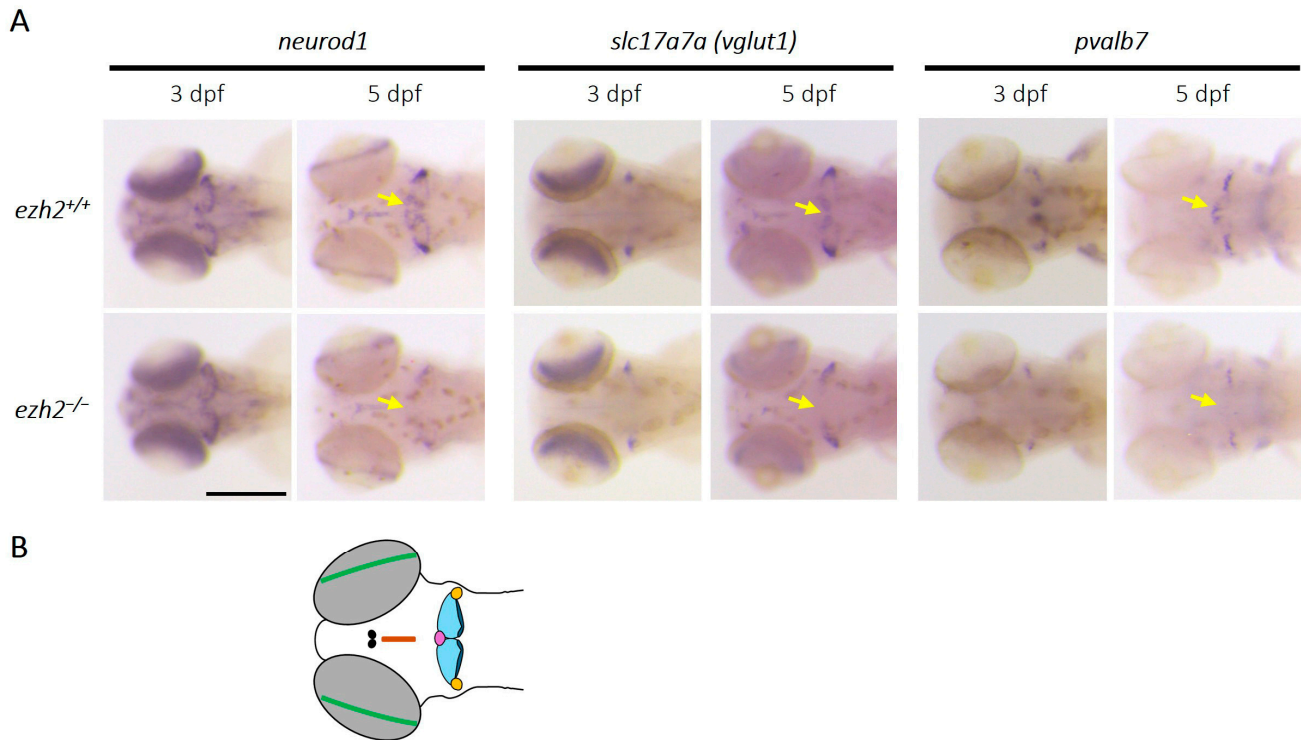
**Figure 3. Role of *ezh2* in cerebellar progenitors:** (A) whole-mount RNA in situ hybridization of the brain region of *ezh2*<sup>+/+</sup> and *ezh2*<sup>-/-</sup> siblings at 2 and 5 dpf, as indicated, to detect the expression of *atoh1a*, *atoh1c* and *ptf1a*. The yellow arrows emphasize *atoh1c* expression profile differences between *ezh2*<sup>+/+</sup> and *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae. Scale bar is 200  $\mu$ m; and (B) schematic representation of zebrafish hindbrain organization at 5 dpf. The corpus cerebelli (Cce) is shown in light blue, the lobus caudalis (LCa) cerebelli in dark blue, the valvula cerebelli (Va) in purple, and the eminentia granularis (EG) in yellow.

Zebrafish possess 3 *atoh1* (atonal bHLH transcription factor 1) paralogs—*atoh1a*, *atoh1b* and *atoh1c*—each expressed in distinct regions of the upper rhombic lip (URL) [29]. In contrast, *ptf1a* (pancreas-associated transcription factor 1a) is expressed in the ventricular zone, marking GABAergic progenitors [30]. At 2 dpf, both *atoh1a* and *atoh1c* were expressed in the URL in wild-type and *ezh2* mutant larvae, consistent with previous reports [27]. Similarly, *ptf1a* expression was detected in both *ezh2*<sup>+/+</sup> and *ezh2*<sup>-/-</sup> siblings at this stage, with no detectable differences. At 5 dpf, *atoh1a* expression becomes restricted to the valvula cerebelli (Va), with similar expression patterns observed in wild-type and *ezh2* mutant larvae. However, *atoh1c* expression, normally observed at the midline of the corpus cerebelli (Cce), as well as in the lobus caudalis cerebelli (LCa) and the eminentia granularis (EG) (Figure 3B), is strongly reduced in *ezh2* mutants compared to their wild-type counterparts. In contrast, *ptf1a* expression could no longer be detected at 5 dpf in either *ezh2*<sup>+/+</sup> or *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae (Supplementary Figure S25), likely reflecting the temporal restriction of expression of this gene to earlier stages of cerebellar development. Altogether, these results indicate that zygotic *ezh2* loss-of-function does not affect early cerebellar progenitor populations but specifically impairs *atoh1c*-expressing progenitor cells at 5 dpf. This suggests that *ezh2* is required for the maintenance or continued identity of *atoh1c*-expressing glutamatergic progenitors in the developing zebrafish cerebellum.

#### 2.4. Loss of Ezh2 Function Impairs the Differentiation of Cerebellar Granule and Purkinje Cells

Neural progenitors expressing *atoh1* genes give rise to immature Neurod1<sup>+</sup> granule cells. The *neurod1* gene encodes a transcription factor required to initiate granule cell differentiation and remains expressed in immature granule cells [27]. The immature granule

cells proliferate and migrate through the granule layer of the cerebellum to become mature granule cells. These mature granule cells are characterized by the expression of *slc17a7a* (solute carrier family 17 member 7a; also known as *vglut1*, L-glutamate transmembrane transporter). To investigate the role of *ezh2* in granule cell development and differentiation within the cerebellum, we analyzed the expression of *neurod1* and *slc17a7a* in wild-type and *ezh2*-deficient zebrafish larvae at 3 and 5 dpf (Figure 4A).



**Figure 4. Role of *ezh2* in the differentiation of cerebellar granule and Purkinje cells:** (A) whole-mount RNA in situ hybridization of the brain region of *ezh2*<sup>+/+</sup> and *ezh2*<sup>-/-</sup> siblings at 3 and 5 dpf, as indicated, to detect the expression of *neurod1*, a marker expressed in immature granule cells, *slc17a7a*, a marker of differentiated granule cells, and *pvalb7*, a marker of differentiated Purkinje cells. The yellow arrows emphasize expression profile differences between *ezh2*<sup>+/+</sup> and *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae. Scale bar is 200  $\mu$ m; and (B) schematic representation of some zebrafish brain structures at 5 dpf. The retina is shown in green, the habenula in black, the torus longitudinalis in brown, the corpus cerebelli (Cce) in light blue, the lobus caudalis (Lc) cerebelli in dark blue, the valvula cerebelli (Va) in purple, and the eminentia granularis (EG) in yellow.

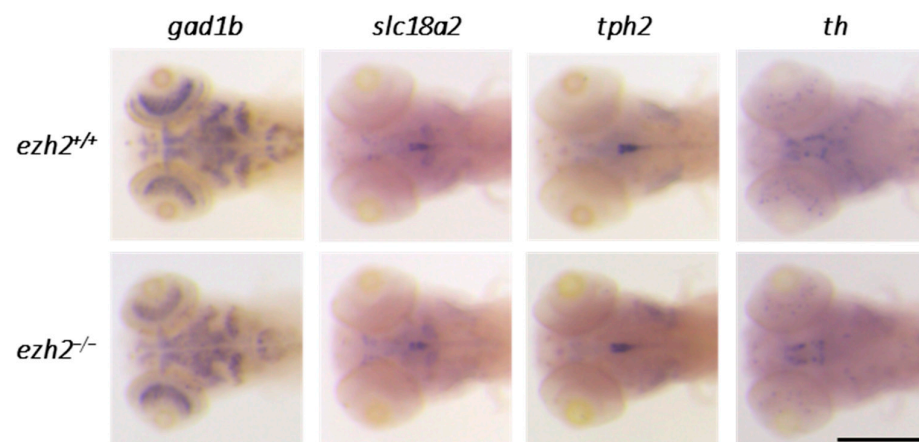
At 3 dpf, the differentiation of GABAergic and glutamatergic neurons [26], *neurod1*, shows similar expression in the cerebellum of wild-type and *ezh2*-deficient zebrafish. However, at 5 dpf, its expression was markedly reduced in the cerebellum of *ezh2* mutant larvae, being restricted to the retina and the eminentia granularis (EG) (Figure 4B). Similarly, *slc17a7a*, which marks mature granule cells, was initially detected in the lateral cerebellum (future EG) in both genotypes at 3 dpf. At 5 dpf, its expression expanded to all cerebellar lobes, the habenula, and the torus longitudinalis in wild-type larvae, while it remained restricted to the EG in *ezh2* mutant larvae, with diminished expression in the habenula and torus longitudinalis (Figure 4A,B). These findings suggest that *ezh2* is required for the proper late differentiation of granule cells, particularly in the central cerebellar lobe (CCe) and caudal lobe (Lc), as well as for the development of *slc17a7a*-expressing neurons in extracerebellar regions.

In addition, the analysis of *pvalb7* (parvalbumin 7), a marker of differentiated Purkinje cells derived from *ptf1a*-expressing progenitors [27], revealed a loss of medial cerebellar expression in *ezh2*<sup>-/-</sup> mutants at both 3 and 5 dpf. At 5 dpf, the *pvalb7* signal is confined

to the EG in *ezh2*-deficient larvae, while it is present in both the CCe and EG in wild-type counterparts. These data indicate that *ezh2* is also essential for the differentiation of Purkinje cells, particularly in the CCe. Altogether, *ezh2* loss-of-function disrupts the development of both glutamatergic (granular cells) and GABAergic (Purkinje cells) neurons in specific cerebellar subregions.

### 2.5. Loss of Ezh2 Function Does Not Affect the Development of Most Neurotransmitter-Specific Neuronal Populations

Expression profiles, obtained using the glutamatergic-specific *slc17a7a* probe, revealed that cells located outside the cerebellum, specifically in the habenula and torus longitudinalis, are affected by *ezh2* loss-of-function (Figure 4A). In order to obtain an overview of the effect of the *ezh2* mutation on neuronal development, we performed in situ hybridization experiments to label the expression of markers for other main neurotransmitters in wild-type and *ezh2*<sup>-/-</sup> zebrafish larvae at 5 dpf (Figure 5).



**Figure 5. Role of *ezh2* in the development of neurotransmitter-specific neuronal populations:** whole-mount RNA in situ hybridization of the brain region of *ezh2*<sup>+/+</sup> and *ezh2*<sup>-/-</sup> siblings at 5 dpf to detect the expression of *gad1b*, labeling GABAergic neurons, *slc18a2*, labeling catecholaminergic neurons, *tph2*, labeling serotonergic neurons, and *th*, labeling dopaminergic neurons. Scale bar is 200  $\mu$ m.

In both mammals and zebrafish, GABAergic neurons express glutamate decarboxylase enzymes (Gad1 and Gad2), which catalyze the conversion of glutamate to GABA [26]. Zebrafish possess two paralogs of Gad1, *gad1a* and *gad1b*, which exhibit similar expression patterns [31]. At 5 dpf, *gad1b* is strongly expressed in several brain regions, including the retina, subpallium, optic tectum, and cerebellum. Expression patterns of *gad1b* are comparable between wild-type and *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae, suggesting that zygotic *ezh2* loss-of-function does not disrupt the development of GABAergic neurons.

Catecholamines are organic compounds synthesized from tyrosine; they act as neurotransmitters, with the most common being adrenaline, noradrenaline, and dopamine. In zebrafish, catecholaminergic neurons can be identified by the expression of *slc18a2* (the solute carrier family 18 member 2, an ATP-dependent transporter of monoamines) [32]. At 5 dpf, *slc18a2* is expressed in a cell cluster located in the diencephalon, as well as in the raphe nuclei and hypothalamus. These expression domains are maintained in *ezh2*<sup>-/-</sup> mutants, indicating that catecholaminergic neuron development is not impaired by the loss of zygotic *ezh2* function.

Serotonergic neurons were examined using a probe against *tph2* (tryptophan 5-monooxygenase), which encodes the enzyme tryptophan hydroxylase responsible for serotonin biosynthesis [33]. At 5 dpf, *tph2* expression is detected in the raphe neurons in

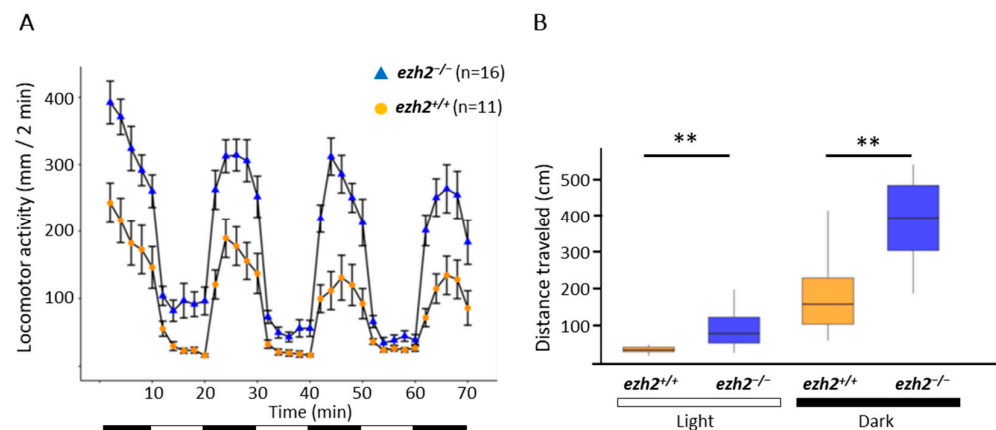
both wild-type and *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae, with no observable differences by whole-mount in situ hybridization, suggesting that serotonergic neuron development remains unaffected.

Dopaminergic neurons were visualized using *th* (tyrosine hydroxylase) expression as a marker. In zebrafish, *th*-positive clusters are found in the olfactory bulb, subpallium, preoptic area, pretectum, thalamus, hypothalamus, locus coeruleus, and medulla oblongata. These domains were preserved in *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae at 5 dpf, indicating that loss of *ezh2* function does not induce major alterations in the dopaminergic system development.

Then, in situ hybridization experiments performed on *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae highlighted a specific effect of *ezh2* loss-of-function on the development of cerebellar neurons, particularly on subpopulations of granular cells and Purkinje cells, with little or no effect in other brain regions.

## 2.6. Loss of Ezh2 Function Alters Locomotor Activity

The cerebellum is involved in various motor functions, particularly in the regulation of locomotion through the activity of Purkinje cells [34]. To investigate whether *ezh2* loss-of-function could affect larval behavior, we performed locomotor assays using a Zebrabox chamber (ViewPoint Life Sciences, Lyon, France) equipped with an infrared light-emitting floor and a top-mounted infrared camera, which allowed for the video recording of whole plates under both light and dark conditions. Locomotor activity assays conducted in 48-well plates, following a protocol that consisted of a 10 min initial acclimating period in the dark, followed by six alternating 10 min light and dark phases. As previously described [35], switching from dark to light dramatically decreases larval activity, whereas the return to darkness is associated with an increase in locomotor activity (Figure 6A).



**Figure 6.** Comparison of the locomotor activities between wild-type and *ezh2*<sup>-/-</sup> mutants at 5 dpf: (A) distance traveled throughout a 70 min session for wild-type (yellow, n = 11) and *ezh2*<sup>-/-</sup> mutant (blue, n = 16). Data are presented as mean  $\pm$  SD of the distance moved (in mm) in 2 min intervals. Black and white bars at the bottom indicate dark and light conditions, respectively; and (B) cumulative distance travelled for each wild-type (yellow) and mutant (blue) larvae during the light (left) and dark (right) periods. Statistical analysis was performed using a Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s post hoc test. \*\*,  $p < 0.05$ .

Moreover, the assay reveals a hyperlocomotor phenotype and an increased total swimming distance (Figure 6B) for *ezh2*<sup>-/-</sup> mutants at 5 dpf when compared to wild-type larvae. This indicates that *ezh2* plays a role in the locomotor activity of zebrafish larvae at 5 dpf.

Finally, this hyperlocomotor phenotype was not observed in the heterozygous *ezh2*<sup>+/-</sup> larvae, in which the expression of *neurod1*, *slc17a7a* and *pvalb7* was also similar to wild-type (Supplementary Figure S28).

### 3. Discussion

Polycomb group proteins, and, in particular, the PRC2 complex member EZH2, have emerged as key epigenetic regulators of neural development. In this study, we investigated the role of *ezh2* during zebrafish brain development, with a particular focus on oligodendrocyte specification, cerebellar neurogenesis, and neurotransmitter-specific neuronal populations.

Our results show that *ezh2* is dispensable for early oligodendrocyte lineage specification in zebrafish. The expression of *olig2*, as well as mature oligodendrocyte markers, such as *mag* and *mpz*, are preserved in *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae, suggesting that PRC2 activity is not required for oligodendrocyte precursor cell formation or terminal oligodendrocyte differentiation in this context. This contrasts with in vitro studies showing that *Ezh2* promotes oligodendrocyte differentiation instead of the astrocyte fate [19] but aligns with in vivo data in mice showing normal oligodendrocyte precursor cell differentiation despite delayed maturation upon *Ezh2* inactivation [21]. These findings underscore the importance of in vivo models for defining the context-dependent roles of PRC2 components.

Strikingly, the most profound effects of *ezh2* loss-of-function in zebrafish were observed in the cerebellum. Our data demonstrate a selective reduction in proliferative markers (*pcna* and *ccna2*) within the cerebellum of *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae, while other proliferative brain zones remain unaffected, at least within the limit of sensitivity of whole-mount in situ hybridization. These results suggest that *ezh2* is specifically required to maintain cerebellar progenitor proliferation during late stages of development. This is supported by the selective downregulation of *atoh1c*, a key marker of glutamatergic progenitors in the corpus cerebelli and caudal lobes, at 5 dpf in *ezh2*-deficient larvae, whereas earlier expression of *atoh1a* and *ptf1a* remains intact. In line with this, we observed an impaired differentiation of both major cerebellar neuronal subtypes, the glutamatergic granule cells and the GABAergic Purkinje cells. The expression of *neurod1* and *slc17a7a* (*vglut1*), marking immature and mature granule cells, respectively, was markedly reduced in the cerebellum of *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae, indicating a failure in granule cell maturation. Similarly, *pvalb7*, a marker of Purkinje cells, was diminished in the medial cerebellum of mutant larvae. These findings suggest that *ezh2* is essential for the differentiation of multiple cerebellar neuron populations derived from distinct progenitor domains. The selective sensitivity of cerebellar neurons to *ezh2* loss raises intriguing questions regarding the underlying mechanisms, whether due to epigenetic control of lineage-specific transcriptional programs or due to broader roles in cell cycle progression and survival. We speculate that *ezh2* loss-of-function directly alters the development of these cerebellar subpopulations; however, we cannot exclude the possibility that some of the phenotypes are also caused by cell non-autonomous effects. Therefore, our observations require additional histological analyses and time-lapse studies using GFP-expressing transgenic lines to better elucidate the role of *ezh2* in cerebellar granule and Purkinje cell development.

Interestingly, neuronal cells outside the cerebellum were largely preserved in *ezh2* mutants. The expression of *gad1b*, *slc18a2*, *tph2*, and *th*, markers for GABAergic, catecholaminergic, serotonergic, and dopaminergic neurons, respectively, was indistinguishable between wild-type and *ezh2*-deficient larvae. This reinforces the notion that *ezh2* exerts region- and lineage-specific effects, primarily targeting cerebellar neurogenesis rather than global neural differentiation. Within the cerebellum, despite the loss of a number of Purkinje cells, the *gad1b* signal appears similar in *ezh2* mutants compared to wild-type larvae. In *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae, the reduction of *gad1b* expression could be masked by the signal originating from the GABAergic interneurons. Indeed, in situ hybridization for *pax2a* expression, a marker of interneurons [36], reveals that the number of interneurons is comparable between wild-type and *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae at 5 dpf (Supplementary Figure S26). Alternatively, one cannot rule

out the possibility that *ezh2* loss-of-function affects the maturation of certain Purkinje cells, giving rise to a *Gad1b*<sup>+</sup>, *Pvalb7*<sup>-</sup> cell population.

The functional consequences of impaired cerebellar development were highlighted by behavioral assays, which revealed a hyperlocomotor phenotype in *ezh2*<sup>-/-</sup> larvae at 5 dpf. The cerebellum plays a key role in fine-tuning motor coordination; Purkinje cells, in particular, are crucial for modulating motor output [37,38]. Indeed, the targeted ablation of Purkinje cells at 2 dpf induces a hyperlocomotor phenotype in zebrafish larvae [37]. Thus, the observed behavioral phenotype could reflect cerebellar dysfunction resulting from the loss of certain Purkinje cell populations, although we cannot exclude that this phenotype is due to other neuronal or metabolic defects not detected by our in situ hybridization approach.

Our data in zebrafish parallel findings in mice, where conditional inactivation of *Ezh2* in the cerebellum causes transcriptional dysregulation, leading to a reduction in Purkinje cells and impaired proliferation of granule precursor cells derived from the rhombic lip [3]. However, while cerebellar interneurons do not appear to be affected by *ezh2* loss-of-function in zebrafish at 5 dpf (Supplementary Figure S26), this cell population is increased in *Ezh2*-deficient mouse cerebella [3]. Moreover, these mice exhibit marked cerebellar hypoplasia at postnatal day (P)8. Interestingly, deregulated expression of *EZH2* has also been reported in congenital brainstem disconnection (CBSD), a rare developmental anomaly characterized by severe cerebellar hypoplasia and brainstem malformation [39]. Although we did not observe obvious cerebellar hypoplasia in *ezh2*-deficient zebrafish larvae at 5 dpf—likely because this developmental window precedes its manifestation—data from zebrafish, mice, and human disease collectively support the notion that *EZH2* dysfunction impairs cerebellar development.

Beyond development, *EZH2* and *PRC2* dysfunction have also been implicated in pediatric brain tumorigenesis. Notably, diffuse midline gliomas (DMGs) harbor *H3K27M* mutations or overexpress *EZH1*, both of which competitively inhibit *EZH2* methyltransferase activity and result in global *H3K27me3* loss to impair neural differentiation and to promote a poorly differentiated, proliferative tumor state [7,8]. Oligodendrocyte progenitors are thought to be the cells of origin for the development of DMG [40,41]. However, our data do not show a role of *ezh2* in oligodendrocyte differentiation. Thus, our model did not allow us to identify cellular developmental abnormalities that might contribute to diffuse midline gliomagenesis. In contrast, our results in zebrafish show that *ezh2* loss-of-function disrupts the progression of cerebellar progenitors, a population particularly relevant in the context of *H3K27me3*-deficient medulloblastoma. The parallel between impaired cerebellar development in *ezh2*<sup>-/-</sup> mutants and *H3K27me3* loss in human cerebellar tumors reinforces the importance of *EZH2* in cerebellar lineage fidelity and highlights zebrafish as a tractable model with which to study the developmental origins of these pediatric brain cancers. However, additional experiments are still required to determine whether the cerebellar developmental alterations observed in our zebrafish model affect the cells at the origin of human *H3K27me3*-deficient medulloblastoma. Our study identifies *ezh2* as a key epigenetic regulator required for cerebellar progenitor proliferation and neuron differentiation in zebrafish, with striking parallels to mechanisms disrupted in certain medulloblastomas.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Zebrafish Maintenance and Embryo Preparation

The zebrafish *ezh2*(ul2) line ([15]; ZDB-ALT-171009-3) harbors a 22 bp net insertion (insertion of 27 nucleotides together with a deletion of 5 bp) in the *ezh2* exon 2, leading

to a frameshift in the coding sequence and to the appearance of a premature stop codon. Hereafter, *ezh2<sup>ul2/ul2</sup>* embryos will be referred as *ezh2<sup>-/-</sup>*.

Zebrafish were maintained at 28 °C in a 14/10 h light/dark cycle. After spawning, embryos or larvae were collected and staged according to Kimmel et al. [42]. The chorions were removed from embryos by the action of 1% pronase (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 1 min. Zebrafish embryos or larvae were fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PBS (phosphate-buffered saline, Invitrogen-ThermoFisher, Waltham, MA, USA), dehydrated gradually to 100% methanol, and kept at −20 °C.

#### 4.2. Whole-Mount In Situ Hybridization

Antisense-RNA probes were generated using RT-PCR from the total mRNA extracted from zebrafish larvae at 5 dpf using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), following the manufacturer's instructions. After reverse transcription (Superscript III, Invitrogen), cDNAs were amplified by PCR using primers coupled to the T7 sequence for forward primers and to the SP6 sequence for reverse primers.

The primers used for probe generation were:

ISH\_olig2\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGATGGACTCTGACACGAGC*  
 ISH\_olig2\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGGGGCTGAGGAAGGTTTGCCAT*  
 ISH\_mag\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGCCGTGAGGGTGTTTCAGTGTGTGT*  
 ISH\_mag\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGCGTCTCCCGTGCCTTCTCT*  
 ISH\_mpz\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGGTGGTGCTCTTGGGCATAGCCTCTC*  
 ISH\_mpz\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGGGAGCCCGTTATCACACCAGCC*  
 ISH\_pcnaf\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGGGCAACATCAAGCTCTCACA*  
 ISH\_pcnaf\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGAAATCCACAGATGACAGGC*  
 ISH\_ccna2\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGGGAAGGATGTCAACACAAGGAAG*  
 ISH\_ccna2\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGGAGAGAAGTGTGTCAGCACCAGATG*  
 ISH\_atoh1a\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGCCAACGTCGTGCAGAAA*  
 ISH\_atoh1a\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGAACCCATTACAAAGCCCAGATA*  
 ISH\_atoh1c\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGTTTCTCAGCGCACACGACCCT*  
 ISH\_atoh1c\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGTTTGGTCTCTTCGGTCATAGGCAAC*  
 ISH\_ptf1a\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGCACAGGCTTAGACTCTTTCTCC*  
 ISH\_ptf1a\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGCCCGTAGTCTGGGTCATTTG*  
 ISH\_neurod1\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGTCGAGACGCTCCGACTAGCCAA*  
 ISH\_neurod1\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGGCGTCGAGCCCGCGTAAAGA*  
 ISH\_vglut1\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGTGCCAGGGACTTGTGGAGGG*  
 ISH\_vglut1\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGCTGGCGTAGCGTGGTGCGA*  
 ISH\_pvalb7\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGTTATCCGTCTCTCACCTCCAGCCA*  
 ISH\_pvalb7\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGCGTGTTCGGTGGCTCTATCACA*  
 ISH\_gad1b\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGTGAGCGGCATTGAGAGGGCA*  
 ISH\_gad1b\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGCGTAGGCGACCACTGAGCC*  
 ISH\_slc18a2\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGGCACTGGGAGGACTAGCAATGGG*  
 ISH\_slc18a2\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGGTTGGCGGGAGGATTTCCGAG*  
 ISH\_tph2\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGCGGACACCTGCCATGAACTGCTT*  
 ISH\_tph2\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGTGAGTAAGTCGATGCTCTGCGTGT*  
 ISH\_th\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGCCTGTTCGGATGTTAGCACGCTGG*  
 ISH\_th\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGGGCCTCAACTGAAATCCTGTGCGT*  
 ISH\_pax2a\_F: *TAATACGACTCACTATAGGGGCACTGGAGCAGACGCAACCA*  
 ISH\_pax2a\_R: *GATTTAGGTGACACTATAGAGGTCGCCGTCTCGCCTTGA*.

The sequences corresponding to T7 and SP6 promoters for in vitro transcription are in italics.

The cDNAs were used to in vitro synthesize digoxigenin-labelled antisense RNA probes using the DIG RNA Labeling Kit (SP6) (Roche-Sigma Aldrich Chimie S.a.r.l, Saint-Quentin-Follavier, France), following the manufacturer's protocol.

In situ hybridization was then performed, as described by Thisse and Thisse [43]. Briefly, the fixed embryos were rehydrated and permeabilized with 10 µg/mL proteinase K for 10 min (2 dpf embryos) or 30 min (3–5 dpf larvae) at room temperature. Twenty-four to 50 embryos or larvae from *ezh2<sup>+/-</sup>* in-crosses 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 GmbH, Mannheim, Germany, 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 and larvae were imaged using a Leica MZ10F stereomicroscope equipped with a Leica DFC295 digital camera. After imaging, the stained embryos and larvae were genotyped (see Supplementary Figures S1–S26).

#### 4.3. Genotype Analyses

To genotype paraformaldehyde-fixed embryos and larvae, DNA was extracted using sodium hydroxide and Tris [15]. Single embryos or larvae were placed into microcentrifuge tubes containing 20 µL of 50 mM NaOH and heated for 20 min at 95 °C. The tubes were then cooled to 4 °C, and 2 µL of 1 M Tris-HCl, pH 7.4, was added to neutralize the basic solution. Genotype analysis was performed by PCR on 2.5 µL of samples using the primer set TAL\_ezh2\_En\_5' (AAATCGGAGAAGGGTCCTG) and TAL\_ezh2\_En\_3' (ACACACATGCAACTGGACTC) followed by a 2.5% agarose gel electrophoresis. The 22-bp insertion in the mutant allele allows to distinguish (+/+), (+/-) and (-/-) genotypes.

#### 4.4. Locomotor Activity Assays

The locomotor activity assays were performed on 5 dpf larvae from *ezh2<sup>+/-</sup>* in-crosses in 48-well plates that were handled minimally before placement in a Zebrafish chamber (ViewPoint Life Sciences, Lyon, France) equipped with an infrared light-emitting floor and a top-mounted infrared camera, allowing for video recording of the whole plate under both light and dark conditions. Larval behavior measurements, during a protocol consisting of a 10 min initial acclimating period in the dark, followed by six alternating 10 min light and dark phases, were achieved using the ZebraLab (version VpCore2-5.19.0.40) software with a detection threshold set at 35 and an xmin set at 3 (ViewPoint Life Sciences). After recording, the larvae were euthanized and their genotype determined, as detailed before. Locomotor activity assays were conducted 5 times from 3 independent *ezh2<sup>+/-</sup>* in-crosses (see Supplementary Figure S27).

#### 4.5. Statistical Analyses

Data analysis was carried out using the R/RStudio packages for statistical computing [44]. Datasets were tested for normal distribution by the Shapiro–Wilk's test. Group differences were calculated by the Kruskal–Wallis test, followed by Dunn's post hoc test (ns, no statistical difference; \*,  $p < 0.01$ ; \*\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms26199736/s1>.

**Author Contributions:** Supervision, P.-O.A.; Conceptualization, M.H. and P.-O.A.; Methodology and data collection, M.H., P.V. and P.-O.A.; Formal Analysis, M.H., P.V., X.L.B., C.L. and P.-O.A.; Resources and funding acquisition, X.L.B., C.L. and P.-O.A.; Original draft preparation, M.H. and P.-O.A.; Writing of the manuscript, P.-O.A.; Revision of the manuscript, M.H., P.V., X.L.B. and C.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the CNRS, Inserm, the University of Lille, CHU Lille, the Comité de l’Oise de la Ligue Contre le Cancer and the GIP Cancéropôle Nord-Ouest.

**Institutional Review Board Statement:** Zebrafish were maintained in compliance with 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, CEEA 75 Nord Pas-de-Calais, the Structure du Bien-être Animal (SBEA) of the University of Lille and the French Ministry of Higher Education and Research (APAFiS approval number 48102-2024031116485688\_v4).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All relevant data are contained within the manuscript.

**Acknowledgments:** We are grateful to our colleagues from the “Cell Plasticity and Cancer Team” for fruitful discussions.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

DMG	Diffuse midline glioma
dpf	Days post fertilization
EG	Eminentia granularis
ESC	Embryonic stem cell
hpf	Hours post fertilization
LCa	Lobus caudalis cerebelli
NSC	Neuronal stem cell
OPC	Oligodendrocyte precursor cell
pMN	Progenitor domain of motor neurons
PRC2	Polycomb repressive complex 2
URL	Upper rhombic lip
Va	Valvula cerebelli
CCe	Corpus Cerebelli

## References

1. Liu, P.P.; Tang, G.B.; Xu, Y.J.; Zeng, Y.Q.; Zhang, S.F.; Du, H.Z.; Teng, Z.Q.; Liu, C.M. MiR-203 Interplays with Polycomb Repressive Complexes to Regulate the Proliferation of Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cell Rep.* **2017**, *9*, 190–202. [[CrossRef](#)]
2. Ronan, J.L.; Wu, W.; Crabtree, G.R. From neural development to cognition: Unexpected roles for chromatin. *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*, 347–359. [[CrossRef](#)]
3. Feng, X.; Juan, A.H.; Wang, H.A.; Ko, K.D.; Zare, H.; Sartorelli, V. Polycomb Ezh2 controls the fate of GABAergic neurons in the embryonic cerebellum. *Development* **2016**, *143*, 1971–1980. [[CrossRef](#)]
4. Paskeh, M.D.A.; Mehrabi, A.; Gholami, M.H.; Zabolian, A.; Ranjbar, E.; Saleki, H.; Ranjbar, A.; Hashemi, M.; Ertas, Y.N.; Hushmandi, K.; et al. EZH2 as a new therapeutic target in brain tumors: Molecular landscape, therapeutic targeting and future prospects. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *146*, 112532. [[CrossRef](#)]
5. Lewis, P.W.; Müller, M.M.; Koletsky, M.S.; Cordero, F.; Lin, S.; Banaszynski, L.A.; Garcia, B.A.; Muir, T.W.; Becher, O.J.; Allis, C.D. Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* **2013**, *340*, 857–861. [[CrossRef](#)]
6. Jain, S.U.; Do, T.J.; Lund, P.J.; Rashoff, A.Q.; Diehl, K.L.; Cieslik, M.; Bajic, A.; Juretic, N.; Deshmukh, S.; Venneti, S.; et al. PFA ependymoma-associated protein EZHIP inhibits PRC2 activity through a H3 K27M-like mechanism. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Cassim, A.; Dun, M.D.; Gallego-Ortega, D.; Valdes-Mora, F. EZHIP’s role in diffuse midline glioma: Echoes of oncohistones? *Trends Cancer* **2024**, *10*, 1095–1105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Silveira, A.B.; Kasper, L.H.; Fan, Y.; Jin, H.; Wu, G.; Shaw, T.I.; Zhu, X.; Larson, J.D.; Easton, J.; Shao, Y.; et al. H3.3 K27M depletion increases differentiation and extends latency of diffuse intrinsic pontine glioma growth in vivo. *Acta Neuropathol.* **2019**, *137*, 637–655, Erratum in *Acta Neuropathol.* **2019**, *137*, 1021. [[CrossRef](#)]
9. Robinson, G.; Parker, M.; Kranenburg, T.A.; Lu, C.; Chen, X.; Ding, L.; Phoenix, T.N.; Hedlund, E.; Wei, L.; Zhu, X.; et al. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature* **2012**, *488*, 43–48. [[CrossRef](#)]
10. Gabriel, N.; Balaji, K.; Jayachandran, K.; Inkman, M.; Zhang, J.; Dahiya, S.; Goldstein, M. Loss of H3K27 Trimethylation Promotes Radiotherapy Resistance in Medulloblastoma and Induces an Actionable Vulnerability to BET Inhibition. *Cancer Res.* **2022**, *82*, 2019–2030. [[CrossRef](#)]
11. Rougeot, J.; Chrispijn, N.D.; Aben, M.; Elurbe, D.M.; Andralojc, K.M.; Murphy, P.J.; Jansen, P.W.T.C.; Vermeulen, M.; Cairns, B.R.; Kamminga, L.M. Maintenance of spatial gene expression by Polycomb-mediated repression after formation of a vertebrate body plan. *Development* **2019**, *146*, dev178590. [[CrossRef](#)]
12. Hanot, M.; Raby, L.; Völkel, P.; Le Bourhis, X.; Angrand, P.-O. The Contribution of the Zebrafish Model to the Understanding of Polycomb Repression in Vertebrates. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. O'Carroll, D.; Erhardt, S.; Pagani, M.; Barton, S.C.; Surani, M.A.; Jenuwein, T. The polycomb-group gene Ezh2 is required for early mouse development. *Mol. Cell Biol.* **2001**, *21*, 4330–4336. [[CrossRef](#)]
14. San, B.; Chrispijn, N.D.; Wittkopp, N.; van Heeringen, S.J.; Lagendijk, A.K.; Aben, M.; Bakkers, J.; Ketting, R.F.; Kamminga, L.M. Normal formation of a vertebrate body plan and loss of tissue maintenance in the absence of ezh2. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24658. [[CrossRef](#)]
15. Dupret, B.; Völkel, P.; Vennin, C.; Toillon, R.-A.; Le Bourhis, X.; Angrand, P.-O. The histone lysine methyltransferase Ezh2 is required for maintenance of the intestine integrity and for caudal fin regeneration in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2017**, *1860*, 1079–1093. [[CrossRef](#)]
16. Schmidt, R.; Strähle, U.; Scholpp, S. Neurogenesis in zebrafish—From embryo to adult. *Neural Dev.* **2013**, *8*, 3. [[CrossRef](#)]
17. Mohn, F.; Weber, M.; Rebhan, M.; Roloff, T.C.; Richter, J.; Stadler, M.B.; Bibel, M.; Schübeler, D. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol. Cell* **2008**, *30*, 755–766. [[CrossRef](#)]
18. Corley, M.; Kroll, K.L. The roles and regulation of Polycomb complexes in neural development. *Cell Tissue Res.* **2015**, *359*, 65–85. [[CrossRef](#)]
19. Sher, F.; Rössler, R.; Brouwer, N.; Balasubramanian, V.; Boddeke, E.; Copray, S. Differentiation of neural stem cells into oligodendrocytes: Involvement of the polycomb group protein Ezh2. *Stem Cells* **2008**, *26*, 2875–2883. [[CrossRef](#)]
20. Sher, F.; Boddeke, E.; Olah, M.; Copray, S. Dynamic changes in Ezh2 gene occupancy underlie its involvement in neural stem cell self-renewal and differentiation towards oligodendrocytes. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40399. [[CrossRef](#)]
21. Wang, W.; Cho, H.; Kim, D.; Park, Y.; Moon, J.H.; Lim, S.J.; Yoon, S.M.; McCane, M.; Aicher, S.A.; Kim, S.; et al. PRC2 Acts as a Critical Timer That Drives Oligodendrocyte Fate over Astrocyte Identity by Repressing the Notch Pathway. *Cell Rep.* **2020**, *32*, 108147. [[CrossRef](#)]
22. Ackerman, S.D.; Monk, K.R. The scales and tales of myelination: Using zebrafish and mouse to study myelinating glia. *Brain Res.* **2016**, *1641*, 79–91. [[CrossRef](#)]
23. Emery, B.; Lu, Q.R. Transcriptional and Epigenetic Regulation of Oligodendrocyte Development and Myelination in the Central Nervous System. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *7*, a020461. [[CrossRef](#)]
24. Park, H.C.; Shin, J.; Roberts, R.K.; Appel, B. An olig2 reporter gene marks oligodendrocyte precursors in the postembryonic spinal cord of zebrafish. *Dev. Dyn.* **2007**, *236*, 3402–3407. [[CrossRef](#)]
25. McFarland, K.A.; Topczewska, J.M.; Weidinger, G.; Dorsky, R.I.; Appel, B. Hh and Wnt signaling regulate formation of olig2+ neurons in the zebrafish cerebellum. *Dev. Biol.* **2008**, *318*, 162–171. [[CrossRef](#)]
26. Bae, Y.K.; Kani, S.; Shimizu, T.; Tanabe, K.; Nojima, H.; Kimura, Y.; Higashijima, S.; Hibi, M. Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Dev. Biol.* **2009**, *330*, 406–426. [[CrossRef](#)]
27. Kani, S.; Bae, Y.K.; Shimizu, T.; Tanabe, K.; Satou, C.; Parsons, M.J.; Scott, E.; Higashijima, S.; Hibi, M. Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum. *Dev. Biol.* **2010**, *343*, 1–17. [[CrossRef](#)]
28. Wullmann, M.F.; Knipp, S. Proliferation pattern changes in the zebrafish brain from embryonic through early postembryonic stages. *Anat. Embryol.* **2000**, *202*, 385–400. [[CrossRef](#)]
29. Adolf, B.; Bellipanni, G.; Huber, V.; Bally-Cuif, L. atoh1.2 and beta3.1 are two new bHLH-encoding genes expressed in selective precursor cells of the zebrafish anterior hindbrain. *Gene Expr. Patterns* **2004**, *5*, 35–41. [[CrossRef](#)]
30. Volkman, K.; Rieger, S.; Babaryka, A.; Köster, R.W. The zebrafish cerebellar rhombic lip is spatially patterned in producing granule cell populations of different functional compartments. *Dev. Biol.* **2008**, *313*, 167–180. [[CrossRef](#)]
31. Lüffe, T.M.; D'Orazio, A.; Bauer, M.; Gioga, Z.; Schoeffler, V.; Lesch, K.P.; Romanos, M.; Drepper, C.; Lillesaar, C. Increased locomotor activity via regulation of GABAergic signalling in foxp2 mutant zebrafish-implications for neurodevelopmental disorders. *Transl. Psychiatry* **2021**, *11*, 529. [[CrossRef](#)]

32. Wen, L.; Wei, W.; Gu, W.; Huang, P.; Ren, X.; Zhang, Z.; Zhu, Z.; Lin, S.; Zhang, B. Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* **2008**, *314*, 84–92. [[CrossRef](#)]
33. Teraoka, H.; Russell, C.; Regan, J.; Chandrasekhar, A.; Concha, M.L.; Yokoyama, R.; Higashi, K.; Take-Uchi, M.; Dong, W.; Hiraga, T.; et al. Hedgehog and Fgf signaling pathways regulate the development of tphR-expressing serotonergic raphe neurons in zebrafish embryos. *J. Neurobiol.* **2004**, *60*, 275–288. [[CrossRef](#)]
34. Pose-Méndez, S.; Schramm, P.; Valishetti, K.; Köster, R.W. Development, circuitry, and function of the zebrafish cerebellum. *Cell Mol. Life Sci.* **2023**, *80*, 227. [[CrossRef](#)]
35. MacPhail, R.C.; Brooks, J.; Hunter, D.L.; Padnos, B.; Irons, T.D.; Padilla, S. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology* **2009**, *30*, 52–58. [[CrossRef](#)]
36. Batista, M.F.; Lewis, K.E. Pax2/8 act redundantly to specify glycinergic and GABAergic fates of multiple spinal interneurons. *Dev. Biol.* **2008**, *323*, 88–97. [[CrossRef](#)]
37. Pose-Méndez, S.; Schramm, P.; Winter, B.; Meier, J.C.; Ampatzis, K.; Köster, R.W. Lifelong regeneration of cerebellar Purkinje cells after induced cell ablation in zebrafish. *eLife* **2023**, *12*, e79672. [[CrossRef](#)]
38. Auer, F.; Nardone, K.; Matsuda, K.; Hibi, M.; Schoppik, D. Cerebellar Purkinje cells control posture in larval zebrafish (*Danio rerio*). *eLife* **2025**, *13*, RP97614. [[CrossRef](#)]
39. Barth, P.G.; Aronica, E.; Fox, S.; Fluiter, K.; Weterman, M.A.J.; Poretti, A.; Miller, D.C.; Boltshauser, E.; Harding, B.; Santi, M.; et al. Deregulated expression of EZH2 in congenital brainstem disconnection. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2017**, *43*, 358–365. [[CrossRef](#)]
40. Anderson, J.L.; Muraleedharan, R.; Oatman, N.; Klotter, A.; Sengupta, S.; Waclaw, R.R.; Wu, J.; Drissi, R.; Miles, L.; Raabe, E.H.; et al. The transcription factor Olig2 is important for the biology of diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro Oncol.* **2017**, *19*, 1068–1078. [[CrossRef](#)]
41. Monje, M.; Mitra, S.S.; Freret, M.E.; Raveh, T.B.; Kim, J.; Masek, M.; Attema, J.L.; Li, G.; Haddix, T.; Edwards, M.S.; et al. Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4453–4458. [[CrossRef](#)]
42. Kimmel, C.B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S.R.; Ullmann, B.; Schilling, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **1995**, *203*, 253–310. [[CrossRef](#)]
43. Thisse, C.; Thisse, B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 59–69. [[CrossRef](#)]
44. Posit Team. *RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software*, Version 4.5.1; PBC: Boston, MA, USA, 2025. Available online: <http://www.posit.co/> (accessed on 1 February 2025).

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.