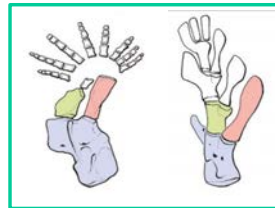


Denis Duboule

Collège de France
Chaire Internationale

Evolution des Génomes et du Développement

Denis.Duboule@college-de-france.fr



 @Duboule

 @CdF1530

Images: Nobu Tamura; Chase Bolt, Michael Coates

1



**Gènes du développement et évolution. La transition
des nageoires aux membres des tétrapodes**

Cours #5, 14 juin 2022, 17h

*Rappel des notions du cours #4, fonction des gènes Hox dans la nageoire
pectorale, approche génétique et criblage en gain de fonction, études du
développement des nageoires et expression des gènes Hox
chez le poisson-spatule (polyodon)*



2

Denis Duboule

2021-2022

Gènes du développement et évolution. La transition des nageoires aux membres des tétrapodes

Déroulé du cours

Cours 1: Des nageoires aux membres, introduction, définitions des membres ptérygiens et chirodiens, notions de phylogénèse des animaux à membres pairs, fossiles.

Cours 2: Homologies 'classiques', 'profondes', 'super-profondes', développement embryonnaire des membres tétrapodes, développement de l'appareil cartilagineux, branchements et segmentation

Cours 3: Développement des membres ptérygiens (nageoires), AER versus AEF, squelette dermique (exo-) versus squelette endochondral (endo-), origine de l'exosquelette

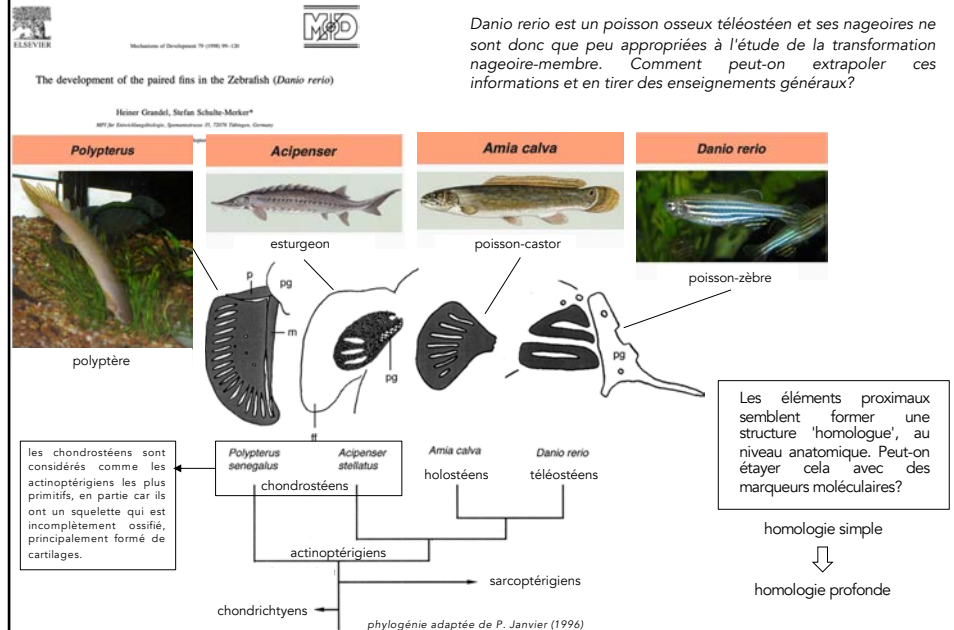
Cours 4: Utilisation de marqueurs génétiques, gènes Hox et marquages cellulaires, inactivations fonctionnelles et mutagenèse chez le poisson-zèbre

Cours 5: L'études d'espèces 'intermédiaires', poisson-spatule, roussette, poissons à poumons, nous éclaire-t-elle sur les homologies possibles?

Cours 6: Homologies super-profondes (mécanistiques, régulatives..) et conservation des régulations dans les membres ptérygiens et chirodiens. Conclusions

3

Rappel; Homo et Danio, aux extrêmes des formes



4

Rappel; Marqueurs moléculaires sur l'axe PD

COLLEGE DE FRANCE
Denis Duboule/2021-2022

Gènes exprimés dans des structures précises du membres tétrapode:

Distal
Intermédiaire
Proximal

Dans ce cas particulier de recherche d'homologies, il s'agit d'utiliser des marqueurs distribués le long de l'axe **proximo-distal**, puisque l'hypothèse de l'apparition ou de l'extension d'une partie distale concerne avant tout cet axe précis. L'axe PD étant lié, pendant le développement, à l'axe antéro-postérieur (voir avant), des marqueurs de ce dernier peuvent aussi être utiles.

5

Rappel; Gènes Hox, marqueurs de l'axe PD

COLLEGE DE FRANCE
Denis Duboule/2021-2022

*Deux clusters de gènes Hox (sur les quatre) furent 'recrutés' pour fonctionner dans les membres, A et D.

*Il s'agit en particulier des gènes des groupes 11 (zeugopode) et 13 (autopode)

HoxA: A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A9, A10, A11, A13
HoxD: D1, D3, D4, D8, D9, D10, D11, D12, D13
Paralogies 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Hoxd11 Hoxd13
P D D

HoxA11 HoxA13
P D

HoxA11^{-/-} HoxD11^{-/-} HoxA13^{-/-} HoxD13^{-/-}

Capecchi, Chambon, Duboule laboratories; from Zakany and Duboule, 2007; Kmita et al., 2005

6

Rappel; 7 groupes Hox chez le poissons zèbre

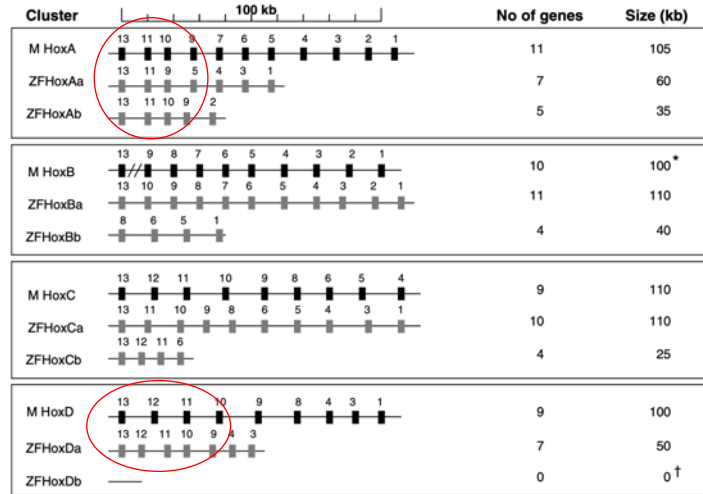
REVIEW 2549

Development 134, 2549-2560 (2007) doi:10.1242/dev.001065

The rise and fall of Hox gene clusters

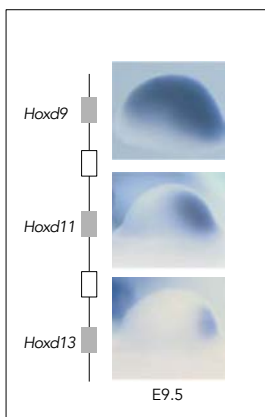
Denis Duboule

Relations d'orthologies entre les clusters Hox de la souris (M) et du poisson-zèbre (ZF)



7

Rappel; Phases d'expression précoces comparables...



LETTERS TO NATURE

Hox gene expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits

Paolo Sordino, Frank van der Hoeven & Denis Duboule*

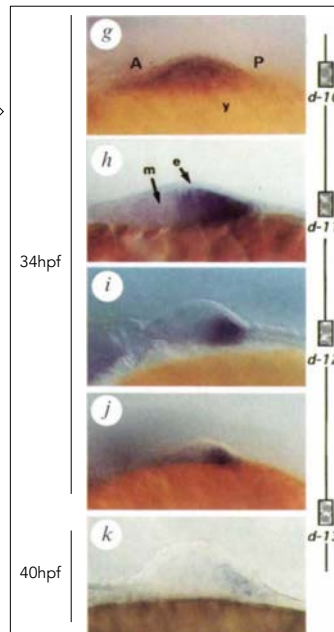
NATURE · VOL 375 · 22 JUNE 1995

L'expression des gènes Hox pendant la période précoce (phase I) est très comparable entre le poisson-zèbre et les amniotes (souris, poulet), avec une stratégie de distribution des domaines d'ARNs en poupées russes centrées sur la partie postérieure. *Quid de la phase tardive (II), dans la partie distale?*

Developmental Cell 10, 93-103, January, 2006 ©2006 Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.devcel.2005.11.014

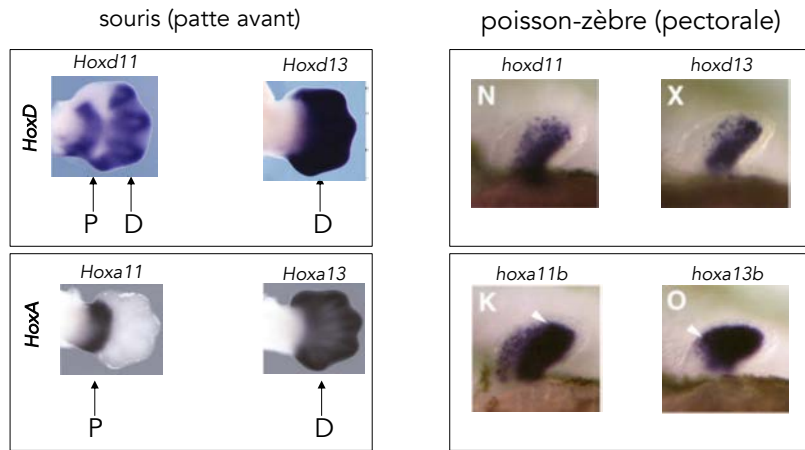
Control of Hoxd Genes' Collinearity during Early Limb Development

Basile Tarchini¹ and Denis Duboule^{1,*}
¹Department of Zoology and Animal Biology and National Research Centre "Frontiers in Genetics" University of Geneva



8

Rappel; Phases d'expression tardives différentes...



9

Rappel; Expression de *hoxa13a* dans l'exosquelette

LETTER

Digits and fin rays share common developmental histories

Shinya Nakamura¹, Andrew K. Getchik¹, Justin Lemberg¹, Julie Szymanski¹ & Neil H. Shubin¹

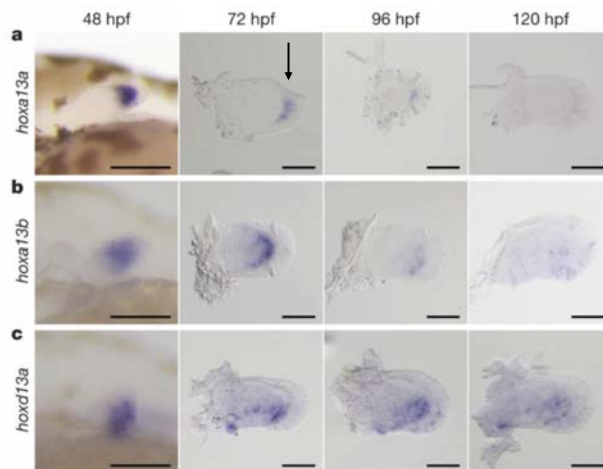
8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

En 2016, Shubin et collègues ré-évaluent l'expression des gènes *Hoxa13a* et *b* et *Hoxd13a*.

Hoxa13a exprimé dans le mésenchyme distal à 48 hpf puis dans le repliement ectodermique proximal à 72 hpf.

Hoxa13b exprimé dans le mésenchyme distal à 48 hpf puis reste exprimé dans le disque endochondral.

Hoxd13a exprimé dans le mésenchyme distal et postérieur à 48 hpf puis reste exprimé dans le disque endochondral.



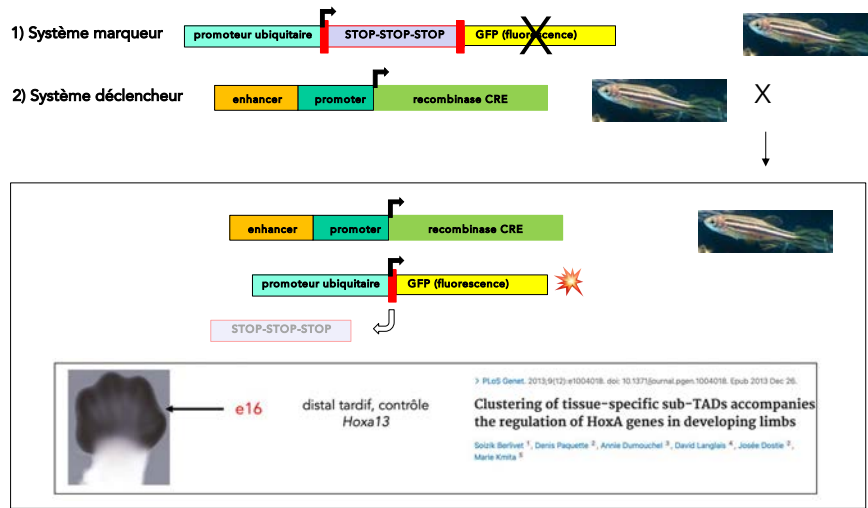
barres d'échelle: 100 microns

10

Rappel; Cellules $hoxa13a^+$ colonisent l'exosquelette

Site LoxP (petite séquence d'ADN reconnue par la recombinaise CRE. Le recombinaise délète (par recombinaison...) l'ADN localisé entre deux sites LoxP

*Promoteur ubiquitaire: promoteur qui fonctionne partout, dans toutes les cellules.. (par exemple les gènes qui codent pour des enzymes cellulaires etc....)



11

Rappel; Cellules $hoxa13a^+$ colonisent l'exosquelette

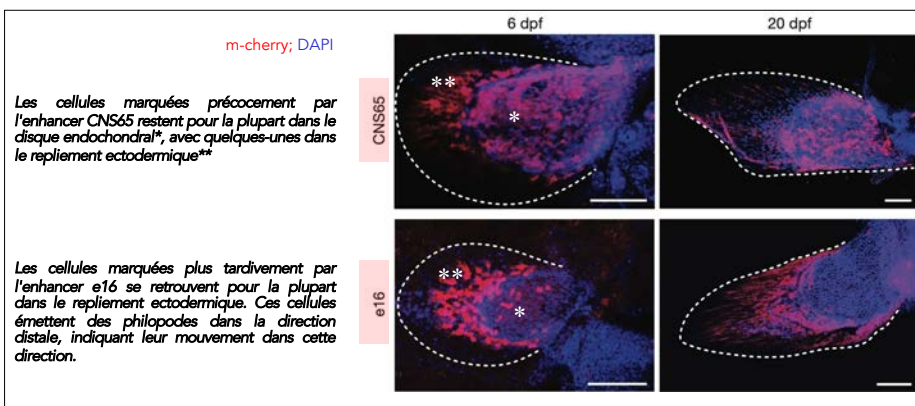
LETTER

Digits and fin rays share common developmental histories

Tomoya Nakamura^{1*}, Andrew R. Gehrke^{2*}, Justin Lemberg¹, Julie Scymanski¹ & Neil H. Shubin¹

8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

Chaque cellule dans laquelle l'enhancer **CNS65** (ou **e16**) est actif va produire de la recombinaise CRE. Cette recombinaise va rendre actif un transgène reporter qui va fabriquer de façon stable de la **m-cherry fluorescente**. Par conséquent, toutes les cellules descendantes de ces cellules initiales seront marquées.



12

Rappel; Cellules *hoxa13a*⁺ colonisent l'exosquelette

LETTER

Digits and fin rays share common developmental histories

Tetsuya Nakamura*, Andrew K. Gehral*, Justin Lemberg, Julie Seymour* & Neil H. Shubin*

8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

Chaque cellule dans laquelle l'enhancer **CNS65** (ou **e16**) est actif va produire de la recombinaise CRE. Cette recombinaise va rendre actif un transgène reporter qui va fabriquer de façon stable de la **m-cherry fluorescente**. Par conséquent, toutes les cellules descendantes de ces cellules initiales seront marquées.

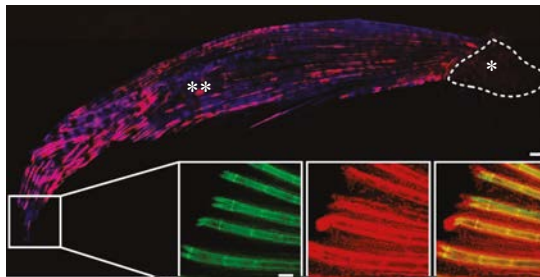
Les cellules marquées plus tardivement par l'enhancer **e16** se retrouvent pour la plupart dans le repliement ectodermique. Ces cellules émettent des philopodes dans la direction distale, indiquant leur mouvement dans cette direction.

A 120 Dpf (nageoire adulte), le **m-cherry** n'est détecté que dans le squelette dermique** et aucune cellule n'est visible dans la partie endochondrale*

Les rayons des nageoires (dermique) sont marqués par la **m-cherry** et par des ARNs **Zns-5**, spécifiques des ostéoblastes

m-cherry; DAPI

Enhancer **e16**



Zns-5 (ostéoblastes)

e16-'positive' (ou déclenchées)

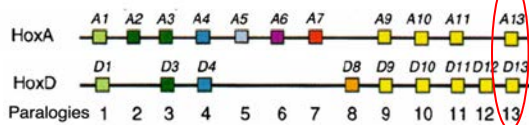
Zns-5 + Cre

m-cherry

CRE!!

13

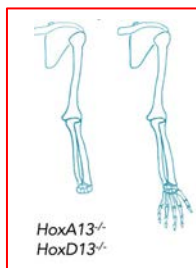
Les gènes *Hox13* et les autopodes



*Deux clusters de gènes Hox (sur les quatre) furent 'recrutés' pour fonctionner dans les membres, A et D.

*Les gènes #13 sont impliqués dans la fabrication des autopodes.

*L'inactivation des gènes *Hoxa13* et *Hoxd13* produit des animaux pratiquement sans autopodes.



HoxA13^{-/-}
HoxD13^{-/-}

Cell, Vol. 75, 431-441, November 5, 1993. Copyright © 1993 by Cell Press

Disruption of the *Hoxd-13* Gene Induces Localized Heterochrony Leading to Mice with Neotenic Limbs

Pascal Dollé,* Andrée Dierich,* Marianne LeMeur,* Thomas Schimmang,† Brigitte Schuhbaur,* Pierre Chambon,* and Denis Duboule!†

JOURNAL ARTICLE | 01 OCTOBER 1996

Hoxa-13 and *Hoxd-13* play a crucial role in the patterning of the limb autopod

C. Fromental-Ramain, X. Warot, N. Messadecq, M. LeMeur, P. Dollé, P. Chambon

† Author and article information
Development (1996) 122 (10): 2997-3011.

Development
For advances in developmental biology and stem cells.

14

Inactivation fonctionnelle des gènes Hox13

LETTER

Digits and fin rays share common developmental histories

Tetsuya Nakamura^{1*}, Andrew R. Gebicki^{2*}, Justin Lemberg³, Julie Seymour⁴ & Neil H. Shubin¹

8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

La fonction des différents gènes 13 est alors évaluée par un approche de perte de fonction utilisant CRISPR/cas9 (lignées et croisements pour KO multiples). Examen des spécimens par micro CT-scan

Morphologie 'normale'	contrôle				
Morphologie app 'normale'	<i>Hoxd13a^{-/-}</i>				
Rayons réduits en longueur, endosquelette normal	<i>Hoxa13b^{-/-}</i>				
Rayons réduits en longueur, endosquelette normal	<i>Hoxa13a^{-/-}</i>				
Rayons très réduits en longueur, endosquelette augmenté de app 10% (masse) et augmentation de #radiaux distaux	<i>Hoxa13a^{-/-}</i> <i>Hoxa13b^{-/-}</i>				
Rayons très réduits en longueur, endosquelette augmenté de app 10% (masse) et augmentation de #radiaux distaux, plus un 'pattern' anormal de radiaux proximaux (?)	<i>Hoxa13a^{-/-}</i> <i>Hoxa13b^{-/-}</i> <i>Hoxd13a^{-/-}</i>				

15

Conclusion et hypothèse

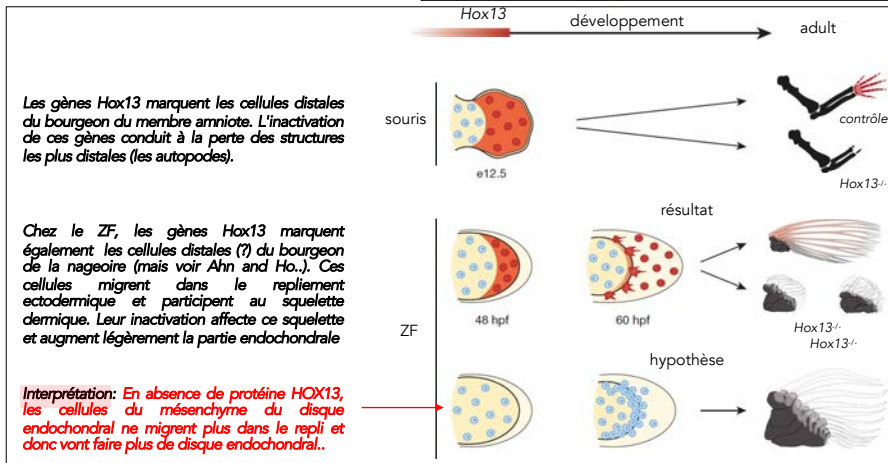
LETTER

Digits and fin rays share common developmental histories

Tetsuya Nakamura^{1*}, Andrew R. Gebicki^{2*}, Justin Lemberg³, Julie Seymour⁴ & Neil H. Shubin¹

8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

Figure 4 | Shared developmental histories in fin rays and digits. In mice (top row), late phase Hox expression (red) marks the distal cells of the limb bud that result in bones of the autopod (wrists and digits). Double knockout of *Hoxa13* and *Hoxd13* results in the loss of the autopod. In zebrafish wild-type fins (middle row), cells marked by late phase Hox expression (red) end up in the fin fold and within osteoblasts of the dermal rays. *Hoxa13* double knockout fish (*hoxa13a^{-/-}*, *a13b^{-/-}*) and the triple knockout (mosaic for *hoxa13b* and *hoxd13a*) have extremely reduced fin rays with increased distal endochondral radials. Note that



16

Conclusion et hypothèse

LETTER

doi:10.1038/nature20222

Digits and fin rays share common developmental histories

Itzayra Nakamura¹, Andrew R. Gehrke^{1*}, Justin Lemberg¹, Julie Seyssaud¹ & Neil H. Shubin¹

8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

Figure 4 | Shared developmental histories in fin rays and digits. In mice (top row), late phase *Hox* expression (red) marks the distal cells of the limb bud that result in bones of the autopod (wrists and digits). Double knockout of *Hoxa13* and *Hoxd13* results in the loss of the autopod. In zebrafish wild-type fins (middle row), cells marked by late phase *hox* expression (red) end up in the fin fold and within osteoblasts of the dermal rays. *Hoxa13* double knockout fish (*hoxa13a*^{-/-}, *a13b*^{-/-}) and the triple knockout (mosaic for *hoxa13b* and *hoxd13a*) have extremely reduced fin rays with increased distal endochondral radials. Note that

MAISI

*gènes *Hox13*'s exprimés aussi dans la partie proximale

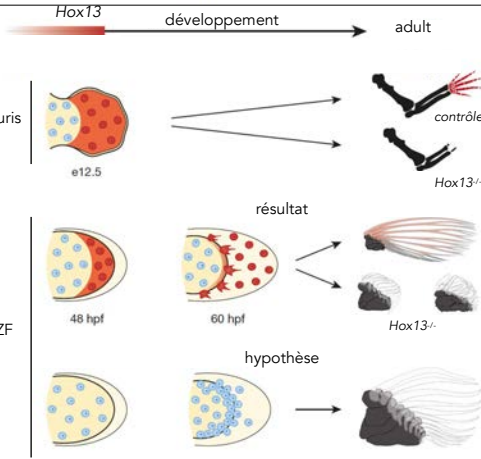
*gène *Hoxa11* exprimé dans la partie distale

*seules les cellules *Hoxa13a** migrent dans l'exosquelette, pas les cellules *Hoxa13b**. Double mutant?

*L'étude du laboratoire de Peter Currie (cours #3) montrait que les cellules dans le repli dérivent du mésoderme somitique... (mais peut-être seulement pour la transition AER-AEF, ensuite elles pourraient venir du disque endochondral... (Currie, juillet 2016; Shubin, septembre 2016....)

Marquer des somites ne veut pas dire que TOUTES les cellules migrantes dans le repliement sont de cette origine...

*Des expressions géniques suffisent-elles à assigner des homologies? TITRE de la publication....



17

Gènes *HoxA* comme marqueurs de l'axe PD

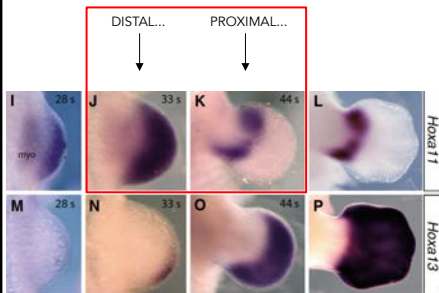


*Deux clusters de gènes *Hox* (sur les quatre) furent 'recrutés' pour fonctionner dans les membres, A et D.

*Il s'agit en particulier des gènes des groupes 9 à 13, tous orthologues au gène *AbdB* de la mouche *Drosophila*.

*Ces gènes déterminent des segments différents le long de l'axe proximo-distal, comme le montrent à la fois les effets de leurs inactivations et leurs domaines d'expression

*Dans le cas du cluster A, les gènes #11 et #13 ont des domaines complémentaires qui se séparent pendant la croissance du bourgeon.



Int. J. Dev. Biol. 33: 1483-1494 (2009)
doi:10.1385/ijdb.072409mem

DEVELOPMENTAL
BIOLOGY
www.sagepub.com

Ectopic *Meis1* expression in the mouse limb bud alters P-D patterning in a *Pbx1*-independent manner

NADIA MERCADER¹, LICIA SELLER¹, LUIS MIGUEL CRIADO¹, PILAR PALLARES¹, CARLOS PARRAS¹, MICHAEL L. CLEARY¹ and MIGUEL TORRES^{1*}

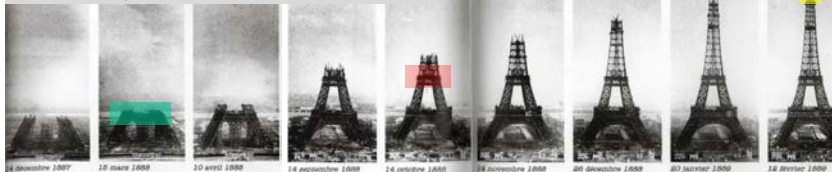
18

Gènes *Hox*; Information de qualité ou de position?

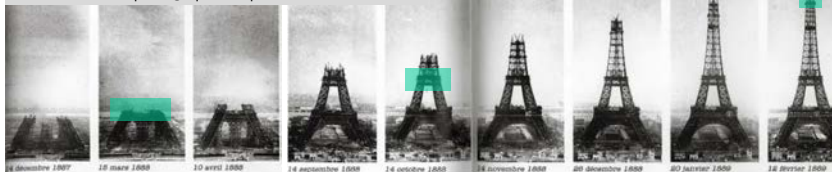
Dans le contexte du développement des membres (chiridiens et ptérygiens),
le gène *Hox* déterminent-ils une structure ou une position relative?

Chez la souris, le double mutant *Hox13* induit-il la perte des 'mains' ou la
perte 'de la partie la plus distale des membres'?

information qualitative (1er, 2ème, 3ème...)



information topologique (le plus distal..)



<https://france3-regions.francetvinfo.fr/paris-ile-de-france/paris/paris-tour-eiffel-130-ans-1647182.html>

19

La suite...

LETTER

doi:10.1038/nature19102

Digits and fin rays share common developmental histories

Tetsuya Nakamura^{1*}, Andrew R. Gebauer^{2*}, Justin Lenzberg³, Julia Skjmesrud⁴ & Neil H. Shubin¹

8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

*Partager des histoires développementales (?) Des mécanismes? Des linéages?...

*Des structures homologues (homologie simple, profonde ou ontologique?)

Comment faire avancer la discussion?

Trois angles d'attaque:

*Poursuivre et creuser les analyses chez le ZF (outils génétiques et cellulaires..imagerie..).

*Comparer avec d'autres systèmes 'phylogénétiquement' intéressants afin de voir si telle ou telle hypothèse est confirmée/infirmer.

*Comparer les systèmes de régulations de ces gènes *Hox* en détails pour estimer la profondeur de l'homologie...

20

La suite...

LETTER

doi:10.1038/nature19302

Digits and fin rays share common developmental histories

Tetsuya Nakamura^{1*}, Andrew R. Gebicki^{2*}, Justin Lemberg³, Julie Skjansoek⁴ & Neil H. Shubin¹

8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

*Partager des histoires développementales (?) Des mécanismes? Des lignées?...

*Des structures homologues (homologie simple, profonde ou ontologique?)

Comment faire avancer la discussion?

Trois angles d'attaque:

*Poursuivre et creuser les analyses chez le ZF (outils génétiques et cellulaires..imagerie..).

*Comparer avec d'autres systèmes 'phylogénétiquement' intéressants afin de voir si telle ou telle hypothèse est confirmée/infirmée.

*Comparer les systèmes de régulations de ces gènes *Hox* en détails pour estimer la profondeur de l'homologie...

21

Approche par mutagenèse chez le poisson-zèbre

Cell. 2021 Feb 18;184(4):899-911.e13. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.003. Epub 2021 Feb 4.

Article

Latent developmental potential to form limb-like skeletal structures in zebrafish

M. Brent Hawkins,^{1,2,3,4} Katrin Henke,^{1,2} and Matthew P. Harris^{1,2,5,*}

¹Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

²Department of Orthopedic Research, Boston Children's Hospital, Boston, MA 02115, USA

³Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

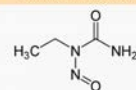
⁴Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

SUMMARY

Changes in appendage structure underlie key transitions in vertebrate evolution. Addition of skeletal elements along the proximal-distal axis facilitated critical transformations, including the fin-to-limb transition that permitted generation of diverse modes of locomotion. Here, we identify zebrafish mutants that form supernumerary long bones in their pectoral fins. These new bones integrate into musculature, form joints, and articulate with neighboring elements. This phenotype is caused by activating mutations in previously unrecognized regulators of appendage patterning, *vav2* and *wasl*, that function in a common pathway. This pathway is required for appendage development across vertebrates, and loss of *Wasl* in mice causes defects similar to those seen in murine *Hox* mutants. Concordantly, formation of supernumerary bones requires *Hox11* function, and mutations in the *vav2/wasl* pathway drive enhanced expression of *hoxa11b*, indicating developmental homology with the forearm. Our findings reveal a latent, limb-like pattern ability in fins that is activated by simple genetic perturbation.

Les auteurs procèdent à un criblage génétique par gain de fonction, en utilisant le mutagène ENU (N-nitroso-N-éthylurée (fr) -N-ethyl-N-nitrosourea (ang.)), qui agit par transfert du groupe éthyl de l'ENU sur une base d'ADN (en général la thymine). Efficacité très élevée de 1 hit par 700 loci...

N-nitroso-N-éthyl urée



22

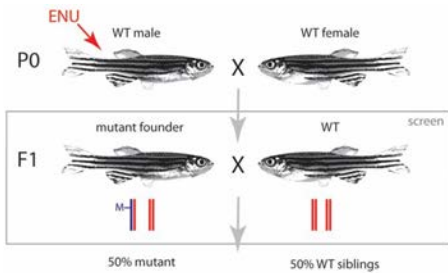
Approche par mutagenèse en gain de fonction

> *Genetics*. 2017 Oct;207(2):609-623. doi: 10.1534/genetics.117.300187. Epub 2017 Aug 23.

Genetic Screen for Postembryonic Development in the Zebrafish (*Danio rerio*): Dominant Mutations Affecting Adult Form

Katrin Henke^{1,2}, Jacob M Daane^{3,2}, M Brent Hawkins^{3,2,4}, Christopher M Dooley⁵, Elisabeth M Busch-Nentwich^{5,6}, Derek L Stemple⁵, Matthew P Harris^{1,2}

Traitement au ENU, mutagenèse des spermatozoïdes et croisement avec des femelles de type sauvage



Production d'animaux F1 (14'000.). Anesthésie, examen microscopique et sélection des mâles intéressants. Croisements avec des femelles type sauvage



Production d'animaux F2. Anesthésie, examen microscopique et sélection des lignées intéressantes après confirmation du phénotype et de sa stabilité



Génotypage, recherche du gène affecté

23

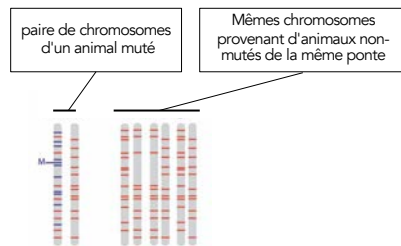
Génotypage (identification du gène et de la mutation)

> *Genetics*. 2017 Oct;207(2):609-623. doi: 10.1534/genetics.117.300187. Epub 2017 Aug 23.

Genetic Screen for Postembryonic Development in the Zebrafish (*Danio rerio*): Dominant Mutations Affecting Adult Form

Katrin Henke^{1,2}, Jacob M Daane^{3,2}, M Brent Hawkins^{3,2,4}, Christopher M Dooley⁵, Elisabeth M Busch-Nentwich^{5,6}, Derek L Stemple⁵, Matthew P Harris^{1,2}

Séquençage des exomes (parties codantes des gènes), comparaison avec la même ponte ('frères, soeurs', #4-6) qui tous contiennent des SNPs



La soustraction des SNPs présents chez les 'frères/soeurs' permet alors d'identifier le chromosome (morceau de-) contenant la mutation (car sélection sur le phénotype..)



Nouvelle soustraction en incluant aussi des séquences exomiques obtenues d'autres animaux 'frères/soeurs/mutants', conduisant à un resserrement de la localisation...



Examen visuel des gènes candidats, nature de la mutation (synonyme, non-synonyme..)



Hypothèse sur un gène cible



Vérification fonctionnelle

24

La mutation *Rephaim* (*reph*)

Cell. 2021 Feb 18;184(4):899-911.e13. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.003. Epub 2021 Feb 4.

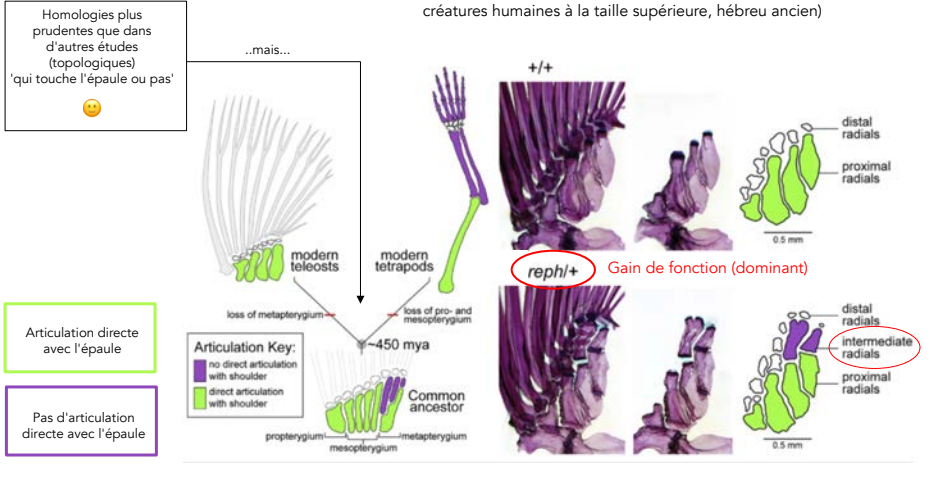
Article

Latent developmental potential to form limb-like skeletal structures in zebrafish

M. Brent Hawkins,^{1,2,3,4} Katrin Henke,^{1,2} and Matthew P. Harris^{1,2,3,4}
¹Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA
²Department of Orthopedic Research, Boston Children's Hospital, Boston, MA 02115, USA
³Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA
⁴Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

Identification d'une lignée mutante montrant des pièces surnuméraires en position distale des rayons endosquelettiques. Ces pièces (intermédiaires) sont considérées comme 'homologues' au zeugopode des amniotes, basé sur le patron d'articulation.

Mutant appelé 'Rephaim' (*reph*) en référence aux Ephraïms (des créatures humaines à la taille supérieure, hébreu ancien)



25

La mutation *Rephaim* (*reph*)

Cell. 2021 Feb 18;184(4):899-911.e13. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.003. Epub 2021 Feb 4.

Article

Latent developmental potential to form limb-like skeletal structures in zebrafish

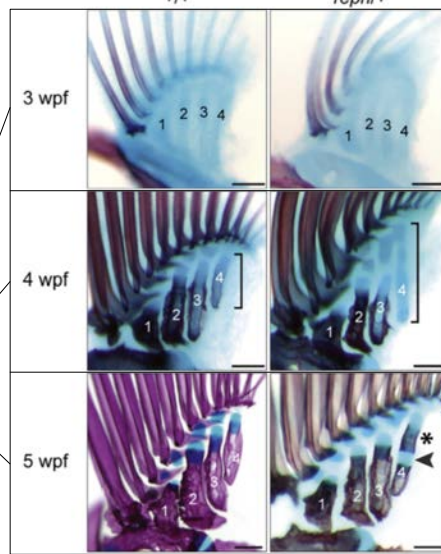
M. Brent Hawkins,^{1,2,3,4} Katrin Henke,^{1,2} and Matthew P. Harris^{1,2,3,4}
¹Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA
²Department of Orthopedic Research, Boston Children's Hospital, Boston, MA 02115, USA
³Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA
⁴Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

wpf: semaines après fertilisation

Développement du phénotype mutant:

- *Formation normale du bourgeon de la nageoire
- *Formation normale du repli ectodermique
- *Apparence normale du disque endosquelettique
- *A 3 wpf, séparation en quatre condensation cartilagineuse visible mais un peu perturbée dans l'aspect distal du rayon #4
- *A 4 wpf, début de minéralisation proximale des rayons et début de segmentation anormale en partie distale
- *A 5 wpf, cette segmentation anormale des modèles cartilagineux se transforme en ossification de pièces surnuméraires.

Interprétation: Les cartilages des rayons #3 et 4 (*ad minima*) sont trop longs et (donc) se segmentent dans leur partie distale.



26

Rephaim (reph), un allèle du gène *waslb* (*waslb*^{Reph})

Cell. 2021 Feb 18;184(4):899-911.e13. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.003. Epub 2021 Feb 4.

Article

Latent developmental potential to form limb-like skeletal structures in zebrafish

M. Brent Hawkins,^{1,2,3,4} Katrin Henke,^{1,2} and Matthew P. Harris^{1,2,4*}

¹Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA
²Department of Orthopedic Research, Boston Children's Hospital, Boston, MA 02115, USA
³Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA
⁴Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

*Les protéines de la famille WAS sont impliquées dans la régulation du cytosquelette actinique. Waslb interagit avec d'autres protéines (e.g. Cdc42) dans la formation des filaments de F-actin. Fonctionne également dans la migration et la polarité cellulaire...



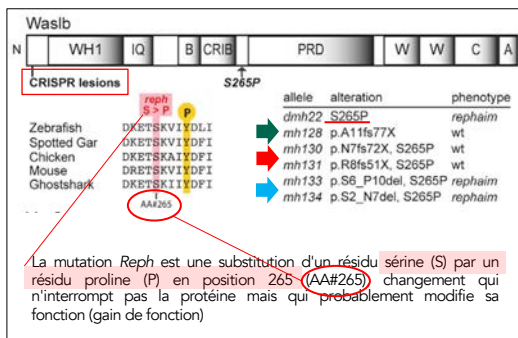
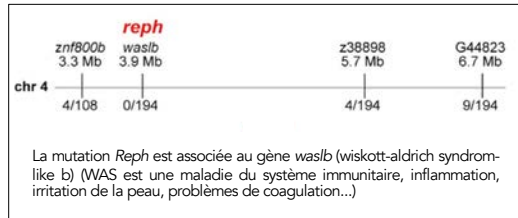
Trois contrôles essentiels

*L'inactivation complète de *waslb* (CRISPR/Cas9) (mutant non-sens) ne donne aucun phénotype visible →

*Des mutations par CRISPR/Cas9 **en cis** avec le gène muté (donc une deuxième mutation sur le même allèle déjà muté..) **mais en amont de la mutation Reph, suppriment le phénotype** →

*Des petites délétions 'in frame' 'en cis' ne suppriment pas le phénotype →

Cela démontre que la mutation *Reph* (*waslb*^{Reph}) est responsable du phénotype observé.



27

Interactions génétiques avec les gènes *Hox*?

Cell. 2021 Feb 18;184(4):899-911.e13. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.003. Epub 2021 Feb 4.

Article

Latent developmental potential to form limb-like skeletal structures in zebrafish

*Quelle relation avec les gènes *HoxA* et *HoxD*?

M. Brent Hawkins,^{1,2,3,4} Katrin Henke,^{1,2} and Matthew P. Harris^{1,2,4*}

¹Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA
²Department of Orthopedic Research, Boston Children's Hospital, Boston, MA 02115, USA
³Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA
⁴Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

*Les auteurs décident d'induire une série de mutations conditionnelles de *waslb* chez la souris afin de voir si ce gène est également impliqué dans la formation des structures osseuses (membres, squelette axial.). Effectivement, ils voient des problèmes dans la fabrication des os longs, avec une réduction et des anomalies. Ils en concluent que:

These similarities suggest that the effects of *wasl/vav2* signaling on skeletal development might be mediated through known limb patterning pathways such as the *Hox* and *Gdf* genes.



Série de croisements génétiques avec des mutants des gènes *HoxA* et *HoxD* pour voir si effectivement la fonction du gène *Waslb* pourrait être 'médiée' par les gènes *Hox*.

28

Interactions génétiques avec les gènes Hox?

Cell. 2021 Feb 18;184(4):899-911.e13. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.003. Epub 2021 Feb 4.

Article

Latent developmental potential to form limb-like skeletal structures in zebrafish

M. Brent Hawkins,^{1,2,3,4} Katrin Henke,^{1,2} and Matthew P. Harris^{1,2,3,4}*

¹Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

²Department of Orthopedic Research, Boston Children's Hospital, Boston, MA 02115, USA

³Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

⁴Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

*Le mutant *waslb^{reph/+}* montre le phénotype 'attendu' avec les rayons (radiaux) surnuméraires

...mais pas d'anomalie en absence des gènes 11

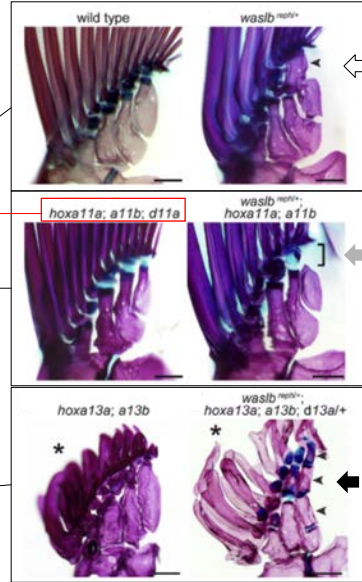
*Le mutant *waslb^{reph/+}* en absence de fonction des gènes *Hox11* ne montre PAS le phénotype 'attendu'. Absence de rayons (radiaux) surnuméraires

Conclusion: Les gènes *Hox11* sont nécessaires pour la formation des éléments surnuméraires (mais pas pour les rayons 'normaux')

*Le mutant *waslb^{reph/+}* en absence de fonction des gènes *Hox13* montre un phénotype exacerbé (multiples rayons (radiaux) surnuméraires), en plus du phénotype attendu sur le squelette dermique *

Conclusion: Effet des protéines HOX13 sur la fonctionnalité des gènes *Hox11*....

...mais disque endochondral plus grand...(mutants 13)



29

Conclusion scientifique

Cell. 2021 Feb 18;184(4):899-911.e13. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.003. Epub 2021 Feb 4.

Article

Latent developmental potential to form limb-like skeletal structures in zebrafish

M. Brent Hawkins,^{1,2,3,4} Katrin Henke,^{1,2} and Matthew P. Harris^{1,2,3,4}*

¹Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

²Department of Orthopedic Research, Boston Children's Hospital, Boston, MA 02115, USA

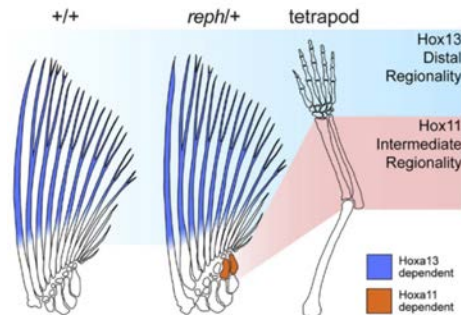
³Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

⁴Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

protéines HOX13
⊥
gènes *Hox11*

..En l'absence de protéine 13, les gènes *Hox11* sont surexprimés et donc vont favoriser la croissance des radiaux (en présence de la protéine *waslb* anormale...)

**Cela pourrait tout de même dire que l'expression des gènes 13 dans le disque endochondral a une fonction et que cette fonction n'est pas restreinte aux cellules qui vont migrer dans le squelette dermique....Cette situation de contrôle négatif de 13 sur 11 est exactement ce qui est observé dans la partie distale du membre amniote, contrairement au schéma...



between these paralogs is unknown. Shockingly, we found that deletion of the three *hox13* paralogs of the A and D clusters enhances the *reph/+* phenotype and causes the development of even more additional supernumerary long bones along the proximal-distal axis (Figures 6F and S7A). Given that *reph* and *war* increase *hoxa11b* expression, we interpret these results as a consequence of de-repression of *hoxa11* paralogs and suggest that, similar to limbs, *hoxa13* paralogs negatively regulate *hoxa11b* in the fin. as we find that removal of *hoxa11* paralogs results in an increase in *hox13* positive cells in the fin fold (Figure S7B).

30

Conclusion médiatique

NEWS RELEASE 4-FEB-2021

Researchers replicate a potential step of the fin-to-limb transition in zebrafish

Peer-Reviewed Publication
CELL PRESS

Communiqué de presse du magazine *Cell*:
<https://www.eurekalert.org/news-releases/660491>

(DD traduction; "...Image: Cette image montre comment des poissons-zèbres mutants transforment leurs 'membres' pour devenir proches des membres humains."

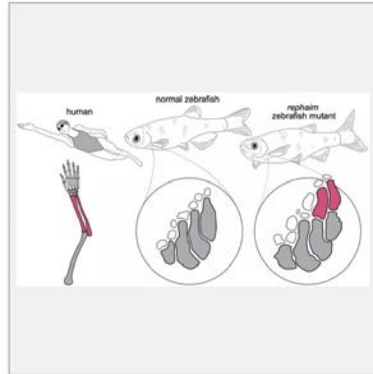


IMAGE: THIS IMAGE SHOWS HOW MUTANT ZEBRAFISH TRANSFORM THEIR LIMBS TO BE CLOSE TO HUMAN LIMBS [view more >](#)

CREDIT: M. BRENT HAWKINS

31

Conclusion scientifique

CellPress

Cell
Leading Edge

Previews

Bones of contention: skeletal patterning across the fin-to-limb transition

Frank J. Tulenko^{1,2,*} and Peter D. Currie^{1,2,*}

Commentaire heureusement plus balancé

- 1) partie 'proximale/intermédiaire
- 2) partie 'dépendante'...(mais 13 dans endosquelette..)
- 3) points d'interrogation pour le zeugopode...
- 4) point d'interrogation pour le domaine 13 de neoceratodus

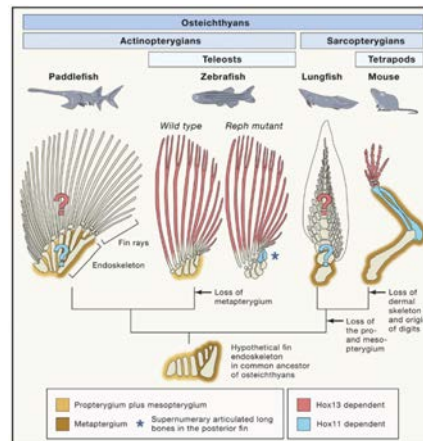


Figure 1. Model for fin-limb evolution in bony fishes and skeletal phenotype of the Zebrafish *rshp* mutant

32

La suite...

LETTER

doi:10.1038/nature19302

Digits and fin rays share common developmental histories

Tetsuya Nakamura^{1*}, Andrew R. Gebicki^{2*}, Justin Lemberg³, Julie Skymasová⁴ & Neil H. Shubin¹

8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

*Partager des histoires développementales (?) Des mécanismes? Des lignées?...

*Des structures homologues (homologie simple, profonde ou ontologique?)

Comment faire avancer la discussion?

Trois angles d'attaque:

*Poursuivre et creuser les analyses chez le ZF (outils génétiques et cellulaires..imagerie..).

*Comparer avec d'autres systèmes 'phylogénétiquement' intéressants afin de voir si telle ou telle hypothèse est confirmée/infirmée.

*Comparer les systèmes de régulations de ces gènes *Hox* en détails pour estimer la profondeur de l'homologie...

33

Etude du poisson-spatule (spatulaire)

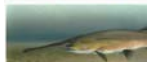
Acipenseriformes (espèces assez proches)

Acipenser



esturgeon

Polyodon spathula



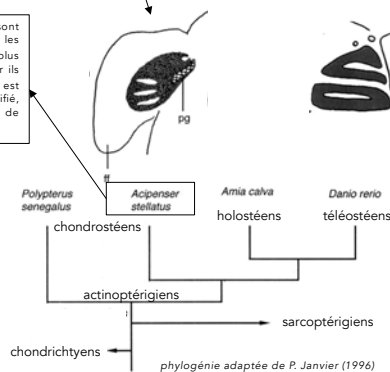
poisson-spatule

Danio rerio



poisson-zèbre

les chondrostéens sont considérés comme les actinoptériens les plus primitifs, en partie car ils ont un squelette qui est incomplètement ossifié, principalement formé de cartilages.



Les éléments proximaux semblent former une structure 'homologue', au niveau anatomique. Peut-on étayer cela avec des marqueurs moléculaires?

phylogénie adaptée de P. Janvier (1996)

34

Etude du poisson-spatule (spatulaire)

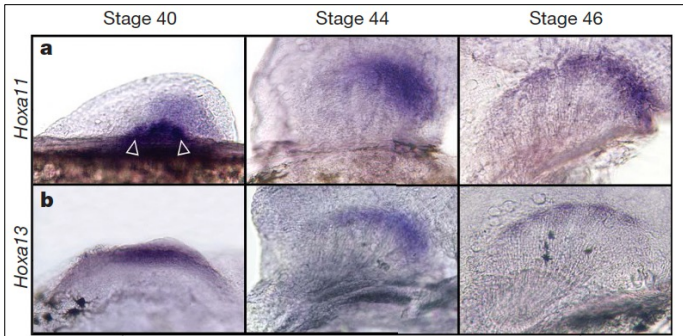
2007

LETTERS

HoxA

An autopodial-like pattern of Hox expression in the fins of a basal actinopterygian fish

Marcus C. Davis¹, Randall D. Dahn¹ & Neil H. Shubin^{1,2}



Les ARNs *HoxA11* et *HoxA13* sont restreints aux cellules les plus distales du disque endochondral. Très vraisemblablement dans (partiellement) les mêmes cellules.

Pas d'exclusion des deux domaines d'expression comme chez les amniotes, une situation similaire à celle décrite chez le ZF

Polyodon spathula



Spatulaire

Classification

Règne	Animalia
Embranchement	Chordata
Sous-embr.	Vertebrata
Super-classe	Osteichthyes
Classe	Actinopterygii
Sous-classe	Chondrostei
Ordre	Acipenseriformes
Sous-ordre	Acipenseroides
Famille	Polyodontidae

35

Etude du poisson-spatule (spatulaire)

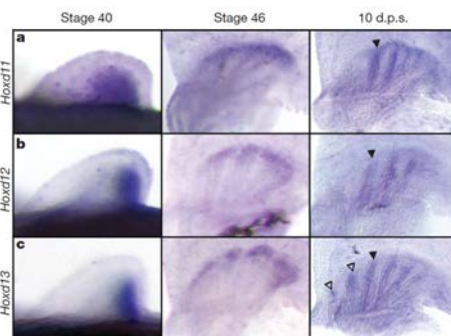
2007

LETTERS

HoxD

An autopodial-like pattern of Hox expression in the fins of a basal actinopterygian fish

Marcus C. Davis¹, Randall D. Dahn¹ & Neil H. Shubin^{1,2}

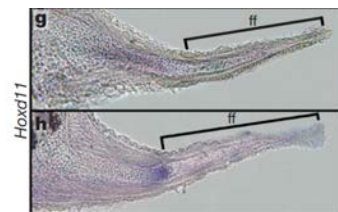


Les ARNs *Hoxd11*, comme ceux de *Hoxd13*, sont aussi restreints à l'aspect distal sans distinction entre deux domaines concomitants comme c'est le cas chez les amniotes. La partie la plus distale se trouve au niveau des radiaux distaux. Comme pour les *Hoxa*, l'expression n'est pas détectée dans le AEF et FF.

Polyodon spathula



poisson-spatule



radial (g, section at the anterior-posterior level of closed arrowhead in a) and in adjacent distal-most cells (h, section posterior to the level of the closed arrowhead in a). Magnification (f) reveals that *Hoxd11* expression is isolated to the mesenchymal cells distal to the proximal radials. This region sits within the proximal fin fold and is the site of condensing distal radials (see Supplementary Information), dm, dorsal fin musculature; vm, ventral musculature.

36

Etude du poisson-spatule (spatulaire)

COLLEGE DE FRANCE
Denis Duboule/2021-2022

2007 LETTERS

An autopodial-like pattern of Hox expression in the fins of a basal actinopterygian fish
Marcus C. Davis¹, Randall D. Dahn² & Neil H. Shubin^{3,4}

Polyodon spathula
poisson-spatule

a) 'Acquisition de la phase 'tardive' des gènes *Hoxd11* et *Hoxd13*
 d) Perte du repliement ectodermique
 e) Perte de la phase 'tardive' des gènes *Hoxd11* et *Hoxd13*

En fait, on ne voit jamais des phases différentes en même temps comme c'est le cas pour les amniotes, alors que la terminologie (précoce, 'tardive') est prise de chez la souris. Chez le ZF, les gènes *Hoxd* sont-ils exprimés en plusieurs phases? Si oui pourquoi ne les voit-on jamais ensemble et si non, est-ce une phase précoce ou une phase tardive?

Poisson-zèbre poisson-spatule Tiktaalik tétrapode

Late-phase HoxD expression

Hox d11-d13 co-expressed
 Hox d13 only

37

Etude du poisson-spatule (spatulaire)

COLLEGE DE FRANCE
Denis Duboule/2021-2022

PROCEEDINGS B
rspb.royalsocietypublishing.org

2016 Research

Fin-fold development in paddlefish and catshark and implications for the evolution of the autopod
Frank J. Tolentino^{1,2}, James L. Massey², Elisha Holmquist¹, Gabriel Rigundo¹, Sarah Thomas¹, Susan M. E. Smith¹, Sylvie Mazan³ and Marcus C. Davis⁴

¹Department of Molecular and Cellular Biology, Kenesaw State University, OH 44241, USA
²Canadian Regenerative Medicine Institute, Kenesaw University, Ontario, 2005, Canada
³Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Colorado Boulder, CO 80509, USA
⁴Yale, School of Forestry and Environmental Studies, 366 Prospect Street, New Haven, CT 06511, USA
 Email: mcdavis@kenesaw.edu

HoxA

Polyodon spathula
Spatulaire

Classification

Règne	Animalia
Embranchement	Chordata
Sous-embr.	Vertebrata
Super-classe	Osteichthyes
Classe	Actinopterygii
Sous-classe	Chondrostei
Ordre	Acipenseriformes
Sous-ordre	Acipenseroidae
Famille	Polyodontidae

HoxA11 And1
 HoxA13 And1

Stade 45

Les ARNs *HoxA11* et *HoxA13* sont clairement détectés dans le repli ectodermique?? Mêmes gènes, même espèce... même auteur? Problèmes techniques, manque de matériel pour développer de vrais SOP risque de mauvaises interprétations...

38

Etude du poisson-spatule (spatulaire)

PROCEEDINGS B
rspb.royalsocietypublishing.org
2016
Research

Cite this article: Tolénko FJ, Massey A, Holmquist C, Thomas S, Smith SHL, Mazan S, Davis MC. 2017 Fin fold development in paddlefish and catshark and implications for the evolution of the autopod. *Proc. R. Soc. B* 284: 20162780. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2016.2780>

Fin-fold development in paddlefish and catshark and implications for the evolution of the autopod

Frank J. Tolénko^{1,2}, James L. Massey¹, Eliska Holmquist¹, Gabriel Kigundu¹, Sarah Thomas¹, Susan M. E. Smith³, Sylvie Mazan⁴ and Marcus C. Davis¹

¹Department of Molecular and Cellular Biology, Bioscience State University, CA 95961, USA
²Australian Regenerative Medicine Institute, Monash University, Victoria, 3000, Australia
³Department of Biology and Evolutionary Biology, University of Colorado Boulder, CO 80509, USA
⁴UMR, Sorbonne Université, CNRS UMR 7082, Département Anatomologie, F-69622, Bayrolles-sur-Mer, France

© F1000-0000-1342-1515; DOI: 10.1098/rspb.2016.2780

HoxA

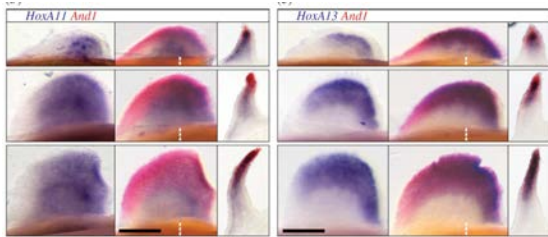
Polyodon spathula



Spatulaire

Classification

Règne	Animalia
Embranchement	Chordata
Sous-embr.	Vertebrata
Super-classe	Osteichthyes
Classe	Actinopterygii
Sous-classe	Chondrostei
Ordre	Acipenseriformes
Sous-ordre	Acipenseroidae
Famille	Polyodontidae



Stade 45

4. Discussion

Our characterization of *HoxA* expression in paddlefish refines previous data for this taxon (1074) and demonstrates that transcripts of *HoxA13* co-localize with the actinotrichia protein *And1* in the fin-fold (figure 4a). We also show a similar overlap

39

Etude du poisson-spatule (spatulaire)

> Sci Rep. 2016 Mar 4;6:22720. doi: 10.1038/srep22720.

HoxD expression in the fin-fold compartment of basal gnathostomes and implications for paired appendage evolution

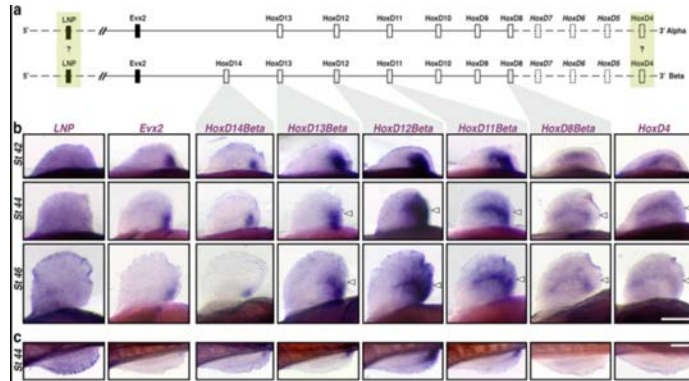
Frank J. Tolénko¹, Galus J. Augustus^{1,2}, James L. Massey^{1,3}, Seth E. Sims¹, Sylvie Mazan⁴, Marcus C. Davis¹

Affiliations + expand
PMID: 26940624 PMCID: PMC4778128 DOI: 10.1038/srep22720
Free PMC article

Abstract

The role of Homeobox transcription factors during fin and limb development have been the focus of recent work investigating the evolutionary origin of limb-specific morphologies. Here we characterize the expression of *HoxD* genes, as well as the cluster-associated genes *Evx2* and *LNP*, in the paddlefish *Polyodon spathula*, a basal ray-finned fish. Our results demonstrate a collinear pattern of nesting in early fin buds that includes *HoxD14*, a gene previously thought to be isolated from global *Hox* regulation. We also show that in both *Polyodon* and the catshark *Scyliorhinus canicula* (a representative chondrichthyan) late phase *HoxD* transcripts are present in cells of the fin-fold and co-localize with *And1*, a component of the dermal skeleton. These new data support an ancestral role for *HoxD* genes in patterning the fin-folds of jawed vertebrates, and fuel new hypotheses about the evolution of cluster regulation and the potential downstream differentiation outcomes of distinct *HoxD* compartments.

L'expression des gènes #11, 12 et 13 est très similaire, avec un seul domaine visible. Ensuite, les auteurs identifient une deuxième phase (late phase) d'expression dans la partie exo-squelettique



40

Etude du poisson-spatule (spatulaire)

> Sci Rep. 2016 Mar 4;6:22720. doi: 10.1038/srep22720.

HoxD expression in the fin-fold compartment of basal gnathostomes and implications for paired appendage evolution

Frank J Tulerko¹, Galus J Augustus^{1,2}, James L Massey^{1,3}, Seth E Sims¹, Sylvie Maza Marcus C Davis¹

Affiliations + expand

PMID: 26940624 PMCID: PMC4778128 DOI: 10.1038/srep22720

Free PMC article

Abstract

Go to: ▶

The role of Homeobox transcription factors during fin and limb development have been the focus of recent work investigating the evolutionary origin of limb-specific morphologies. Here we characterize the expression of *HoxD* genes, as well as the cluster-associated genes *Esx2* and *LNP*, in the paddlefish *Polyodon spathula*, a basal ray-finned fish. Our results demonstrate a collinear pattern of nesting in early fin buds that includes *HoxD14*, a gene previously thought to be isolated from global *Hox* regulation. We also show that in both *Polyodon* and the catshark *Scyliorhinus canicula* (a representative chondrichthyan) late phase *HoxD* transcripts are present in cells of the fin-fold and co-localize with *And1*, a component of the dermal skeleton. These new data support an ancestral role for *HoxD* genes in patterning the fin-folds of jawed vertebrates, and fuel new hypotheses about the evolution of cluster regulation and the potential downstream differentiation outcomes of distinct *HoxD*-regulated compartments.

L'expression des gènes #11, 12 et 13 est très similaire, avec un seul domaine visible. Ensuite, les auteurs identifient une deuxième phase (late phase) d'expression dans la partie exosquelettique.

Est-ce un deuxième domaine, l'extension du premier, des cellules migrantes ?

Là encore, les deux 'phases' ne sont pas visibles en même temps, comme dans le cas des amniotes.

