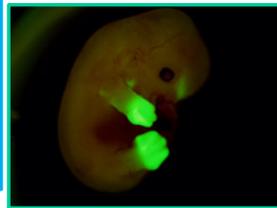




*Denis Duboule*

Collège de France  
Chaire Internationale  
*Evolution des Génomes et du Développement*  
[Denis.Duboule@college-de-france.fr](mailto:Denis.Duboule@college-de-france.fr)



@Duboule

@CdF1530

1



*Denis Duboule*

2020-2021

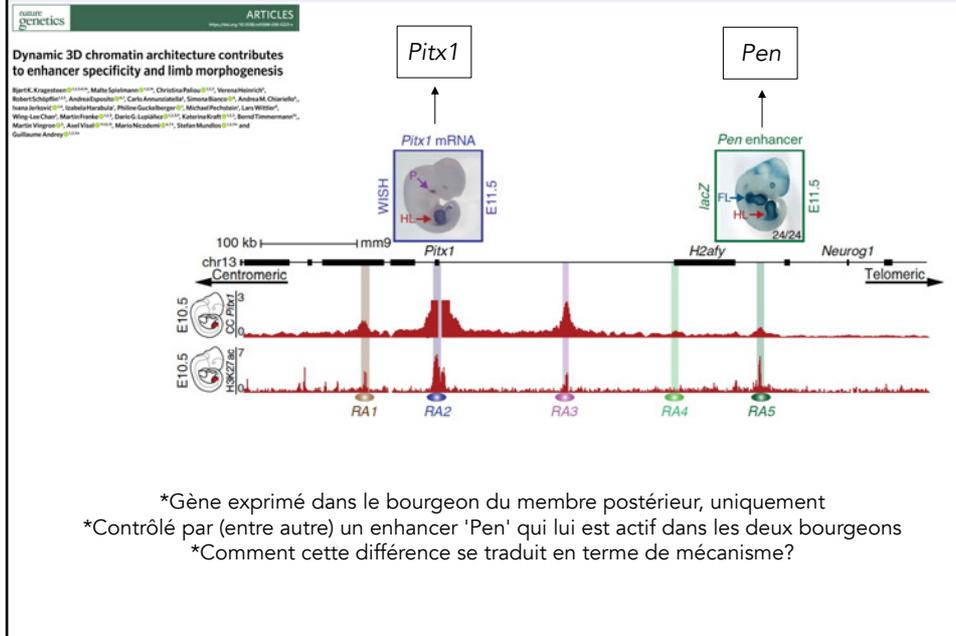
Régulation des gènes du développement et syndromes  
génétiques : Mécanismes, contraintes et atavismes du  
développement

**Leçon #5 (1<sup>er</sup> Juin 2021)**

- \*Résumé des points importants de la leçon 4
- \*Polydactylie pré-axiale et le gène *Lmbr1*
- \*Régulation à grande distance du gène *Shh*
- \*Acheiropodia et topologie de la chromatine

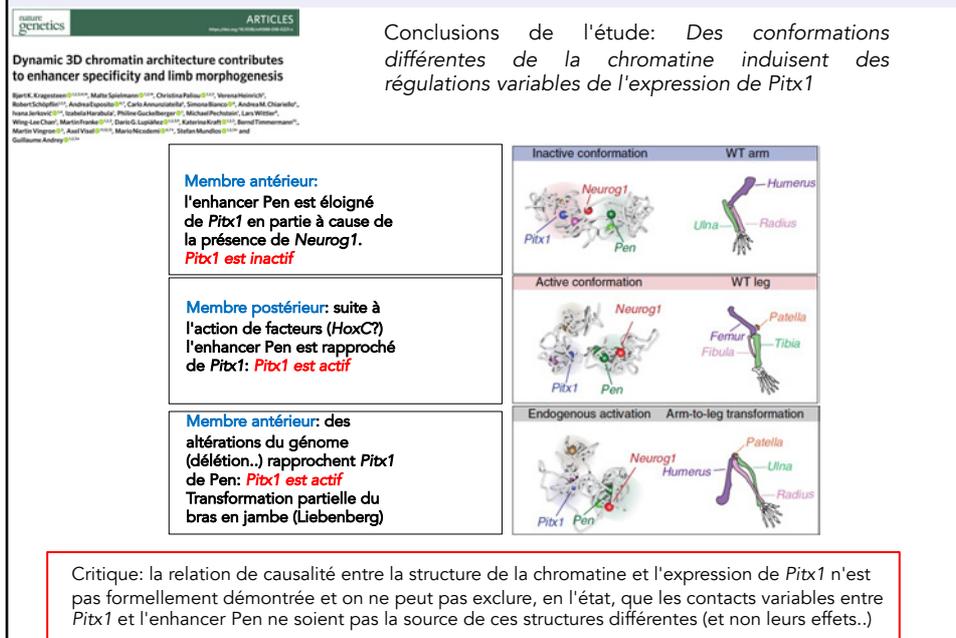
2

## Le mystère de la régulation du gène PITX1 (rappel)



3

## PITX1; 3D structure et régulation (rappel)



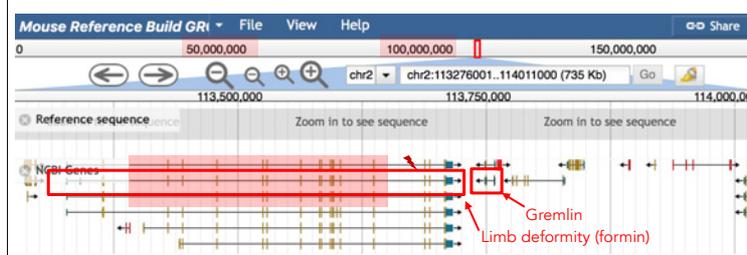
4

## Identification des enhancers: localisation...(rappel)

Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning

nature genetics, 2003

Mustafa K Khokha<sup>1,3</sup>, David Hsu<sup>1,3</sup>, Lisa J Brunet<sup>1</sup>, Marc S Dionne<sup>1,2</sup> & Richard M Harland<sup>1</sup>



25 Kb  
Les deux gènes sont des voisins très proches sur le génome!

Des mutations affectant la transcription du gène *Gremlin* touchent des séquences localisées dans des introns du gène voisin *Ld* codant pour la protéine Formin

5

## Polydactylies (rappel)

### Polydactylies

'An Atlas of Genetic Disorders of Limb Development'  
S. Mundlos, D. Horn, Springer



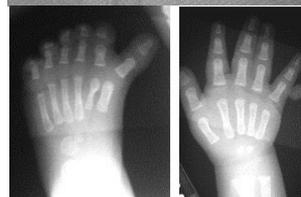
#### Polydactylies isolées

preaxial polydactyly PPD I  
preaxial polydactyly PPD II / TPT  
postaxial polydactyly A  
Greig syndrome  
Mirror image duplication, Laurin-Sandrow  
Synpolydactyly (SPD) I



#### Polydactylies syndromiques

Ellis van Creveld syndrome  
short-rib-polydactyly syndromes  
Bardet-Biedl syndrome BBS 1-7  
Meckel-Gruber syndrome  
Acrocallosal syndrome  
Carpenter syndrome  
Townes Brocks syndrome  
Pallister – Hall syndrome  
LADD syndrome



6

## Régulation du gène *Shh*, une histoire de mutations..(rappel)

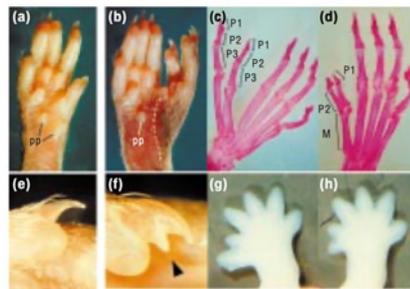
Brief Communication 93

**Identification of *Sonic hedgehog* as a candidate gene responsible for the polydactylous mouse mutant *Sasquatch***  
 James Sharpe<sup>1</sup>, Laura Lettice<sup>1</sup>, Jacob Hecksher-Sørensen<sup>1</sup>, Margaret Fox<sup>1</sup>, Robert Hill<sup>1</sup> and Robb Krumlauf<sup>1</sup>

Published: 18 January 1999

Current Biology 1999, 9:97-100  
<http://biomednet.com/elecref/0960982200900097>

Lors d'une étude d'un gène *Hoxb1* par transgénèse (le gène étant inactif) une souris est produite avec un phénotype polydactyle (mutation par insertion; comparable à '*Limb deformity*' ..) Cette lignée de souris sera appelée '*Sasquatch*' (*Ssq*)



Current Biology



*Sasquatch* (bigfoot) créature imaginaire au Canada

7

## Régulation du gène *Shh*, une histoire de mutations..(rappel)

**Disruption of a long-range cis-acting regulator for *Shh* causes preaxial polydactyly**

Laura A. Lettice<sup>1\*</sup>, Taizo Horikoshi<sup>1,2\*</sup>, Simon J. H. Heaney<sup>1,3</sup>, Marijke J. van Baren<sup>1,4</sup>, Herma C. van der Linde<sup>1</sup>, Guido J. Bredius<sup>1,5</sup>, Marijke Joosten<sup>1</sup>, Nurtan Akman<sup>1</sup>, Ben A. Oosterveld<sup>1</sup>, Naoto Endo<sup>1</sup>, Minoru Shibata<sup>1</sup>, Mikiyo Suzuki<sup>1</sup>, Eiichi Takahashi<sup>1</sup>, Toshikatsu Shinka<sup>1</sup>, Yutaka Nakahori<sup>1</sup>, Dai Ayusawa<sup>1</sup>, Kazuhiko Nakabayashi<sup>1</sup>, Stephen W. Scherer<sup>1</sup>, Peter Heutink<sup>1</sup>, Robert E. Hill<sup>1</sup>, and Sumihare Noji<sup>1</sup>

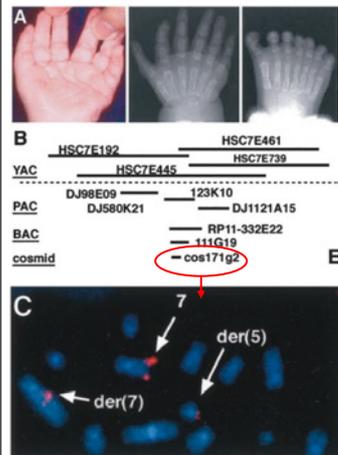
7548-7553 | PNAS | May 28, 2002 | vol. 99 | no. 11

L'analyse chromosomique révèle une translocation chromosomique **t(5;7)(q11, q36)**

Différents segments d'ADN sont alors utilisés comme sondes pour affiner la localisation du point de cassure (segments qui couvrent ce point de cassure).

Lignée cellulaire du patient (lymphoblastoïde).  
 Le cosmid **171g2** couvre le point de cassure

Un patient présentant une polydactylie pré-axiale



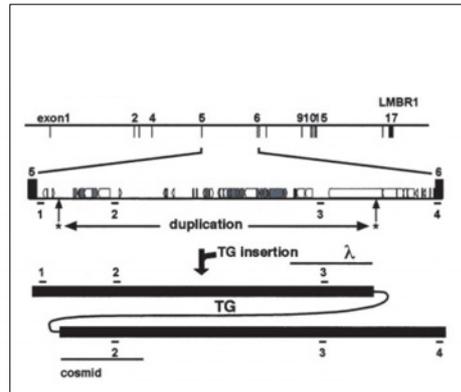
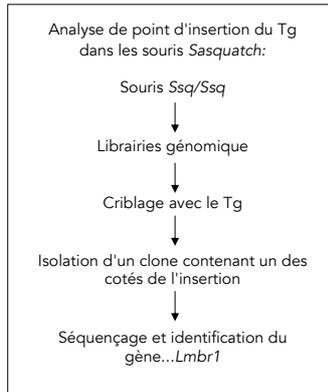
8

## Connection *Shh*, Polydactylie, *Lmbr1* et Sasquatch..(rappel)

### Disruption of a long-range cis-acting regulator for *Shh* causes preaxial polydactyly

Laura A. Lettice<sup>1</sup>, Tazuo Horikoshi<sup>1,2</sup>, Simon J. H. Heaney<sup>1,3</sup>, Marjolein van Baren<sup>1,4</sup>, Henna C. van der Linden<sup>1</sup>, Guido J. Breenheide<sup>1</sup>, Marjolein Joosten<sup>1</sup>, Norman Akman<sup>1</sup>, Ben A. Oostra<sup>1</sup>, Hanao Endo<sup>1</sup>, Miwako Shikata<sup>1</sup>, Mikio Suzuki<sup>1</sup>, Eishi Takahashi<sup>1</sup>, Yoshikatsu Shinkai<sup>1</sup>, Yutaka Nakahori<sup>1</sup>, Dai Ayusawa<sup>1</sup>, Kazuhiko Nakabayashi<sup>1</sup>, Stephen W. Scherer<sup>1</sup>, Peter Heutink<sup>1</sup>, Robert E. Hill<sup>1,5</sup>, and Samihane Nagai<sup>1</sup>

7548-7553 | PNAS | May 28, 2002 | vol. 99 | no. 11



\*L'insertion du Tg a produit une duplication partielle de séquences introniques entre les exons 5 et 6 du gène *Lmbr1*. Toutefois, chez les souris mutantes, la transcription de *Lmbr1* ne semble pas être affectée

9

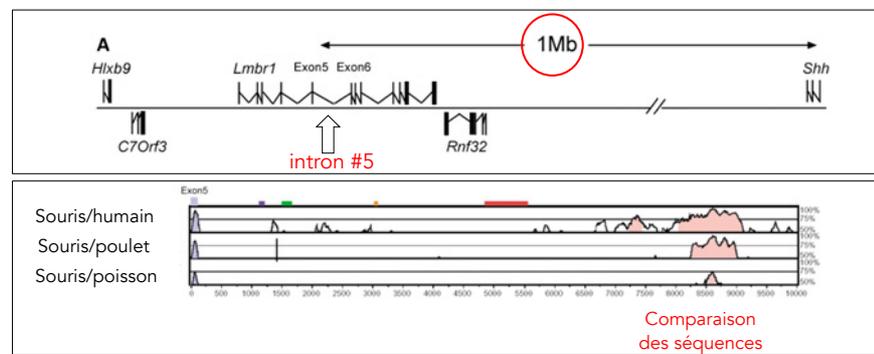
## Enhancers à distance: L'exemple Sonic Hedgehog (*Shh*)

### A long-range *Shh* enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly

Laura A. Lettice<sup>1</sup>, Simon J.H. Heaney<sup>1</sup>, Lorna A. Purdie<sup>1</sup>, Li Li<sup>2</sup>, Philippe de Beer<sup>3</sup>, Ben A. Oostra<sup>4</sup>, Debbie Goode<sup>4</sup>, Greg Elgar<sup>4</sup>, Robert E. Hill<sup>1,5</sup> and Esther de Graaf<sup>6</sup>

Human Molecular Genetics, 2003, Vol. 12, No. 14 1725-1735

\*L'analyse comparative des séquences d'ADN dans cet intron révèle la présence d'une région conservée jusqu'aux poissons



10

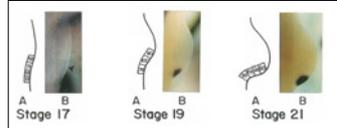
## Enhancers à distance: L'exemple Sonic Hedgehog (Shh)



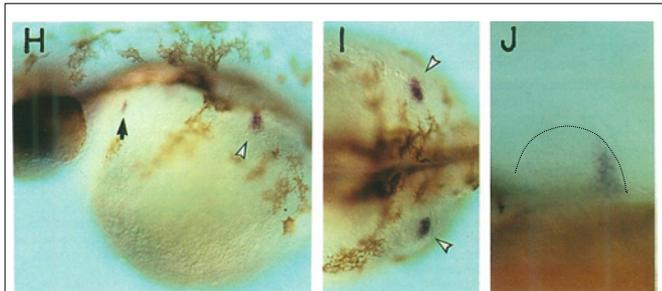
Cell, Vol. 75, 1431-1444, December 31, 1993, Copyright © 1993 by Cell Press

### A Functionally Conserved Homolog of the Drosophila Segment Polarity Gene *hh* Is Expressed in Tissues with Polarizing Activity in Zebrafish Embryos

S. Krauss, J.-P. Concordet, and P. W. Ingham  
Molecular Embryology Laboratory  
Imperial Cancer Research Fund



Expression de *Shh* restreinte à la partie postérieure chez le poulet



Chez le poisson zèbre, *Shh* est exprimé dans la partie postérieure des bourgeons des nageoires pectorales...

11

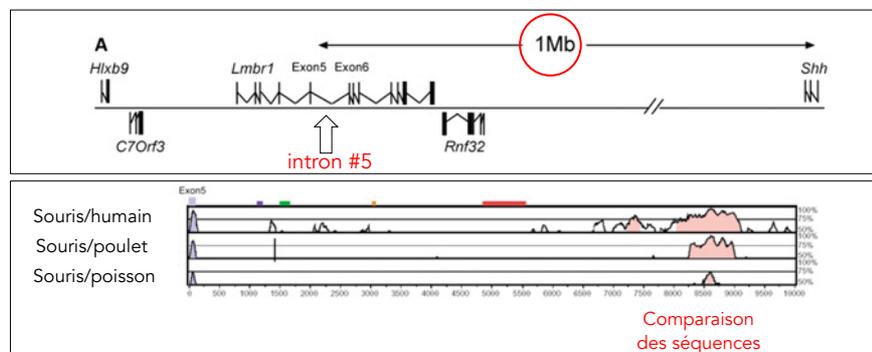
## Enhancers à distance: L'exemple Sonic Hedgehog (Shh)



### A long-range *Shh* enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly

Laura A. Lettice<sup>1</sup>, Simon J.H. Heaney<sup>1</sup>, Lorna A. Purdie<sup>1</sup>, Li Li<sup>2</sup>, Philippe de Beer<sup>3</sup>, Ben A. Oostra<sup>2</sup>, Debbie Goode<sup>4</sup>, Greg Elgar<sup>4</sup>, Robert E. Hill<sup>1,5</sup> and Esther de Graaf<sup>6</sup>  
*Human Molecular Genetics*, 2003, Vol. 12, No. 14, 1725-1735

\*L'analyse comparative des séquences d'ADN dans cet intron révèle la présence d'une région conservée jusqu'aux poissons



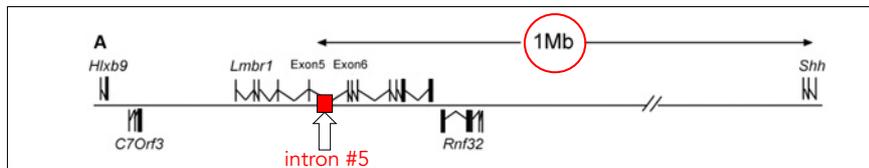
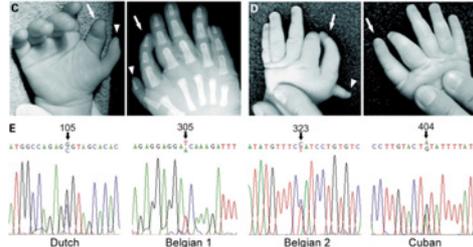
12

## Mutations dans une séquence enhancer (*Shh*)

### A long-range *Shh* enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly

Laura A. Lettice<sup>1</sup>, Simon J.H. Heaney<sup>1</sup>, Lorna A. Purdie<sup>1</sup>, Li Li<sup>2</sup>, Philippe de Beer<sup>3</sup>, Ben A. Oostra<sup>4</sup>, Debbie Goode<sup>4</sup>, Greg Elgar<sup>4</sup>, Robert E. Hill<sup>1,5</sup> and Esther de Graaf<sup>6</sup>  
*Human Molecular Genetics*, 2003, Vol. 12, No. 14 1725-1735

Polydactylie pré-axiale



Les mutations semblent affecter l'expression de *Shh*.  
 L'enhancer sera donc appelé : ZRS (ZPA Regulatory Sequence)

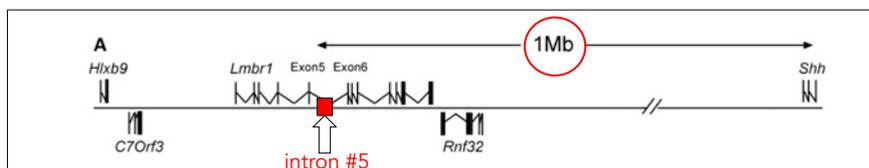
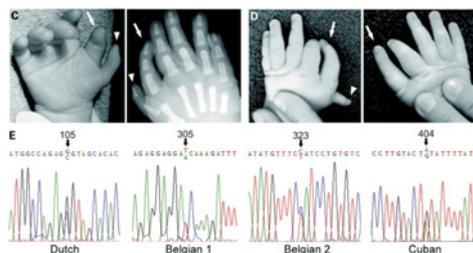
13

## Mutations dans une séquence enhancer (*Shh*)

### A long-range *Shh* enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly

Laura A. Lettice<sup>1</sup>, Simon J.H. Heaney<sup>1</sup>, Lorna A. Purdie<sup>1</sup>, Li Li<sup>2</sup>, Philippe de Beer<sup>3</sup>, Ben A. Oostra<sup>4</sup>, Debbie Goode<sup>4</sup>, Greg Elgar<sup>4</sup>, Robert E. Hill<sup>1,5</sup> and Esther de Graaf<sup>6</sup>  
*Human Molecular Genetics*, 2003, Vol. 12, No. 14 1725-1735

Polydactylie pré-axiale



Des mutations qui sont aussi responsables de la polydactylie des chats (les chats de Hemingway)

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Chat\\_polydactyle](https://fr.wikipedia.org/wiki/Chat_polydactyle)



14

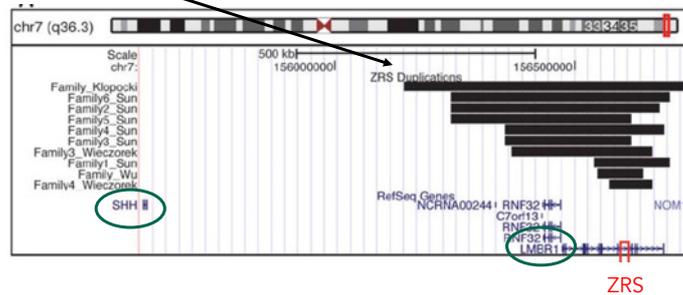
## Mutations dans la ZRS

### *cis*-Regulatory Mutations Are a Genetic Cause of Human Limb Malformations

Julia E. VanderMeer and Nadav Ahituv\*  
 Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences, and Institute for Human Genetics,  
 University of California San Francisco, San Francisco, California

*Dev Dyn.* 2011 May ; 240(5): 920-930. doi:10.1002/dvdy.22535.

Les polydactylies associées à la ZRS peuvent être causées soit par des duplications, soit par des micro-délétions ou des mutations ponctuelles



15

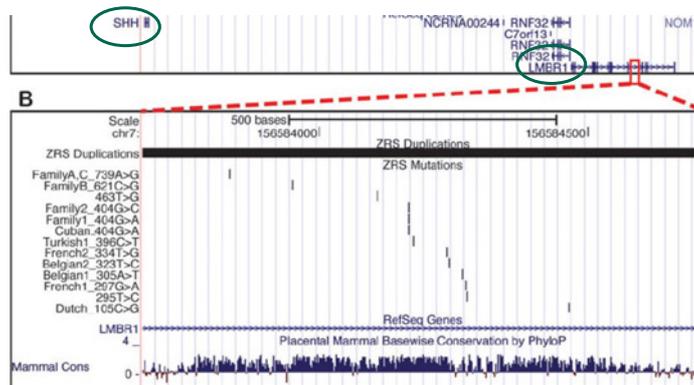
## Mutations dans la ZRS

### *cis*-Regulatory Mutations Are a Genetic Cause of Human Limb Malformations

Julia E. VanderMeer and Nadav Ahituv\*  
 Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences, and Institute for Human Genetics,  
 University of California San Francisco, San Francisco, California

*Dev Dyn.* 2011 May ; 240(5): 920-930. doi:10.1002/dvdy.22535.

### Mutations ponctuelles dans la ZRS



Ces mutations sont distribuées avec une légère préférence pour la partie centrale de la ZRS mais pas que....

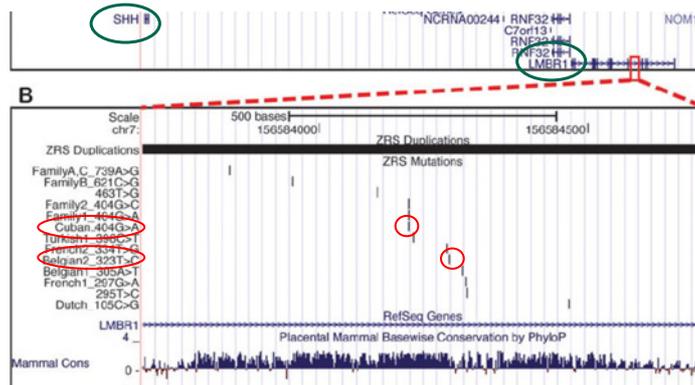
16

## Mutations dans la ZRS

### *cis*-Regulatory Mutations Are a Genetic Cause of Human Limb Malformations

Julia E. VanderMeer and Nadav Ahituv\*  
 Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences, and Institute for Human Genetics,  
 University of California San Francisco, San Francisco, California  
*Dev Dyn*. 2011 May; 240(5): 920-930. doi:10.1002/dvdy.22535.

### Mutations ponctuelles dans la ZRS



Ces mutations sont distribuées avec une légère préférence pour la partie centrale de la ZRS mais pas que....

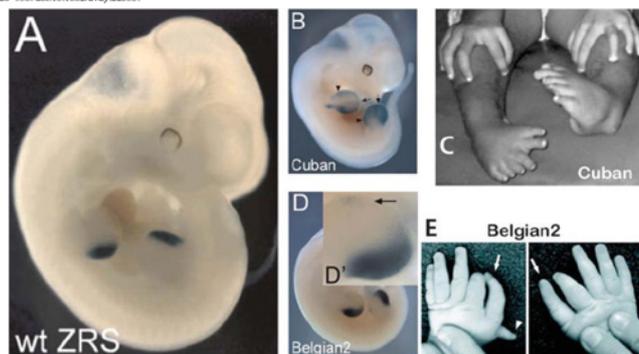
17

## Mutations dans la ZRS

### *cis*-Regulatory Mutations Are a Genetic Cause of Human Limb Malformations

Julia E. VanderMeer and Nadav Ahituv\*  
 Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences, and Institute for Human Genetics,  
 University of California San Francisco, San Francisco, California  
*Dev Dyn*. 2011 May; 240(5): 920-930. doi:10.1002/dvdy.22535.

### Mutations humaines réintroduites dans la souris (transgènes)



Dans les deux cas (vraisemblablement dans toutes les mutations polydactyles impliquant la ZRS), l'expression de *Shh* est activée dans la partie antérieure du bourgeon de membre, comme si la ZRS avait normalement une capacité de régulation plus large que 'postérieur' mais que cette capacité était inhibée/réprimée ailleurs que dans les cellules de la ZPA.

Dans ce contexte, chaque mutation affectant la ZRS pourrait contribuer à la dé-répression (déstabilisation) de l'activité de cette séquence dans la partie antérieure

18

## Mutations dans la ZRS; mécanismes?

Developmental Cell  
Short Article

### Opposing Functions of the ETS Factor Family Define *Shh* Spatial Expression in Limb Buds and Underlie Polydactyly

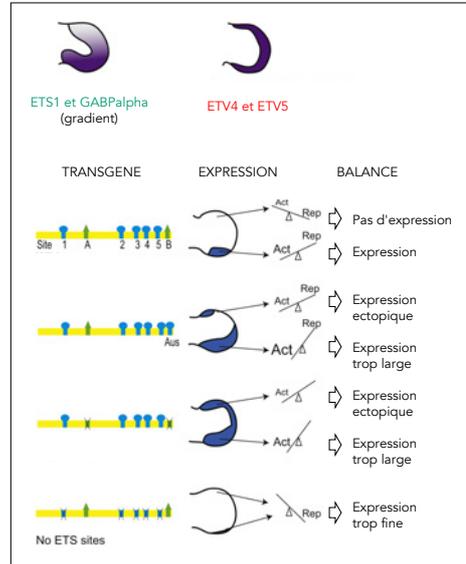
Laura A. Lettice,<sup>1</sup> Iain Williamson,<sup>1</sup> John H. Wilshire,<sup>1</sup> Silvia Petruso,<sup>1</sup> Paul S. Devenney,<sup>1</sup> Alison E. Hill,<sup>1</sup> Abdelkader Essafi,<sup>1</sup> James Haggman,<sup>2</sup> Richard Mort,<sup>1</sup> Graeme Grimes,<sup>1</sup> Carlo L. DeAngelis,<sup>1</sup> and Robert E. Hill<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>MRC Human Genetics Unit, MRC Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, Western General Hospital, Crewe Road, Edinburgh EH4 2XJ, UK  
<sup>2</sup>Integrated Department of Immunology, National Jewish Health, Denver, CO 80206, USA  
\*Correspondence: bob.hill@hgu.mrc.ac.uk  
DOI: 10.1016/j.devcel.2011.12.010

Balance fine entre activateurs et répresseurs

Activateurs: Facteurs ETS (ETS1 et GABPalph)

Répresseurs: Facteurs ETS (ETV4 et ETV5)

(Les facteurs ETS représentent une des plus grande famille de facteurs de transcription chez les mammifères)



19

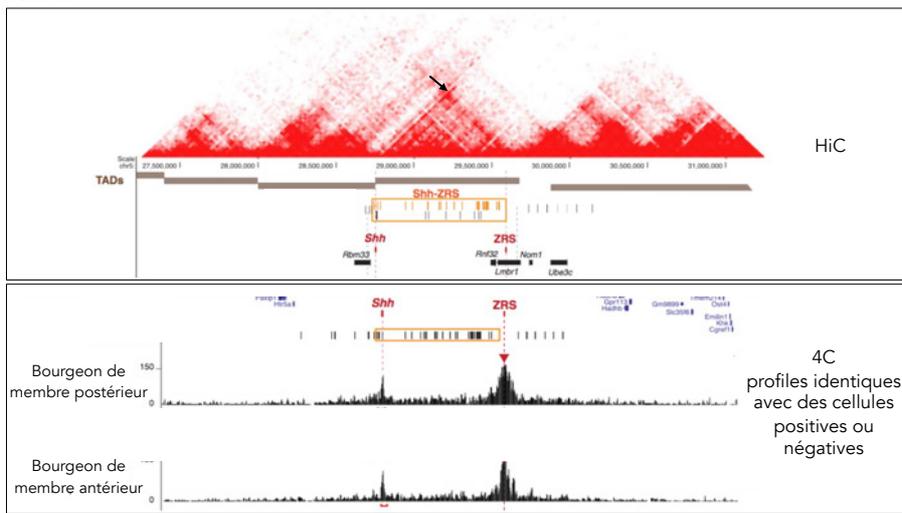
## Mutations dans une séquence enhancer (*Shh*)



### The *Shh* Topological Domain Facilitates the Action of Remote Enhancers by Reducing the Effects of Genomic Distances

Developmental Cell  
Article

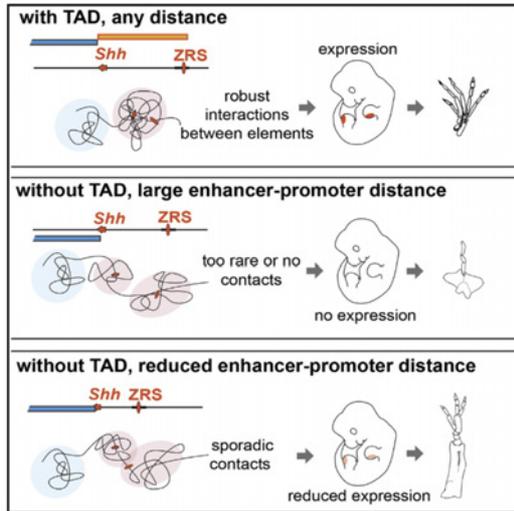
Orsolya Symmons,<sup>1,2</sup> Leslie Pan,<sup>1</sup> Silvia Remeseiro,<sup>1</sup> Tuğçe Aktas,<sup>1,2</sup> Felix Klein,<sup>1</sup> Wolfgang Huber,<sup>1</sup> and François Spitz<sup>1,2\*</sup> (2016)



20

## Enhancers à distance: L'exemple Sonic Hedgehog (Shh)

\*Diverses modifications du paysage de régulation (ingénierie chromosomique) vont révéler une série de conclusions:



\*La structure TAD favorise les contacts entre la ZRS et le gène *Shh*

\*Sans TAD, la fréquence des contacts diminue

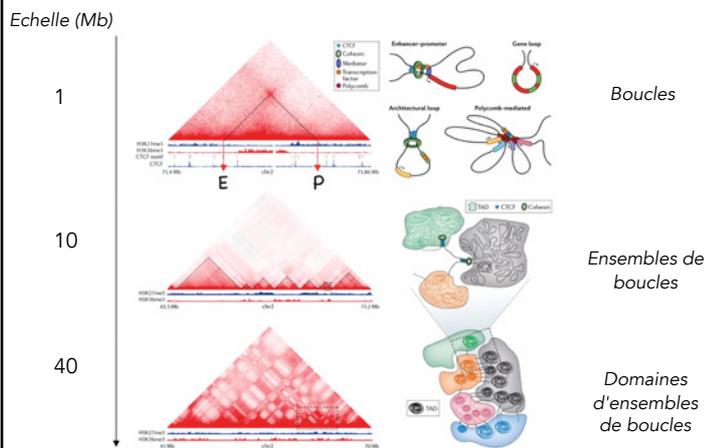
\*Changer les distances entre la ZRS et *Shh* à l'intérieur du TAD n'a pas d'effet marqué

\*Rapprocher la ZRS du gène *Shh* en absence du TAD peu partiellement compenser la perte de contacts

21

## CTCF, cohésine et la structure 3D de la chromatine

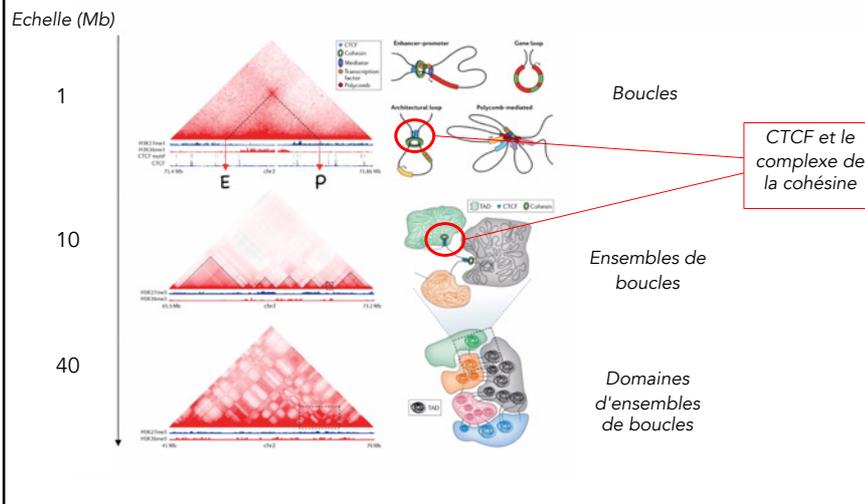
Différents niveaux d'organisation de la chromatine dans l'espace 3D  
(Adapté de Bonev et Cavalli, 2016)



22

## CTCF, cohésine et la structure 3D de la chromatine

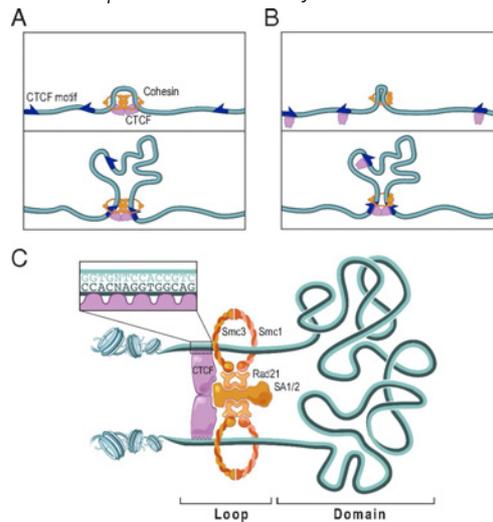
Différents niveaux d'organisation de la chromatine dans l'espace 3D  
(Adapté de Bonev et Cavalli, 2016)



23

## Le modèle du 'Loop Extrusion'

Loops are formed in interphase by a DNA extrusion mechanism involving cohesin complexes and limited by bound CTCF molecules



24

## Enhancers à distance: L'exemple Sonic Hedgehog (*Shh*)

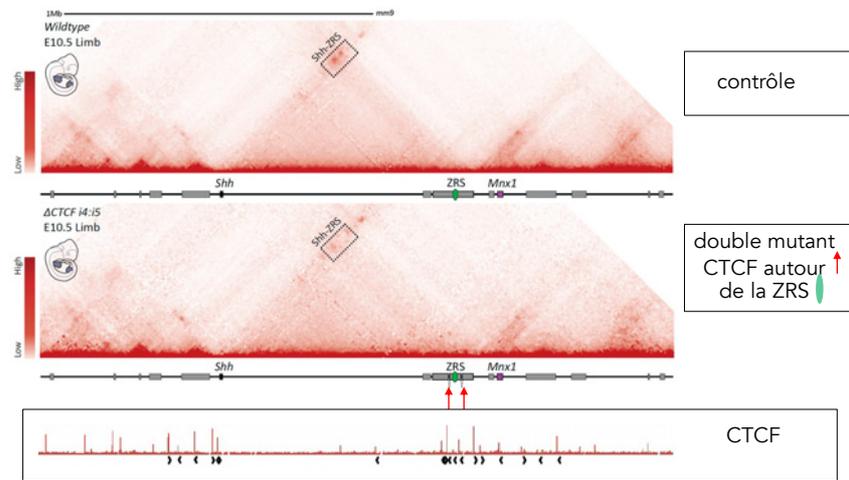


### Preformed chromatin topology assists transcriptional robustness of *Shh* during limb development

Christina Pallou<sup>1,2</sup>, Philine Guckelberger<sup>1</sup>, Robert Schöpflin<sup>1,4</sup>, Verena Heinrich<sup>1</sup>, Andrea Esposito<sup>1,5,6</sup>, Andrea M. Chiarillo<sup>1,2</sup>, Simona Bianco<sup>1,2</sup>, Carlo Annunziatella<sup>1,2</sup>, Johannes Helmuth<sup>1,2</sup>, Stefan Haas<sup>1</sup>, Ivana Jerković<sup>1,2</sup>, Norbert Brieske<sup>1</sup>, Lars Wittler<sup>1</sup>, Bernd Timmermann<sup>1</sup>, Mario Nicodem<sup>1,6</sup>, Martin Vingron<sup>1</sup>, Stefan Mundlos<sup>1,3,7</sup>, and Guillaume Andrey<sup>1,3,4</sup>

12390–12399 | PNAS | June 18, 2019 | vol. 116 | no. 25

\*La délétion (CRISPR-cas9) de deux sites CTCF autour de la ZRS diminue fortement les contacts avec le gène *Shh*



25

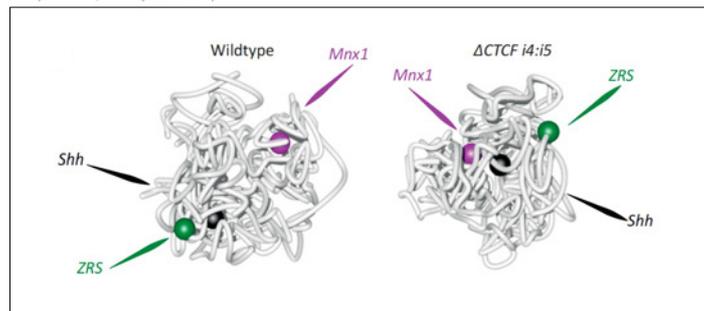
## Enhancers à distance: L'exemple Sonic Hedgehog (*Shh*)



### Preformed chromatin topology assists transcriptional robustness of *Shh* during limb development

Christina Pallou<sup>1,2</sup>, Philine Guckelberger<sup>1</sup>, Robert Schöpflin<sup>1,4</sup>, Verena Heinrich<sup>1</sup>, Andrea Esposito<sup>1,5,6</sup>, Andrea M. Chiarillo<sup>1,2</sup>, Simona Bianco<sup>1,2</sup>, Carlo Annunziatella<sup>1,2</sup>, Johannes Helmuth<sup>1,2</sup>, Stefan Haas<sup>1</sup>, Ivana Jerković<sup>1,2</sup>, Norbert Brieske<sup>1</sup>, Lars Wittler<sup>1</sup>, Bernd Timmermann<sup>1</sup>, Mario Nicodem<sup>1,6</sup>, Martin Vingron<sup>1</sup>, Stefan Mundlos<sup>1,3,7</sup>, and Guillaume Andrey<sup>1,3,4</sup>

12390–12399 | PNAS | June 18, 2019 | vol. 116 | no. 25



\*Un modèle de polymère 3D (basé sur les résultats Hi-C) suggère un changement de proximité entre la ZRS et *Shh* en absence des deux sites CTCF

\*Cependant, une réduction de seulement 50% des mRNAs est observée et aucun phénotype.. (autres sites CTCF..)

26

## Shh; effet de la topologie génomique sur le régulation



\*Ces études semblent montrer l'importance de la topologie génomique pour 'faciliter' ou 'assister' la mise en oeuvre des régulations à distances

### The *Shh* Topological Domain Facilitates the Action of Remote Enhancers by Reducing the Effects of Genomic Distances

Orsolya Symmons,<sup>1,2</sup> Leslie Pan,<sup>1</sup> Sílvia Remeseiro,<sup>1</sup> Tugce Aktas,<sup>1,4</sup> Felix Klein,<sup>1</sup> Wolfgang Huber,<sup>2</sup> and François Spitz<sup>1,2,3,4,5,6</sup>

Developmental Cell 39, 529–543, December 5, 2016

### Preformed chromatin topology assists transcriptional robustness of *Shh* during limb development

Christina Pallou<sup>1,2</sup>, Philine Guckelberger<sup>1</sup>, Robert Schöpflin<sup>1,3</sup>, Verena Heinrich<sup>1</sup>, Andrea Esposito<sup>1,2,4</sup>, Andrea M. Chiarillo<sup>1,2</sup>, Simona Bianco<sup>1,2</sup>, Carlo Annunziatelli<sup>1,2</sup>, Johannes Heineuth<sup>1,2</sup>, Stefan Haas<sup>1</sup>, Ivana Jerković<sup>1,2,4</sup>, Norbert Brieske<sup>1</sup>, Lars Wittler<sup>1</sup>, Bernd Timmermann<sup>1</sup>, Mario Nicodem<sup>1,2,4</sup>, Martin Vingron<sup>1</sup>, Stefan Mundlos<sup>1,2,3,4</sup>, and Guillaume Andréy<sup>1,2,3,4</sup>

12390–12399 | PNAS | June 18, 2019 | vol. 116 | no. 25

\*Mais d'autres études relativisent l'importance de ces structures de la chromatine dans le contrôle de l'expression des gènes cibles

© 2019. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2019) 146, dev179523. doi:10.1242/dev.179523



#### RESEARCH ARTICLE

### Developmentally regulated *Shh* expression is robust to TAD perturbations

Iain Williamson, Lauren Kane, Paul S. Devenney, Ilya M. Flyamer, Eve Anderson<sup>1</sup>, Fiona Kilanowski, Robert E. Hill, Wendy A. Bickmore<sup>2</sup> and Laura A. Lettice<sup>1</sup>

27

## Shh; effet de la topologie génomique sur le régulation



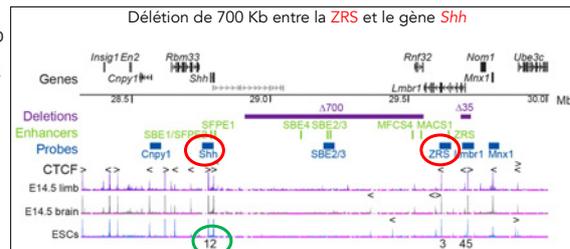
© 2019. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2019) 146, dev179523. doi:10.1242/dev.179523



#### RESEARCH ARTICLE

### Developmentally regulated *Shh* expression is robust to TAD perturbations

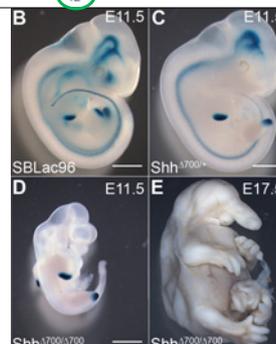
Iain Williamson, Lauren Kane, Paul S. Devenney, Ilya M. Flyamer, Eve Anderson<sup>1</sup>, Fiona Kilanowski, Robert E. Hill, Wendy A. Bickmore<sup>2</sup> and Laura A. Lettice<sup>1</sup>



\*Un rapprochement de 700 Kb entre la ZRS et son gène cible *Shh* ne change pas l'expression du gène de façon visible

\*Contrôles

\*Del/Del



28

# Shh; effet de la topologie génomique sur le régulation



© 2019. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2019) 146, doi:10.1042/dev.1719523



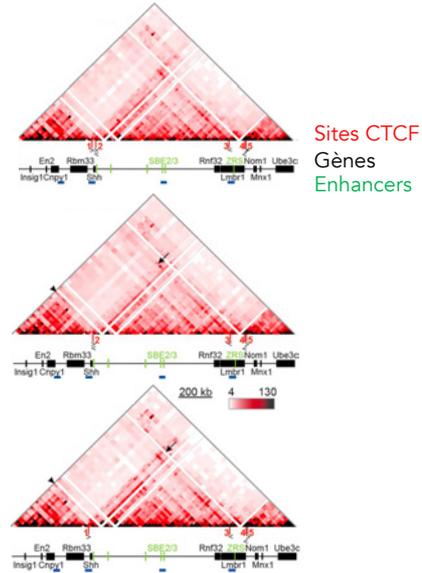
## RESEARCH ARTICLE

Developmentally regulated *Shh* expression is robust to TAD perturbations

Iain Williamson, Lauren Kane, Paul S. Devenney, Ilya M. Flyamer, Eve Anderson\*, Fiona Kilanowski, Robert E. Hill, Wendy A. Bickmore† and Laura A. Lettice‡

\*Mutation du premier site CTCF (1)

\*Mutation du second site CTCF (2)



29

# Shh; effet de la topologie génomique sur le régulation



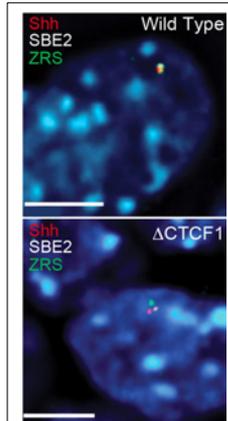
© 2019. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2019) 146, doi:10.1042/dev.1719523



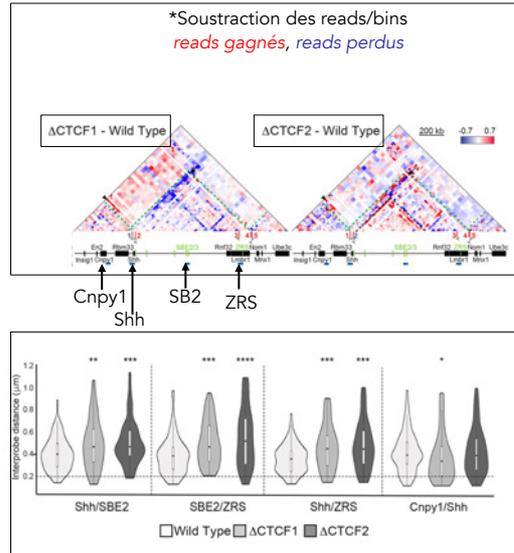
## RESEARCH ARTICLE

Developmentally regulated *Shh* expression is robust to TAD perturbations

Iain Williamson, Lauren Kane, Paul S. Devenney, Ilya M. Flyamer, Eve Anderson\*, Fiona Kilanowski, Robert E. Hill, Wendy A. Bickmore† and Laura A. Lettice‡



\*Fluorescence *in situ* sur chromosomes



Mesures des distances (en micron · 10<sup>-6</sup>)

30

## Shh; effet de la topologie génomique sur le régulation



© 2019. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2019) 146, doi:10.1042/dev.179623



### RESEARCH ARTICLE

Developmentally regulated *Shh* expression is robust to TAD perturbations

Iain Williamson<sup>1</sup>, Lauren Kane<sup>1</sup>, Paul S. Devenney<sup>1</sup>, Ilya M. Flyamer<sup>1</sup>, Eve Anderson<sup>1</sup>, Fiona Kilianowski<sup>1</sup>, Robert E. Hill<sup>1</sup>, Wendy A. Bickmore<sup>2</sup> and Laura A. Lettice<sup>1</sup>\*

\*Mais toutes ces modifications (et de nombreuses autres) n'ont aucun impact sur la transcription du gène *Shh* (sauf lorsque l'on touche à la ZRS, bien entendu)

#### ABSTRACT

Topologically associating domains (TADs) have been proposed to both guide and constrain enhancer activity. *Shh* is located within a TAD known to contain all its enhancers. To investigate the importance of chromatin conformation and TAD integrity on developmental gene regulation, we have manipulated the *Shh* TAD – creating internal deletions, deleting CTCF sites, and deleting and inverting sequences at TAD boundaries. Chromosome conformation capture and fluorescence *in situ* hybridisation assays were used to investigate the changes in chromatin conformation that result from these manipulations. Our data suggest that these substantial alterations in TAD structure have no readily detectable effect on *Shh* expression patterns or levels of *Shh* expression during development – except where enhancers are deleted – and result in no detectable phenotypes. Only in the case of a larger deletion at one TAD boundary could ectopic influence of the *Shh* limb enhancer be detected on a gene (*Mxf1*) in the neighbouring TAD. Our data suggests that, contrary to expectations, the developmental regulation of *Shh* expression is remarkably robust to TAD perturbations.

**KEY WORDS:** Chromosome conformation capture, Fluorescence *in situ* hybridisation, *Shh*, Enhancers, Genome organisation, Development, Topologically associated domains

Mais!....

31

## Acheiropodia



### Genetics of Acheiropodia (the Handless and Footless Families of Brazil). VI. Formal Genetic Analysis

ADEMAR FREIRE-MALTA,<sup>1</sup> NEWTON FREIRE-MALTA,<sup>2</sup> NEWTON E. MORTON,<sup>3</sup> ELIANE S. AZEVEDO,<sup>4</sup> AND ANTONIO QUELCE-SALGADO<sup>5</sup>

*Am J Hum Genet* 27:521–527, 1975



32

# Acheiropodia



## Anomalies de réduction

## Autres catégories

### Reduction anomalies affecting the entire limb

Tetra-amelia  
Al-Awadi/Raas-Rothschild Schinzel Fuhrmann  
Roberts  
Acheiropodia  
Peromelia

### Split hand split foot isolated

SHFM1, SHFM2, SHFM3, SHFM4, SHFM5  
SHFLD

### Split hand split foot syndrome associated

EEC 1-3, AEC, LMS, ADULT  
Hartsfield

### Defects radial ray

Nager  
Fanconi anemia  
TAR  
Baller-Gerold  
Holt-Oram  
Okihiro  
VACTERL association

### Defects ulnar ray

Cornelia de Lange  
FFU  
UMS  
Miller

### Defects lower limb

Hypoplastic femur unusual facies  
Clubfoot familiar  
Gollop-Wolfgang complex  
Clubfoot polydactyly  
Sirenomelia

### Non-genetic reduction anomalies

Amniotic bands /ADAM  
Thalidomide embryopathy  
Poland  
terminal transvers defect  
Valproat

### Acromesomelic dysplasias

acromesomelic type Maroteaux  
Grebe/DuPan  
Werner mesomelic dysplasia  
mesomelic dysplasia Kantaputra, Fryns  
Acromesomelic dysplasia BMPR1B type  
Leri Weill  
Langer  
Robinow

### Macrodactyly / Overgrowth

Hemihypertrophy  
Klippel Trenaunay  
Proteus

### Contracture deformities

Amyoplasia  
Escobar  
Freeman-Sheldon  
Adducted thumb

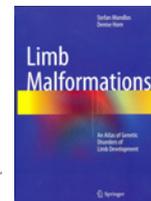
### Enchondromatoses

Enchondromatosis  
Maffucci

### Various types

OFD I-VIII  
Focal dermal hypoplasia  
Otopalatodigital I  
Otopalatodigital II

Acheiropodie: Absence (a-) des mains (cheiros) et des pieds (podos)



'An Atlas of Genetic Disorders of Limb Development'  
S. Mundlos, D. Horn, Springer

33

# Une famille consanguine

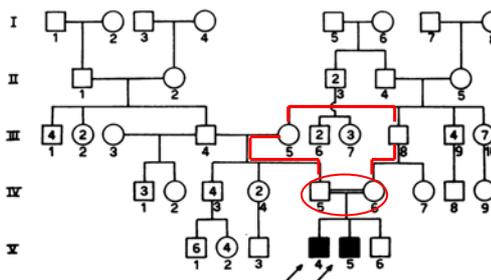


## Genetics of Acheiropodia (the Handless and Footless Families of Brazil). VI. Formal Genetic Analysis

ADEMAR FREIRE-MALTA,<sup>1</sup> NEWTON FREIRE-MALTA,<sup>2</sup> NEWTON E. MORTON,<sup>3</sup> ELIANE S. AZEVEDO,<sup>4</sup> AND ANTONIO QUELCE-SALGADO<sup>5</sup>

*Am J Hum Genet* 27:521-527, 1975

==== : Consanguinité  
(ici, cousins germains)



\*Une mutation récessive présente dans plusieurs familles brésiliennes avec des individus atteints suite à de la consanguinité

**A**cheiropodia (OMIM 200500) is a rare autosomal recessive disorder associated with bilateral congenital transverse defects of the upper and lower limbs including aplasia of the hands and feet<sup>1</sup>. Genetic analysis of five Brazilian families with acheiropodia, three of which were consanguineous, identified a homozygous deletion encompassing exon 4 of the limb development membrane protein 1 (*LMBR1*) gene to be associated with this phenotype<sup>2</sup>. The deletion was estimated to cover 4-6 kilo base (kb) on either side of this exon. However, no assays were done to fine map the deletion or functionally characterize how it could be causing acheiropodia.

34

## Acheiropodia; délétion dans le gène *Lmbr1*

*Am. J. Hum. Genet.* 68:38-45, 2001

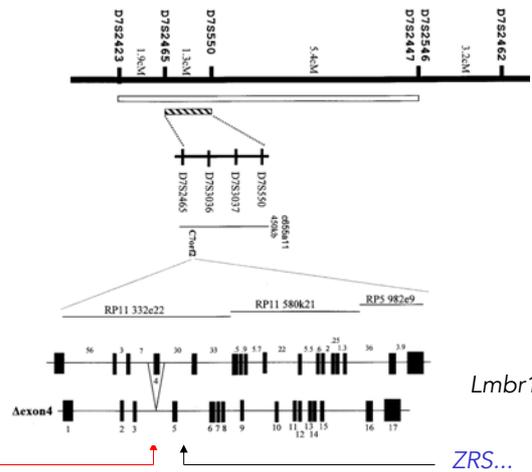
### Acheiropodia Is Caused by a Genomic Deletion in *C7orf2*, the Human Orthologue of the *Lmbr1* Gene

P. Ianakiev,<sup>1</sup> M. J. van Baren,<sup>2</sup> M. J. Daly,<sup>3</sup> S. P. A. Toledo,<sup>4</sup> M. G. Cavalcanti,<sup>4</sup> J. Correa Neto,<sup>5</sup> E. Lemos Silveira,<sup>6</sup> A. Freire-Maia,<sup>7</sup> P. Heutink,<sup>2</sup> M. W. Kilpatrick,<sup>1</sup> and P. Tsipouras<sup>1</sup>

C7orf2 = *Lmbr1*  
(Humain) (souris)

\*En 2001, la mutation est localisée au sein du gène humain *C7orf2*, le gène orthologue à *Lmbr1* chez la souris. Il s'agit d'une délétion de quelques Kb incluant l'exon No 4 de ce gène.

Mais...la délétion ne touche pas la ZRS... et pourtant le phénotype acheiropode est une copie de celui induit par la mutation du gène *Shh* chez la souris.



35

## Acheiropodia; délétion dans le gène *Lmbr1*

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-4> OPEN



### Deletion of CTCF sites in the *SHH* locus alters enhancer-promoter interactions and leads to acheiropodia

Aki Ushiki<sup>1,2</sup>, Yichi Zhang<sup>1,2,3</sup>, Chenling Xiong<sup>1,2</sup>, Jingjing Zhao<sup>1,2</sup>, Elias Georgakopoulos-Souares<sup>1,2</sup>, Lauren Kane<sup>4</sup>, Kirsty Jamieson<sup>2</sup>, Michael J. Bamshad<sup>5,6,7</sup>, Deborah A. Nickerson<sup>5,7</sup>, University of Washington Center for Mendelian Genomics<sup>8</sup>, Yin Shen<sup>2,8</sup>, Laura A. Lettice<sup>4</sup>, Elizabeth Lemos Silveira-Lucas<sup>9</sup>, Florence Petit<sup>10</sup> & Nadav Ahituv<sup>1,2,10</sup>

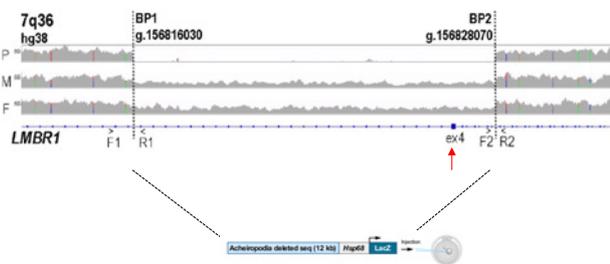
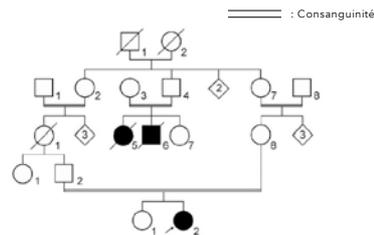
NATURE COMMUNICATIONS | <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-4> avril 2021

\*ADN d'une famille brésilienne différente. avec plusieurs liens consanguins.

\*Une délétion de 12 kb est identifiée, contenant l'exon 4 de *Lmbr1* et insertion de 2 nucléotides

\*L'inactivation de *Lmbr1* ne donne pas de phénotype dans les membres...

\*Les 12 kb perdus ne contiennent pas d'activité enhancer dans les membres..



Un transgène chez la souris ne révèle aucune activité de régulation dans les membres (donc pas de délétion d'une séquence régulatrice)

36

## Acheiropodia; délétion dans le gène *Lmbr1*

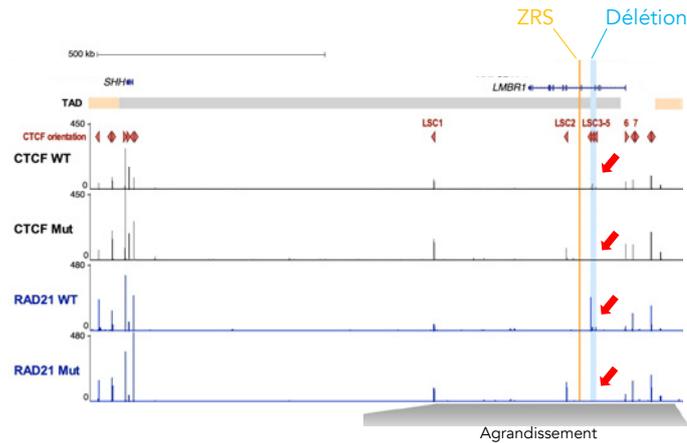


ARTICLE  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-z> OPEN  
 PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE  
 Deletion of CTCF sites in the *SHH* locus alters enhancer-promoter interactions and leads to acheiropodia  
 Ali Ushak<sup>1,2</sup>, Yichi Zhang<sup>1,2,3</sup>, Chenling Xiong<sup>2</sup>, Jingting Zhao<sup>2</sup>, Ilan Georgakopoulos-Soures<sup>1,2</sup>, Lauren Kane<sup>4</sup>, Kristy Jameson<sup>2</sup>, Michael J. Bamshad<sup>4,7</sup>, Deborah A. Nickerson<sup>1,2</sup>, University of Washington Center for Mendelian Genomics\*, Yin Shen<sup>2,8</sup>, Laura A. Lettice<sup>9</sup>, Elizabeth Lemos-Silveira-Lucas<sup>9</sup>, Florence Pettip<sup>10</sup> & Nadav Ahissar<sup>12</sup>  
 NATURE COMMUNICATIONS | <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-z>

\*Profils des sites CTCF occupés et de l'enrichissement de rad21 (sous-unité du complexe de la cohésine)

LSC1-7: *Lmbr1*-*Shh* CTCF sites

\*La délétion enlève trois sites de liaison à CTCF, sites qui par ailleurs accumulent de la protéine rad21 (cohésine).



37

## Acheiropodia; délétion dans le gène *Lmbr1*



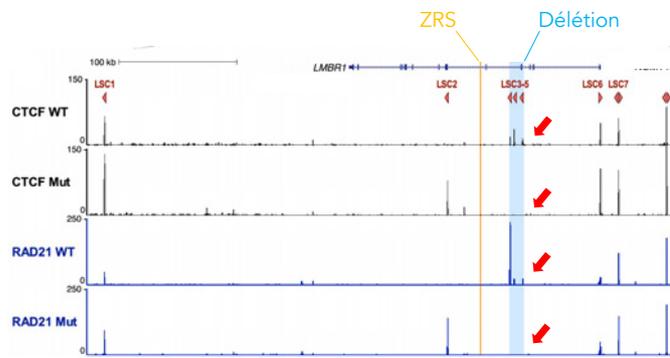
ARTICLE  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-z> OPEN  
 PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE  
 Deletion of CTCF sites in the *SHH* locus alters enhancer-promoter interactions and leads to acheiropodia  
 Ali Ushak<sup>1,2</sup>, Yichi Zhang<sup>1,2,3</sup>, Chenling Xiong<sup>2</sup>, Jingting Zhao<sup>2</sup>, Ilan Georgakopoulos-Soures<sup>1,2</sup>, Lauren Kane<sup>4</sup>, Kristy Jameson<sup>2</sup>, Michael J. Bamshad<sup>4,7</sup>, Deborah A. Nickerson<sup>1,2</sup>, University of Washington Center for Mendelian Genomics\*, Yin Shen<sup>2,8</sup>, Laura A. Lettice<sup>9</sup>, Elizabeth Lemos-Silveira-Lucas<sup>9</sup>, Florence Pettip<sup>10</sup> & Nadav Ahissar<sup>12</sup>  
 NATURE COMMUNICATIONS | <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-z>

\*Profils des sites CTCF occupés et de l'enrichissement de rad21 (sous-unité du complexe de la cohésine)

LSC1-7: *Lmbr1*-*Shh* CTCF sites

\*La délétion enlève trois sites de liaison à CTCF, sites qui par ailleurs accumulent de la protéine rad21 (cohésine).

\*Hypothèse: les sites CTCF enlevés dans le délétion sont nécessaires pour établir le contact avec le gène cible *Shh* sans contenir eux-mêmes de l'information de régulation ('tethering element')



38

## Effet de la délétion sur la topologie génomique

ARTICLE

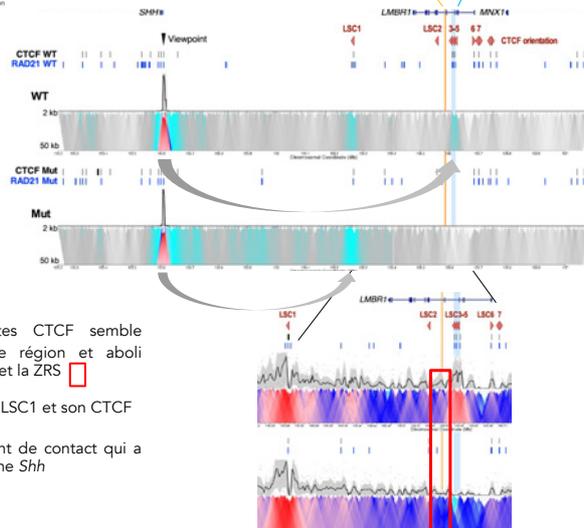
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-z> OPEN

Deletion of CTCF sites in the *SHH* locus alters enhancer-promoter interactions and leads to acheiropodia

Ali Ushak<sup>1,2</sup>, Yichi Zhang<sup>1,2,3</sup>, Chenling Xiong<sup>1,2</sup>, Jingting Zhao<sup>1,2</sup>, Ilan Georgakopoulos-Saunders<sup>1,2</sup>, Lauren Kane<sup>1,2</sup>, Kirsty Jameson<sup>1,2</sup>, Michael J. Bamshad<sup>1,2,4</sup>, Deborah A. Nickerson<sup>1,2</sup>, University of Washington Center for Mendelian Genomics<sup>1</sup>, Yin Shen<sup>1,2,5</sup>, Laura A. Lettice<sup>1,2,6</sup>, Elizabeth Lemos-Silveira-Lucas<sup>1</sup>, Florence Pettit<sup>1,7</sup> & Nadav Ahissar<sup>1,2,8</sup> 

NATURE COMMUNICATIONS | <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-z>

\*Profils d'interactions par 4C avec *Shh* comme 'point de vue'



\*Conclusion: La délétion de ces sites CTCF semble interrompre les interactions avec cette région et aboli également les contacts entre le gène *Shh* et la ZRS 

\*Les contacts sont redirigés vers la région LSC1 et son CTCF

\*Il s'agit bien de la délétion d'un élément de contact qui a pour fonction de rapprocher la ZRS du gène *Shh*

39

## Effet de la délétion sur la transcription de *Shh*

ARTICLE

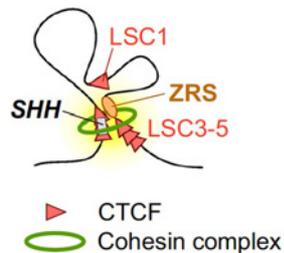
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-z> OPEN

Deletion of CTCF sites in the *SHH* locus alters enhancer-promoter interactions and leads to acheiropodia

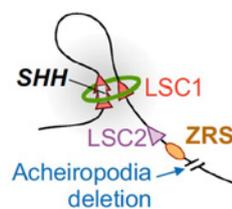
Ali Ushak<sup>1,2</sup>, Yichi Zhang<sup>1,2,3</sup>, Chenling Xiong<sup>1,2</sup>, Jingting Zhao<sup>1,2</sup>, Ilan Georgakopoulos-Saunders<sup>1,2</sup>, Lauren Kane<sup>1,2</sup>, Kirsty Jameson<sup>1,2</sup>, Michael J. Bamshad<sup>1,2,4</sup>, Deborah A. Nickerson<sup>1,2</sup>, University of Washington Center for Mendelian Genomics<sup>1</sup>, Yin Shen<sup>1,2,5</sup>, Laura A. Lettice<sup>1,2,6</sup>, Elizabeth Lemos-Silveira-Lucas<sup>1</sup>, Florence Pettit<sup>1,7</sup> & Nadav Ahissar<sup>1,2,8</sup> 

NATURE COMMUNICATIONS | <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-z>

\*Situation normale: La région LSC3-5 et ses trois sites CTCF rapprochent la ZRS du promoteur *Shh*. La région LSC1 est également contactée



\*Chez les patients, l'absence de la région LSC3-5 et ses trois sites CTCF dérive les contacts vers la région LSC1 et la ZRS est donc laissée de côté..

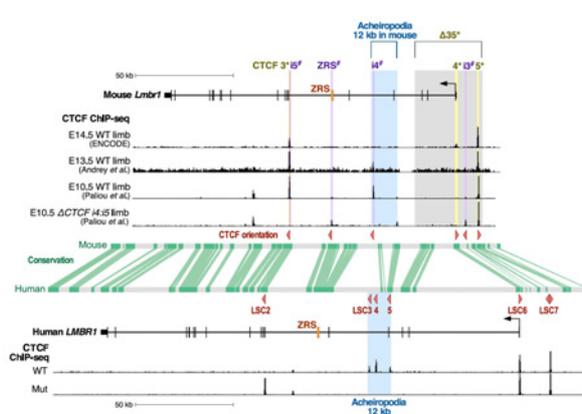


40

## Comparaison avec le locus *Shh* de la souris

ARTICLE  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-2> OPEN  
 Deletion of CTCF sites in the *SHH* locus alters enhancer-promoter interactions and leads to acheiropodia  
 Ali Ushak<sup>1,2</sup>, Yichi Zhang<sup>2,3</sup>, Cheyong Xiong<sup>2</sup>, Jingjing Zhao<sup>2</sup>, Ilan Georgakopoulos-Saunders<sup>1,2</sup>, Lauren Kane<sup>4</sup>, Kristy Jameson<sup>2</sup>, Michael J. Bamshad<sup>4,7</sup>, Deborah A. Nickerson<sup>1,7</sup>, University of Washington Center for Mendelian Genomics<sup>2</sup>, Yin Shen<sup>2,8</sup>, Laura A. Lettice<sup>9</sup>, Elizabeth Lemos-Silveira-Lucas<sup>2</sup>, Florence Petitjeu<sup>10</sup> & Nadav Ahissar<sup>1,11</sup>

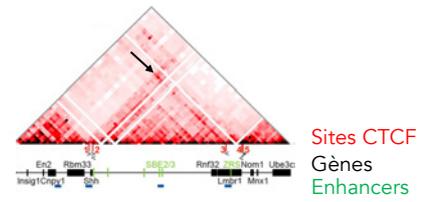
\*Cependant, cette situation est difficilement comparable aux travaux faits chez la souris car ces sites CTCF précis n'ont pas d'équivalents clairs, seul un site étant (parfois) occupé..



41

## Comparaison des loci *Shh* homme-souris

© 2019. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2019) 146, doi:10.1242/dev.179523  
 RESEARCH ARTICLE  
 Developmentally regulated *Shh* expression is robust to TAD perturbations  
 Iain Williamson, Lauren Kane, Paul S. Devenney, Ilya M. Flyamer, Eve Anderson<sup>1</sup>, Fiona Kilanowski, Robert E. Hill, Wendy A. Bickmore<sup>2</sup> and Laura A. Lettice<sup>3</sup>



- \*Le site CTCF #3 (dans cette étude) est un point de contact fort avec le gène *Shh*
- \*Le site CTCF comparable chez les humains (LSC2) n'établit pas de contact avec *Shh*

42

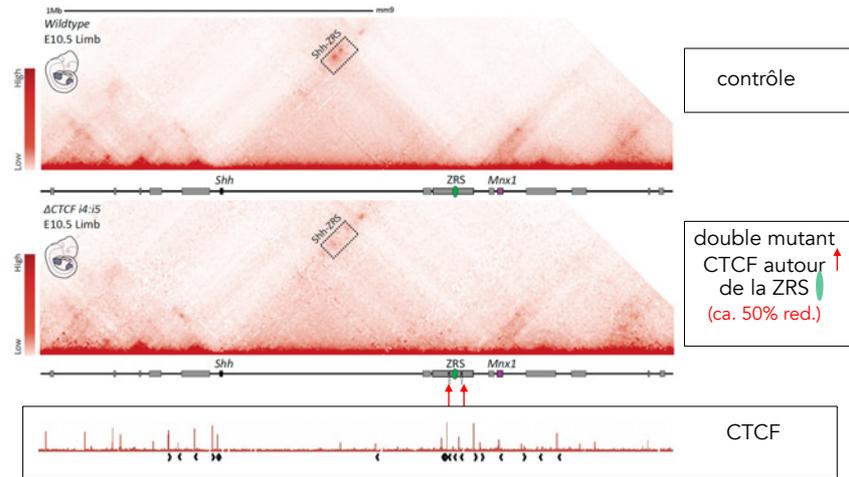
## Mutation hypomorphe de deux sites CTCF

### Preformed chromatin topology assists transcriptional robustness of *Shh* during limb development

Christina Pallou<sup>1,2</sup>, Philine Guckelberger<sup>1,2</sup>, Robert Schöpflin<sup>1,2</sup>, Verena Heinrich<sup>1</sup>, Andrea Esposito<sup>2,3,4</sup>, Andrea M. Chiarillo<sup>1,2</sup>, Simona Bianco<sup>1,2</sup>, Carlo Annunziatelli<sup>1,2</sup>, Johannes Heilmuth<sup>1,2</sup>, Stefan Haas<sup>1</sup>, Ivana Jerković<sup>1,2</sup>, Norbert Brieske<sup>1</sup>, Lars Wittler<sup>1</sup>, Bernd Timmermann<sup>1</sup>, Mario Nicodem<sup>1,5,6</sup>, Martin Vingron<sup>1</sup>, Stefan Mundlos<sup>1,2,3,7</sup>, and Guillaume André<sup>1,2,3,4</sup>

12390–12399 | PNAS | June 18, 2019 | vol. 116 | no. 25

\*La délétion (CRISPR-cas9) de deux sites CTCF autour de la ZRS diminue fortement les contacts avec le gène *Shh*



43

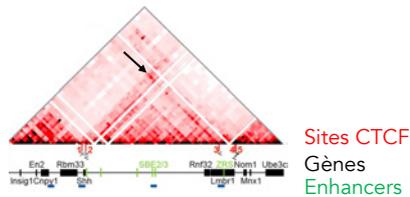
## Différences entre les loci *Shh* homme-souris

© 2019. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2019) 146, doi:10.1242/dev.179523

### RESEARCH ARTICLE

#### Developmentally regulated *Shh* expression is robust to TAD perturbations

Iain Williamson, Lauren Kane, Paul S. Devenney, Ilya M. Flyamer, Eve Anderson\*, Fiona Kilanowski, Robert E. Hill, Wendy A. Bickmore\* and Laura A. Lettice\*



\*Le site CTCF #3 (dans cette étude) est un point de contact fort avec le gène *Shh*

\*Le site CTCF comparable chez les humains (LSC2) n'établit pas de contact avec *Shh*

\*Des différences notables sont donc observées dans la façon dont cette topologie génomique est formée dans les deux espèces

44

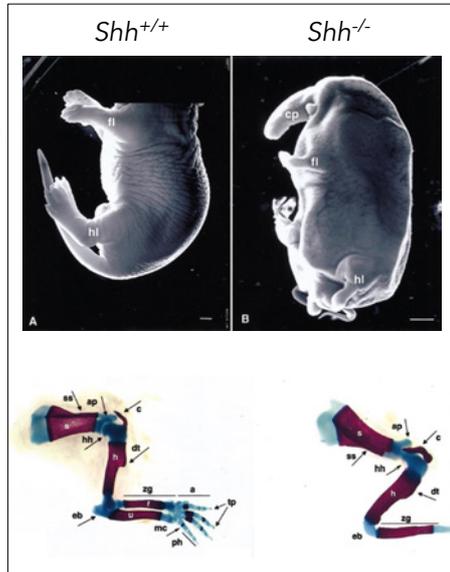
## Inactivation de *Shh* chez la souris et acheiropodia

Developmental Biology 236, 421–435 (2001)  
doi:10.1006/dbio.2001.0346, available online at <http://www.idealibrary.com on IDEAL>

### Manifestation of the Limb Prepattern: Limb Development in the Absence of Sonic Hedgehog Function

Chin Chiang,<sup>1,3</sup> Ying Litingtung,<sup>4</sup> Matthew P. Harris,<sup>1</sup> B. Kay Simandl,<sup>7</sup> Yina Li,<sup>6</sup> Philip A. Beachy,<sup>2</sup> and John F. Fallon<sup>1,2</sup>

\*Les souris mutantes pour *Shh* ont des réductions sévères des membres, équivalentes à l'acheiropodia observée chez les patients humains



45

## Même délétion chez la souris, un effet invisible...

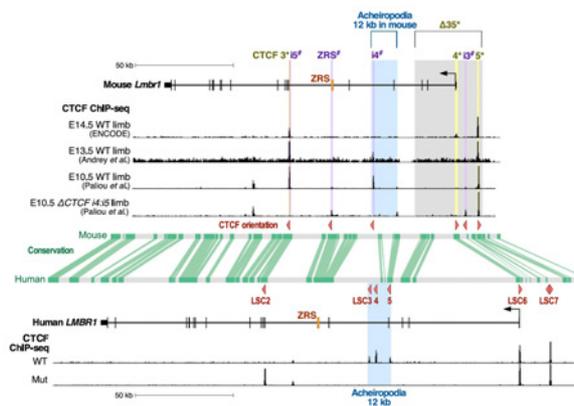
ARTICLE

Deletion of CTCF sites in the *SHH* locus alters enhancer-promoter interactions and leads to acheiropodia

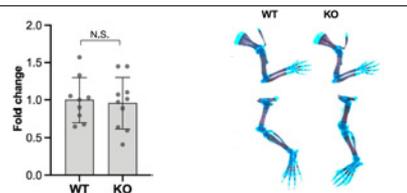
Aki Ushiki<sup>1,2</sup>, Yichi Zhang<sup>1,2,3</sup>, Chenling Xiong<sup>1,2</sup>, Jingjing Zhao<sup>1,2</sup>, Han Georgakopoulos-Sorores<sup>1,2</sup>, Lauren Kaneko<sup>4</sup>, Kiran James<sup>1,2</sup>, Michael J. Bamshad<sup>1,2</sup>, Deborah A. Nickerson<sup>1,2</sup>, University of Washington Center for Mendelian Genomics\*, Yin Shen<sup>1,2</sup>, Laura A. Lettice<sup>5</sup>, Elizabeth Lemos-Silveira-Lucas<sup>6</sup>, Florence Petit<sup>7</sup> & Nadav Ahissar<sup>1,2,3\*</sup>

NATURE COMMUNICATIONS | <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-z>

\*Cependant, cette situation est difficilement comparable aux travaux faits chez la souris car ces sites CTCF précis n'ont pas d'équivalents clairs, seul un site étant (parfois) occupé..



\*De plus, une délétion faite par CRISPR chez la souris recouvrant la région orthologue n'a pas d'effet sur la transcription du gène *Shh* (et donc pas d'anomalie des membres).



46

## *Shh*; effet de la topologie génomique sur la régulation



ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-z>

OPEN



### Deletion of CTCF sites in the *SHH* locus alters enhancer-promoter interactions and leads to acheiropodia

Ali Ushak<sup>1,2</sup>, Yichi Zhang<sup>2,3</sup>, Chenling Xiong<sup>2</sup>, Jingjing Zhai<sup>2</sup>, Ilias Georgakopoulos-Saunders<sup>2</sup>, Lauren Kane<sup>4</sup>, Kristy Jameson<sup>2</sup>, Michael J. Bamshad<sup>4,7</sup>, Deborah A. Nickerson<sup>2</sup>, University of Washington Center for Mendelian Genomics<sup>2</sup>, Yin Shen<sup>2,8</sup>, Laura A. Lettice<sup>9</sup>, Elizabeth Lemos Silveira-Lucas<sup>2</sup>, Florence Petitip<sup>10</sup> & Nadav Ahissar<sup>1,11</sup>

NATURE COMMUNICATIONS | <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22470-z>

This suggests that there are major differences between human and mouse in terms of CTCF location. These differences could be due to various selection pressures, proving more safeguards for enhancer-promoter interactions. It will also be intriguing to test whether these changes in CTCF location and orientation could be involved in phenotypic differences between species. Taken together, our results highlight that mouse is not a useful model to assess the chromatin interactions in humans for this locus and that CTCF location, orientation and number needs to be assessed between human and mice before using mice as an animal model to dissect human nucleotide variation that affects CTCF binding.

La sélection s'exerce sur le résultat (le fait que la ZRS doit être rapprochée du promoteur du gène *Shh*) et non pas sur le mécanisme produit ce résultat...