

*Denis Duboule*

Collège de France  
Chaire: *Evolution des Génomes et du Développement*

[Denis.Duboule@college-de-france.fr](mailto:Denis.Duboule@college-de-france.fr)



*Merci aux équipes techniques!*

UNIVERSITÉ  
DE GENÈVECOLLÈGE  
DE FRANCE  
—1530—

EPFL



@Duboule



@CdF1530





---

2019-2020

Régulation génétique et développement des mammifères :  
les séquences enhancers

Cours les mardis de 14h à 16h  
En direct sur le site internet du Collège de France

12 mai 2020 Histoire des séquences enhancer, identification, validation

19 mai 2020 Topologie des enhancers et fonctionnement à distance

26 mai 2020 Facteurs pionniers et grammaire des enhancers

02 juin 2020 Super enhancers, archipels de régulation et enhanceropathies

1985 'Universalité' des gènes

1990 'Universalité' des principes

1995 'Universalité' des génomes



Changement de paradigme

\**Avant*: Les animaux sont différents les uns des autres car ils ont des gènes différents

\**Après*: Comment se fait-il que les animaux soient si différents les uns des autres en ayant les mêmes gènes..

|                                        |                  |
|----------------------------------------|------------------|
| <i>Nématode (950 cellules):</i>        | ca. 15'000 gènes |
| <i>Homo Sapiens (10<sup>xx</sup>):</i> | ca. 22'000 gènes |

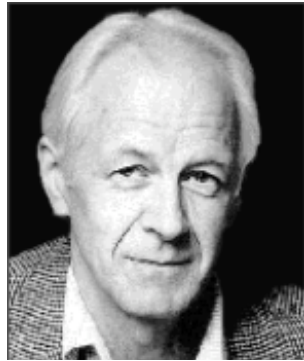
Cela peut-il 'expliquer' la différence de complexité?

\*Complexification des structures géniques  
(isoformes, épissages..)

\*Diversification des fonctions géniques  
(Pleïotropie, multi-fonctionnalité..)

\*Complexification des GRNs et de leurs interactions

# Evolution par régulations; les précurseurs



Allan Wilson



Mary-Claire King

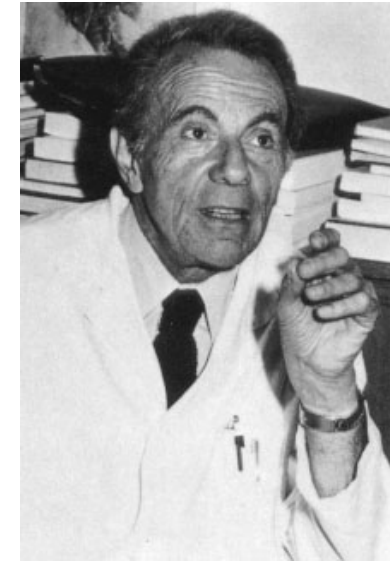
## Evolution at Two Levels in Humans and Chimpanzees

Their macromolecules are so alike that regulatory mutations may account for their biological differences.

Mary-Claire King and A. C. Wilson

11 April 1975, Volume 188, Number 4184

**SCIENCE**



François Jacob

*'C'est une question de  
régulation, pas de structure !'  
Conférence de Berkeley sur le  
bricolage de l'évolution en  
1977 (Science, 1977)*

## Régulation de la transcription des gènes

### **2 grandes catégories (stratégies) de régulation:**

Régulation basale de gènes dont les produits sont nécessaires de façon ubiquitaire pour le bon fonctionnement des cellules (par exemple des gènes codant pour de nombreuses enzymes nécessaires au métabolisme cellulaire). Transcription stable, généralement à des niveaux assez faibles

Régulation spécifique de certains gènes dont les produits sont nécessaires à des temps et dans des types cellulaires précis afin de remplir des fonctions particulières aux tissus concernés (différenciation cellulaire, développement, hormones etc). Niveaux de transcription très variables en amplitude.

## Régulation de la transcription des gènes

Régulation spécifique de certains gènes dont les produits sont nécessaires à des temps et dans des types cellulaires précis afin de remplir des fonctions particulières aux tissus concernés (différenciation cellulaire, développement, hormones etc). Niveaux de transcription très variables en amplitude.

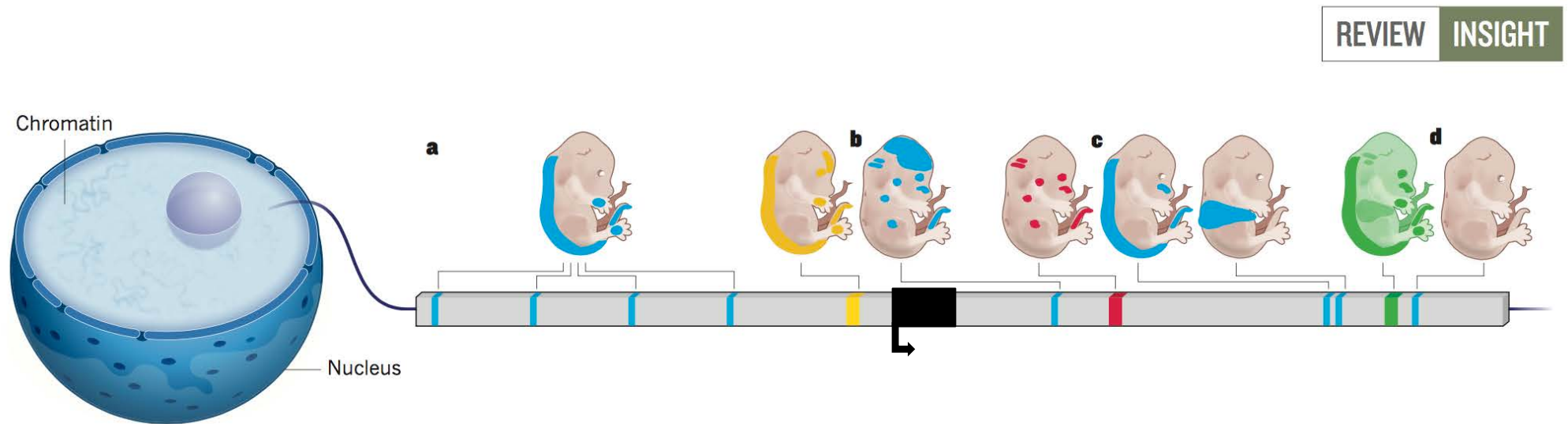
D'où la nécessité de disposer d'interrupteurs moléculaires donnant une série d'instructions claires aux gènes cibles, telles que: 'En marche', 'stop', 'plus fort' 'moins fort' 'en pause' etc...

Les interrupteurs moléculaires positifs sont appelés de façon assez générique des *séquences enhancer* (des *enhancers*).

# Séquences enhancers: Importance et contexte

Ces séquences enhancers ont une grande modularité, de telle sorte que l'expression de ces gènes peut être modifiée de façon locale, **intra-**(pleïotropie) ou **inter-**spécifique (évolution).

Importance des enhancers pour modifier les régulations dans des tissus différents de la même espèce ('*paysage de régulation*', 2003)



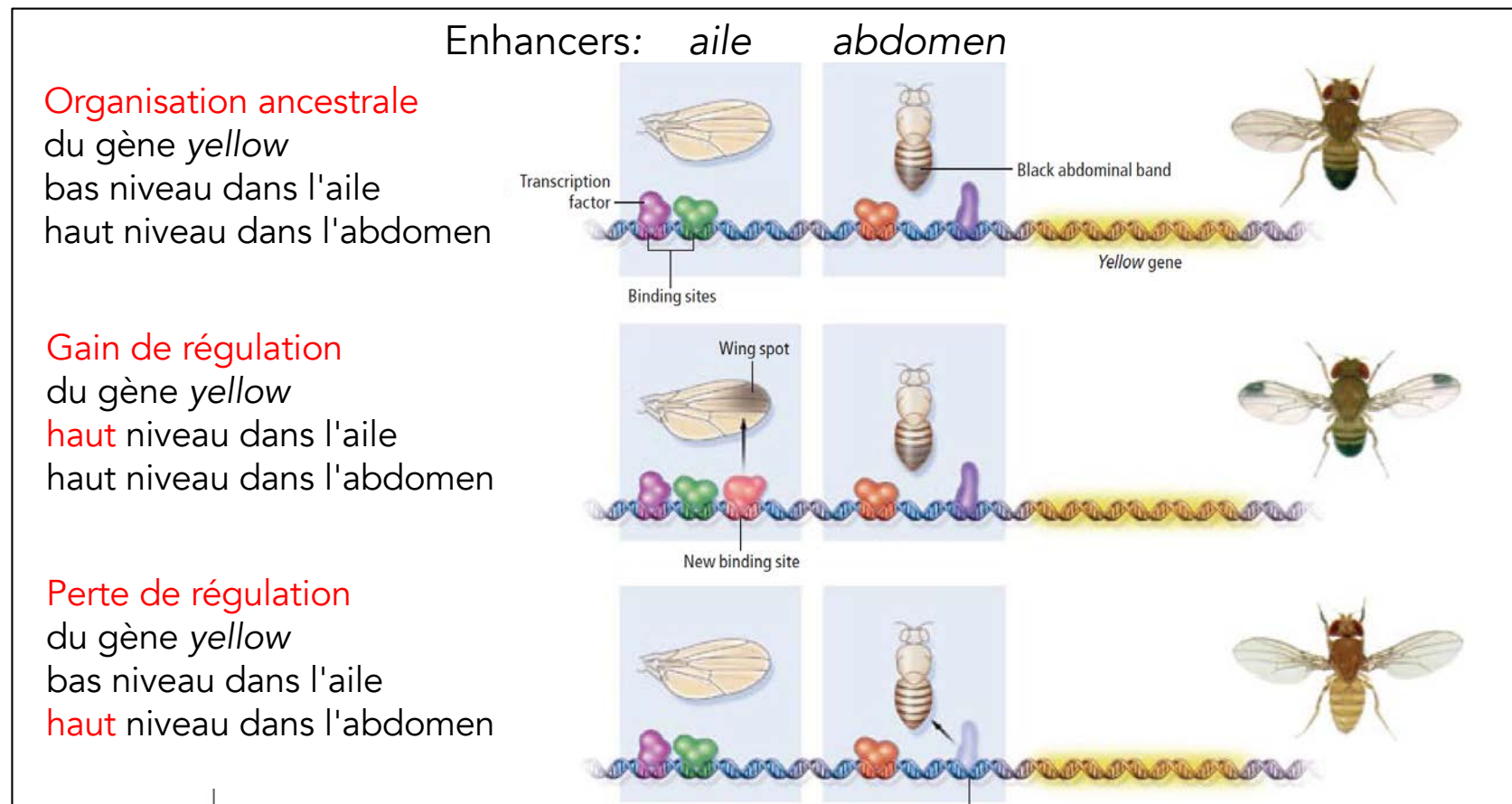
**Figure 2 | The mammalian regulatory jungle.**

Modifié de: de Laat and Duboule, 2013 Nature

# Séquences enhancers: Importance et contexte

Les gènes 'de développement sont régulés par des enhancers multiples qui ont une grande modularité, de telle sorte que l'expression de ces gènes peut être modifiée de façon locale, intra- ou **inter**-spécifique.

Importance des enhancers pour modifier les régulations au cours de la spéciation (*évolution par changement de régulation*)



*\*Découverte des enhancers, identification*

*\*Quelques éléments structurels*

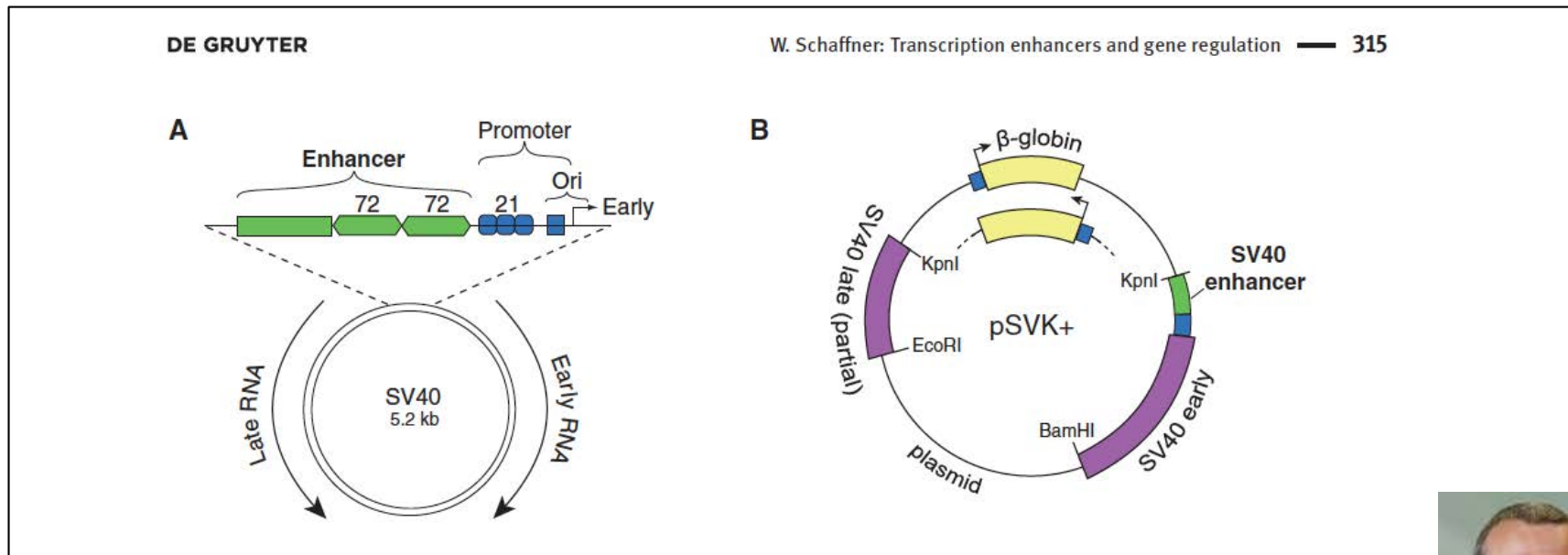
*\*Quelques éléments fonctionnels*

*\*Origine et Evolution de ces séquences*

*\*Enhancers, développement et maladies*

# Un bref historique (1981)

- \*SV40, un virus ADN utilisé pour introduire un gène (bêta-globine) dans des cellules en culture
- \*Expression (ARN) du gène amplifiée (100X) en présence en cis d'un morceau du virus
- \*Ce morceau ('72bp repeat') fonctionne indépendamment de l'endroit et de l'orientation

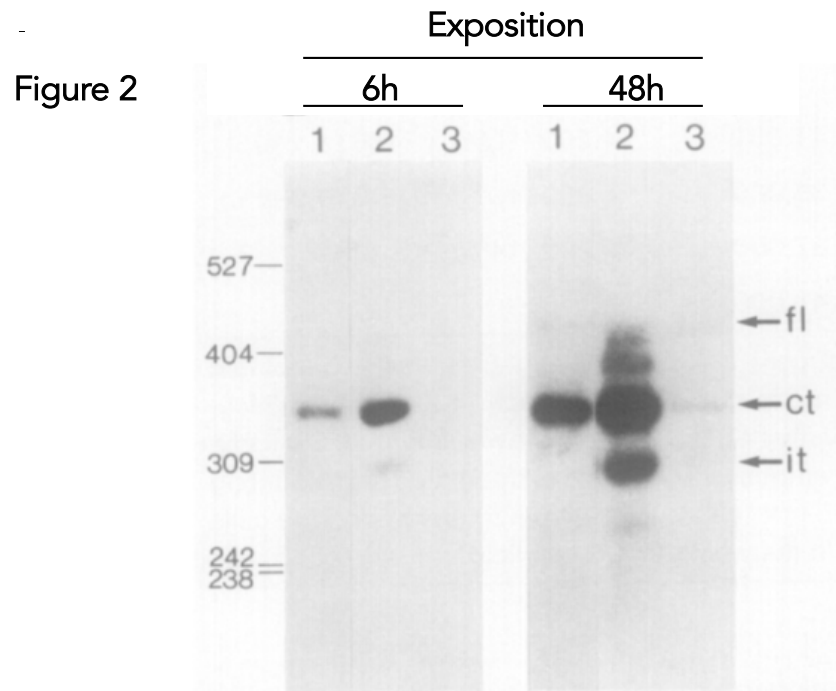


Cell, Vol. 27, 299–308, December 1981 (Part 1), Copyright © 1981 by MIT

## Expression of a $\beta$ -Globin Gene Is Enhanced by Remote SV40 DNA Sequences

Julian Banerji, Sandro Rusconi and  
Walter Schaffner

Institut für Molekularbiologie II  
Universität Zürich  
Hönggerberg, CH-8093 Zürich, Switzerland



- 1) Contrôle (gène de la beta-globine)
- 2) Béta-globine + plasmide **avec** SV40
- 3) Béta-globine + plasmide **sans** SV40

Figure 2. Detection of the Correct 5' Terminus of Globin RNA

(A) S1 nuclease mapping scheme (Weaver and Weissmann, 1979). For this experiment, a globin gene clone lacking the first intervening sequence (IVS1; see Figure 1A; Weber et al., 1981) was used as a radioactive probe (for further details see Rusconi and Schaffner, 1981). DNA end-labeled at the Bam HI site was hybridized to unlabeled RNA, treated with S1 nuclease, denatured, fractionated by gel electrophoresis and autoradiographed.

(B and C) Autoradiographs of the same gel after 6 hr and 48 hr of exposure, respectively. (Lanes 1) Hybridization to 0.2 ng rabbit  $\beta$ -globin mRNA. (Lanes 2) Hybridization to RNA from  $2.5 \times 10^6$  HeLa cells transfected with the  $\beta$ -globin-SV40-pBR322 clone pSVK+ (Figure 1C). (Lanes 3) Hybridization to RNA from the  $\beta$ -globin-gene recombinant plasmid p $\beta 2 \times$ , which does not contain SV40 sequences (Figure 1F). The intensity difference in the major band between lanes 2 and 3 was measured to be 200-fold. This was done by scanning a series of autoradiographs of different exposure times to minimize any nonlinear relation between radioactivity and blackening of the x-ray film.

## Expression of a $\beta$ -Globin Gene Is Enhanced by Remote SV40 DNA Sequences

Banerji, Rusconi and Schaffner

### Summary

**These studies define a class of DNA elements with a mode of action that has not been heretofore described. The activation of genes by specific enhancer elements seems to be a widespread mechanism that may be used for the regulation of gene expression.**

### Discussion (fin)

The DNA in chromosomes of higher organisms seems to be organized into loop structures of 10–100 kb (Marsden and Laemmli, 1979; Razin et al., 1979), and it was speculated that these chromosome loops constitute the domains of gene activation (Bernards et al., 1979; Bernards and Flavell, 1980). Taken together it appears possible that cellular “enhancers” are activating the genes within each chromosome domain, and that classes of different “enhancers” are involved in the developmental, as well as tissue-specific, expression of genes.

Volume 9 Number 22 1981

Nucleic Acids Research

**The SV40 72 base repair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants**

P. Moreau, R. Hen, B. Wasylyk, R. Everett, M. P. Gaub and P. Chambon

Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes du CNRS et Unité 184 de Biologie Moléculaire et de Génie Génétique de l'INSERM, Faculté de Médecine, Institut de Chimie Biologique, 11 Rue Humann, 67085 Strasbourg, France

Received 16 October 1981

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
Vol. 78, No. 2, pp. 943–947, February 1981  
Biochemistry

## Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element of the early promoter

(deletion mutants/chromatin/RNA initiation/transcriptional regulation)

PETER GRUSS, RAVI DHAR, AND GEORGE KHOURY

Laboratory of Molecular Virology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20205

Communicated by Hilary Koprowski, November 17, 1980

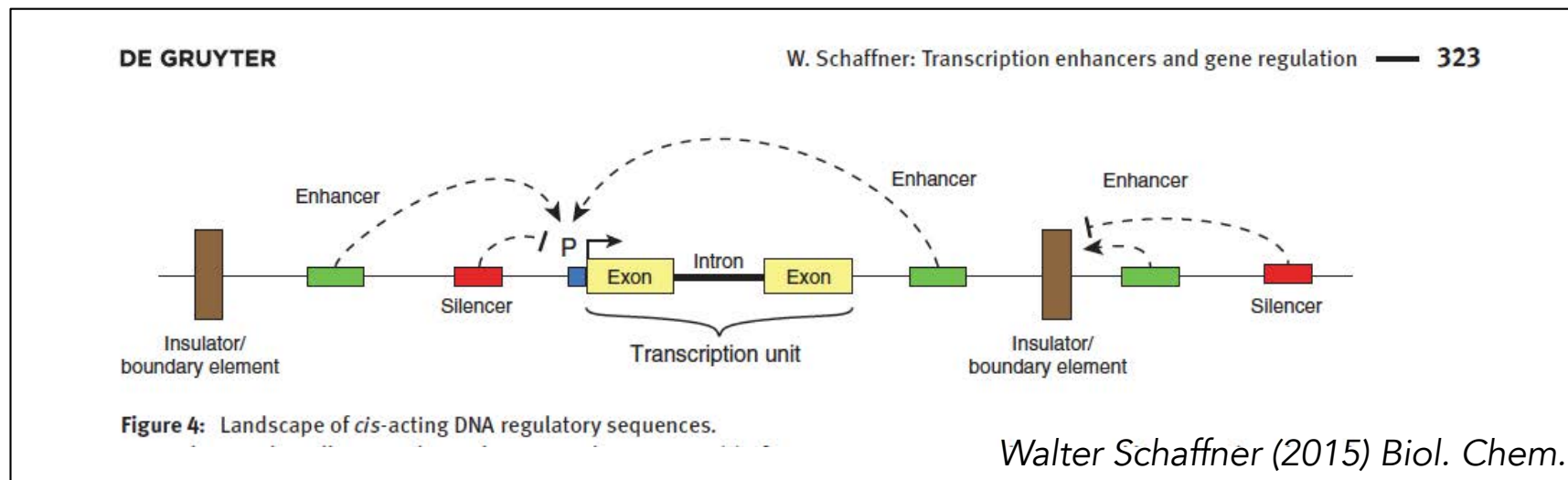
'Enhancers': terme proposé par Michael Botchan (Berkeley)

## Expression of a $\beta$ -Globin Gene Is Enhanced by Remote SV40 DNA Sequences

Banerji, Rusconi and Schaffner

Les bases générales du concept d'enhancer' sont énoncées au début des années 1980

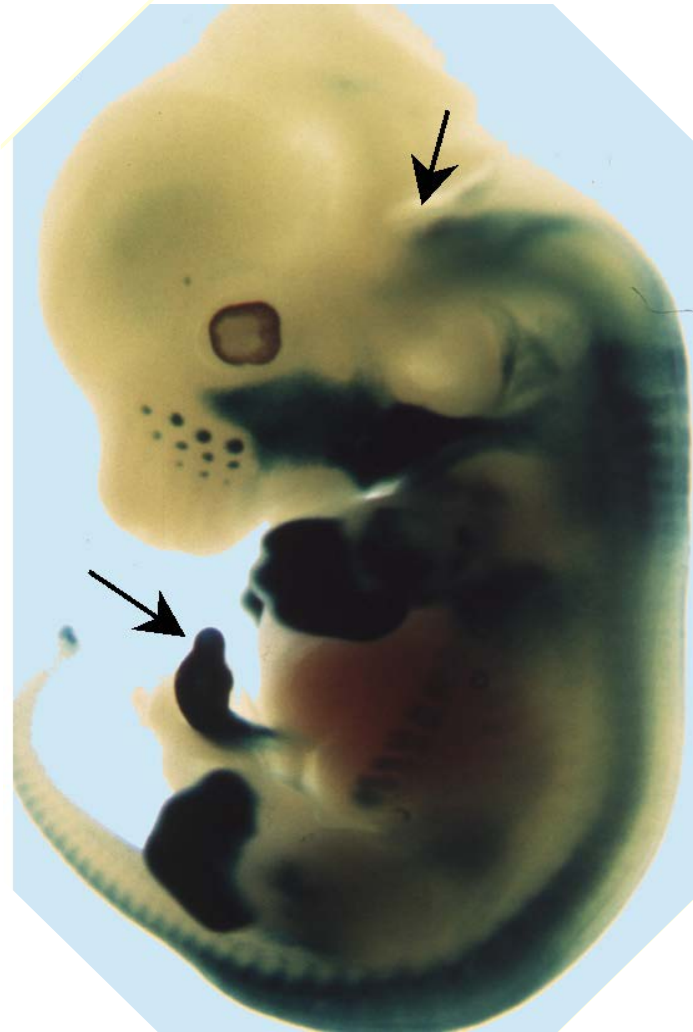
\*Une séquence d'ADN qui peut agir à distance pour augmenter la transcription à partir d'un promoteur cible, et cela indépendamment de son orientation



Raison d'être des enhancers: Ce sont des **interrupteurs** qui décident du temps et de l'endroit où un gène particulier est activé

# Multi-fonctionnalité des gènes du développement

Les séquences 'enhancers' portent la spécificité de l'expression des gènes impliqués dans le développement ou de tout autre gène *pléiotropique*



Un domaine d'expression 'ancestral' et des régulations additionnelles 'recrutées' (co-optées) au fil de l'évolution d'innovations structurelles

**Pléiotropie:** La mutation d'un gène peut avoir des effets multiples, dans différentes structures, organes ou cellules (définition génétique, maladies génétiques syndromiques..)

**Multifonctionnalité:** Un (produit de -) gène peut avoir des fonctions multiples selon les contextes mécanistiques (définition fonctionnelle).

Les enhancers permettent d'éclairer ce concept très ancien

## One Hundred Years of Pleiotropy: A Retrospective

Frank W. Stearns<sup>1</sup>

*Department of Biology, University of Maryland, College Park, Maryland 20742*

Genetics 186: 767–773 (November 2010)

McKUSICK, V. A., 1976 Pleiotropism. *Am. J. Hum. Genet.* **28**: 301–302.

**1910:** Ludwig Plate, étudiant de Ernst Haeckel, Jena.

(du grec "pleion" (πλείων, plus), et tropê (τροπή, changement)

"I call a unit of inheritance pleiotropic if several characteristics are dependent upon it; these characteristics will then always appear together and may thus appear correlated"

'Je qualifie une "unité génétique" de 'pléiotropique' si plusieurs caractéristiques en dépendent; *ces caractéristiques apparaîtront toujours ensemble et seront donc corrélées..'*  
(syndromes...)

## One Hundred Years of Pleiotropy: A Retrospective

Frank W. Stearns<sup>1</sup>

*Department of Biology, University of Maryland, College Park, Maryland 20742*

Genetics 186: 767–773 (November 2010)

McKusick, V. A., 1976 Pleiotropism. Am. J. Hum. Genet. **28**: 301–302.

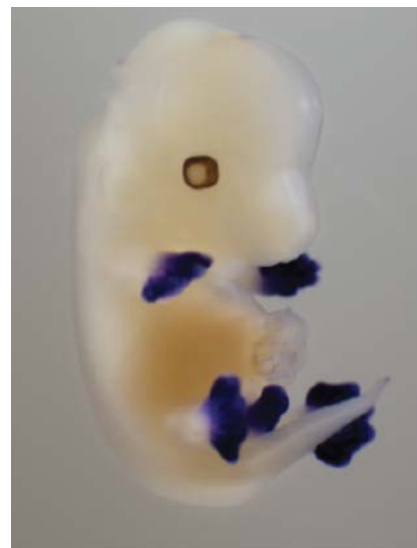
**1938:** Hans Grüneberg (scientifique anglais en Allemagne, émigré à Londres en 1933 où il rencontre entre autres R. Goldschmidt...*Hopeful monster*, 1940)

GRUNEBERG, H., 1938 An analysis of the “pleiotropic” effects of a new lethal mutation in the rat (*Mus norvegicus*). Proc. R. Soc. Lond. B **125**: 123–144.

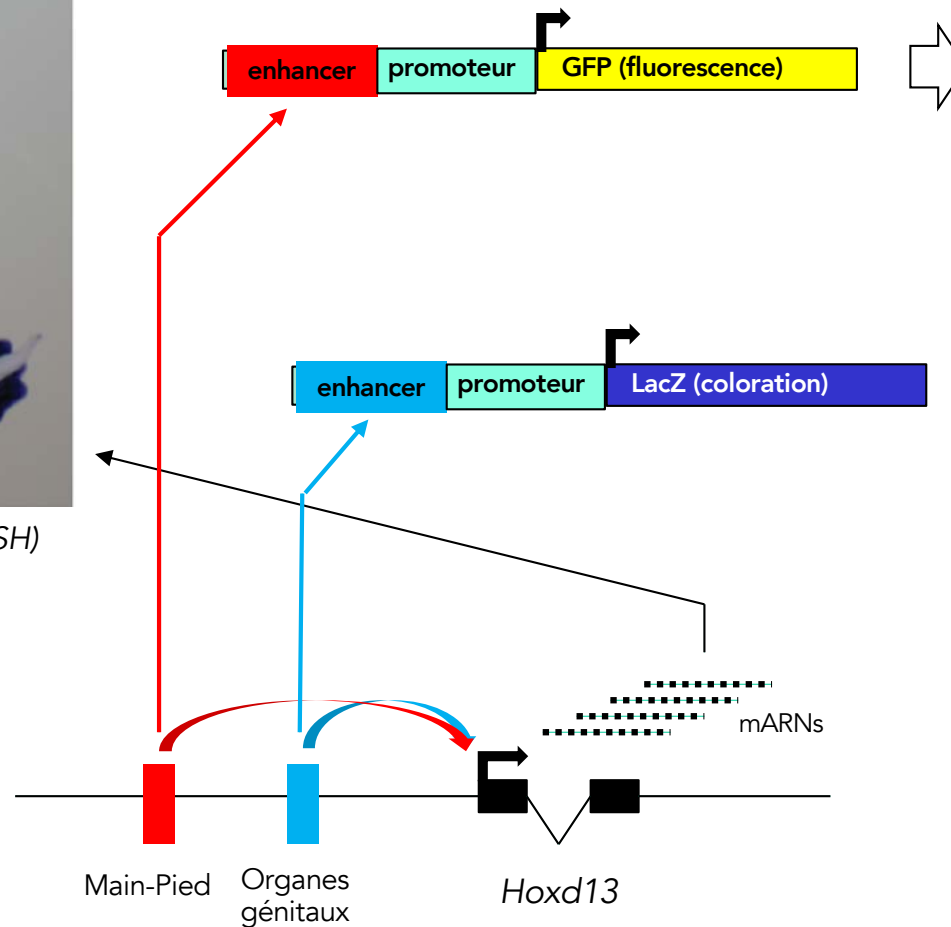
Dans cette publication (anatomie des rats), Gruneberg fait une différence entre d’une part une **pléiotropie ‘authentique’ (genuine)** et, d’autre part, une **pléiotropie ‘infondée’, fallacieuse (‘spurious’)**. La première implique la production de deux produits par le même locus, alors que la seconde implique un seul produit ayant des utilisations différentes.

# Séquences enhancers comme interrupteurs fonctionnels

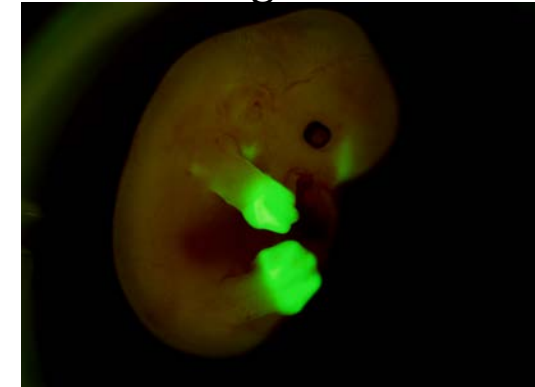
Les gènes 'de développement sont régulés par des enhancers multiples qui ont une grande modularité, de telle sorte que l'expression de ces gènes peut être modifiée selon les contextes cellulaires.



*Hoxd13* mARNs (WISH)

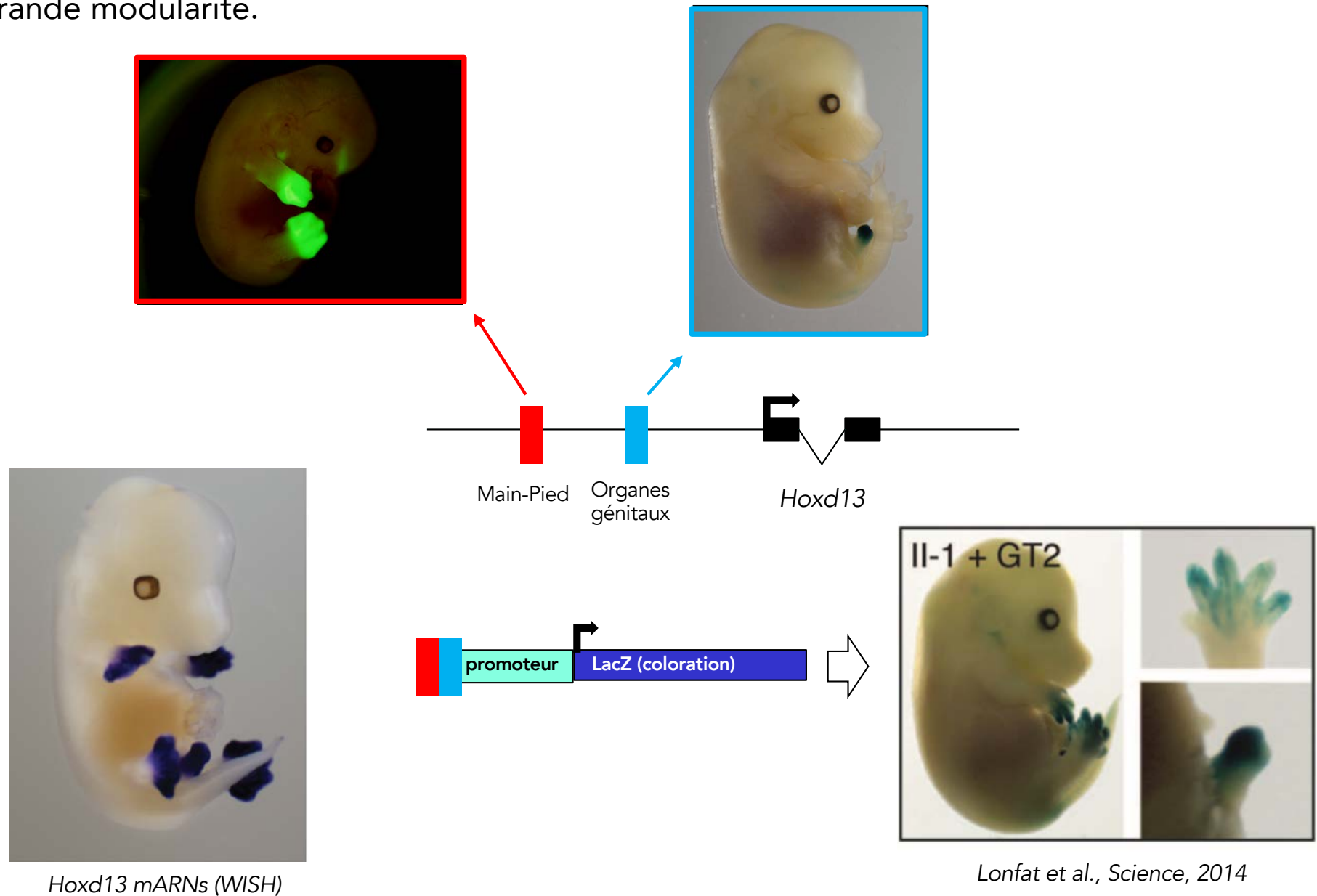


*Transgénèse*



# Séquences enhancers comme interrupteurs fonctionnels

Les gènes 'de développement sont régulés par des enhancers multiples qui ont une grande modularité.



*\*Comment trouver et identifier des enhancers?*

*\*Quels sont les critères de leur identification?  
(historiques et actuels)*

*\*Comment les valider?*

*Historiquement:*

- 1) Comparaisons de séquences*
- 2) Trappes (pièges) à enhancers*

# Identification des enhancers: approches historiques

\*Approche par comparaisons de séquence orthologues

\*Approches par 'enhancer trap' (trappes à enhancers)

Si les fonctions sont conservées entre espèces, alors les enhancers doivent l'être également

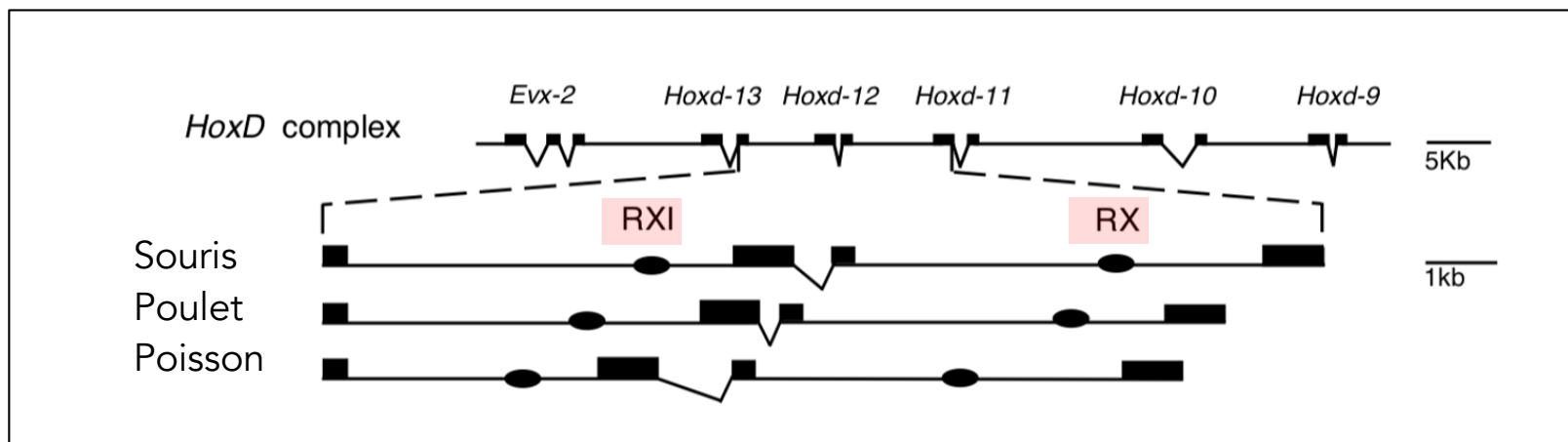
Development 125, 1669-1677 (1998)  
Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 1998  
DEV1271

1669

## Genetic analysis of a *Hoxd-12* regulatory element reveals global versus local modes of controls in the *HoxD* complex

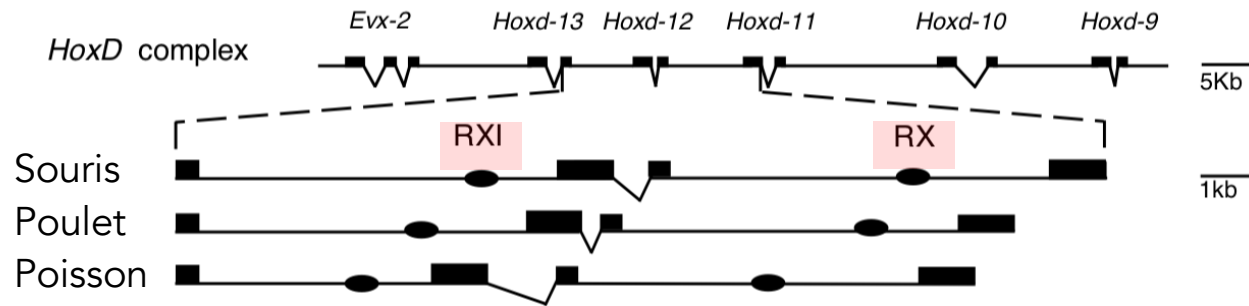
Yann Hérault, Johannes Beckers, Takashi Kondo, Nadine Fraudeau and Denis Duboule\*

Department of Zoology and Animal Biology, University of Geneva, Sciences III, Quai Ernest Ansermet 30, 1211 Geneva 4, Switzerland



Utilisation des relations de **synténie** et d'**orthologie** pour aligner les séquences d'ADN

# Identification des enhancers: approches historiques



|         |                                                                                                             |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Souris  | GGATCCTTAGACTTCCCCACCCACCCCTCCTCCGCCCCAGAGCT-GGAGGAAGAGGACGATTGCTGTCTGAGAGCCGCCCAATTGGTCGCCGTAACACACAATAAAG |
| Poulet  | TTATGGAAGAAGCGGT-CACCTCGGTCTGCGGGGAGAAAAAAGGCGGAAAACAAATAAGTTAATAAGAGGGAGATGCAATTGGCAGACATAACTCAAACAATAAAA  |
| Poisson | GGATATGCAAAAGGAAGGTATATCACA...ATTAAAA                                                                       |

|         |                                                                                                                 |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Souris  | -TCCCAGCGAGGTGGTCAGCCTTGCCCTC--GCGGCGCCTGTGTGGTCTCCTTGC-CAGAGCTGGGGGCTAACCAGTTCAGCTTGGCTCATGGACCATGGTCTGCTTTAG  |
| Poulet  | -ATTAAGGCAGCGGTTCAGTAATATCCTCCAGCGACGCTTGTGTGGTCCGTGTGCTCAG----GGGAGCGCAATCGTTTCAACATTCTTCCAGGGCAATGAAAATTACTGC |
| Poisson | AATTGTA-----CAAATGTTAATAAAG                                                                                     |

