



Denis Duboule

Collège de France
Chaire Internationale
Evolution des Génomes et du Développement
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 #6 (8 Juin 2021)

- *Résumé des points importants de la leçon 5
- *Régulation des gènes *HoxD* dans les bourgeons de membres
 - *La mutation *Ulnaless*
- *Dysplasies mésoméliques humaines en 2q31

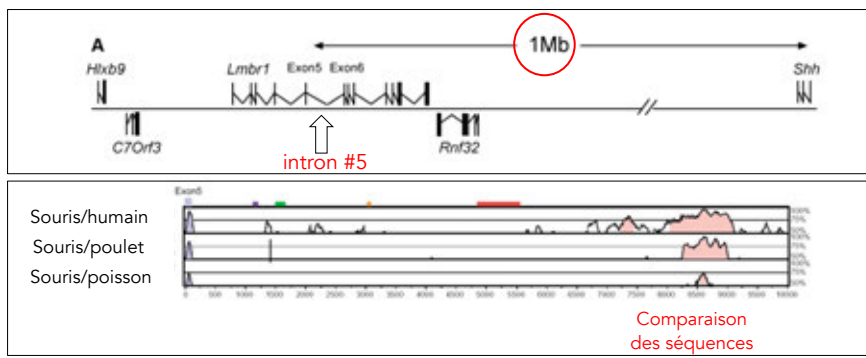
2

Sonic Hedgehog et la ZRS (rappel)

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

Laura A. Lettice¹, Simon J.H. Heaney¹, Lorna A. Pundia¹, Li Li¹, Philippe de Beer², Ben A. Oostra², Debbie Goodie³, Greg Elger³, Robert E. Hill^{1*} and Esther de Graaf^{1*}
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



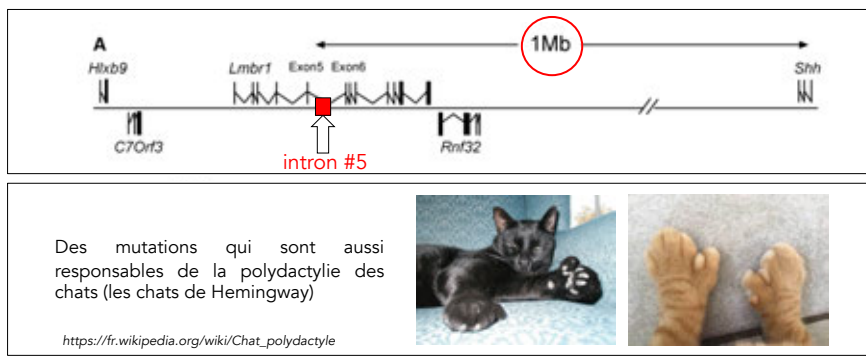
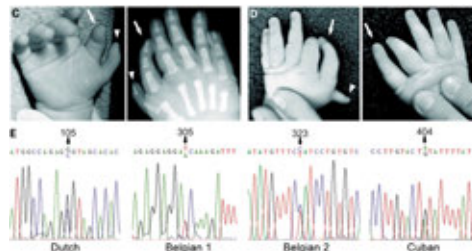
3

Mutations dans la ZRS et polydactylies (rappel)

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

Laura A. Lettice¹, Simon J.H. Heaney¹, Lorna A. Pundia¹, Li Li¹, Philippe de Beer², Ben A. Oostra², Debbie Goodie³, Greg Elger³, Robert E. Hill^{1*} and Esther de Graaf^{1*}
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

4

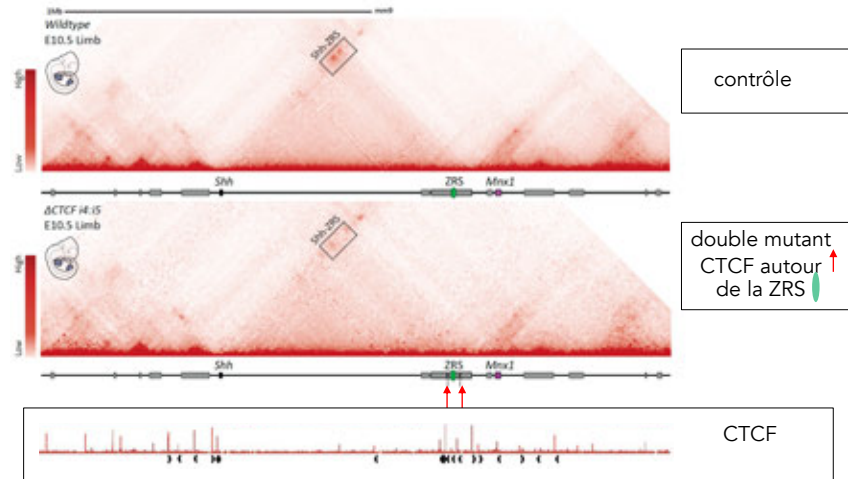
Contacts entre *Shh* et la ZRS médiés par CTCF (rappel)

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

Christina Fallou^{1,2}, Phine Guckelberger¹, Robert Schögl^{1,2}, Verena Heinrich¹, Andrea Esposito^{1,2,3}, Andrea M. Chiaruttini¹, Simone Wang^{1,2}, Carlo Annunziatelli^{1,2}, Johannes Helmuth^{1,2}, Stefan Haase¹, Inna Berkovic^{1,2}, Norbert Bracke¹, Lars Wittler¹, Bernd Timmermann^{1,2}, Maria Nicodem^{1,2}, Martin Vingron^{1,2}, Stefan Mundlos^{1,2,3}, and Guillaume Andrey^{1,2,4}

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*



5

L'acheiropodie et les éléments 'tethering' (rappel)

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

ADEMAR FREIRE-MALA,¹ NEWTON FREIRE-MALA,² NEWTON E. MORTON,³ ELIANE S. AZEVEDO,⁴ AND ANTONIO QUELCE-SALGADO⁵

Am J Hum Genet 27:521-527, 1975



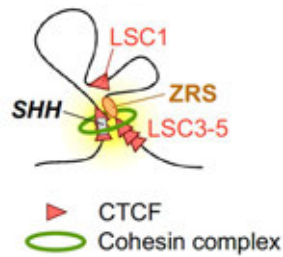
6

L'acheiropodie et les éléments 'tethering' (rappel)

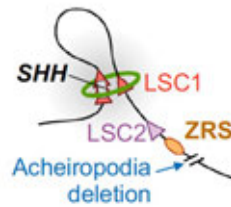
ARTICLE
 Deletion of CTCF sites in the *SHH* locus alters enhancer-promoter interactions and leads to acheiropodia
 Ali Iftikhar^{1,2}, Yuhui Zhang^{1,2}, CheeHong Hong^{1,2}, Jingjing Chen^{1,2}, Bin Gong^{1,2,3,4,5,6,7}, Lauren Katsis^{1,2}, Emily Johnson^{1,2}, Michael J. Ramirez^{1,2,3}, Deborah A. Wilson^{1,2}, University of Washington Center for Mendelian Genomics¹, The Skaggs², Leanne A. Letourneau³, Elizabeth James Skene-Lucas⁴, Florence Pothier⁵ & Nadia Akhavan^{6,7}

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.



7

Variations possibles si le résultat est le même.. (rappel)

ARTICLE
 Deletion of CTCF sites in the *SHH* locus alters enhancer-promoter interactions and leads to acheiropodia
 Ali Iftikhar^{1,2}, Yuhui Zhang^{1,2}, CheeHong Hong^{1,2}, Jingjing Chen^{1,2}, Bin Gong^{1,2,3,4,5,6,7}, Lauren Katsis^{1,2}, Emily Johnson^{1,2}, Michael J. Ramirez^{1,2,3}, Deborah A. Wilson^{1,2}, University of Washington Center for Mendelian Genomics¹, The Skaggs², Leanne A. Letourneau³, Elizabeth James Skene-Lucas⁴, Florence Pothier⁵ & Nadia Akhavan^{6,7}

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, providing 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.

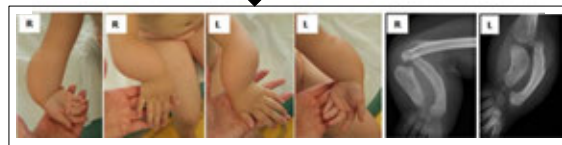
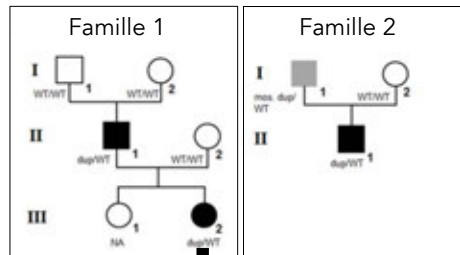
La sélection s'exerce sur le résultat (le fait que la ZRS doit être rapprochée du promoteur du gène *Shh*) et non pas sur le mécanisme qui assure ce résultat...

8

Dysplasie mésomélique (type Fryns)

Fryns type mesomelic dysplasia of the upper limbs caused by inverted duplications of the HOXD gene cluster

Cédric Le Calvez^{1,2}, Olivier Pichon¹, Auroig Briand¹, Benoit de Courtivron¹, Christian Bonnard^{3*}, Pierre Linderbaum^{3,4}, Richard Redon⁵, Caroline Schluth-Billard^{6,7}, Flavie Diquet¹, Pierre-Antoine Rollat-Farrier⁸, Maria Sanchez-Castro⁹, Marie-Laure Vulliamme^{10,11}, Damien Senéville^{12*}, Denis Duboué¹³, André Mégarbané¹⁴, Annick Toutain^{15,12}



9

Dysplasies mésoméliques

Le portail des maladies rares et des médicaments orphelins Dysplasie mésomélique type Kantaputra (MDK)

Contribuer

Définition

La dysplasie mésomélique type Kantaputra est une rare dysplasie squelettique caractérisée par des segments intermédiaires des membres courts et symétriques, et une petite taille.

https://www.orphane.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=2162

*Type **Kantaputra**: les bras et les jambes sont affectés

Le radius et le cubitus (ulna), ainsi que le tibia et le péroné sont réduits en taille et mal formés

Kantaputra PN, Gorlin RJ, Langer LO Jr. Dominant mesomelic dysplasia, ankle, carpal, and tarsal synostosis type: a new autosomal dominant bone disorder. *Am J Med Genet.* 1992;44:730–7.

Kantaputra PN. Thirteen-year-follow up report on mesomelic dysplasia, Kantaputra type (MDK), and comments on the paper of the second reported family of MDK by Shears et al. *Am J Med Genet A.* 2004;128A:1–5.

Kwee ML, van de Shuijs JA, van Vugt JM, Wijnands LC, Gille JJ. Mesomelic dysplasia, Kantaputra type: clinical report, prenatal diagnosis, no evidence for SHOX deletion/mutation. *Am J Med Genet A.* 2004;128A:404–9.

Shears DJ, Oflah A, Rutland P, Sirimanna T, Bitner-Glindzic M, Hall C. Kantaputra mesomelic dysplasia: a second reported family. *Am J Med Genet A.* 2004;128A:6–11.

*Type **Fryns**: les bras seuls sont affectés

Fryns JP, Hofkens G, Fabry G, van den Berghe H. Isolated mesomelic shortening of the forearm in father and daughter: a new entity in the group of mesomelic dysplasias. *Clin Genet.* 1988;33:57–9.

Mégarbané A, Ghanem I. Severe autosomal dominant upper-limb mesomelic dysplasia: report of a second family. *Clin Genet.* 2005;68:567–9.

10

MDK décrite en 1992, localisation en 2q24-32 en 1998

Le portail des maladies rares et des médicaments orphelins
Dysplasie mésomélrique type Kantaputra (MDK)

Contribuer

Définition

La dysplasie mésomélrique type Kantaputra est une rare dysplasie squelettique caractérisée par des segments intermédiaires des membres courts et symétriques, et une petite taille.

https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=2162

*Description de l'anomalie en 1992

Kantaputra PN, Gorlin RJ, Langer LC. **Dominant mesomelic dysplasia, ankle, carpal, and tarsal synostosis type: a new autosomal dominant bone disorder.** Am J Med Genet. 1992;44:730-7.

*Localisation du 'gène MDK' en 1998

J Hum Genet. 1998;43(10):32-6. doi: 10.1007/s100460050023

The gene for mesomelic dysplasia Kantaputra type is mapped to chromosome 2q24-q32

M Fujimoto¹, P N Kantaputra, S Begawi, Y Fukuhima, S Sonta, M Matsui, T Ishii, T Matsumoto, S Kondo, H Tomita, H X Deng, M O'urna, M M Rinaldi, V Venturoli, T Takagi, Y Nakamura, N Nilkawa

Abstract

Mesomelic dysplasia Kantaputra type (MDK) (MM *196232) is a new autosomal dominant skeletal dysplasia characterized by dwarfism, shortening of the forearms/lower-legs, carpal/tarsal synostosis, and dorsolateral foot deviation. We studied a Thai family in which 15 members in 3 generations were affected with MDK. With reference to the breakpoints of a balanced translocation [t(2;8)(q37;p21)] in patients from a previously reported Italian family, a skeletal dysplasia that appears similar to MDK, a linkage analysis was performed in the Thai family using 50 CA-repeat markers mapped to nearby regions (2q22-q34 and 8p24-p21) of the translocation breakpoints. The results clearly ruled out a linkage of MDK to marker loci at the 8p24-p21 region, whereas all nine affected members available for the study shared a haplotype at four loci (D2S2284, D2S2285, D2S2186, and D2S2314) spanning about 22.7 cM in the 2q24-q32 region. The computer-assisted two-point linkage analysis revealed maximum logarithm of odds (lod) scores of 4.82, 4.21, 4.82, and 4.21 (theta = 0) at these loci, respectively. These data indicated that the MDK locus is in the vicinity of D2S2284 and D2S2188 loci that are most likely mapped to 2q24-q32.

*MDK: 2q24-32
*HoxD cluster: 2q31

22 cM...et la séquences des gènes Hoxd ne révèle rien d'anormal

Translocation t(2 8) d'une famille italienne

11

La mutation Ulnaless (Ul) chez la souris ('sans cubitus')

The Mouse Mutation Ulnaless on Chromosome 2

M. T. Davisson and B. M. Cattanach

The dominant skeletal mutation ulnaless (*Ul*) in the mouse causes extreme reduction of the radius and ulna and deformities of the tibia and fibula. Penetrance appears to be complete, but the homozygote is not known, as heterozygous males do not breed. We report the linkage of the *Ul* gene on Chromosome 2, 18 cM proximal to *palid* (*pa*), and describe its phenotypic effects.

152 The Journal of Heredity 1990;81(2)

Materials and Methods

The *Ul* mutation arose during an irradiation experiment at the Medical Research Council Radiobiology Unit in Harwell, United Kingdom^{1,10} and was almost certainly radiation-induced. The mutant was

*Mutation induite au cours d'un criblage par rayons X

*L'effet est observé principalement sur le 'segment intermédiaire' des membres, avec un radius court et malformé et un cubitus absent



Figure 1. Alizarin-stained skeletal preparations of the forelimbs, outside lateral view, of *Ul*⁺ (right) and control (B6C3Hf1 +/+) (left) adult mice.

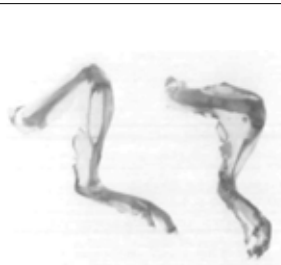


Figure 2. Alizarin-stained skeletal preparations of the hindlimbs, outside lateral view, of *Ul*⁺ (right) and control (B6C3Hf1) (left) adult mice.



Figure 3. Alizarin-stained skeletal preparations of the hindlimbs, frontal view, of *Ul*⁺ (right) and control (B6C3Hf1) (left) adult mice.

12

La mutation *Ulnaless* (*Ul*) chez la souris ('sans cubitus')

The Mouse Mutation *Ulnaless* on Chromosome 2

M. T. Davisson and B. M. Cattanach

The dominant skeletal mutation *ulnaless* (*Ul*) in the mouse causes extreme reduction of the radius and ulna and deformities of the tibia and fibula. Penetrance appears to be complete, but the homozygote is not known, as heterozygous males do not breed. We report the linkage of the *Ul* gene on Chromosome 2, 18 cM proximal to *pallid* (*pa*), and describe its phenotypic effects.

152 The Journal of Heredity 1990:81(2)

Genetics

The *Ul* mutation clearly segregates as an autosomal dominant gene despite a deficiency of mutant progeny in some crosses. In 400 progeny from crosses between *Ul*/*+* females and *+/+* males in The Jackson Laboratory breeding colony for a period of a year, the ratio of *Ul*/*+* to *+/+* progeny was 162:220 females and 166:185 males.

Mutation autosomique dominante
Les mâles de se croisent pas. (Homs?)

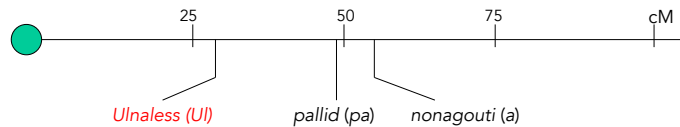
Reproduction

Ul/*+* females breed well, with an average litter size of seven to eight on both the 3H1 and B6C3HF1 backgrounds. Males do not breed, although they appear to have unimpaired spermatogenesis. Seven sexually mature males placed with B6C3HF1 females and two males placed with *Ul*/*+* females for 3 months failed to produce any progeny. Daily examination of females for a 3-week period showed no vaginal plugs. Examination of air-dried preparations of testicular cells from two of the *Ul*/*+* males that failed to produce progeny when mated to *+/+* females revealed that both males had normal numbers of meiotic cells at all stages of spermatogenesis and normal sperm numbers. It therefore seems likely that the absence of progeny from *Ul*/*+* males results from an inability to mate.

Cartographie chromosomique par recombinaisons entre des séries de marqueurs connus (fréquences de cross-overs)

Taken together, the data from all crosses give the following recombination percentages and order: **Cen - 30.0 ± 4.6 - *Ul* - 18.4 ± 3.9 - *pa* - 14.3 ± 3.5 - *a*.**

Chromosome 2 de la souris:
app 100 centiMorgans (cM)
app 180 Mb



13

La mutation *Ulnaless* (*Ul*) chez la souris ('sans cubitus')

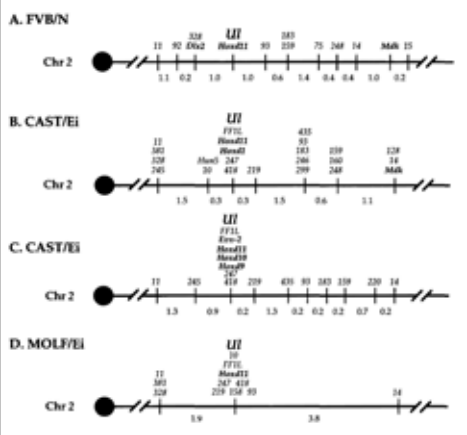
Genetic and Physical Mapping of the Mouse *Ulnaless* Locus

Catherine L. Peichel,* Catherine M. Abbott^{1,3} and Thomas F. Vogt*

*Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, New Jersey 08544 and ¹MRC Human Genetics Unit, Western General Hospital, Edinburgh EH4 2XU, Scotland

Genetics 144: 1757-1767 (December, 1996)

Lien génétique entre *Ul* et les gènes *HoxD*



Cartographie chromosomique plus fine par croisements avec des lignées éloignées et recombinaisons entre marqueurs génétiques

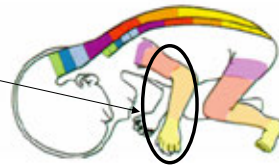
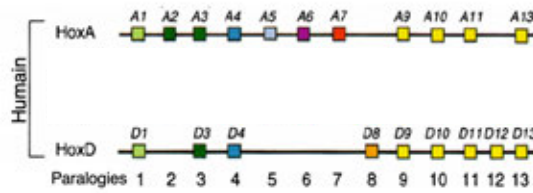
DISCUSSION

We have characterized the *Ulnaless* locus on mouse chromosome 2 as a semidominant mutation that affects limb patterning as well as postnatal viability. A high-density genetic map was created using 1564 *N*₂ animals from four backcrosses, and the *Ulnaless* locus was defined to a 0.4-cM region on mouse chromosome 2. No recombination was observed between *Ulnaless* and the *Hoxd* cluster, suggesting that the *Hoxd* genes are within 0.2 cM of *Ul* (SILVER 1995). Absence of recombination, coupled with the expression of the *Hoxd* genes in the developing limb, and the limb phenotypes associated with targeted mutations in the *Hoxd* genes, suggests that a mutation in a *Hoxd* gene(s) could be responsible for the *Ulnaless* phenotype. The *Ulnaless* interval was cloned

14

Colinéarité des gènes *HoxA/D* dans les membres

Certains gènes *Hox* utilisés pour organiser l'axe antéro-postérieur du corps sont réutilisés pendant le développement des membres



15

Gènes *Hox* dans le développement des membres

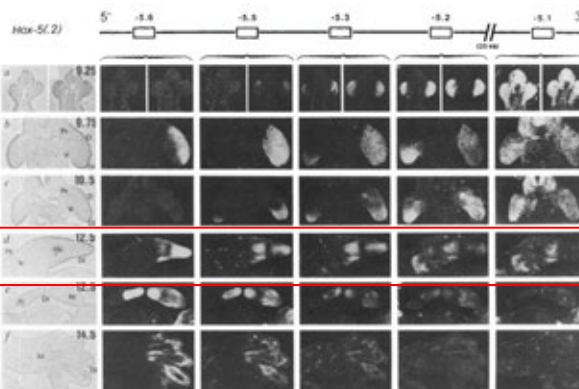
ARTICLES

Coordinate expression of the murine *Hox-5* complex homeobox-containing genes during limb pattern formation

Hox-5 = Hoxd

Pascal Dollé, Juan-Carlos Izpisua-Belmonte, Hildegard Falkenstein, Armand Renucci & Denis Duboule*

NATURE · VOL 342 · 14 DECEMBER 1989



*Déroulement de l'expression dans le temps

*Domaines d'expression différents, avec une partie proximale et une partie distale

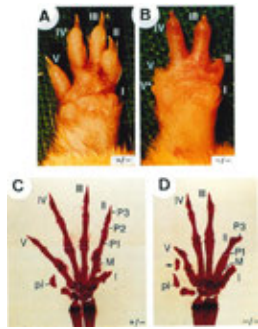
16

Gènes Hox dans le développement des membres

Cell, Vol. 75, 421-431, November 6, 1992, Copyright © 1992 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 Schuhbeur,^{*} Pierre Chambon,^{*} and Denis Duboule^{1†}
^{*}Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes du CNRS



*Ces gènes ont des fonctions essentielles dans les membres, en particulier les gènes *Hoxd13* et *Hoxa13* qui sont les deux nécessaires à la fabrication des extrémités, avec des fonctions redondantes

Inactivation de *Hoxd13*

Inactivations combinées de *Hoxd13* et *Hoxa13*

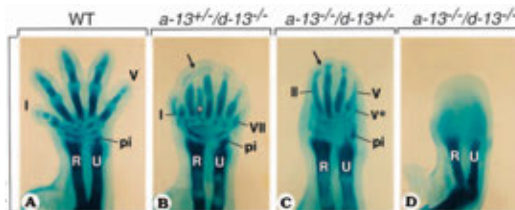
Development 133, 2957-2971 (1998)

2957

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

Catherine Fromental-Ramain¹, Xavier Warot¹, Nadia Messadecq, Marianne LeMeur, Pascal Dollé and Pierre Chambon²

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, Collège de France, BP 163-67084 ILLKIRCH-CEDEX, C. 11, de Strasbourg, FRANCE



17

Gènes Hox dans le développement des membres

Vol. 435, 23 June 2005 (doi:10.1038/nature03648)

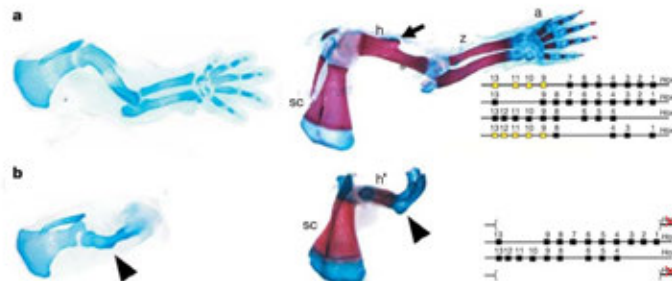
RESEARCH

LETTERS

Early developmental arrest of mammalian limbs lacking *HoxA/HoxD* gene function

Marie Knäuper¹, Basile Tarchini¹, Jozsef Zákány¹, Malcolm Logan², Clifford J. Tabin³ & Denis Duboule¹

*Mutation complète de *HoxD* et conditionnelle de *HoxA* dans les membres



*L'absence de fonctions des gènes *HoxA* et *HoxD* dans les membres induit une agénèse presque complète

18

Régulation bimodale des gènes *Hoxd* dans les membres

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

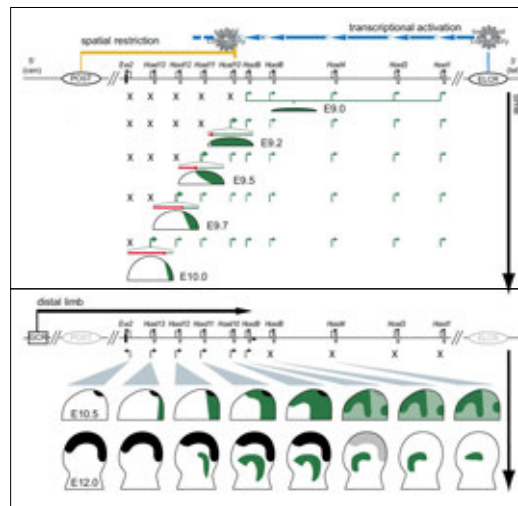
Control of *Hoxd* Genes' Collinearity during Early Limb Development

Basile Tschopp¹ and Denis Duboule^{1,2}
¹Department of Zoology and Animal Biology and National Research Centre "Frontiers in Genetics" University of Geneva

*Deux phases de régulation distinctes

*Une première phase établit l'expression des gènes *Hox* 'proximaux' dans la partie proximale du membre

*Une deuxième phase établit l'expression des gènes 'distaux' dans la partie la plus distale des bourgeons de membres



19

Régulation bimodale des gènes *Hoxd* dans les membres

A Switch Between Topological Domains Underlies *HoxD* Genes Collinearity in Mouse Limbs

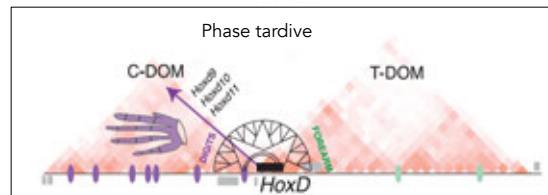
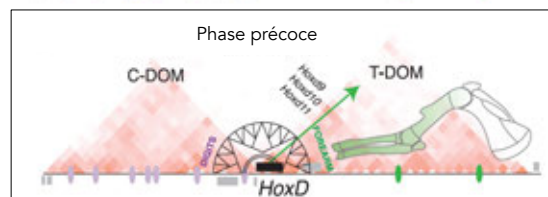
Guillaume Andrey,¹ Thomas Montanari,^{1*} Bénédicte Marozzi,² Federico Gonzalez,^{1,3} Daan Noordmans,¹ Marlon Lelias,¹ Didier Trono,¹ François Spitz,² Denis Duboule^{1,4,5}

www.sciencemag.org SCIENCE VOL 340 7 JUNE 2013

*Deux domaines de régulation distincts

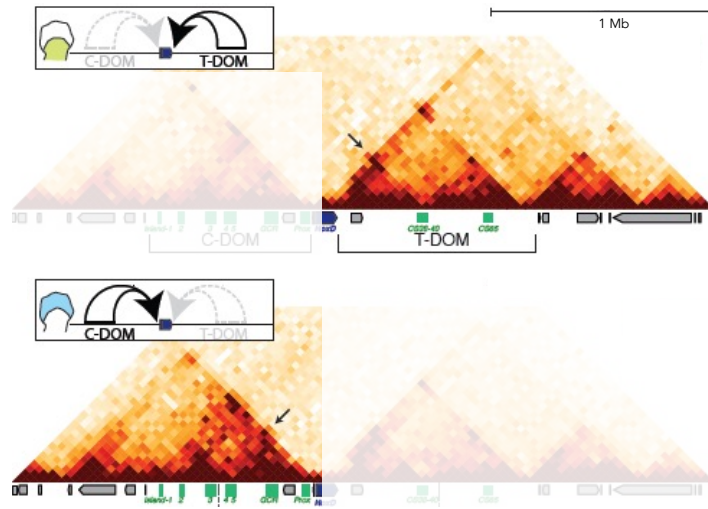
*La phase précoce implique des enhancers localisés dans le domaine de régulation télomérique (T-DOM) et contrôle des gènes *Hoxd* qui 'fabriquent' le bras et l'avant-bras

*La phase tardive implique des enhancers localisés dans le domaine de régulation centromérique (C-DOM) et contrôle des gènes *Hoxd* qui 'fabriquent' les mains et les pieds (autopodes)



20

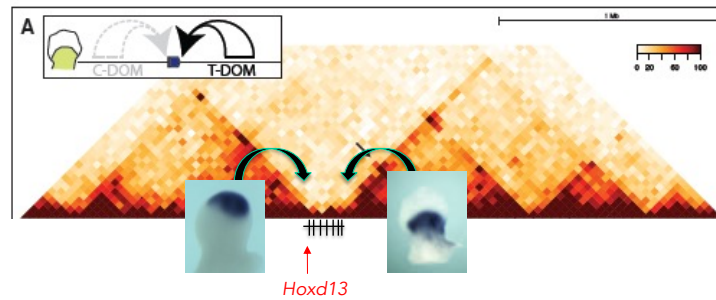
Régulation bimodale des gènes *Hoxd* dans les membres



Andrey et al., Science 2013; Rodriguez-Carballo et al. Genes & Dev. 2017

21

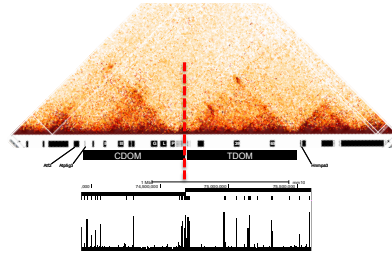
Régulation bimodale des gènes *Hoxd* dans les membres



Quels sont les facteurs qui déterminent la formation de cette frontière qui empêche le gène le plus distal d'être exprimé dans des domaines proximaux?

22

Régulation bimodale des gènes *Hoxd* dans les membres



La frontière, déterminée par la présence de nombreux sites de liaison à CTCF empêche les enhancers 'avant-bras' de contrôler l'expression des gènes terminaux qui fabriquent les doigts (*Hoxd12*, *Hoxd13*)

Beccari et al., *Genes & Dev.* 2016
Rodriguez-Carballo et al., *Genes & Dev.* 2017

23

Les dangers des protéines HOX13

Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes

DENIS DUBOULE AND GINES MORATA

Homeotic genes identify structures along the anterior to posterior axis during the development of most animals. These genes are clustered into complexes, and their positions within the cluster correlates with their time of expression and the positions of the anterior-posterior boundaries of their expression domains. Functional analyses have revealed that this specific genetic order also coincides with a functional hierarchy among members of these complexes, so that the products of more posterior genes in the cluster tend to be prevalent over those of more anterior genes.

TIG OCTOBER 1994 VOL. 10 No. 10

Les protéines *Hox* les plus 'postérieures' ou 'distales' ont une tendance à supprimer la fonction des protéines *Hox* plus antérieure ou proximale. Cette propriété est appelée:

*Prévalence postérieure et est analogue au phénomène de suppression phénotypique décrit chez la mouche *Drosophila*

Par conséquent, il faut éviter que ces gènes *Hox13* ne soient exprimés dans des domaines trop antérieurs ou proximaux, ce qui induirait des pertes de fonctions d'autres gènes *Hox* dans ces domaines (une sorte de 'dominant négatif'). Dès lors, ces gènes sont isolés du reste du cluster par une frontière de chromatine...

24

La mutation Ulnaless (U) chez la souris ('sans cubitus')

The Mouse Mutation Ulnaless on Chromosome 2

M. T. Davisson and B. M. Cattanach

The dominant skeletal mutation ulnaless (*U*) in the mouse causes extreme reduction of the radius and ulna and deformities of the tibia and fibula. Penetrance appears to be complete, but the homozygote is not known, as heterozygous males do not breed. We report the linkage of the *U* gene on Chromosome 2, 18 cM proximal to pallid (*pa*), and describe its phenotypic effects.

152 The Journal of Heredity 1990:81(2)

Materials and Methods

The *U* mutation arose during an irradiation experiment at the Medical Research Council Radiobiology Unit in Harwell, United Kingdom^{8,10} and was almost certainly radiation-induced. The mutant was

*Mutation induite au cours d'un criblage par rayons X

*L'effet est observé principalement sur le 'segment intermédiaire' des membres, avec un radius court et malformé et un cubitus absent



Figure 1. Alizarin-stained skeletal preparations of the forelimbs, outside lateral view, of *U*/*+* (right) and control (B6C3Hf1 *+/+*) (left) adult mice.

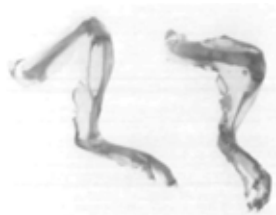


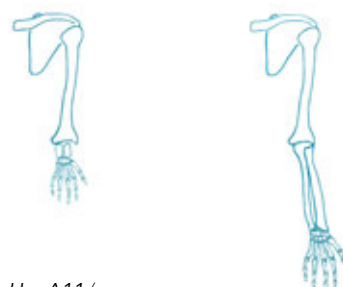
Figure 2. Alizarin-stained skeletal preparations of the hindlimbs, outside lateral view, of *U*/*+* (right) and control (B6C3Hf1) (left) adult mice.



Figure 3. Alizarin-stained skeletal preparations of the hindlimbs, frontal view, of *U*/*+* (right) and control (B6C3Hf1) (left) adult mice.

25

Effets des inactivations combinées (*HoxA11/HoxD11*)



HoxA11^{-/-}
HoxD11^{-/-}

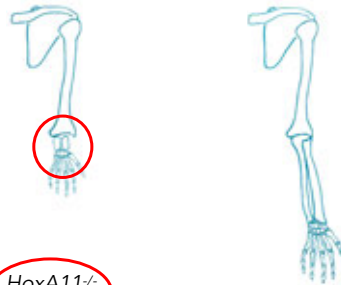
Capecchi, Chambon, Duboule laboratories; from Zakany and Duboule, 2007; Davis et al., 1995

26

Effets des inactivations combinées (HoxA11/HoxD11)



Dysplasie
mésomélique!



HoxA11^{-/-}
HoxD11^{-/-}

Capecchi, Chambon, Duboule laboratories; from Zakany and Duboule, 2007; Davis et al., 1995

27

Effets des inactivations combinées (HoxA11/HoxD11)

Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*

Allan Peter Davis*, David P. Witte*,
Hsiu M. Hsieh-LI†, S. Steven Potter†
& Mario R. Capecchi*

NATURE · VOL 375 · 29 JUNE 1995

*Inactivations fonctionnelles combinées
des gènes *Hoxd11* et *Hoxa11*

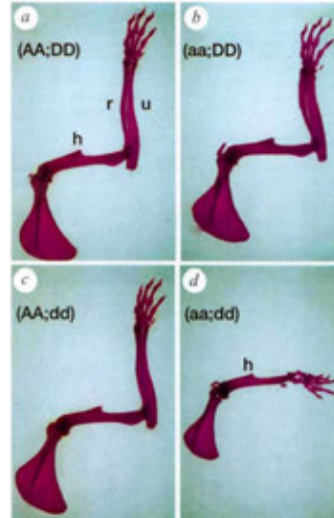
*Phénotypes partiellement compensés
grâce aux ressemblances des deux
protéines (redondance)

* Phénotype combiné faisant penser à
une dysplasie mésomélique

*Aucune mention ni de cette condition
ni du mutant *Ul* dans cette publication
(1995! mapping de *Ul* en 2006..)

2 doses semblent suffisantes...

Hoxa11^{+/+}; Hoxd11^{+/+} Hoxa11^{-/-}; Hoxd11^{+/+}



Hoxa11^{+/+}; Hoxd11^{-/-} Hoxa11^{-/-}; Hoxd11^{-/-}

28

Effets des inactivations combinées (HoxA11/HoxD11)

Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*

Allan Peter Davis*, David P. Witte†, Hsiu M. Hsieh-Li†, S. Steven Potter† & Mario R. Capecchi*‡

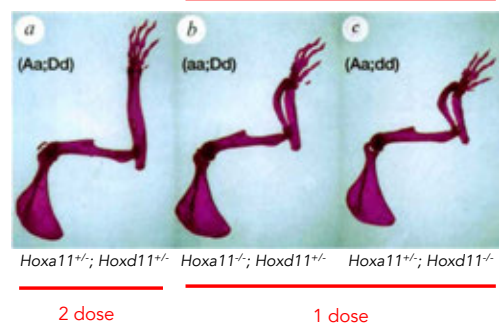
NATURE · VOL 375 · 29 JUNE 1995

- *Inactivations fonctionnelles combinées des gènes *Hoxd11* et *Hoxa11*
- *Phénotypes partiellement compensés grâce aux ressemblances des deux protéines (redondance)
- * Phénotype combiné faisant penser à une dysplasie mésomélique
- *Aucune mention ni de cette condition ni du mutant *Ul* dans cette publication (1995! mapping de *Ul* en 2006..)

2 doses semblent suffisantes...
1 dose insuffisante...

Une dysplasie mésomélique claire mais moins sévère que *Ul*...

Si *Ul* était une perte de fonction des gènes *Hox11*, il faudrait une perte équivalente à plus de trois doses chez les hétérozygotes...



29

Ulnaless (*Ul*) et gènes *Hox*; l'étau se resserme....



*La convergence entre d'une part la localisation chromosomique fine de *Ul* (indissociable du complexe *HoxD*) et, d'autre part, le phénotype de dysplasie mésomélique associé aux mutations combinées des gènes *Hox11* chez la souris incitera à retourner vers l'analyse de la mutation *Ulnaless*.

Mais! Il faut inactiver les deux gènes Hox11 pour obtenir une dysplasie mésomélique alors que Ul est une mutation dominante!! (gain de fonction?)

Development 124, 3483-3506 (1997)
Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 1997
DEV1267

3483

Ulnaless (Ul), a regulatory mutation inducing both loss-of-function and gain-of-function of posterior *Hoxd* genes

Yann Hérauld, Nadine Fraudeau, József Zákány and Denis Duboule*

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

Development 124, 3481-3492 (1997)
Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 1997
DEV1262

3481

The mouse *Ulnaless* mutation deregulates posterior *HoxD* gene expression and alters appendicular patterning

Catherine L. Peichel, Bindu Prabhakaran and Thomas F. Vogt*

Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, New Jersey 08544, USA

30

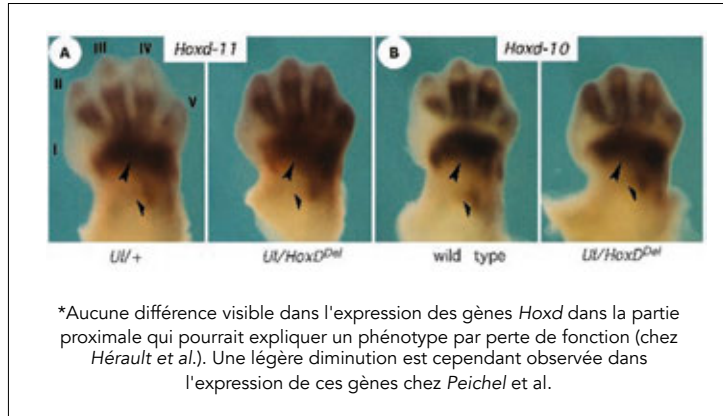
Ulnaless (Ul) et gènes Hox; l'étau se resserre....

Development 124, 3493-3505 (1997)
 Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 1997
 DEV1267

Ulnaless (Ul), a regulatory mutation inducing both loss-of-function and gain-of-function of posterior Hoxd genes

Yann Héralut, Nadine Fraudeau, József Zákány and Denis Duboule*

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



*Aucune différence visible dans l'expression des gènes Hoxd dans la partie proximale qui pourrait expliquer un phénotype par perte de fonction (chez Héralut et al.). Une légère diminution est cependant observée dans l'expression de ces gènes chez Peichel et al.

31

Ulnaless (Ul) et gènes Hox; l'étau se resserre....

Development 124, 3493-3505 (1997)
 Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 1997
 DEV1267

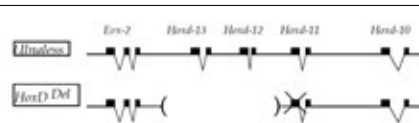
Ulnaless (Ul), a regulatory mutation inducing both loss-of-function and gain-of-function of posterior Hoxd genes

Yann Héralut, Nadine Fraudeau, József Zákány and Denis Duboule*

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

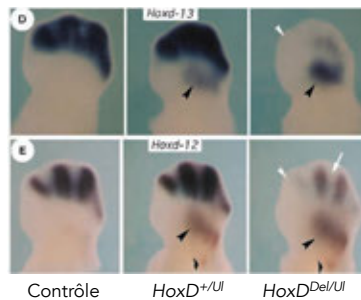


*Utilisation d'une micro-délétion de Hoxd13 et Hoxd12 afin de pouvoir observer leurs expressions à partir du chromosome Ulnaless uniquement, sans ambiguïté



*Sur le chromosome Ulnaless, l'expression de Hoxd12 et Hoxd13 est à la fois gagnée dans le futur avant-bras (gain d'expression), et perdue dans les futurs doigts (perte d'expression).

Par conséquent, Ulnaless est bien un allèle de HoxD!! (HoxD^{Ul}). Une mutation de régulation, probablement un effet 'dominant-négatif'.



32

La mutation *Ulnaless* (*Ul*): *HoxD^{Ul}* ou *Lnpk^{Ul}*?

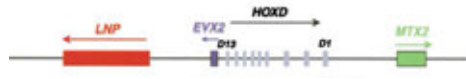
Cell, Vol. 113, 408-417, May 3, 2003, Copyright © 2003 by Cell Press

A Global Control Region Defines a Chromosomal Regulatory Landscape Containing the *HoxD* Cluster

François Spitz, Federico Gonzalez, and Denis Duboule*
Department of Zoology and Animal Biology and NCCR Frontiers in Genetics

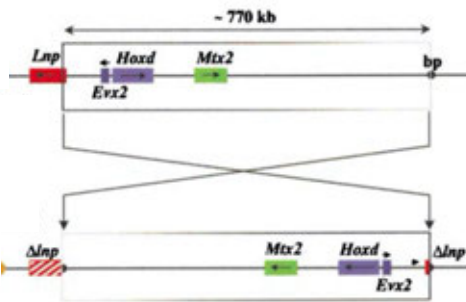
Lnp wt: TGGACTTTTAAAGCAACATCTGGAACTTAAAGTGAATGTAATGAACTAAATGATTTCAATGTTTC
Lnp ^{Ul}: TGGACTTTTAAAGCAACATCTGGAACTTAAAGTGAATGTAATGAACTAAATGATTTCAATGTTTC
Evx2 wt: GTTGAAGAGGCTGCTGATGAGGCTTCAAGGCAAGAAAGTGAAGTAAAGAACTAAATGATTTCAATGTTTC
Evx2 ^{Ul}: GTTGAAGAGGCTGCTGATGAGGCTTCAAGGCAAGAAAGTGAAGTAAAGAACTAAATGATTTCAATGTTTC

*En 2003, la structure complète du locus *HoxD* est établie, avec la présence de trois gènes voisins dont la gène *Lnp* (aujourd'hui *Lnpk*), un gène impliqué dans la morphologie du réticulum endoplasmique...



*La mutation est résolue par l'analyse génomique et *Ulnaless* est une inversion de 770 Kb dont un point de cassure se trouve dans le gène *Lnpk*, centromérique de *HoxD*, qui le rend alors inactif. L'autre point de cassure se trouve du côté télomérique de *HoxD*, expliquant l'absence de mutation dans les gènes *Hoxd* eux-mêmes...

Mais alors, est-ce *HoxD^{Ul}* ou *Lnpk^{Ul}*? i.e. *Ul* est-elle allélique à *HoxD* ou à *Lnpk*?



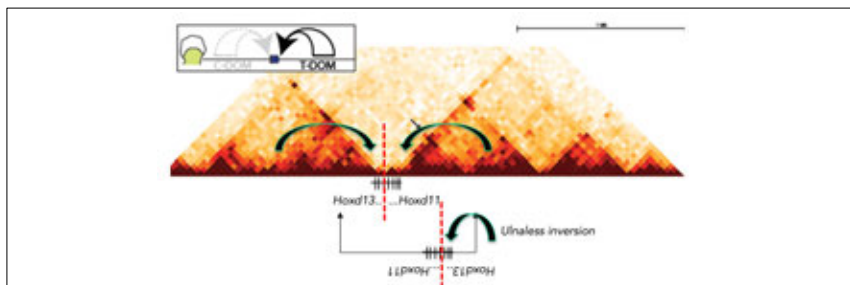
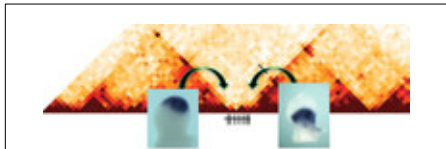
33

La mutation *Ulnaless* (*Ul*): Hypothèse de 2003...

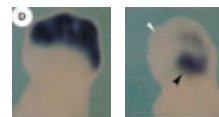
Cell, Vol. 113, 408-417, May 3, 2003, Copyright © 2003 by Cell Press

A Global Control Region Defines a Chromosomal Regulatory Landscape Containing the *HoxD* Cluster

François Spitz, Federico Gonzalez, and Denis Duboule*
Department of Zoology and Animal Biology and NCCR Frontiers in Genetics



*L'inversion *Ul* inverse les polarités de la régulation bimodale. C'est maintenant *Hoxd13* (et *Hoxd12*) qui se trouvent du côté des enhancers proximaux (avant-bras). De la même façon, ces gènes sont 'déconnectés des enhancers 'doigts' et séparés d'eux par une frontière... Cela explique pourquoi l'expression de *Hoxd13* est gagnée dans l'avant-bras tout en étant perdue dans les doigts...



34

Transformer une hypothèse en 'certitude'

MESOMELIC DYSPLASIAS ASSOCIATED WITH THE HOXD LOCUS ARE CAUSED BY REGULATORY REALLOCATIONS

Christopher Chase Bell, Lucille Lopez-Delisle, Bénédicte Mesrez, Denis Duboule
doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.01.429171>



Questions en suspens:

- *La mutation *Ulnaless* est-elle également allélique à *Lnpk*?
- *Quel est le mécanisme de dominance de la mutation *Ulnaless*?
- *Pourquoi un gain de fonction de *Hoxd13* montre le même phénotype que la perte de fonction combinée de *Hoxd11* et *Hoxa11*?
- *Cette hypothèse est-elle compatible avec les cas de dysplasies mésoméliques observés chez les humains en 2q31?

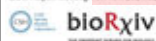
Les développements récents des outils d'édition de génomes CRISPR/cas9 ont permis ces dernières années de revenir sur ce cas d'école et d'apporter les réponses aux questions ci-dessus.

35

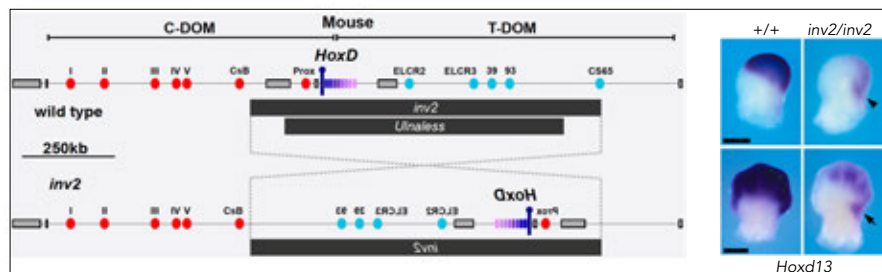
Une inversion un peu plus longue..

MESOMELIC DYSPLASIAS ASSOCIATED WITH THE HOXD LOCUS ARE CAUSED BY REGULATORY REALLOCATIONS

Christopher Chase Bell, Lucille Lopez-Delisle, Bénédicte Mesrez, Denis Duboule
doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.01.429171>



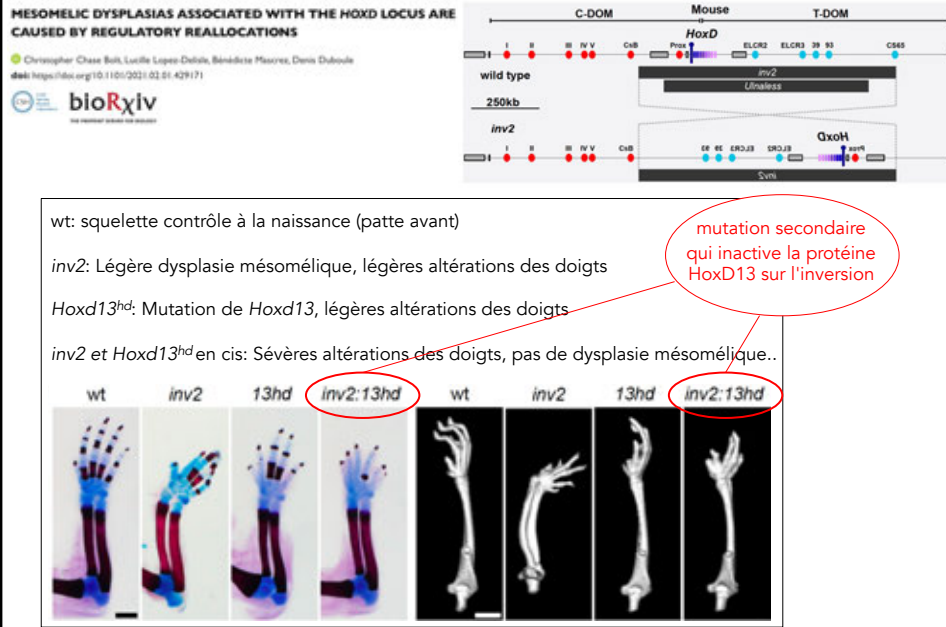
Solution envisagée: produire une inversion un peu plus longue (*inv2*) de façon à 1) ne pas casser le gène *Lnpk* et 2) réduire le gain d'expression de *Hoxd13* dans l'avant-bras et ainsi espérer avoir des animaux vivants et fertiles à l'état homozygote afin de pouvoir conduire les analyses moléculaires nécessaires.



- *Perte d'expression dans les doigts (équivalent à *Ul.*)
- *Gain léger d'expression dans l'avant-bras distal (suffisant pour un phénotype?)

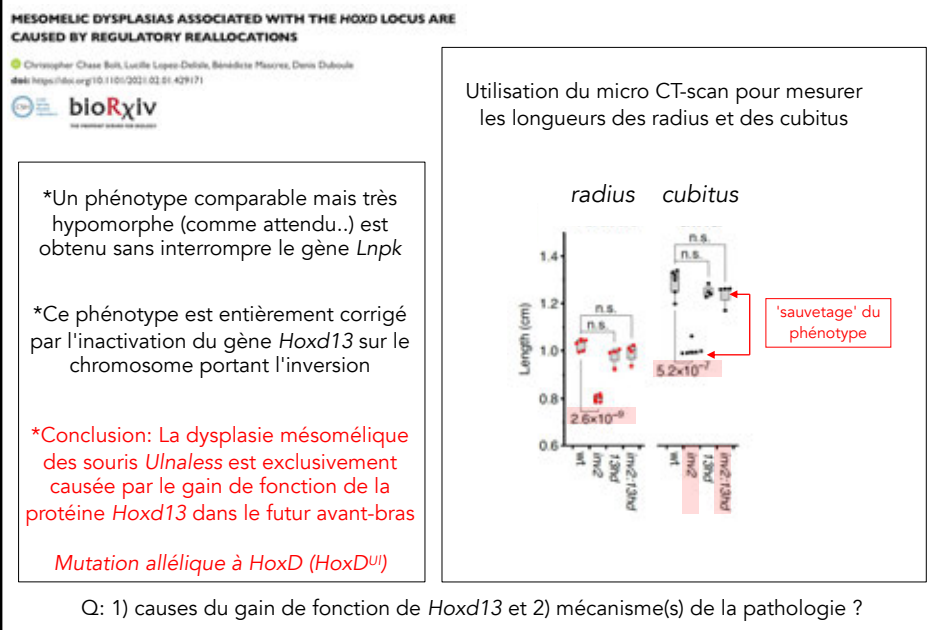
36

Une inversion un peu plus longue..



37

Inversion un peu plus longue..phénotype plus faible..



38

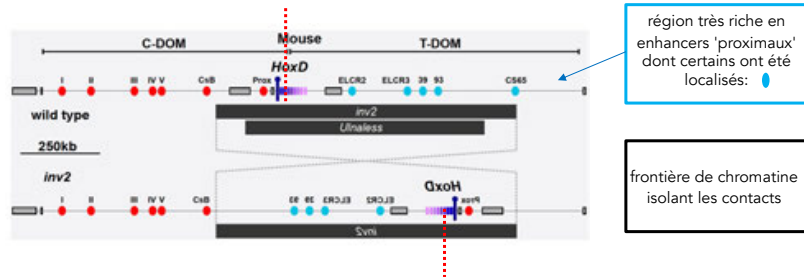
Cause du gain de fonction de *Hoxd13*

MESOMELIC DYSPLASIAS ASSOCIATED WITH THE HOXD LOCUS ARE CAUSED BY REGULATORY REALLOCATIONS

Christopher Chass Baki, Lucille Lopez Delisle, Bénédicte Mesores, Denis Duboule
doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.01.429171>



Q1: causes du gain d'expression de *Hoxd13* dans la partie proximale du membre (futur avant-bras)?



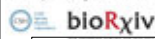
Que deviennent les contacts établis par *Hoxd13* dans l'inversion?
Y-a-t-il d'autres enhancers proximaux localisés plus télomérique?

39

Cause du gain de fonction de *Hoxd13*

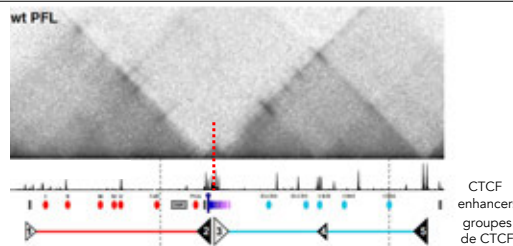
MESOMELIC DYSPLASIAS ASSOCIATED WITH THE HOXD LOCUS ARE CAUSED BY REGULATORY REALLOCATIONS

Christopher Chass Baki, Lucille Lopez Delisle, Bénédicte Mesores, Denis Duboule
doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.01.429171>

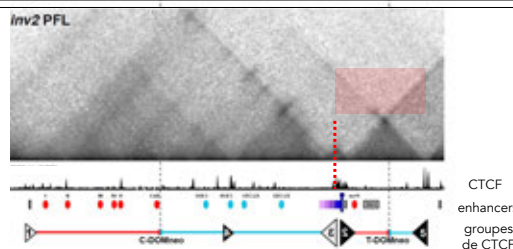


Carte des interactions avant et après l'inversion ('capture Hi-C')

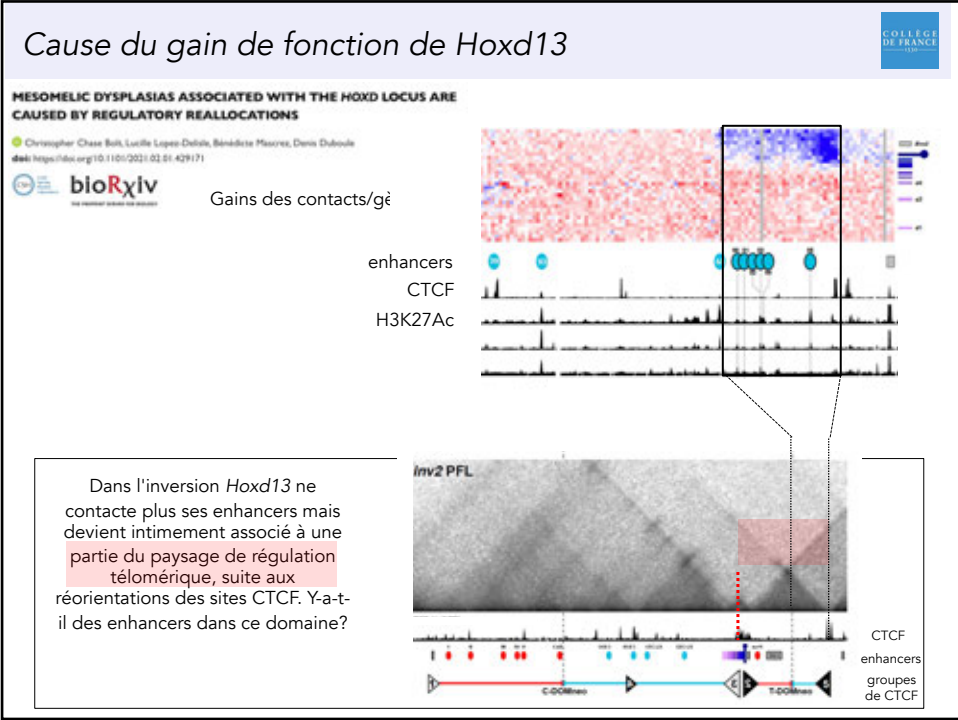
Contrôle: *Hoxd13* ne contacte que ses enhancers habituels dans le paysage de régulation distal (doigts) suite à la présence et aux orientations des sites CTCF



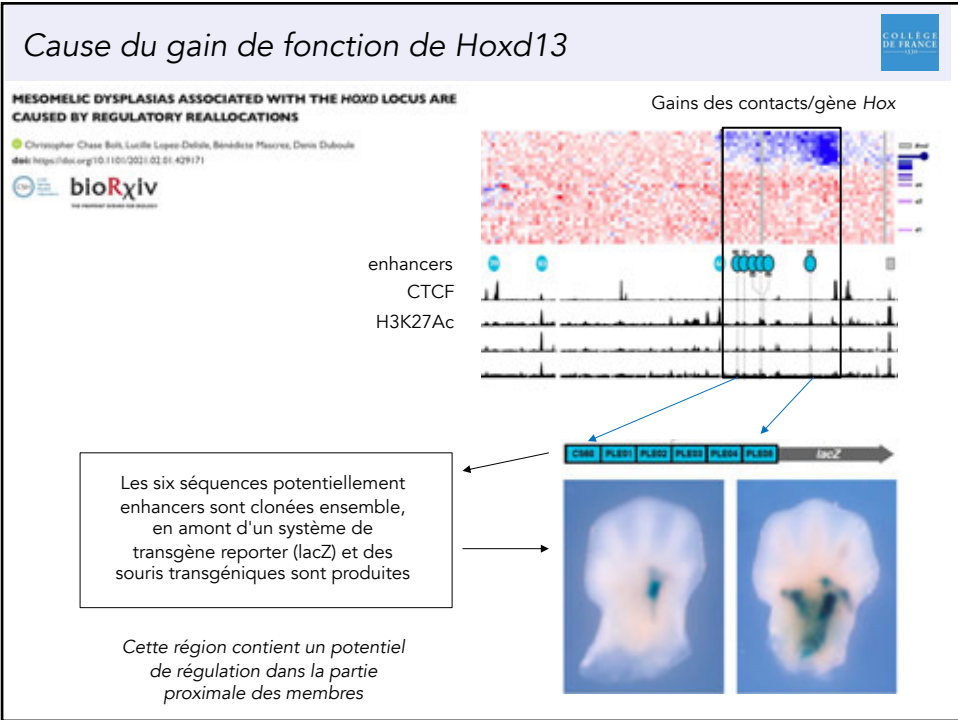
Dans l'inversion *Hoxd13* ne contacte plus ses enhancers mais devient intimement associé à une partie du paysage de régulation télomérique, suite aux réorientations des sites CTCF. Y-a-t-il des enhancers dans ce domaine?



40



41



42

Effet(s) du gain de fonction de *Hoxd13*

MESOMELIC DYSPLASIAS ASSOCIATED WITH THE HOXD LOCUS ARE CAUSED BY REGULATORY REALLOCATIONS

Christopher Chass Baki, Lucille Lopez Delisle, Bénédicte Mesures, Denis Duboué
doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.01.429171>

bioRxiv

contrôle

inv2

micro-dissection de la région dans laquelle *Hoxd13* est gagné

Rappel: une dysplasie mésomélisque sévère est observée chez les souris inactivées pour *Hoxa11* et *Hoxd11*...

Question: Y-a-t-il une perte de fonction de ces deux gènes dans les cellules proximales qui expriment *Hoxd13* de façon ectopique?

Séquençage des ARNs de cellules individuelles ('scRNA-seq')

Deux clusters peuvent représenter les cellules 'proximales' *Hoxd13*

Dans les deux, les ARNs *Hoxa11* diminuent (30-50%) alors que les ARNs *Hoxd11* restent au mêmes niveaux (ou presque)

cluster 1	3.25	0.61	0.68	0.80	Cl. 1
cluster 6	1.85	0.44	0.85	0.35	Cl. 6

Conclusion: La baisse de quantité d'ARNs *Hoxa11* (max: 50%) ne peut pas expliquer à elle seule la dysplasie mésomélisque

43

Effet(s) du gain de fonction de *Hoxd13*

MESOMELIC DYSPLASIAS ASSOCIATED WITH THE HOXD LOCUS ARE CAUSED BY REGULATORY REALLOCATIONS

Christopher Chass Baki, Lucille Lopez Delisle, Bénédicte Mesures, Denis Duboué
doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.01.429171>

bioRxiv

Approche: Analyses comparative des sites de liaison de la protéine HOXD13 dans les cellules distales (contrôle) et dans les cellules proximales exprimant *Hoxd13*.

Analyses comparative des sites de liaison par la technique de CUT&RUN

Rappel: une dysplasie mésomélisque sévère est observée chez les souris inactivées pour *Hoxa11* et *Hoxd11*...

Deux possibilités: 1) *Hoxd13* ectopique démarre un nouveau programme génétique 'doigts' qui produit une dysplasie mésomélisque indépendamment de *Hoxa11* et *Hoxd11* ou 2) HOXD13 exerce un effet dominant négatif sur les protéines HOXA11 et HOXD11 (une double inactivation par gain de fonction...)

wt DFL

GCCTATAAAA

p = 1e-420

inv2 P-PFL

GCCTATAAAA

p = 1e-244

44

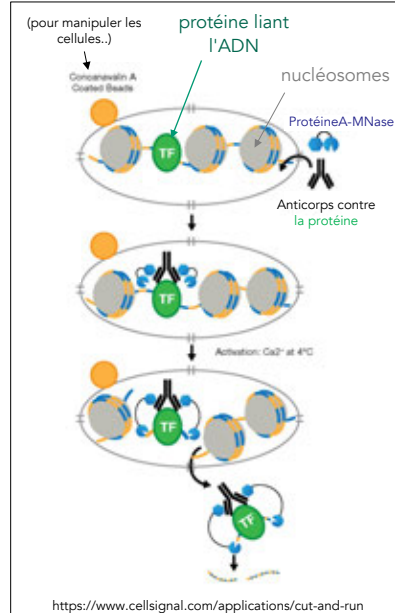
Détermination de sites de liaison par 'CUT&RUN'

CUT&RUN: Technique basée sur l'utilisation de la micrococcal nucléase (qui coupe l'ADN) associée à la protéine A qui se colle aux anticorps. La MNase va donc couper l'ADN aux alentours des séquences reconnues par une protéine, elle-même reconnue par un anticorps (Uli Laemmli, S. Henikoff).

Introduction dans les noyaux (cellules) de l'anticorps spécifique au TF couplé à la PA-MNase, reconnaissance et liaison.

Activation de la MNase (Ca^{2+} ; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) et digestion (coupure) de l'ADN à proximité des sites de liaison.

Purification de l'ADN digéré et séquençage à haut débit. Analyse des séquences (gènes cibles, recherche d'une séquence consensus..)



45

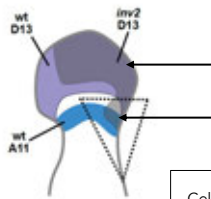
Séquences liées par la protéine HOXD13

MESOMELIC DYSPLASIAS ASSOCIATED WITH THE HOXD LOCUS ARE CAUSED BY REGULATORY REALLOCATIONS

Christopher Chass Ball, Lucille Lopez-Delella, Bénédicte Meures, Denis Duboule
doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.01.429171>

bioRxiv

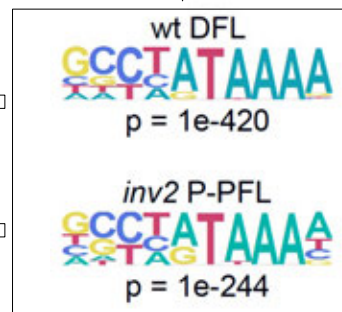
Approche: Analyses comparative des sites de liaison de la protéine HOXD13 dans les cellules distales (contrôle) et dans les cellules proximales exprimant *Hoxd13*.



Analyses comparative des sites de liaison de HOXD13 par la technique de CUT&RUN

Cellules distales: Les 5 top sites de liaison sont des sites définis précédemment pour HOXD13

Cellules proximales disséquées: Parmi les 5 top sites, 3 sont des sites définis précédemment pour HOXD13 et 2 pour HOXD11...

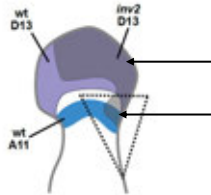


46

Séquences liées par la protéine HOXD13

MESOMELIC DYSPLASIAS ASSOCIATED WITH THE HOXD LOCUS ARE CAUSED BY REGULATORY REALLOCATIONS

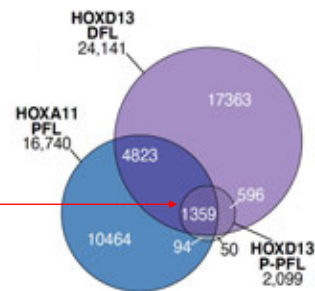
Christopher Chasse-Bell, Lucille Lopez-Delisle, Bénédicte Mesores, Denis Duboulet
doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.01.429171>



Analyses comparative des sites de liaison de HOXD13 par la technique de CUT&RUN

Approche: Analyses comparative des sites de liaison de la protéine HOXD13 dans les cellules distales (contrôle) et dans les cellules proximales exprimant *Hoxd13*.

- 1) HOXD13 ectopique lie des sites qui sont normalement occupés par HOXD13
- 2) HOXD13 ectopique lie des sites qui sont normalement occupés par HOXA11



47

Ulnaless (Ul), *Hox* et dysplasies mésoméliques en 2q31

MESOMELIC DYSPLASIAS ASSOCIATED WITH THE HOXD LOCUS ARE CAUSED BY REGULATORY REALLOCATIONS

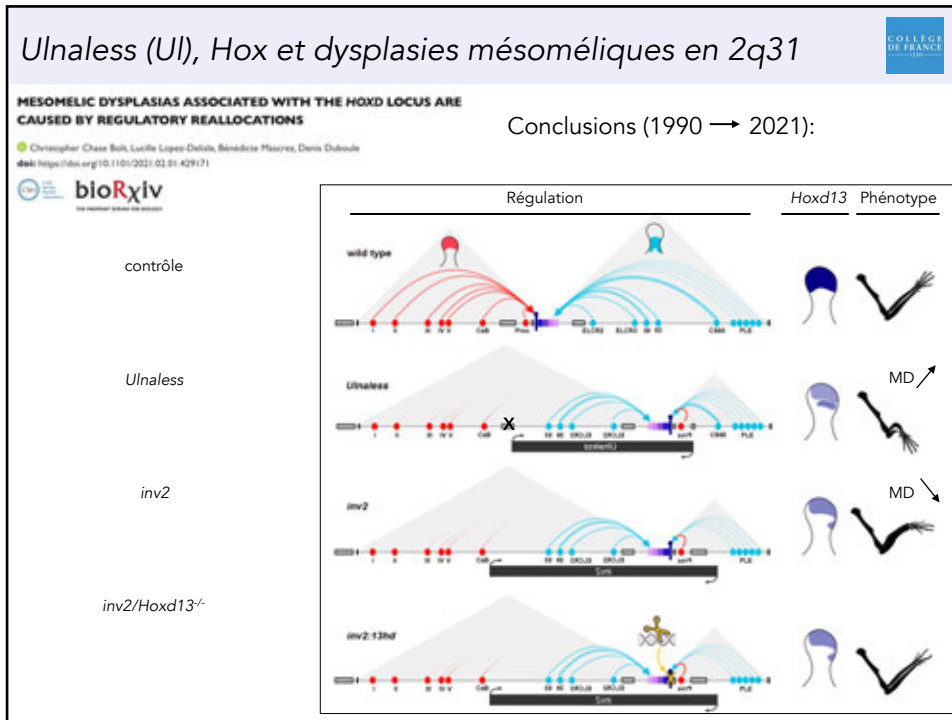
Christopher Chasse-Bell, Lucille Lopez-Delisle, Bénédicte Mesores, Denis Duboulet
doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.01.429171>



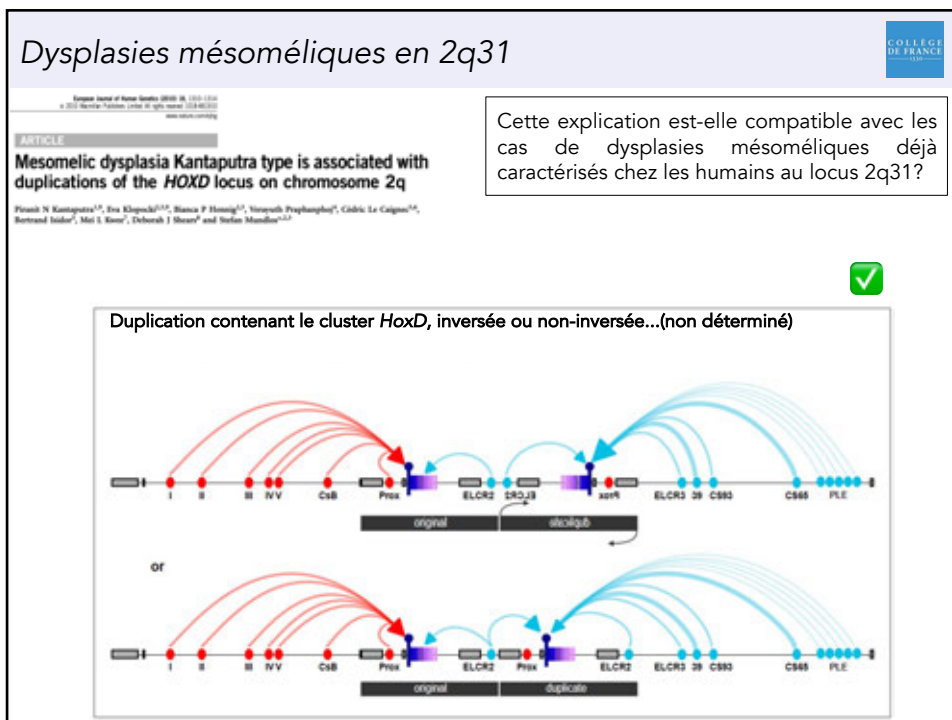
Conclusions (1990 → 2021):

- 1) La mutation *Ulnaless* est une inversion du cluster *HoxD* qui amène le gène *Hoxd13* à proximité de séquences enhanceurs spécifiques de l'avant-bras.
- 2) Cela conduit à l'expression ectopique de *Hoxd13* dans des cellules impliquées dans le développement des avant-bras, qui normalement expriment les gènes *Hoxa11* et *Hoxd11*.
- 3) Le gain de *Hoxd13* proximal induit une légère réduction des protéines HOX11, mais certainement pas suffisante pour produire le phénotype.
- 4) L'étude des séquences liées par HOXD13 dans les cellules proximales suggère que cette protéine lie des sites normalement liés par les protéines HOXA11, induisant peut-être une compétition de liaison (dominant négatif).
- 5) Cette compétition pour les sites de liaisons, avec la réduction des ARNs *Hoxa11* produit une phénotypie des double mutant *Hoxa11/Hoxd11* (MD).

48



49



50

Dysplasies mésoméliques en 2q31

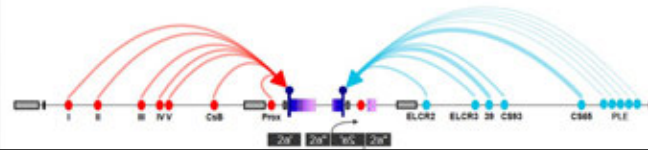
Fryns type mesomelic dysplasia of the upper limbs caused by inverted duplications of the HOXD gene cluster

Cédric Le Calvez^{1,2}, Olivier Pichon¹, Annelise Briand¹, Benoît de Courtivron¹, Christian Bonnard^{3,4}, Pierre Lindenbaum^{5,6}, Richard Redon^{3,4}, Caroline Schuth-Boland^{3,4}, Flavie Diguet⁷, Pierre-Antoine Rollot-Farmer^{7,8}, María Sánchez-Castro⁹, Marie-Laure Vuillaume^{1,10}, Damien Sanlaville^{3,4}, Denis Duboulet¹¹, André Mégarbané¹², Amrick Tourain^{11,12}

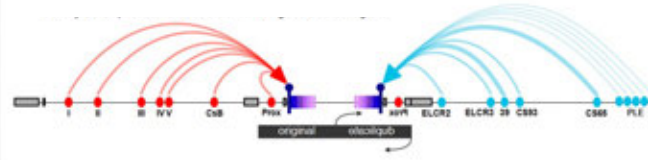
Cette explication est-elle compatible avec les cas de dysplasies mésoméliques déjà caractérisés chez les humains au locus 2q31?



Famille 1: Duplication de deux régions dont une est inversée



Famille 2: Duplication inversée du cluster HoxD



51

Dysplasies mésoméliques en 2q31

A dominant mesomelic dysplasia associated with a 1.0-Mb microduplication of HOXD gene cluster at 2q31.1

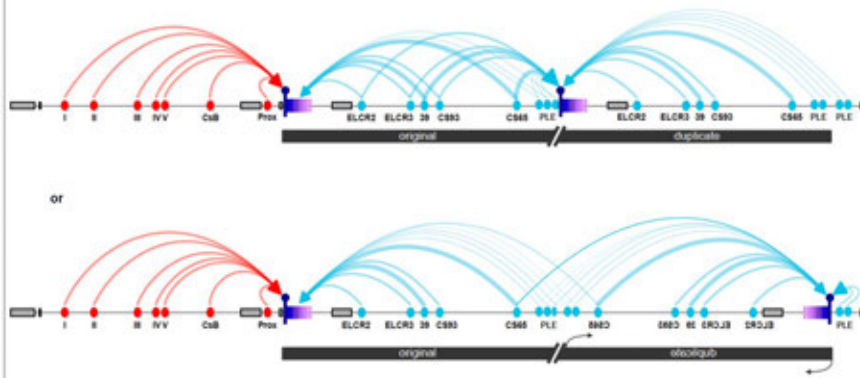
Tae Sun Cho¹, Jih-Hwa Kim¹, In-Ho Cho¹, Gen Nakabayashi¹, Andrea Superti-Furga², Kang-Sup Kim³, Young-Gi Lee¹, Hyoung-Tsang Park¹

J. Med Genet, 2010

Cette explication est-elle compatible avec les cas de dysplasies mésoméliques déjà caractérisés chez les humains au locus 2q31?



Duplication du cluster HoxD et des enhancers proximaux, inversée ou non-inversée (non déterminé)



52

Dysplasies mésoméliques en 2q31

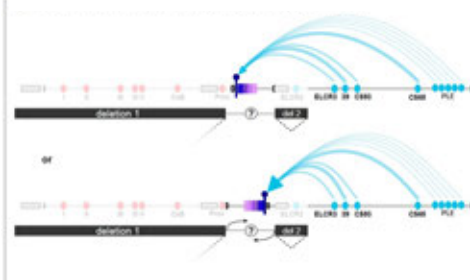
Prenatal upper-limb mesomelia and 2q31.1 microdeletions affecting the regulatory genome

Angela Peron, MD^{1,2}, Simona Bollo, MD¹,
Teresa Rizzoli, MD¹, Irene Borzani, MD¹,
Marco Baccarelli, PhD¹, Maria Francesca Bolchini, MD¹ and
Faustina Laletta, MD¹

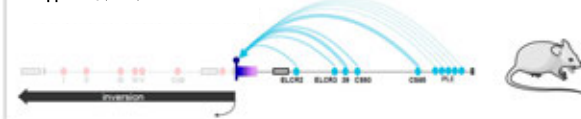
LETTER TO THE EDITOR Genetics in Medicine

Cette explication est-elle compatible avec les cas de dysplasies mésoméliques déjà caractérisés chez les humains au locus 2q31?

Deux délétions entourant le cluster *HoxD* avec ou sans inversion du cluster.



Tschopp et al., (2011) Dev Biol



53

Dysplasies mésoméliques en 2q31

European Journal of Human Genetics (2018) 26,324–332
https://doi.org/10.1038/s41431-018-0252-2

ESHG

ARTICLE

Fryns type mesomelic dysplasia of the upper limbs caused by inverted duplications of the *HOXD* gene cluster

Cédric Le Calvez^{1,2}, Olivier Pichon¹, Annelie Brandt¹, Benoît de Courteron¹, Christian Bonnard^{3,4},
Pierre Lindenbaum^{5,6}, Richard Redon^{6,7}, Caroline Schluth-Boland^{8,9}, Flavie Diquet¹,
Pierre-Antoine Rollat-Farrier¹⁰, Maria Sanchez-Castro¹¹, Marie-Laure Vulliamme^{1,12}, Damien Sanlaville^{8,9},
Denis Duboué¹⁰, André Mégarbané¹⁰, Annick Toutain^{1,12}



Cette condition est handicapante pour homo sapiens, mais peut être adaptative dans d'autres espèces...



54

'Dysplasies mésoméliques' endémiques...



'Phocomelia' (fin du 18^{ème} siècle) du grec:
Phoke (le phoque) and *melos* (le membre)

L'accès à des embryons de phoques/otaries etc est difficile et il est donc compliqué de savoir sur quelle bases génétiques se construisent ces membres particulièrement bien adaptés à la nage

55



Le cours 2021-2022 aura lieu du 17 mai
au 21 juin 2022, auditoire Budé à 17h

56