



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

Syndromes génétiques :
Mécanismes, contraintes et atavismes du développement

Leçon #3 (18 mai 2021)

- *Résumé des points importants de la leçon 2
- *Notions de 'pléiotropie et de 'séquences enhancers'
- *Malformations des membres, incidence
- *Classification(s) des malformations des membres
- *Syndrome de Liebenberg (histoire et bases moléculaires)
 - *Quelques technologies utiles..(rappel)
 - *Régulation à distance du gène *Pitx1*

2

Axe proximo-distal (rappel)

© 2020. Published by The Company of Biologists Ltd [Development (2020) 147, doi:10.1098/dev.171988]

REVIEW
Establishing the pattern of the vertebrate limb
Callin McQueen and Matthew Towers*

Diffusible signals, not autonomous mechanisms, determine the main proximodistal limb subdivision.

Roselló-Oleiz A¹, Rics MA¹, Torres M¹

Author Information
Science, 01 May 2011, 332(6033):1086-1088
DOI: 10.1126/science.1199489 PMID: 21617076

Actions opposées de deux systèmes →

Signalisation du tronc → Croissance indépendante du membre

spécification proximale → spécification intermédiaire → spécification distale → prolifération, expansion, différenciation

omoplate humérus → radius cubitus → poignet doigts

Proximal → Distal

RA → Meis1/2 → Grem1 → BMP → Fgf8 → G1-S

Shh → Grem1 → BMPs → AER → Fgf8 → Fgf/Shh loop

An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth

J. Verheijen, X. Bai • Published 2008 • Biology, Medicine • Nature
DOI: 10.1038/nature07085 • Corpus ID: 2223422

3

Axe proximo-distal (rappel)

© 2020. Published by The Company of Biologists Ltd [Development (2020) 147, doi:10.1098/dev.171988]

REVIEW
Establishing the pattern of the vertebrate limb
Callin McQueen and Matthew Towers*

2) système de spécification des segments du membre

Signalisation du tronc → Croissance indépendante du membre

spécification proximale → spécification intermédiaire → spécification distale → prolifération, expansion, différenciation

omoplate humérus → radius cubitus → poignet doigts

Proximal → Distal

RA → Meis1/2 → Grem1 → BMP → Fgf8 → G1-S

Shh → Grem1 → BMPs → AER → Fgf8 → Fgf/Shh loop

Hox9-10 → Hox11 → Hox13

Temps absolu (app 3 jours)

4

Axe antéro-postérieur (rappel)

Cell. Vol. 75, 1401-1416, December 31, 1993, Copyright © 1993 by Cell Press

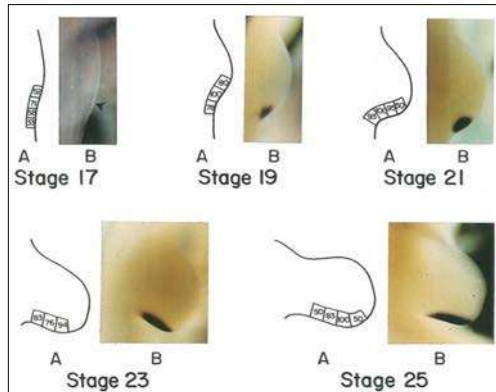
Sonic hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the ZPA

Robert D. Riddle, Randy L. Johnson, Ed Laufer, and Cliff Tabin
Department of Genetics
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts 02115



Shh est un des trois membres, chez les mammifères, d'une famille de protéines extracellulaires, sécrétées, qui signalisent à courte et longue distance, à travers une voie de signalisation impliquant deux protéines membranaires (*desert hh*; *indian hh*).

Le clonage original (1993) est fait en utilisant le gène Hedgehog (*hh*) de la *Drosophila mélanogaster*, par homologie, un gène qui est exprimé dans les cellules postérieures de chaque segment de la l'embryon de mouche.



Expression (ARNs) de *Shh* est restreinte à une population de cellules localisée à l'aspect postérieur du bourgeon

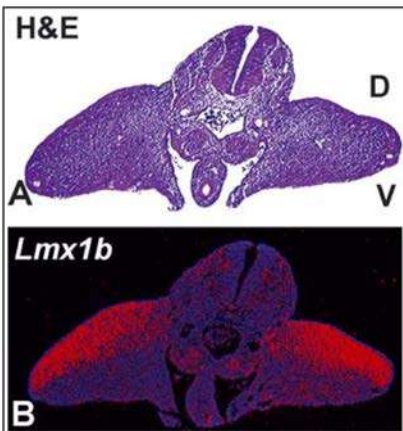
5

Axe dorso-ventral (rappel)



Lmx1b expression during joint and tendon formation: localization and evaluation of potential downstream targets

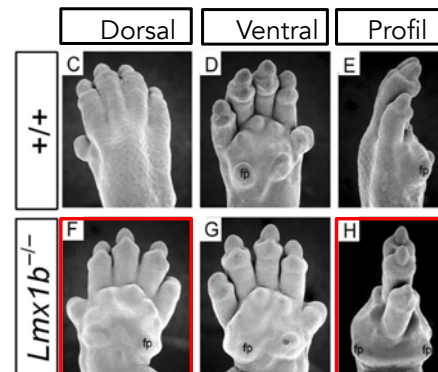
Sandra D. Dreyer^{1,2}, Takaji Naruse², Roy Morello², Bernhard Zabel¹, Andreas Winterpacht¹, Randy L. Johnson², Brendan Lee^{2,3}, Kerby C. Oberg^{2,3,4}



© 1998 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturegenetics> letter

Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of *LMX1B* in human nail patella syndrome

Haijun Chen¹, Yi Lun¹, Dmitry Ovchinnikov¹, Hiroki Kokubo¹, Kerby C. Oberg², Carmen V. Pictorelli³, Lin Gan¹, Brendan Lee² & Randy L. Johnson²



6

Différences entre membres antérieurs et postérieurs (rappel)



Hindlimb patterning and mandible development require the *Ptx1* gene

Christian Lancôt^{1,5†}, Alain Moreau^{1,5†}, Michel Chamberland¹, Michel L. Tremblay² and Jacques Drouin^{1,4}

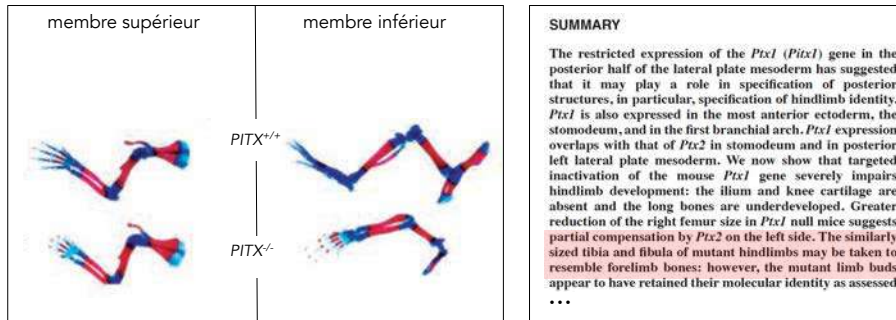
¹Laboratoire de génétique moléculaire, Institut de recherches cliniques de Montréal, 110 des Pins Ouest, Montréal Québec, Canada H2W 1R7

²Department of Biochemistry, McGill University, Montréal Québec, Canada

Development 126, 1805-1810 (1999)

Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 1999

DEV2416



Une suspicion de transformation homéotique des pattes arrière en pattes avant
(William Bateson -1861-1926- homeo- ...into the likeness of..)

7

Pléiotropie



One Hundred Years of Pleiotropy: A Retrospective

Frank W. Stearns¹

¹Department 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 tropé (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...)

8

PITX1 et les épinoches à trois épines...

Gasterosteus aculeatus (variation intra-spécifique)

thymus nageoires organes sensoriels ~~PITX1~~ fosses olfactives

non-pléiotropique! pléiotropique!

Mutation de régulation

La modularité des enhanceurs permet l'évolution de traits spécifiques sans compromettre la viabilité de l'animal (épinoche à trois épines pectorales)

Shapiro et al... Kingsley, 2004 Nature

9

Séquences enhanceurs: Importance et contexte

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

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

Chromatin Nucleus

REVIEW INSIGHT

Figure 2 | The mammalian regulatory jungle.
Modifié de: de Laat and Duboule, 2013 Nature

10

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

11

Réseaux de gènes, pleiotropie, syndromes...



*Les membres se développent en réutilisant des composants génétiques qui sont déjà à l'oeuvre pendant le développement de l'embryon (co-optation).

*Ces facteurs de transcription et voies de signalisation sont par conséquent multi-fonctionnels et des mutations structurelles induisent souvent des effets largement pleiotropiques (syndromiques) et par là-même souvent létaux.

*Dès lors, beaucoup de mutations affectant ces composants génétiques qui sont détectées et transmises chez les humains sont des mutations de régulation, qui n'affectent qu'une partie des fonctionnalités de ces composants génétiques et c'est en cela que ces malformations congénitales souvent nous renseignent sur des mécanismes importants.

12

Réseaux de gènes, pleiotropie, syndromes...



*Ces mécanismes de régulation sont souvent très complexes et l'étude de certains syndromes humains qui y sont associés permet parfois d'en comprendre l'étiologie moléculaire, qui peut alors être vérifiée expérimentalement par l'utilisation de systèmes modèles tel que la souris.

*La suite de ce cours 2020-2021 va traiter de quelques exemples illustrant ce principe et touchant aux différents aspects du développement des membres, à savoir:

- 1) La différence entre membres antérieurs et postérieurs (bras et jambes) (syndrome de Liebenberg)
- 2) La polarité antérieur-postérieur du membre (oligosyndactylies, synostoses radio-ulnaire, polydactylies...)
- 3) La polarité proximal-distal du membre (displasies mésoméliques en 2q31; Kantaputra (MDK), Fryns)

13

Importance/prévalence des anomalies des membres



Research article | Open Access | Published: 16 November 2013

Birth prevalence for congenital limb defects in the northern Netherlands: a 30-year population-based study

Ecaterina Vasiliu, Corry K. van der Sluis, Anthonie J. van Essen, Jorleke E. H. Bergman, Pieter U. Dijkstra, Heleen A. Reinders-Messelink & Hermien E. K. de Walle

BMC Musculoskeletal Disorders 14, Article number: 323 (2013) | Cite this article

30 années de surveillance des anomalies congénitales des membres au nord de la Hollande.

A peu près 1 cas/500 naissances

Nécessité de disposer d'un système de classification permettant des diagnostics et des thérapies éventuelles communs ainsi que des données épidémiologiques etc..

Différents paramètres peuvent être considérés ce qui rend ces classifications complexes...

Abstract

Background

Reported birth prevalences of congenital limb defects (CLD) vary between countries: from 13/10,000 in Finland for the period 1964–1977 to 30.4/10,000 births in Scotland from 1964–1968. Epidemiological studies permit the timely detection of trends in CLD and of associations with other birth defects. The aim of this study is to describe the birth prevalence of CLD in the northern Netherlands.

Results

The birth prevalence of CLD was 21.1/10,000 births for 1981–2010. There was an overall decrease in non-syndromic limb defects ($P = 0.023$) caused by a decrease in the prevalence of non-syndromic syndactyly ($P < 0.01$) in 1992–2010. Of 1,048 children with CLD, 55% were males, 57% had isolated defects, 13% had multiple congenital anomalies (MCA), and 30% had a recognised syndrome. The upper:lower limb ratio was 2:1, and the left:right side ratio was 1.2:1. Cardiovascular and urinary tract anomalies were common in combination with CLD (37% and 25% of cases with MCA). Digestive-tract anomalies were significantly associated with CLD ($P = 0.016$).

Conclusions

The birth prevalence of CLD in the northern Netherlands was 21.1/10,000 births. The

14

Importance des anomalies des membres/ classifications



Research article | Open Access | Published: 16 November 2013

Birth prevalence for congenital limb defects in the northern Netherlands: a 30-year population-based study

Ecaterina Vasiliu , Corry K. van der Sluis, Anthonie J. van Essen, Jorieke E. H. Bergman, Pieter L. Dijkstra, Heleen A. Benders-Messelink & Hermien E. K. de Walle

BMC Musculoskeletal Disorders 14, Article number: 323 (2013) | [Cite this article](#)

Classification des anomalies selon EUROCAT (système international permettant les comparaisons etc)

Mais, ne prend en compte que les données cliniques...

CLD	Isolated CLD, n	Multiple congenital anomalies, n	CLD is part of a recognized condition, n	Total, n	Prevalence per 10,000
Polydactyly	231	45	83	419	8.4
Upper limb	228	38	83*	329	6.6
Preaxial	73	15	26	108	2.1
Postaxial	141	23	39	201	4.0
NOS	14	4	6	24	0.5
Lower limb	76	9	32	116	2.3
Preaxial	12	1	8	21	0.4
Postaxial	59	7	19	85	1.7
NOS	4	1	5	10	0.2
NOS	4	0	2	6	0.1
Upper and lower limb	16	2	14	32	0.6
Reduction defects	180	42	120	342	6.9
Upper limb	128	28	84	250	5.0
Transverse	89	17	28	145	2.9
Longitudinal	23*	9	51	81	1.6
Preaxial	12	7	33	52	1.0
Postaxial	10	2	18	30	0.6
Intercalary	3	1	5	9	0.2
Central	16	1	4	21	0.4
Multiple	1	0	5	6	0.1
Lower limb	66	25	68	149	3.0
Transverse	29	15	31	75	1.5
Longitudinal	23*	5	24	52	1.0
Preaxial	4	3	9	16	0.3
Postaxial	21	2	16	39	0.8
Intercalary	7	5	10	22	0.4
Central	13	1	2	16	0.3
Multiple	7	2	8*	17	0.3
NOS	1	1	0	2	0.04
NOS	0	0	1	1	0.02
Upper and lower limb	14	15	33	62	1.2
Syndactyly	126	29	77	232	4.7
Upper limb	77	17	46	140	2.8
Lower limb	69	12	46	117	2.4
NOS	0	1	0	1	0.02
Upper and lower limb	10	1	16	26	0.5
Other CLD*	41	24	88	163	3.3
Upper limb	18	14	66	96	2.0
Lower limb	25	22	63	100	2.0
NOS	0	1	0	1	0.02
Upper and lower limb	2	3	31	36	0.7
Multiple CLD*	181	149	449	101	2.0
Total no. of cases	1088	136	315	1548	31.1
Total no. of live births	687	77	109	823	16.5

15

Classifier le vivant.. (J. L. Borges, 1942)



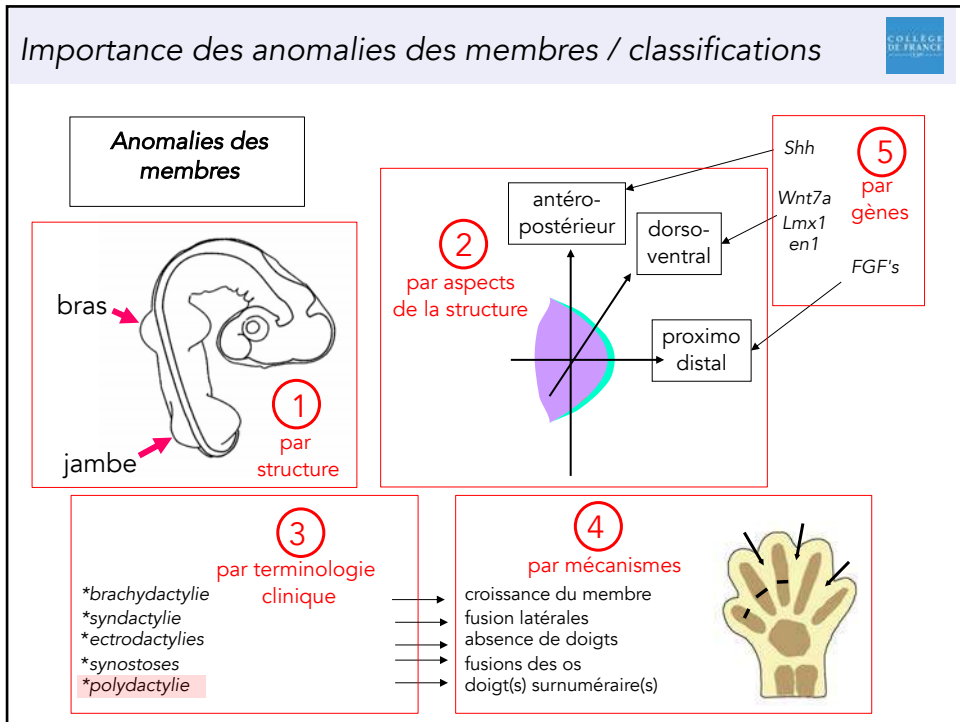
Celestial Emporium of Benevolent Knowledge's Taxonomy (découverte par un certain Dr Franz Kuhn dans une encyclopédie chinoise..)

Les animaux sont divisés en:

- (a) Belonging to the emperor (ceux qui appartiennent à l'Empereur)
- (b) Embalmed (ceux qui sont embaumés)
- (c) Tame (ceux qui sont apprivoisés)
- (d) Sucking pigs (les cochons de lait)
- (e) Sirens (les sirènes)
- (f) Fabulous (les fabuleux)
- (g) Stray dogs (les chiens en liberté)
- (h) Included in the present classification (ceux inclus dans cette classification)
- (i) Frenzied (ceux qui s'agitent)
- (j) Innumerable (les innombrables)
- (k) Drawn with a very fine camelhair brush (ceux dessinés avec des poils de chameau)
- (l) et cetera
- (m) Having just broken the water pitcher (ceux qui viennent de casser une cruche)
- (n) That from a long way off look like flies (ceux qui de loin ressemblent aux mouches)
- (o) Those that tremble as if they were mad (ceux qui tremblent comme des malades)

'Le Langage Analytique de John Wilkins' (J. L. Borges, 1942)

16



17

Importance des anomalies des membres / classifications

Polydactylies

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

Limb Malformations

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

18

Importance des anomalies des membres / classifications

Anomalies de réduction

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
- Okhiro
- VACTERL association

Autres catégories

Defects ulnar ray

- Cornelia de Lange
- FFU
- UMS
- Miller

Defects lower limb

- Hypoplastic femur unusual facies
- Clubfoot familial
- 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, Fyngs
- Acromesomelic dysplasia BMPR1B type
- Leri Weill
- Langer
- Robinow

Macrodactyly / Overgrowth

- Hemihypertrophy
- Klippel Trenaunay
- Proteus

Contracture deformities

- Amyoplasia
- Escobar
- Freeman-Sheldon
- Adducted thumb

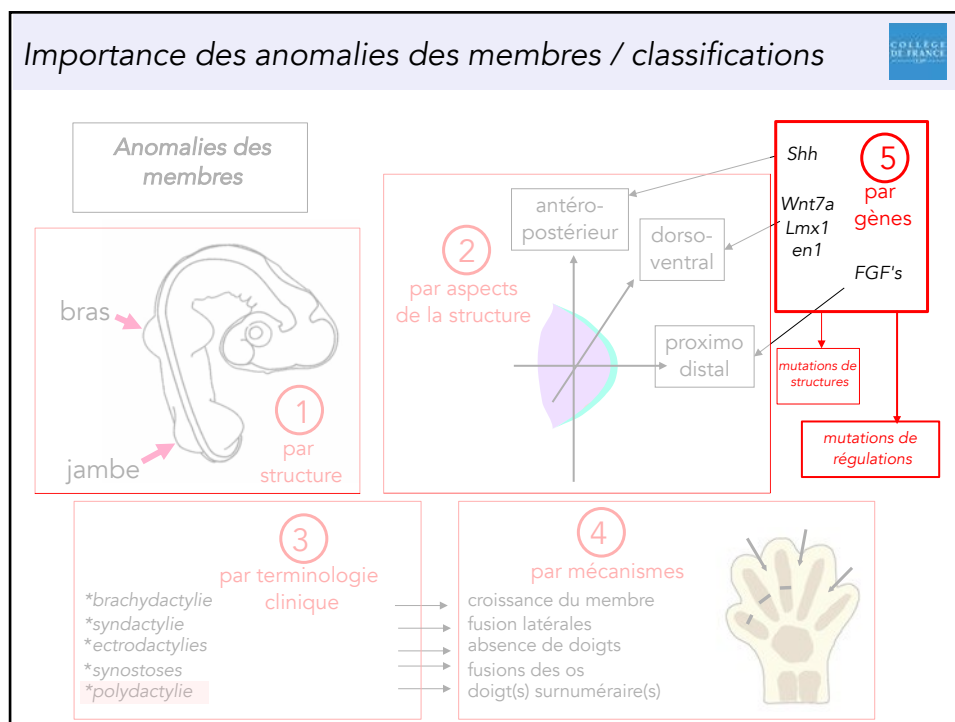
Enchondromatoses

- Enchondromatosis
- Maffucci

Various types

- OFD I-VIII
- Focal dermal hypoplasia
- Otopalatodigital I
- Otopalatodigital II

19



20

Syndromes génétiques affectant les membres



*Ces mécanismes de régulation sont souvent très complexes et l'étude de syndromes humains qui y sont associés permet parfois d'en comprendre l'étiologie moléculaire, qui peut alors être vérifiée expérimentalement par l'utilisation de systèmes modèles tel que la souris.

*La suite de ce cours 2020-2021 va traiter de quelques exemples illustrant ce principe et touchant aux différents aspects du développement des membres, à savoir:

- 1) La différence entre membres antérieurs et postérieurs (bras et jambes) (Syndrome de Liebenberg)
- 2) La polarité antérieur-postérieur du membre (oligosyndactylies, synostoses radio-ulnaire, polydactylies)
- 3) La polarité proximal-distal du membre (Displasies mésoméliques en 2q31)

21

Syndrome de Liebenberg



'Syndrome de brachydactylie et dysplasie du coude et du poignet'

Liebenberg, F., 1973. A pedigree with unusual anomalies of the elbows, wrist, and hands in five generations. S. Afr. Med. J. 47, 745-747.

*Description d'une famille Sud-Africaine affectée sur 5 générations

*Seuls les membres antérieurs (bras) sont affectés

*Allèle semi-dominant (actif à l'état hétérozygote)

*Plusieurs familles additionnelles décrites par la suite

*En 2012, caractérisation des altérations génomiques de trois familles distinctes

*Mutations cartographiées sur le chromosome 5, à proximité du gène PITX1

22

Syndrome de Liebenberg

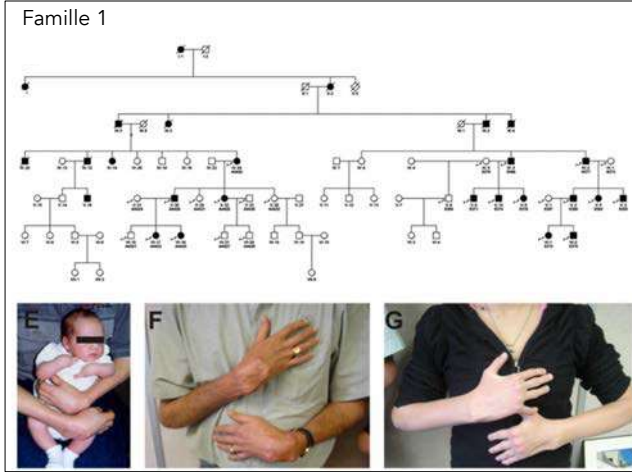


ARTICLE

Homeotic Arm-to-Leg Transformation Associated with Genomic Rearrangements at the *PITX1* Locus

Malle Spielmann,^{1,2} Francesco Brancati,^{1,4} Peter M. Krawitz,¹ Peter N. Robinson,¹ Daniel M. Ibrahim,^{1,2} Martin Franke,² Joshua Hochli,^{1,5} Silke Johans,^{1,2} Katerina Barby,² Anisa Maria Nardone,⁶ Paula Ferraz,⁶ Antonio Landi,⁷ Lars Witzke,⁸ Bernd Timmermann,⁹ Danny Chan,¹⁰ Ulrich Meisner,¹¹ Eva Klopocki,^{1,2} and Stefan Mundlos^{1,2,5*}

The American Journal of Human Genetics 91, 629-635, October 3, 2012 631



Clés du pedigree

- Non-affected female
- Non-affected male
- Affected female
- Affected male
- ◇ Unknown gender
- / Deceased
- p ↗ Analyses cliniques et moléculaires faites



23

Syndrome de Liebenberg

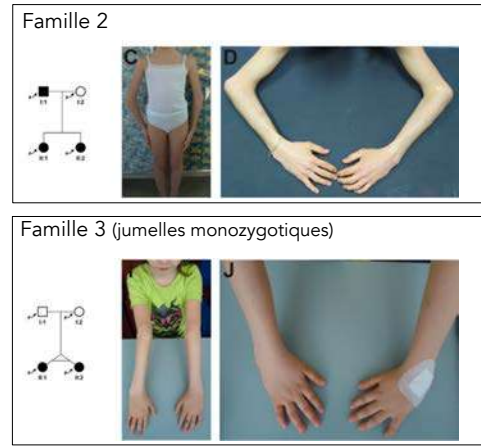


ARTICLE

Homeotic Arm-to-Leg Transformation Associated with Genomic Rearrangements at the *PITX1* Locus

Malle Spielmann,^{1,2} Francesco Brancati,^{1,4} Peter M. Krawitz,¹ Peter N. Robinson,¹ Daniel M. Ibrahim,^{1,2} Martin Franke,² Joshua Hochli,^{1,5} Silke Johans,^{1,2} Katerina Barby,² Anisa Maria Nardone,⁶ Paula Ferraz,⁶ Antonio Landi,⁷ Lars Witzke,⁸ Bernd Timmermann,⁹ Danny Chan,¹⁰ Ulrich Meisner,¹¹ Eva Klopocki,^{1,2} and Stefan Mundlos^{1,2,5*}

The American Journal of Human Genetics 91, 629-635, October 3, 2012 631



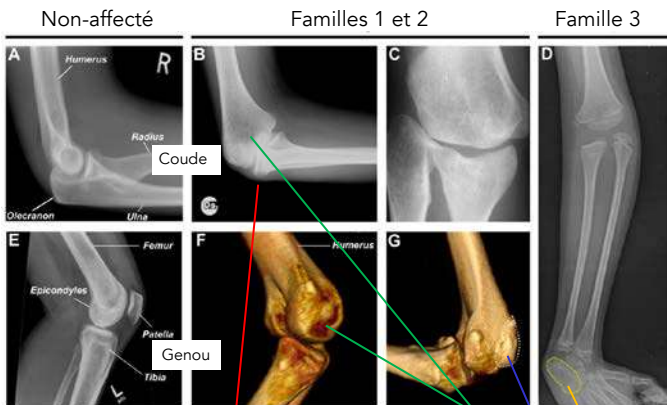
Clés du pedigree

- Non-affected female
- Non-affected male
- Affected female
- Affected male
- ◇ Unknown gender
- / Deceased
- p ↗ Analyses cliniques et moléculaires faites

Des bras qui, à plusieurs égards, ressemblent à des jambes..

24

Syndrome de Liebenberg



Results
Arm-to-Leg Transformation in Liebenberg Syndrome
 We investigated three unrelated families affected by Liebenberg syndrome (Figures 1A-1B). After initial inspection of the phenotype, we performed in-depth imaging of the skeletal and soft-tissue abnormalities. In the normal elbow, the distal head of the humerus articulates with the ulna at the trochlear notch, and the olecranon process of the ulna extends proximally from the elbow joint (Figure 2A). In the affected subjects, the olecranon was hypoplastic or missing (Figures 2B-2D), and the distal humerus and the proximal head of the ulna were broadened (Figures 2B and 2C) such that the distal humerus resembled the distal head of the femur and the proximal ulna resembled the proximal head of the tibia (Figures 2B, 2C, and 2E). Three-dimensional computed tomography (CT) scans of the humerus showed a medial and lateral condyle separated by an intercondylar fossa (Figure 2F) resembling the femoral epicondyles of the knee (Figure 2E) and a patella-like structure hood to the distal head of the humerus (Figure 2G, outlined in white). The joint surface of the radius and ulna was flat and resembled that of the tibia and fibula. In family 3, the arm-to-leg transformation phenotype is even more severe. In family 3, the fusion of the triquetrum and pisiform (Figure 2D, outlined in yellow) formed an element that is similar in shape and size to the calcaneus of the ankle.

- *Hypoplasie de l'olécrâne chez les patients affectés
- *Épaississement de l'humérus distal, ressemblant à un fémur
- *Fusion d'une pseudo-rotule à la partie la plus distale de l'humérus
- *Absence de l'olécrâne et fusion d'os carpiens produisant un os ressemblant au calcaneum de la cheville

25

Syndrome de Liebenberg



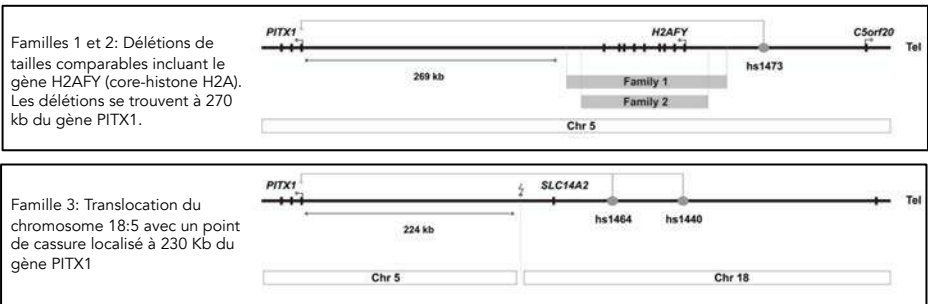
ARTICLE

Homeotic Arm-to-Leg Transformation Associated with Genomic Rearrangements at the PITX1 Locus
 Malte Spiekermann,^{1,2} Francesco Brancati,^{1,4} Peter M. Krawitz,¹ Peter N. Robinson,¹ Daniel M. Ibrahim,^{1,2} Martin Franke,² Jochem Hirsch,^{1,5} Silla Johans,^{1,2} Katrina Darby,¹ Anisa Maria Nardone,¹ Paolo Ferraro,¹ Antonio Landi,¹ Lars Wirtke,¹ Bernd Timmermann,² Danny Chan,^{1,6} Ulrich Meisner,¹ Eva Klopocki,^{1,2} and Stefan Mundlos^{1,2,5*}

The American Journal of Human Genetics 91, 629-635, October 3, 2012 631

Analyses génomiques des patients affectés dans les trois familles: deux délétions et une translocation.

Recherche d'un gain de fonction de PITX1 (si le bras se transforme en jambe alors PITX1 devrait être exprimé dans le bourgeon de membre antérieur...)



hs 1473, hs1464 et hs 1440 sont des séquences ADN identifiées précédemment comme ayant un potentiel enhancer

26

Les séquences enhancers (cours CdF 2019-2020)



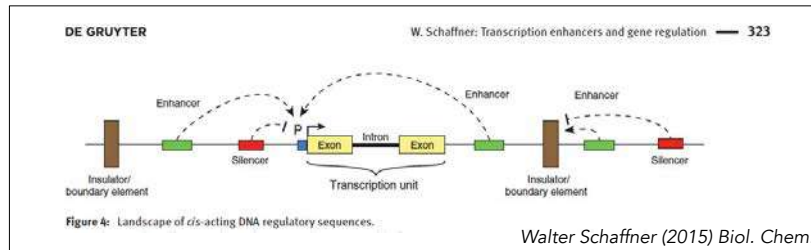
Cell, Vol. 27, 299-308, December 1981 (Part 1), Copyright © 1981 by MIT

Expression of a β -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



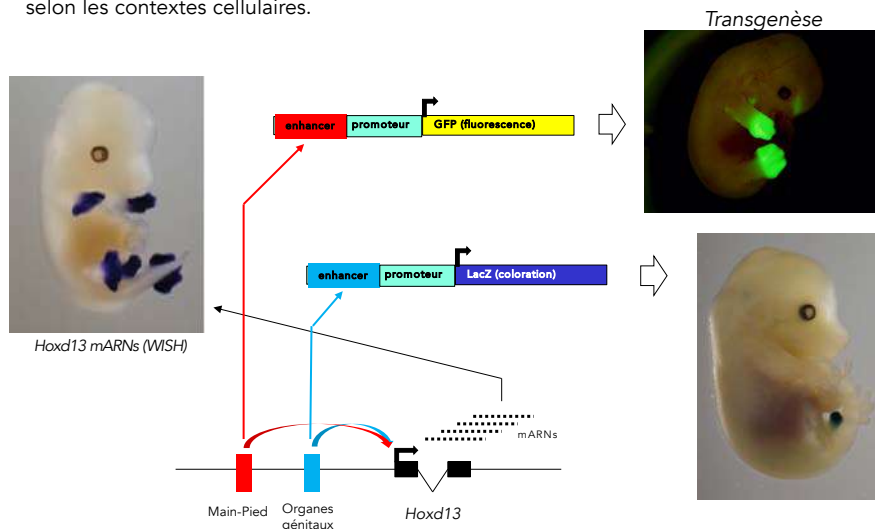
Raison d'être des enhancers: Ce sont des **interrupteurs** qui décident du temps et de l'endroit où un gène particulier est soit activé, soit sur-activé.

27

Spécificité des séquences enhancers (cours CdF 2019-2020)



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.



Lonfat et al., Science, 2014; Chase Bolt, EPFL Lausanne

28

Syndrome de Liebenberg



ARTICLE

Homeotic Arm-to-Leg Transformation Associated with Genomic Rearrangements at the *PITX1* Locus

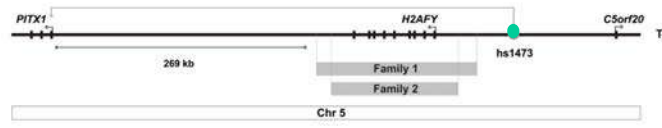
Matthé Spielmann,^{1,2} Francesco Brancati,^{1,4} Peter M. Krawitz,¹ Peter N. Robinson,¹ Daniel M. Ibrahim,^{1,2} Martin Franke,² Jochen Hecht,^{1,5} Silla Johari,^{1,2} Katrina Darby,¹ Aneta Maria Nardone,¹ Paula Ferraz,¹ Antonio Landi,⁷ Lars Weiler,⁸ Bernd Timmermann,⁹ Danny Chan,¹⁰ Ulrich Meinen,¹¹ Eva Klopocki,^{1,2} and Stefan Mundlos^{1,2,5*}

The American Journal of Human Genetics 91, 629-635, October 3, 2012 631

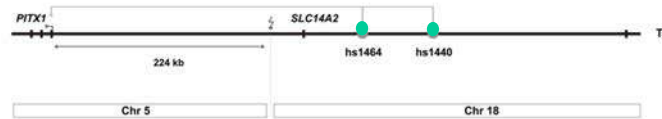
Analyses génomiques des patients affectés dans les trois familles: deux délétions et une translocation.

Recherche d'un **gain de fonction** de PITX1 (si le bras se transforme en jambe alors PITX1 devrait être exprimé dans le bourgeon de membre antérieur...)

Familles 1 et 2: Délétions de tailles comparables incluant le gène H2AFY (core-histone H2A). Les délétions se trouvent à 270 kb du gène PITX1.



Famille 3: Translocation du chromosome 18:5 avec un point de cassure localisé à 230 Kb du gène PITX1



hs 1473, hs1464 et hs 1440 sont des séquences ADN identifiées précédemment comme ayant un **potentiel enhancer**

29

Syndrome de Liebenberg, mécanisme



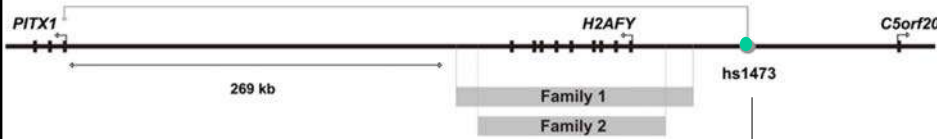
ARTICLE

Homeotic Arm-to-Leg Transformation Associated with Genomic Rearrangements at the *PITX1* Locus

Matthé Spielmann,^{1,2} Francesco Brancati,^{1,4} Peter M. Krawitz,¹ Peter N. Robinson,¹ Daniel M. Ibrahim,^{1,2} Martin Franke,² Jochen Hecht,^{1,5} Silla Johari,^{1,2} Katrina Darby,¹ Aneta Maria Nardone,¹ Paula Ferraz,¹ Antonio Landi,⁷ Lars Weiler,⁸ Bernd Timmermann,⁹ Danny Chan,¹⁰ Ulrich Meinen,¹¹ Eva Klopocki,^{1,2} and Stefan Mundlos^{1,2,5*}

The American Journal of Human Genetics 91, 629-635, October 3, 2012 631

Souris transgénique portant une copie de la séquence hs1473 mise devant un promoteur quelconque et un gène *LacZ* pour détecter l'activité de hs1473



Hypothèse

Les délétions dans les familles 1 et 2 permettent de mettre en contact la séquence enhancer hs1473 et le gène PITX1 qui va dès lors être exprimé dans les bourgeons de membres antérieurs, les 'transformant' ainsi en membres postérieurs.

Encyclopédie des enhancers ayant une spécificité pour les membres



Visel, A., Minovitsky, S., Dubchak, I., and Pennacchio, L.A. (2007). VISTA Enhancer Browser—a database of tissue-specific human enhancers. *Nucleic Acids Res.* 35 (Database issue), D88–D92.

Pennacchio, L.A., Ahituv, N., Moses, A.M., Prabhakar, S., Nobrega, M.A., Shoukry, M., Minovitsky, S., Dubchak, I., Holt, A., Lewis, K.D., et al. (2006). In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature* 444, 499–502.



30

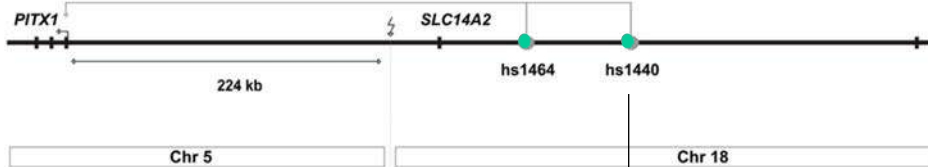
Syndrome de Liebenberg, mécanisme

ARTICLE

Homeotic Arm-to-Leg Transformation Associated with Genomic Rearrangements at the *PITX1* Locus

Matthé Spielmann,^{1,2} Francesco Brancati,^{1,3} Peter M. Krawitz,¹ Peter N. Robinson,¹ Daniel M. Ibrahim,^{1,2} Martin Franke,¹ Jochem Hecht,^{1,2} Silke Johan,^{1,2} Katarina Darby,¹ Anna Maria Nardone,¹ Paolo Ferraro,¹ Antonio Landi,¹ Lars Witzke,¹ Bernd Timmermann,¹ Danny Chan,^{1,2} Ulrich Meinen,¹ Eva Klopocki,^{1,2} and Stefan Mundlos^{1,2,4*}

The American Journal of Human Genetics 91, 629-635, October 5, 2012 631



Hypothèse

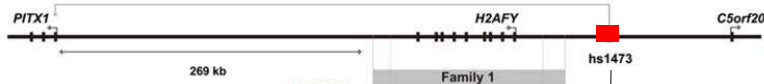
La translocation observée dans les familles 3 met en contact la séquence enhancer hs1440 et le gène *PITX1* qui va dès lors être exprimé dans les bourgeons de membres antérieurs, les 'transformant' ainsi en membres postérieurs.



Peux-on reproduire cette situation pathologique chez la souris, expérimentalement?

31

Syndrome de Liebenberg, vérification du mécanisme

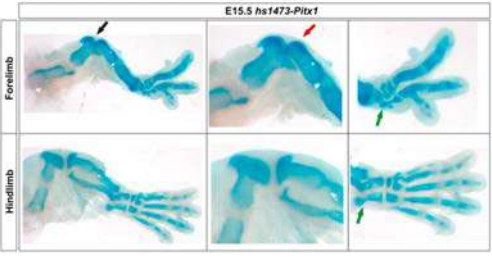


ARTICLE

Homeotic Arm-to-Leg Transformation Associated with Genomic Rearrangements at the *PITX1* Locus

Matthé Spielmann,^{1,2} Francesco Brancati,^{1,3} Peter M. Krawitz,¹ Peter N. Robinson,¹ Daniel M. Ibrahim,^{1,2} Martin Franke,¹ Jochem Hecht,^{1,2} Silke Johan,^{1,2} Katarina Darby,¹ Anna Maria Nardone,¹ Paolo Ferraro,¹ Antonio Landi,¹ Lars Witzke,¹ Bernd Timmermann,¹ Danny Chan,^{1,2} Ulrich Meinen,¹ Eva Klopocki,^{1,2} and Stefan Mundlos^{1,2,4*}

The American Journal of Human Genetics 91, 629-635, October 5, 2012 631



Production de souris transgéniques exprimant *PITX1* dans les bourgeons de membres antérieurs sous le contrôle de l'enhancer hs1473



- *Perte de l'olécrâne
- *Proximal zeugopode ressemble au tibia proximal
- *Fusion des os carpiens ressemblant au calcaneum

PITX dans le membre antérieur; voir aussi: DeLaurier, A., Schweitzer, R., and Logan, M. (2006). *Pitx1* determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb. *Dev. Biol.* 299, 22-34.

32

Syndrome de Liebenberg, mécanisme

*Explication mécanistique de premier niveau (phénoménologique): le gène *PITX1* est contacté dans le bourgeon de membre antérieur par un enhancer 'inhabituel' suite à des altérations génomiques.

The Liebenberg syndrome: in depth analysis of the original family

U. Meenen
Jacaranda Hospital, Muckleneuk, Pretoria, South Africa

S. Mundlos
Institute for Medical Genetics and Human Genetics, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany
FG Development & Disease, Max-Planck-Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany

M. Spielmann
Institute for Medical Genetics and Human Genetics, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany
FG Development & Disease, Max-Planck-Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany

En 2013, ces même auteurs analysent une branche différente de la famille Sud-Africaine observée initialement par Liebenberg et concluent à la disparition, dans la délétion, d'un élément bloqueur. Sans cet élément, l'enhancer peut accéder à *PITX1*

33

Mécanismes de régulation de *PITX1*

Pour confirmer ou infirmer cette explication moléculaire, une compréhension approfondie des mécanismes de régulation du gène *PITX1* pendant le développement des membres antérieurs (régulation négative) et postérieurs (régulation positive) est nécessaire.

nature genetics

ARTICLES
<https://doi.org/10.1038/nature14733>

NATURE GENETICS | VOL 50 | OCTOBER 2018 | 1473-1473 | www.nature.com/naturegenetics

Dynamic 3D chromatin architecture contributes to enhancer specificity and limb morphogenesis

Bjort K. Kragesteen^{1,2,3,4,5}, Malte Spielmann^{1,2,3,4}, Christina Paliou^{1,2,3}, Verena Heinrich⁵, Robert Schöpflin^{1,2,5}, Andrea Esposito^{6,7}, Carlo Annunziatella⁶, Simona Bianco⁶, Andrea M. Chiariello⁶, Ivana Jerković^{1,4}, Izabela Harabula¹, Philine Guckelberger¹, Michael Pechstein¹, Lars Wittler⁸, Wing-Lee Chan⁹, Martin Franke^{1,2,3}, Darío G. Lupiáñez^{1,2,3,9}, Katerina Kraft^{1,2,3}, Bernd Timmermann¹⁰, Martin Vingron⁵, Axel Visel^{11,12,13}, Mario Nicodemi^{6,7*}, Stefan Mundlos^{1,2,3,4} and Guillaume Andrey^{1,2,3*}

The regulatory specificity of enhancers and their interaction with gene promoters is thought to be controlled by their sequence and the binding of transcription factors. By studying *Pitx1*, a regulator of hindlimb development, we show that dynamic changes in chromatin conformation can restrict the activity of enhancers. Inconsistent with its hindlimb-restricted expression, *Pitx1* is controlled by an enhancer (Pen) that shows activity in forelimbs and hindlimbs. By Capture Hi-C and three-dimensional modeling of the locus, we demonstrate that forelimbs and hindlimbs have fundamentally different chromatin configurations, whereby Pen and *Pitx1* interact in hindlimbs and are physically separated in forelimbs. Structural variants can convert the inactive into the active conformation, thereby inducing *Pitx1* misexpression in forelimbs, causing partial arm-to-leg transformation in mice and humans. Thus, tissue-specific three-dimensional chromatin conformation can contribute to enhancer activity and specificity in vivo and its disturbance can result in gene misexpression and disease.

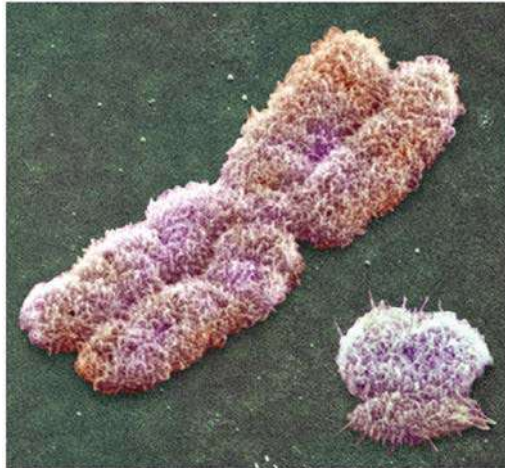
..différentes configurations de la chromatine..

34

Structure des chromosomes (voir cours CdF 2020-2021)



*Les chromosomes sont fait d'ADN, mais également de nombreuses protéines impliquées dans sa fonction et également dans sa structure en 3(4)D, qui sont entre autre responsables de son empaquetage, nécessaire pour 'tenir' dans un noyau cellulaire

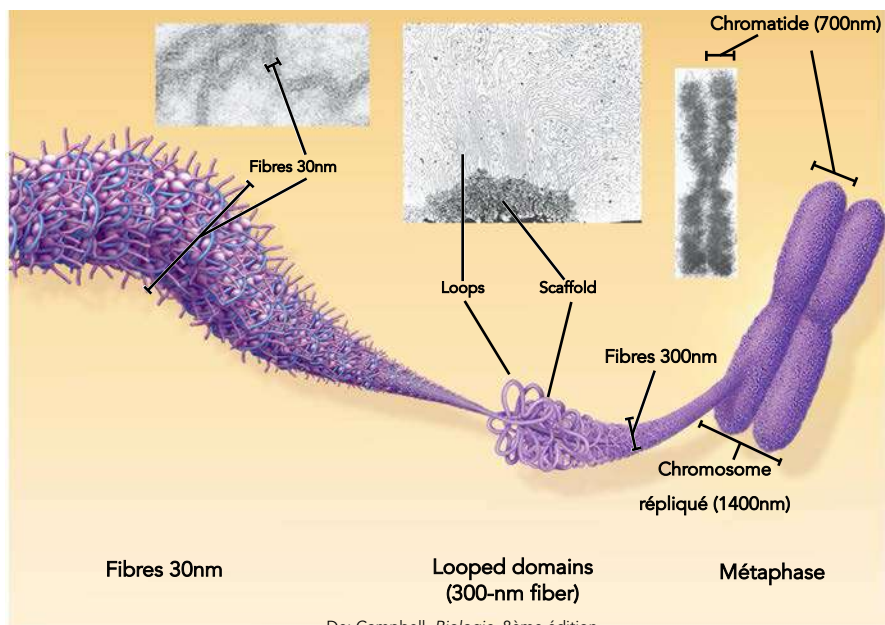


Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

De: Campbell, *Biologie*, 8ème édition

35

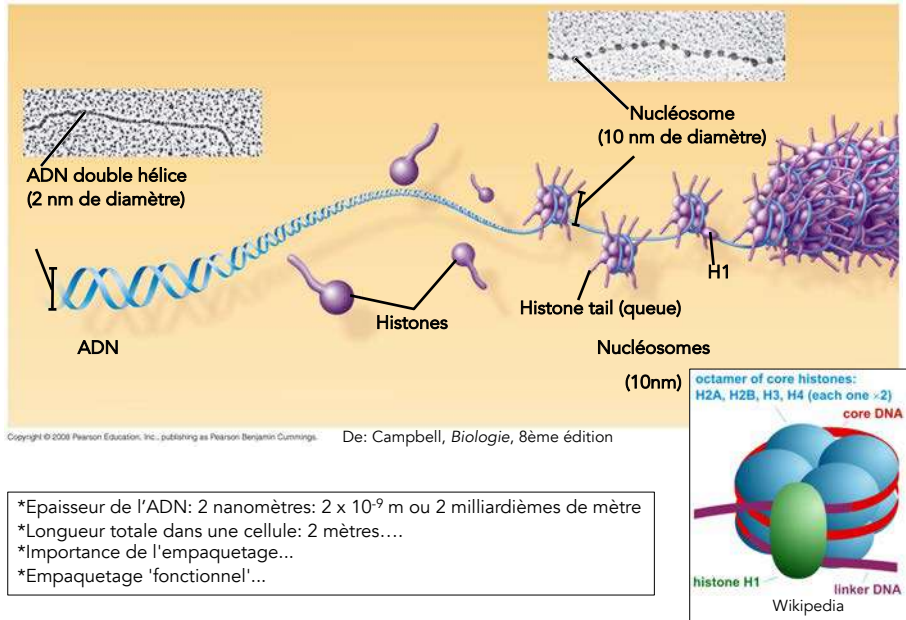
Déroutement de la chromatine (voir cours CdF 2020-2021)



De: Campbell, *Biologie*, 8ème édition

36

Déroulement de la chromatine (voir cours CdF 2020-2021)



- *Épaisseur de l'ADN: 2 nanomètres: 2×10^{-9} m ou 2 milliardièmes de mètre
- *Longueur totale dans une cellule: 2 mètres....
- *Importance de l'empaquetage...
- *Empaquetage 'fonctionnel'...

37

Modifications épigénétiques de la chromatine (Histones)

- *Modifications post-traduction, faites par des enzymes (réversibles)
- *Modifications associées à des états différents de la chromatine (active, inactive..)
- *Modifications utilisées pour évaluer l'état fonctionnel de séquence d'ADN

Lowe et al., 2019 *Cancers* (11) 660



- H3K27ac → Chromatine active (gènes transcrits, enhanceurs..)
- H3K27me1
- H3K27me2
- H3K27me3 → Chromatine inactive (gènes non-transcrits)

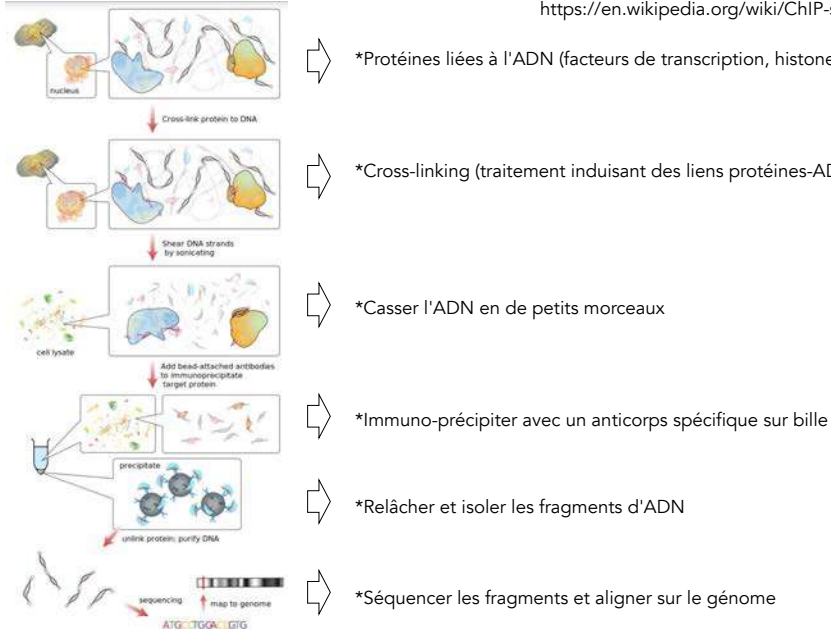
- *Il existe des anticorps qui reconnaissent ces modifications de façon spécifique
- *L'utilisation de ces anticorps associée au séquençage ADN à haut débit permet de localiser les endroits où ces modifications se trouvent (ChIP-seq)

38

ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation/sequence..)



<https://en.wikipedia.org/wiki/ChIP-sequencing>

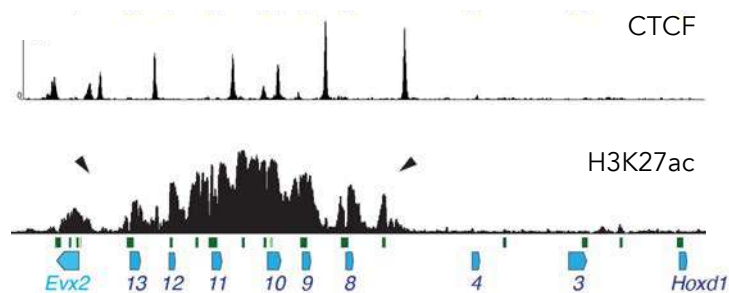


39

ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation/sequence..)



Exemple: gènes *Hoxd*, cellules d'avant-bras d'un foetus de souris à 12.5 jours

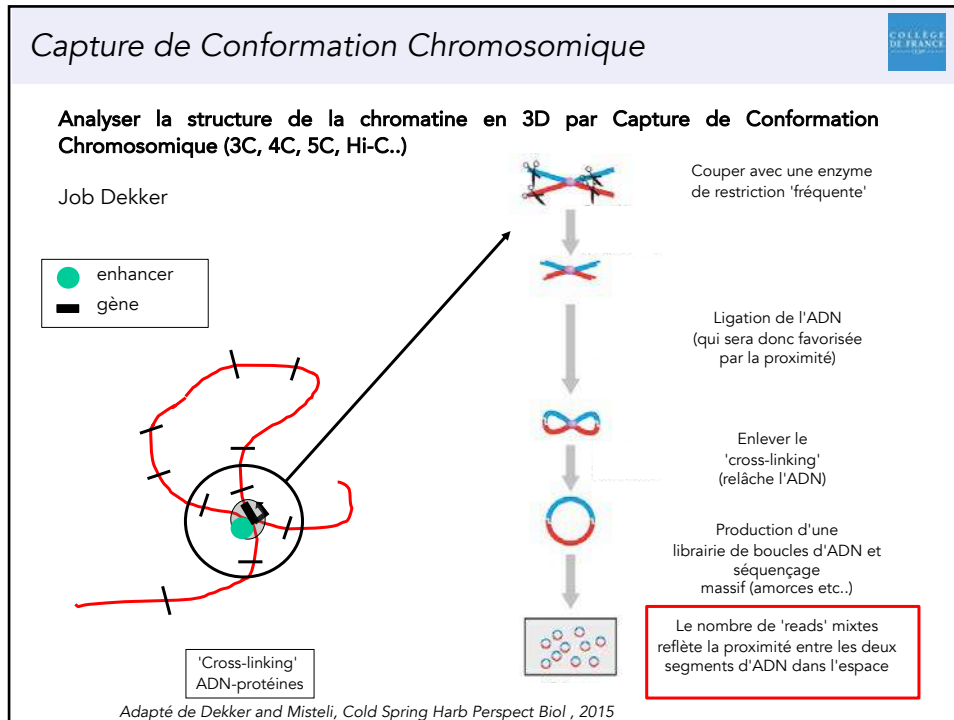


CTCF: Protéine se liant directement à l'ADN, impliquée dans l'organisation de la structure de la chromatine

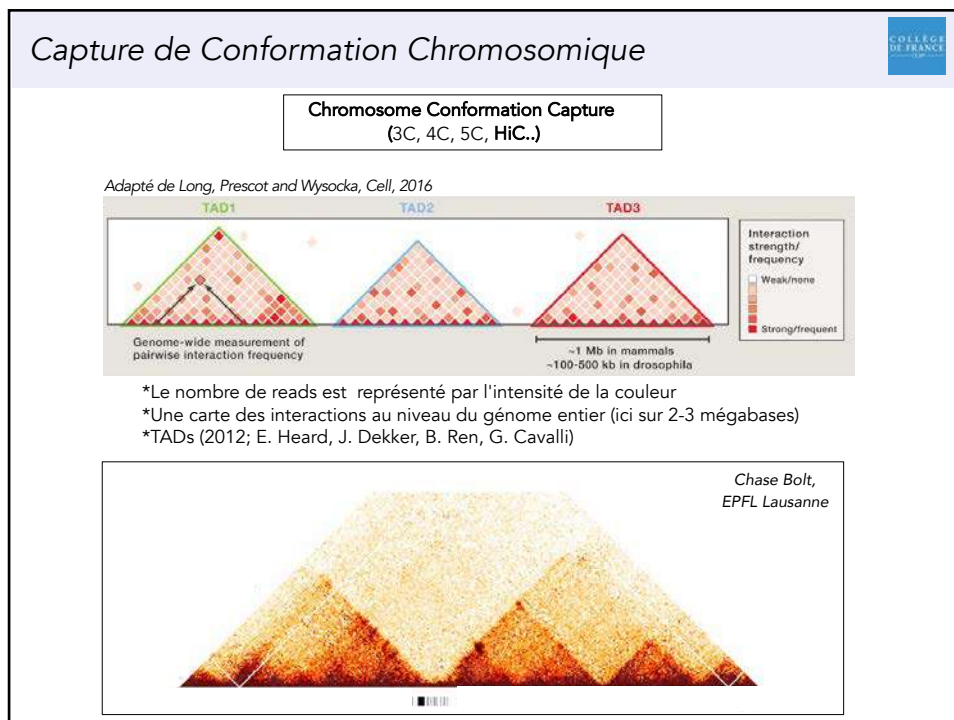
H3K27ac: Histone H3 avec une modification (acétylation) du résidu Lysine 27 (profils assez différents suite aux caractéristiques des protéines..)

Extrait de: Rodriguez-Carballo et al., *Genes & Dev.* (2017)

40



41

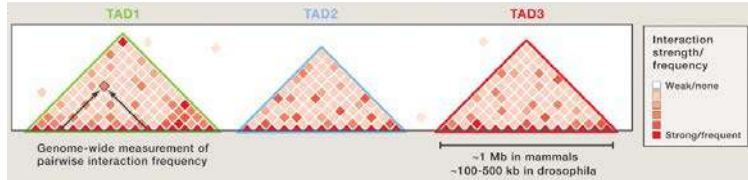


42

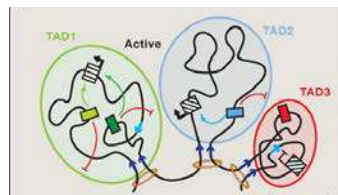
Capture de Conformation Chromosomique

Chromosome Conformation Capture
(3C, 4C, 5C, HiC..)

TADs: Topologically-associating domains (cours de la Prof. E. Heard)



Adapté de Long, Prescott and Wysocka, Cell, 2016



TADs: Domaines (paysages) d'action des enhanceurs pour une cible précise (mais quid de la causalité..?)

43

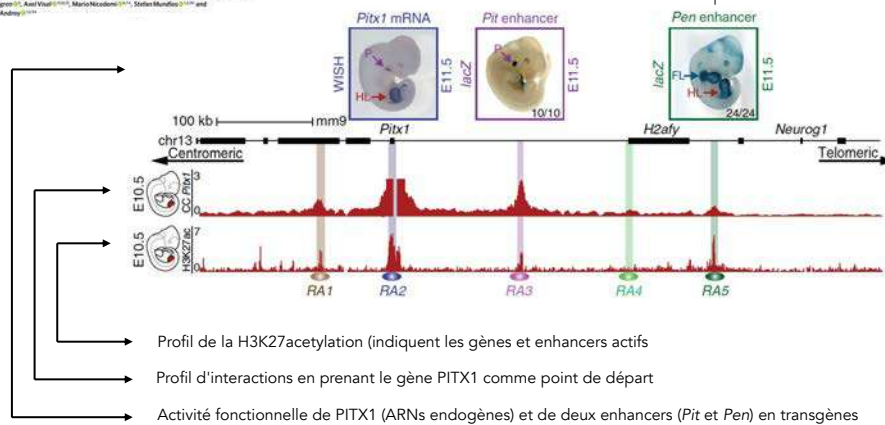
PITX1; Paysage de régulation

nature GENETICS ARTICLES

Dynamic 3D chromatin architecture contributes to enhancer specificity and limb morphogenesis

Benk K. Kragg... Maria Spitzmann... Christina Pallas... Verena Kowalczyk... Robert Schlapbach... Andrea Rappalini... Carlo Antonucci... Simona Basso... Andrea M. Chiarini... Ivana Jerkovic... Sabella Harabula... Rhodie Guckenberger... Michael Pechl... Lars Willmar... Wang-Lee Chen... Martin Franke... David Lupshin... Katerina Kuhl... Bernd Emmert... Martin Vingron... Axel Vogel... Marco Hernandez... Stefan Herzig... and Guillaume Andrieu

RA5 = hs1473 = Pen..



RA1-5: Regulatory anchors (attaches de régulation, points de formation des loops en 3D)

44

PITX1; Pièges à enhanceurs

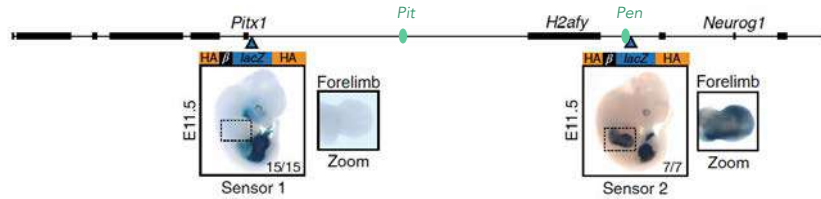


ARTICLES

Dynamic 3D chromatin architecture contributes to enhancer specificity and limb morphogenesis

Robert Knapik, Maria Spitzmann, Christine Palau, Verónica Morán, Robert D. Klein, Andrés Rodríguez, Carlos Amador, Simon Sauer, Andrea C. Olivieri, Juan J. Rodríguez, Sabine Haralab, Robin Guckenberger, Michael Pachatz, Lars Willert, Wang-Lin Chen, Martin Brack, David Lapshin, Katerina Kuhl, Bernd Timmermann, Martin Vingron, Axel Vogel, Marco Rodriguez, Stefan Haendler and Guillaume Andrey

Insertion de transgènes 'sensors' (en fait ce sont des pièges à enhanceurs) (voir cours CdF 2020)
HA: Bras d'homologies



Lorsqu'intégré à proximité du promoteur du gène *Pitx1*, le 'sensor' est exprimé comme le gène. Il 'repêche' les régulations qui agissent à ce point précis du paysage de régulation

Lorsqu'intégré à proximité de l'enhancer *Pen*, le 'sensor' ne repêche plus l'activité dans l'hypophyse (qui vient de l'enhancer *Pit*) mais est exprimé fortement dans les deux membres...

Pour essayer de comprendre le(s) mécanisme(s) qui distribue(nt) ces régulations de façon différente selon la topologie du locus, les auteurs utilisent une approche génétique

45



46