

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

Cours 2019-2020: Régulation génétique et développement des mammifères:
Les séquences enhancers (Cours #2, 19 mai 2020)

Vidéos des cours sur le site: <https://www.college-de-france.fr>
Questions, commentaires: #CdFenhancer



Merci aux équipes
techniques!



**Contexte général*

**Importance des enhancers dans la régulation génétique*

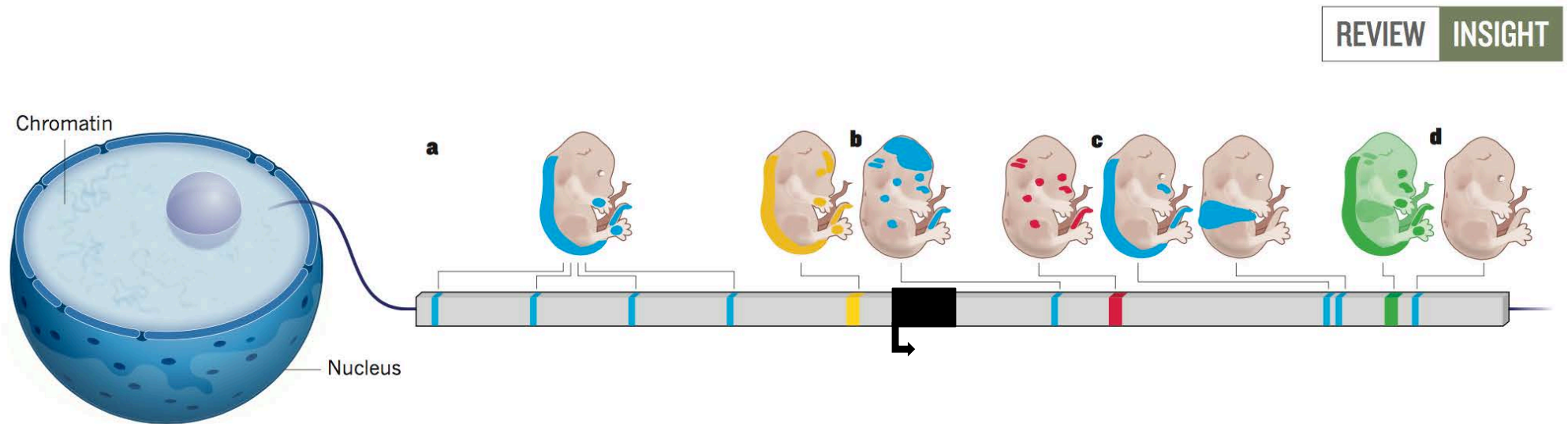
**Rôle des enhancers pendant le développement (interrupteurs, pleiotropie..)*

**Rôle des enhancers pendant l'évolution*

**Découverte des enhancers*

**Identification par comparaisons de séquences ADN*

Importance des enhancers pour modifier les régulations dans des cellules différentes du même embryon ('paysage de régulation', 2003)



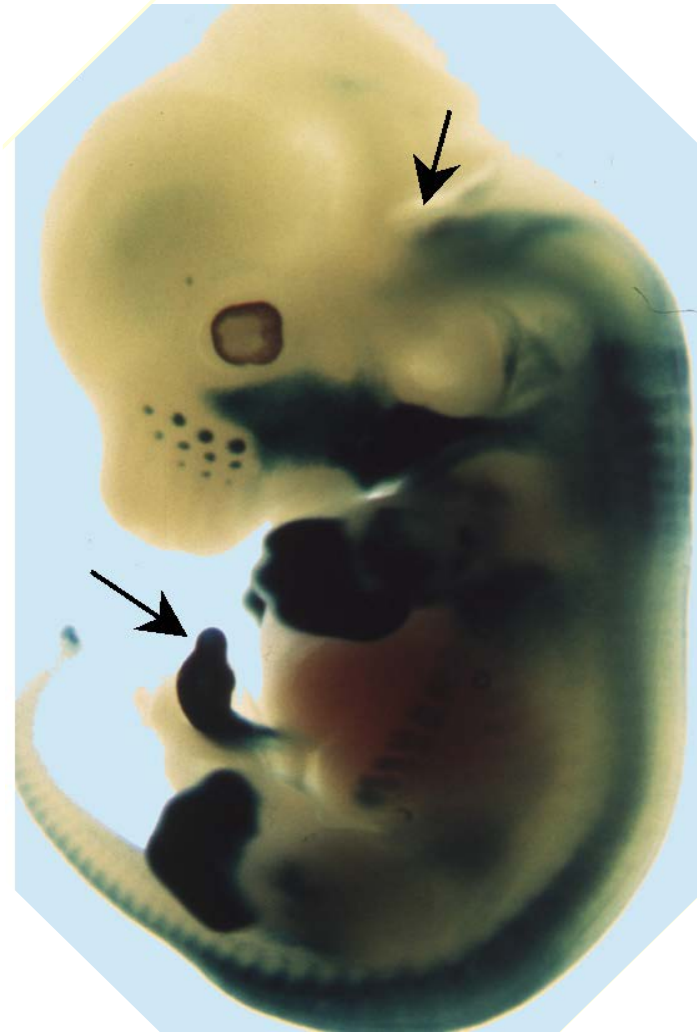
REVIEW INSIGHT

Figure 2 | The mammalian regulatory jungle.

Modifié de: de Laat and Duboule, 2013 Nature

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

**Contexte général*

**Importance des enhancers dans la régulation génétique*

**Rôle des enhancers pendant le développement (interrupteurs, pleiotropie..)*

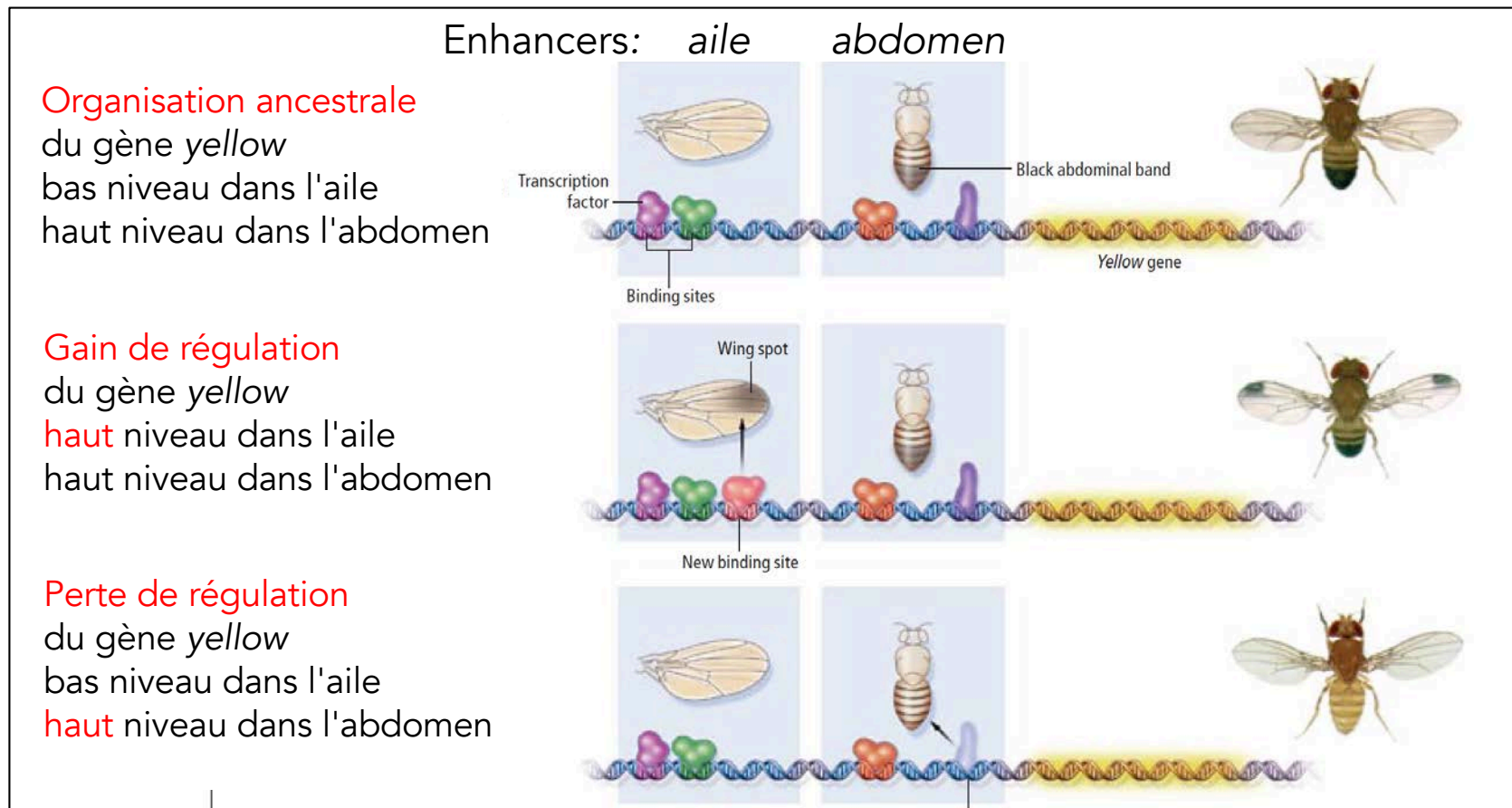
****Rôle des enhancers pendant l'évolution des espèces***

**Découverte des enhancers*

**Identification par comparaisons de séquences ADN*

Séquences enhancers et évolution (I)

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

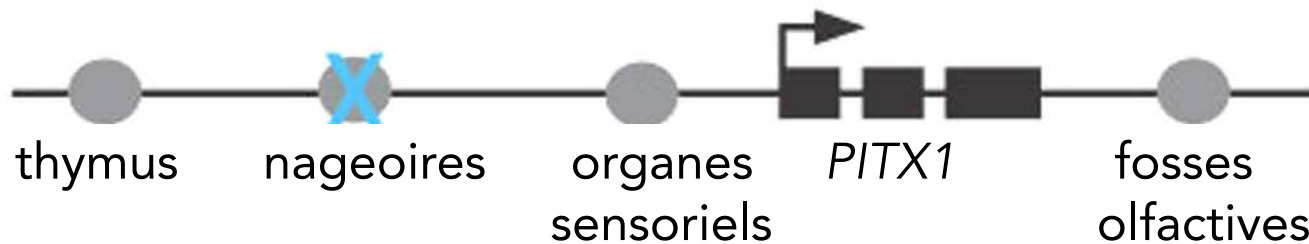
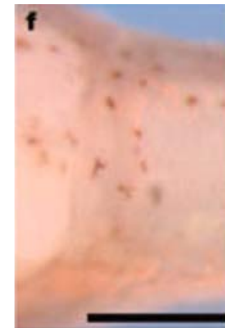
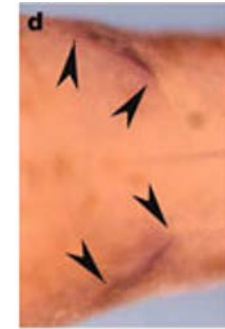


Modifié de: Carroll, Prud'homme et Gompel (mai 2008) *Scientific American*

Séquences enhancers et évolution (II)



Gasterosteus aculeatus (variation intra-spécifique)



Mutation de
régulation

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

**Contexte général*

**Importance des enhancers dans la régulation génétique*

**Rôle des enhancers pendant le développement (interrupteurs, pleiotropie..)*

**Rôle des enhancers pendant l'évolution*

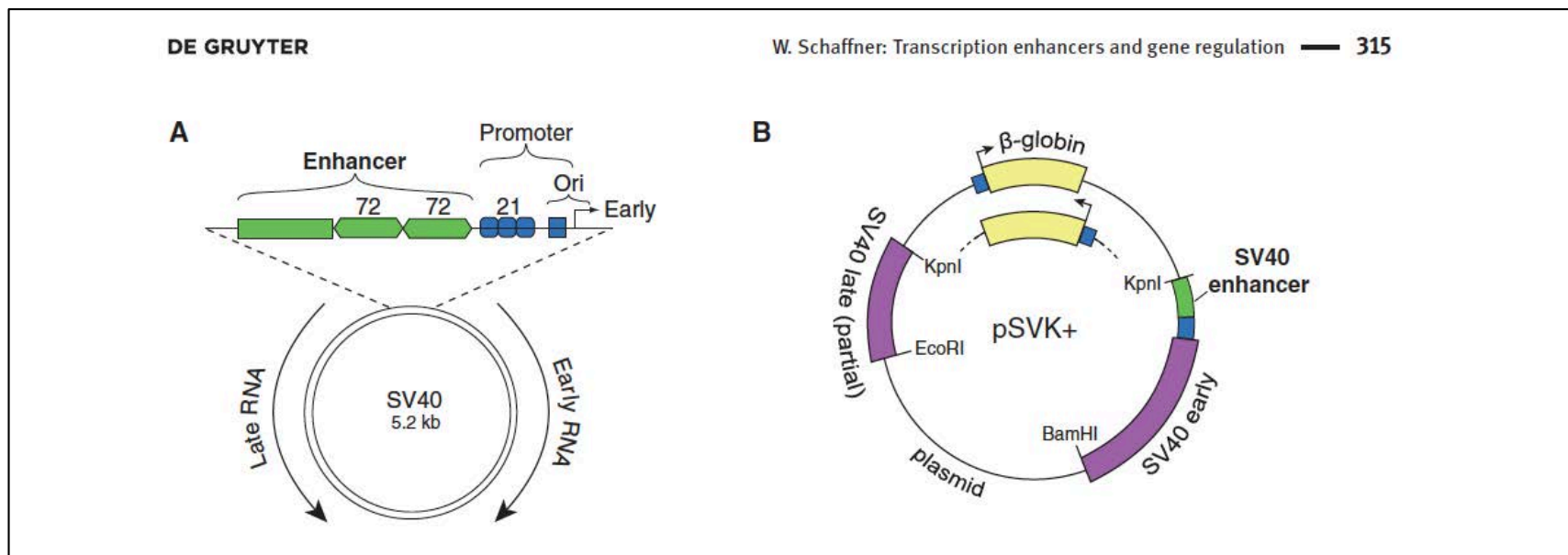
****Découverte des séquences enhancers***

**Identification par comparaisons de séquences ADN*

Découverte des séquences enhancers (1981)



- *SV40, un virus ADN utilisé pour introduire un gène (béta-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



**Contexte général*

**Importance des enhancers dans la régulation génétique*

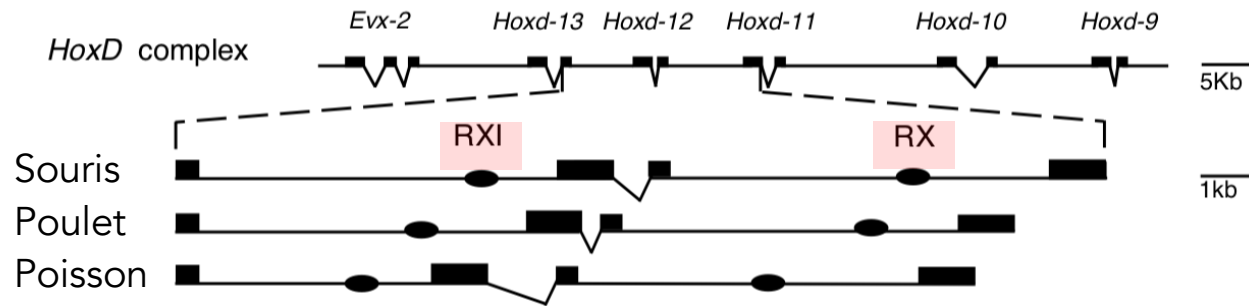
**Rôle des enhancers pendant le développement (interrupteurs, pleiotropie..)*

**Rôle des enhancers pendant l'évolution*

**Découverte des enhancers*

****Identification par comparaisons de séquences ADN***

Identification des enhancers: approches historiques



Souris	GGATCCTTAGACTTCCCCACCCACCCCTCCTCCGCCCCAGAGCT-GGAGGAAGAGGACGATTGCTGTCTGAGAGCCGCCCAATGGTCGCCGTAAC TCACACAATAAAG
Poulet	TTATGGAAAGAAGCGGT-CACCTCGGTCTGCGGGGAGAAAAAAGCGGAAAACAAATAAGTTAATAAGAGGGAGATGCAATGGCAGACATAAC TCAAACAATAAAA
Poisson	GGATATGCAAAAGGAAGGTATATCACA...ATTAAAA

Souris	-TCCCAGCGAGGTGGTCAGCC TGCCCTC--GCGGCGCCTGTGTGGTCTCCTTGC-CAGAGCTGGGGCCTAACCAGTTCAGCTTGGCTCATGGACCATGGTCTGCTTTAG
Poulet	-ATTAAGGCAGCGGTCAGTAATATCCTCAGCGACGCTTGTGTGGTCCGTGTGCTCAG---GGGAGCGCAATCGTTTCAACATTTCTTCCAGGGCAATGAAAATTACTGC
Poisson	AATTGTA-----CAAATGTTAATAAAG

**Comment trouver et identifier des enhanceurs?*

Historiquement:

- 1) Comparaisons de séquences
- 2) Trappes (pièges) à enhanceurs

**Pièges à enhanceurs*

Repêcher des enhanceurs grâce à leur activité d'activation d'un gène cible artificiel

*Développement des systèmes de transgénèse animale

*Intégration de l'ADN au hasard et à haute efficacité

*Système de détection rapide et pratique

Identification des enhancers: approches historiques

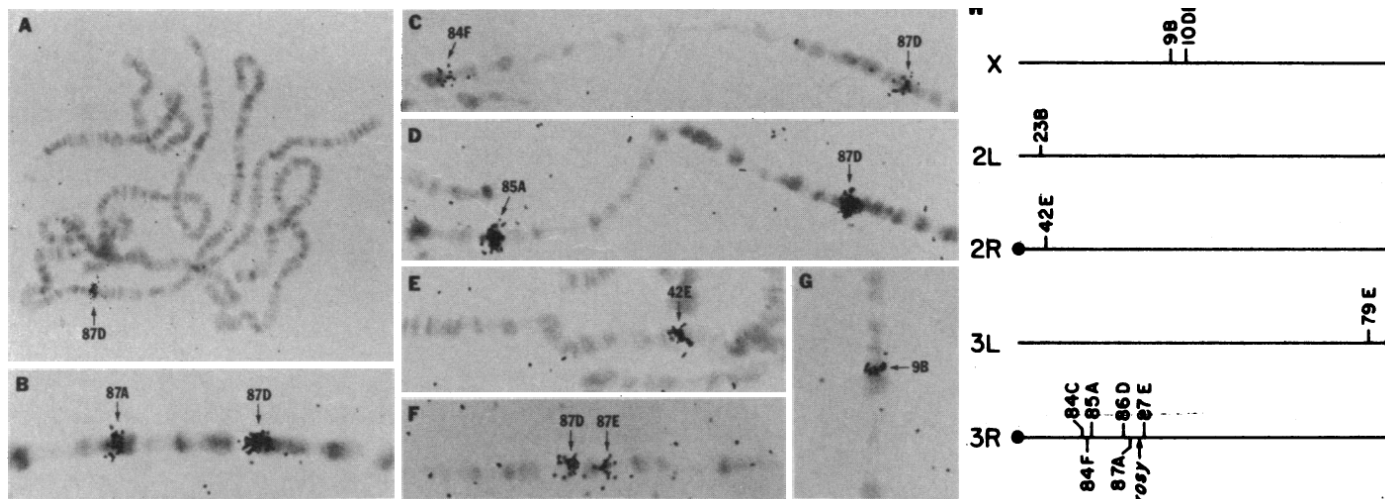
- *Approche par comparaisons de séquence orthologues
- *Approches par 'enhancer trap' (trappes à enhancers), dérivées de travaux chez E. Coli
Piéger des enhancers en utilisant leur fonction comme signal de leur présence..
- *Un système basé sur le développement de la transgénèse chez les mouches

Genetic Transformation of *Drosophila* with Transposable Element Vectors

Gerald M. Rubin and Allan C. Spradling

SCIENCE, VOL. 218, 22 OCTOBER 1982

Summary. Exogenous DNA sequences were introduced into the *Drosophila* germ line. A *rosy* transposon (*ry1*), constructed by inserting a chromosomal DNA fragment containing the wild-type *rosy* gene into a P transposable element, transformed germ line cells in 20 to 50 percent of the injected *rosy* mutant embryos. Transformants contained one or two copies of chromosomally integrated, intact *ry1* that were stably inherited in subsequent generations. These transformed flies had wild-type eye color indicating that the visible genetic defect in the host strain could be fully and permanently corrected by the transferred gene. To demonstrate the generality of this approach, a DNA segment that does not confer a recognizable phenotype on recipients was also transferred into germ line chromosomes.



Introduction du gène *rosy* qui est normalement localisé en 87D sur le chromosome 3 de la mouche. Visualisation directe des copies surnuméraires grâce aux chromosomes polytènes des glandes salivaires.

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

Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*

(position effects/P transposon/enhancers/ β -galactosidase/cell-type markers)

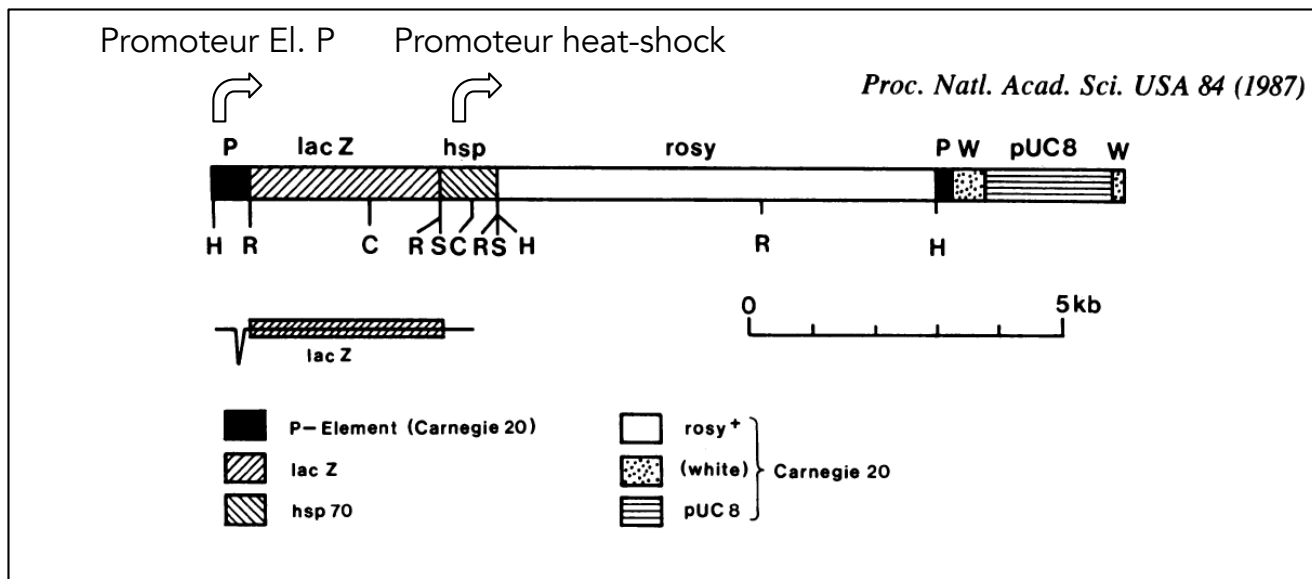
CAHIR J. O'KANE AND WALTER J. GEHRING

Department of Cell Biology, Biozentrum, University of Basel, Klingelbergstrasse 70, CH-4056 Basel, Switzerland

Proc. Natl. Acad. Sci. USA

Vol. 84, pp. 9123–9127, December 1987

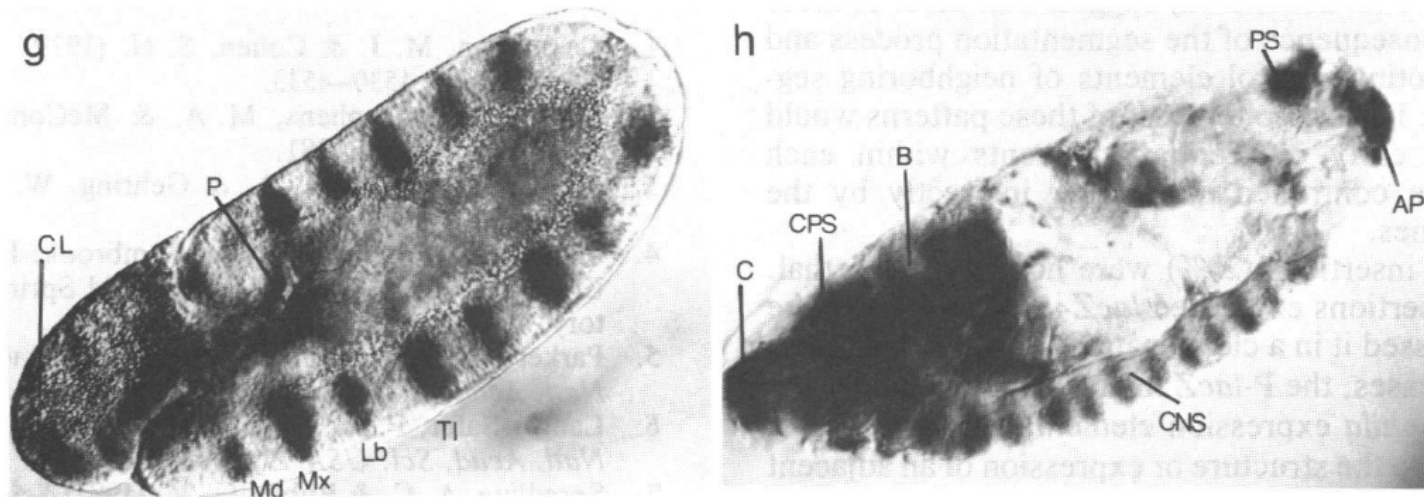
Genetics



ABSTRACT We have developed an approach for the *in situ* detection of genomic elements that regulate transcription in *Drosophila melanogaster*. The approach is analogous to a powerful method of bacterial genetics, the random generation of operon fusions, that enables the isolation and characterization of genes simply by knowing or postulating their pattern of expression; it is not necessary initially to screen for mutant phenotypes. To apply this approach to *Drosophila*, we have used the expression of the *lacZ* gene of *Escherichia coli* from the P-element promoter in germ-line transformant flies to screen for chromosomal elements that can act at a distance to stimulate expression from this apparently weak promoter. Of 49 transformed fly lines obtained, $\approx 70\%$ show some type of spatially regulated expression of the *lacZ* gene in embryos; many of these express *lacZ* specifically in the nervous system. The P-*lacZ* fusion gene is, therefore, an efficient tool for the recovery of elements that may regulate gene expression in *Drosophila* and for the generation of a wide variety of cell-type-specific markers.

Identification des enhancers: approches historiques

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



in the region of the cephalic sensory organs and in a number of cells posteriorly that we have not been able to identify. (g and h) Embryos carrying insertion 5 (cytological map position 56F) at stages 11 and 17, respectively. β -Galactosidase expression begins at stage 10 in segmentally repeated ventral ectodermal stripes. The stripes show a two-segment periodicity in the strength of expression and are in the posterior part of each segment. Other sites of expression at this stage are in the proctodeum, clypeolabrum, and the procephalic neurogenic region (not in focus). In later embryos

*Détection d'un enhancer actif dans les parties postérieures des segments

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

Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*

(position effects/P transposon/enhancers/ β -galactosidase/cell-type markers)

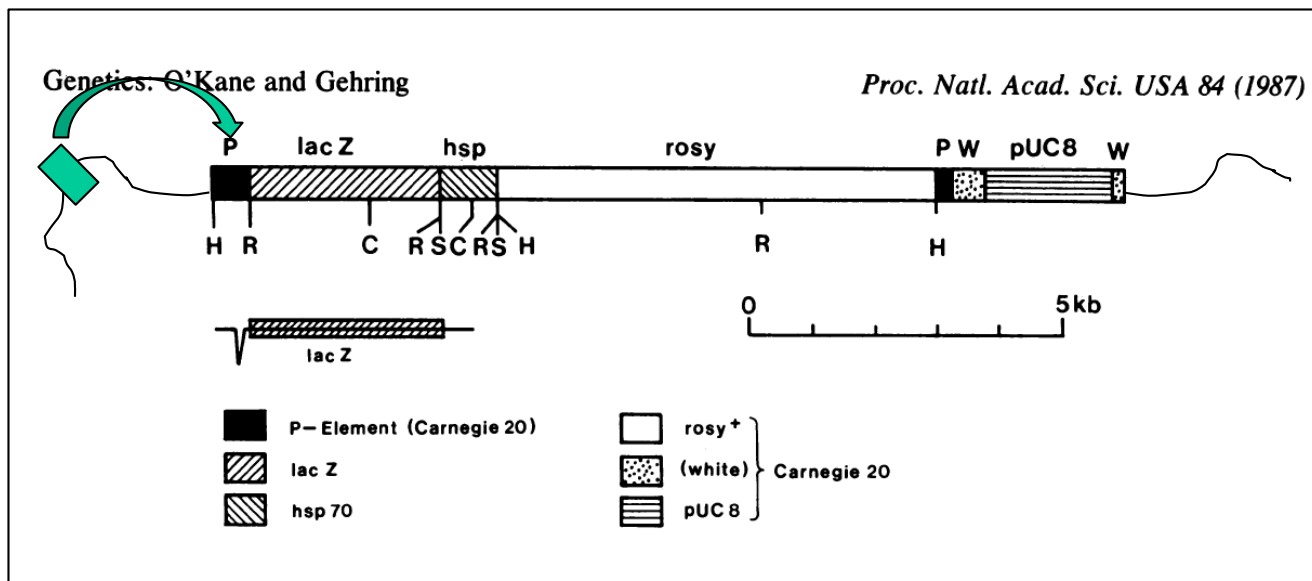
CAHIR J. O'KANE AND WALTER J. GEHRING

Department of Cell Biology, Biozentrum, University of Basel, Klingelbergstrasse 70, CH-4056 Basel, Switzerland

Proc. Natl. Acad. Sci. USA

Vol. 84, pp. 9123–9127, December 1987

Genetics



ABSTRACT We have developed an approach for the *in situ* detection of genomic elements that regulate transcription in *Drosophila melanogaster*. The approach is analogous to a powerful method of bacterial genetics, the random generation of operon fusions, that enables the isolation and characterization of genes simply by knowing or postulating their pattern of expression; it is not necessary initially to screen for mutant phenotypes. To apply this approach to *Drosophila*, we have used the expression of the *lacZ* gene of *Escherichia coli* from the P-element promoter in germ-line transformant flies to screen for chromosomal elements that can act at a distance to stimulate expression from this apparently weak promoter. Of 49 transformed fly lines obtained, $\approx 70\%$ show some type of spatially regulated expression of the *lacZ* gene in embryos; many of these express *lacZ* specifically in the nervous system. The P-*lacZ* fusion gene is, therefore, an efficient tool for the recovery of elements that may regulate gene expression in *Drosophila* and for the generation of a wide variety of cell-type-specific markers.

■ Enhancer (piégé) ayant une spécificité de 'demi-segment postérieur'

Identification des enhancers: approches historiques

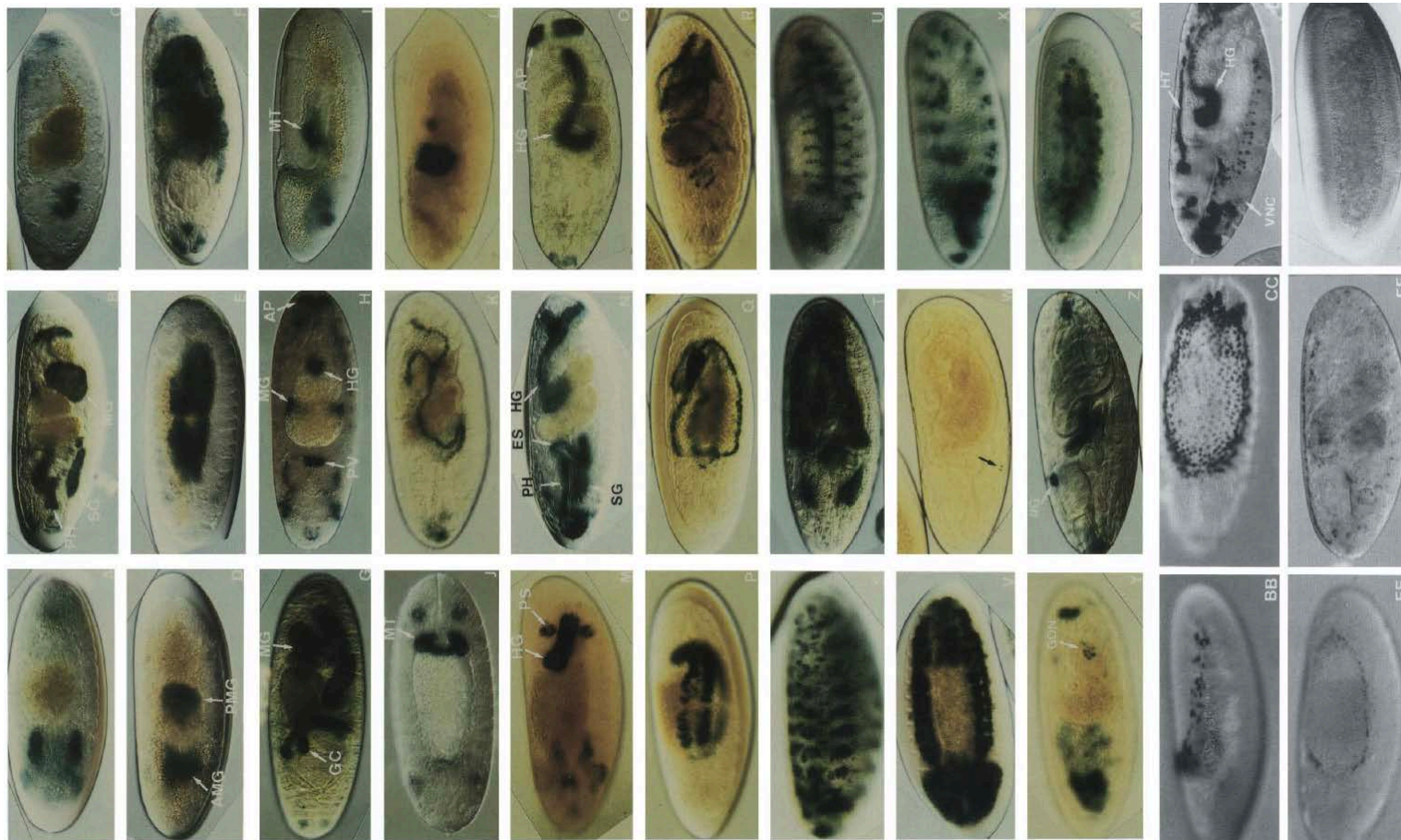
*Approches par 'enhancer trap' (trappes à enhancers) et 'gene trap' (trappe à gènes)

P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*

Hugo J. Bellen,¹ Cahir J. O'Kane,² Clive Wilson, Ueli Grossniklaus, Rebecca Kurth Pearson, and
Walter J. Gehring

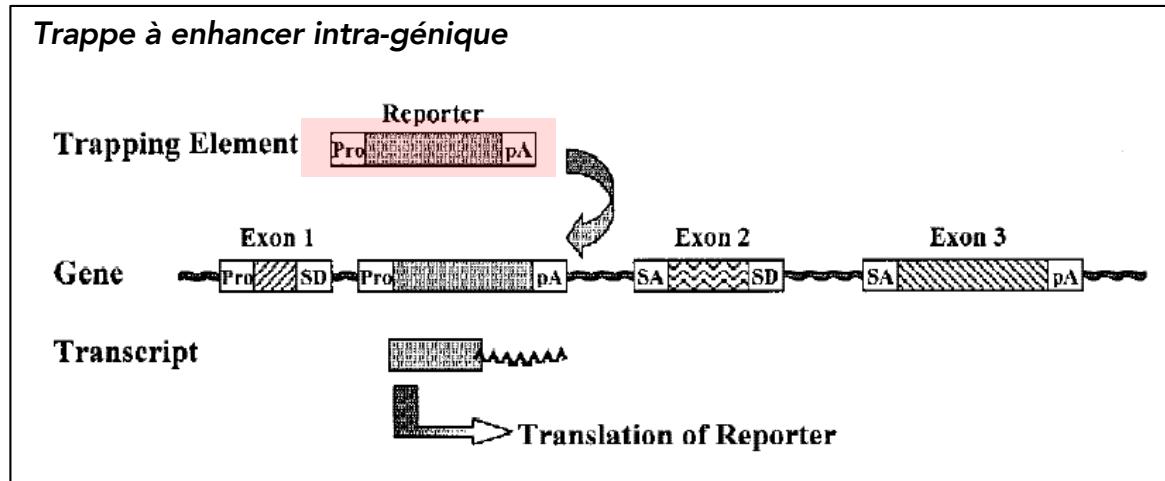
Department of Cell Biology, Biozentrum, University of Basel, CH 4056 Basel, Switzerland

GENES & DEVELOPMENT 3:1288–1300 © 1989



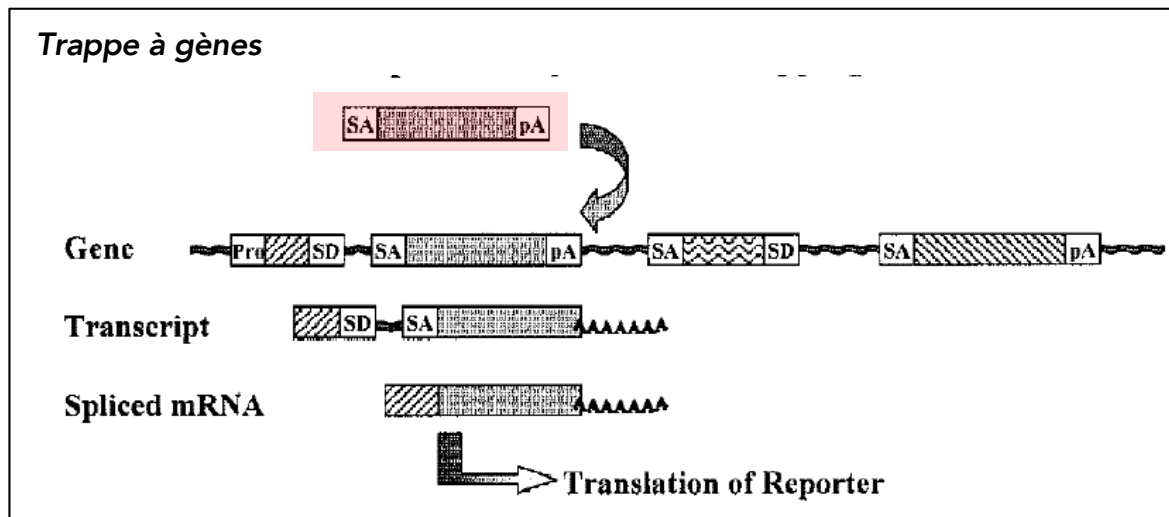
Identification des enhancers: approches historiques

*Approches par 'enhancer trap' (trappes à enhancers) et 'gene trap' (trappe à gènes)



Durik et al., *Genome Research*, 1999

Un vecteur **enhancer-trap** peut également s'intégrer à l'intérieur d'introns (dans un gène). Dans ce cas, l'expression du reporter sera celle du gène et le gène sera interrompu (mutant hypomorphe?)



Un vecteur **enhancer-trap** modifié peut devenir une trappe à gène car un site accepteur d'épissage permet de remonter en séquence vers l'identité du gène en question grâce à un ARN chimérique.

Pro: Promoteur; pA: site de polyadénylation; SD: site donneur d'épissage; SA: site accepteur d'épissage

**Visualisation des enhancers chez les mammifères*

Développement du gène 'reporter' LacZ

The EMBO Journal vol.5 no.12 pp.3133–3142, 1986

Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos

**Joshua R.Sanes, John L.R.Rubenstein¹ and
Jean-François Nicolas²**

Department of Anatomy and Neurobiology, Washington University Medical Center, St. Louis, MO 63110, USA, and ²Unité de Genetique cellulaire de l'Institut Pasteur, Unite associée CNRS 1148, 25, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

¹Present address: Department of Psychiatry, Stanford Medical Center, Stanford, CA 94305, USA

Communicated by F.Jacob

*Approches par 'enhancer trap' (trappes à enhancers; trappe à gènes)

*Transfert rapide des technologies chez les mammifères, suivant les progrès de la transgénèse (début des années 1980). **Introduction du gène *LacZ* en 1986 (virus)**

The EMBO Journal vol.5 no.12 pp.3133–3142, 1986

Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos

Joshua R.Sanes, John L.R.Rubenstein¹ and Jean-François Nicolas²

Department of Anatomy and Neurobiology, Washington University Medical Center, St. Louis, MO 63110, USA, and ²Unité de Genetique cellulaire de l'Institut Pasteur, Unité associée CNRS 1148, 25, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

¹Present address: Department of Psychiatry, Stanford Medical Center, Stanford, CA 94305, USA

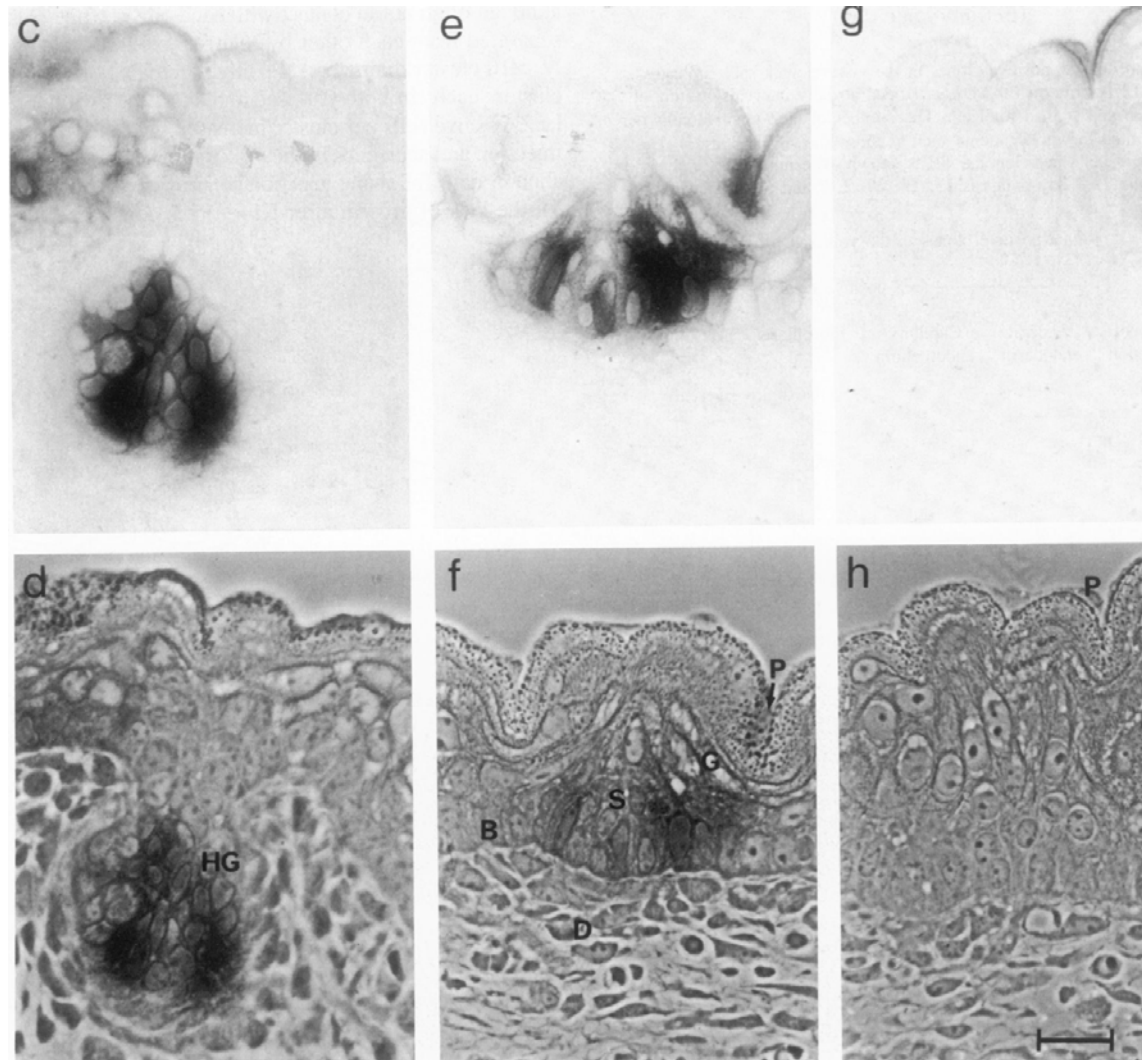
Communicated by F.Jacob

Injection of the lacZ retrovirus into mouse embryos

Concentrated LZ1 virus (0.2–0.5 μ l, or a few hundred virions) was injected through the uterine wall into E7–11 embryos. Two to eight days later, the embryos and extra-embryonic membranes were dissected, fixed, and stained for lacZ. We began by seeking infected cells in the skin, visceral yolk sac, and amnion because these tissues are thin, flat and easy to examine as whole mounts. Table II shows that 60% of the embryos survived in-

We show that a gene introduced into cells of mouse embryos by a retrovirus can serve as a heritable marker for the study of cell lineage *in vivo*. We constructed a defective recombinant retrovirus in which the *Escherichia coli* β -galactosidase (*lacZ*) gene is inserted in the genome of a Muloney murine leukemia virus (M-MuLV). Expression of lacZ was detected with a histochemical stain that can be applied to cultured cells and embryonic tissue. Infection of cultured cells showed that lacZ has no detectable deleterious effects on cell viability or growth, that the enzyme is stably expressed in the progeny of infected cells for many generations in the absence of selective pressure, and that the virus can induce lacZ in a variety of cell types. Following injection of the virus into mid-gestation mouse embryos, clones of lacZ-positive cells were detected in skin, skull, meninges, brain, visceral yolk sac, and amnion. We identified the cell types comprising a series of lacZ-positive clones in the visceral yolk sac and skin to learn the lineage relationships of the labelled cells. In each tissue, we obtained evidence that several cell types have a pluripotential ancestor and that cell fate is progressively restricted as development proceeds.

Key words: cell lineage/lacZ/retrovirus/skin/visceral yolk sac



Des clones de cellules infectées par le virus portant le gène *lacZ* sont détectés dans des sections de peau. Le produit du gène reporter est transmis, stable et détectable

Fig. 7. Clonal analysis in the skin. (a) Lac-Z-positive cell types in 10 clones that were embedded in plastic and semi-serially cross sectioned. (b) Lineage diagram constructed from the results in (a). '0' indicates that no hair germ was present in the tissue fragment. (c–h) Sections from clones #2 (c,d), 3 (e,f) and 10 (g,h), photographed with brightfield (c,e,g) and phase (d,f,h) optics. **B**, stratum basale; **S**, stratum spinosum; **G**, stratum granulosum; **P**, periderm; **HG**, hair germ; **D**, dermis; **BL**, basal lamina. Bar is 20 μ m.

Identification des enhancers: approches historiques

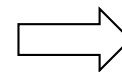
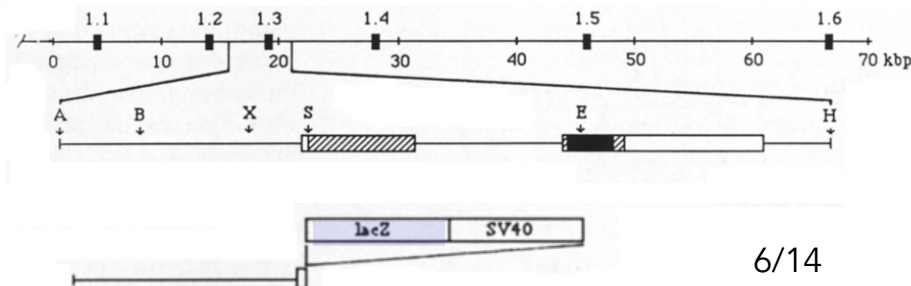
*En 1988, la Coloration *lacZ in embryo* permet de voir directement la spécificité spatio-temporelle du fonctionnement d'un gène/enhancer

Neuron, Vol. 1, 679-691, October, 1988, Copyright © 1988 by Cell Press

Spatial Regulation of Homeobox Gene Fusions in the Embryonic Central Nervous System of Transgenic Mice

Jozsef Zakany, Christopher K. Tuggle, Mayuri D. Patel, and M. Chi Nguyen-Huu

Departments of Microbiology and Urology
College of Physicians and Surgeons
Columbia University
New York, New York 10032



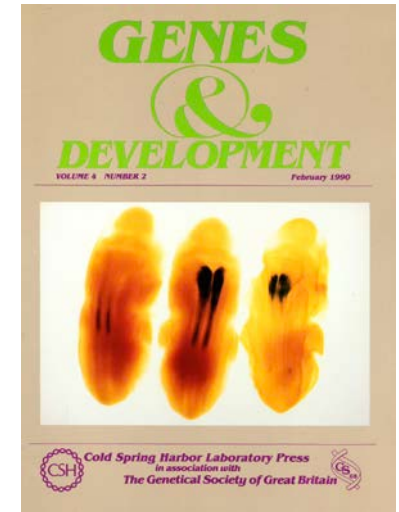
La coloration est stable, héritable et reflète une accumulation de protéines plus qu'une activité transcriptionnelle. Elle peut être présente dans des cellules qui n'exprime plus le gène/enhancer en question.

Region-specific enhancers near two mammalian homeo box genes define adjacent rostrocaudal domains in the central nervous system

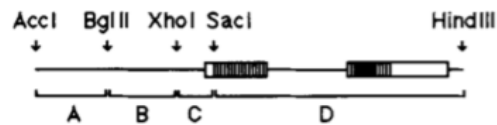
Christopher K. Tuggle,^{1,4} Jozsef Zakany,^{1,2} Luciano Cianetti,³ Cesare Peschle,³ and M. Chi Nguyen-Huu^{1,4}

¹Departments of Microbiology and Urology, Columbia University, New York, New York 10032 USA; ²Institute of Genetics of the Hungarian Academy of Sciences, 6701 Szeged, Hungary; ³Department of Hematology-Oncology, Istituto Superiore di Sanita, I-00161 Rome, Italy.

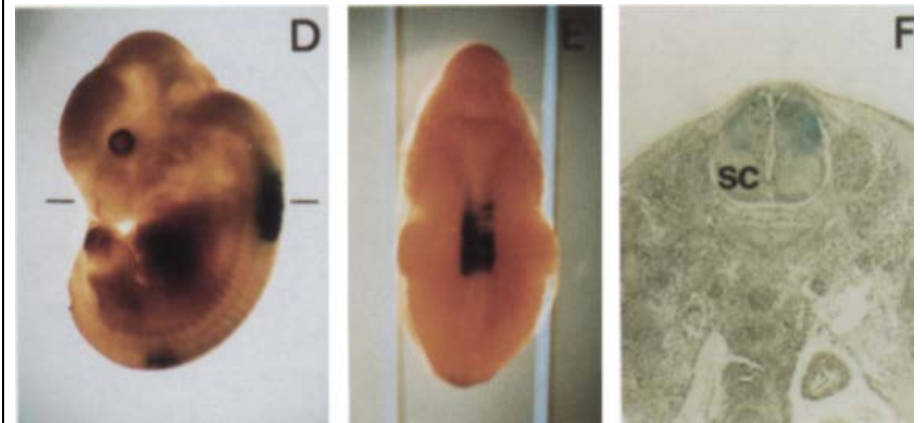
GENES & DEVELOPMENT 4:180-189 © 1990 by Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 0890-9369/90



Gène Hox1-3 (Hoxa5)



Hox 1.3 Gene	Expression Patterns	
	Brachial SC	Cervical SC
B/1.3/lacZ	6/14 ^a	---
Bflip/1.3/lacZ	6/18 ^b	---
B/hsp68/lacZ	5/11 ^c	---
1.3/lacZ	0/6 ^a	---



**Adaptation du pièges à enhanceurs aux mammifères..*

Le développement de cet outil chez les mammifères est beaucoup plus compliqué car:

*Les fréquences d'intégrations de transgènes sont basses

*Le nombre d'animaux par portée est bas

*Difficultés techniques (injections)

*La génétique n'est pas celle de la mouche etc.

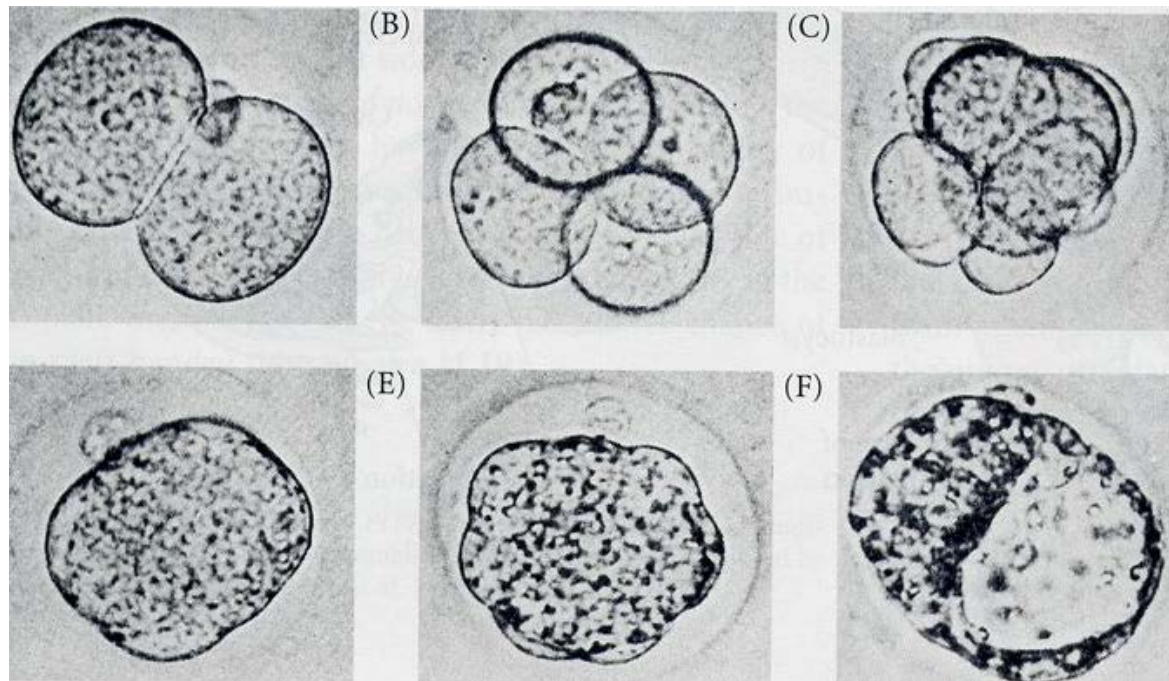
DONC: Recours aux cellules ES

Identification des enhancers: approches historiques

*Fin des années 1980, la validation d'enhancers et leur description pendant le développement de souris transgénique devient possible. Mais l'utilisation directe de la transgénèse par injection dans l'oeuf de souris pour la détection de nouveaux enhancers est compliquée (fréquence, logistique etc)

*Passage aux cellules souches embryonnaires (ES) comme système alternatif, également pour développer le 'enhancer trap'.

*Emergence des cellules souches embryonnaires (début 1980's), souris: (1981)
Evans, Kaufman and Martin.*

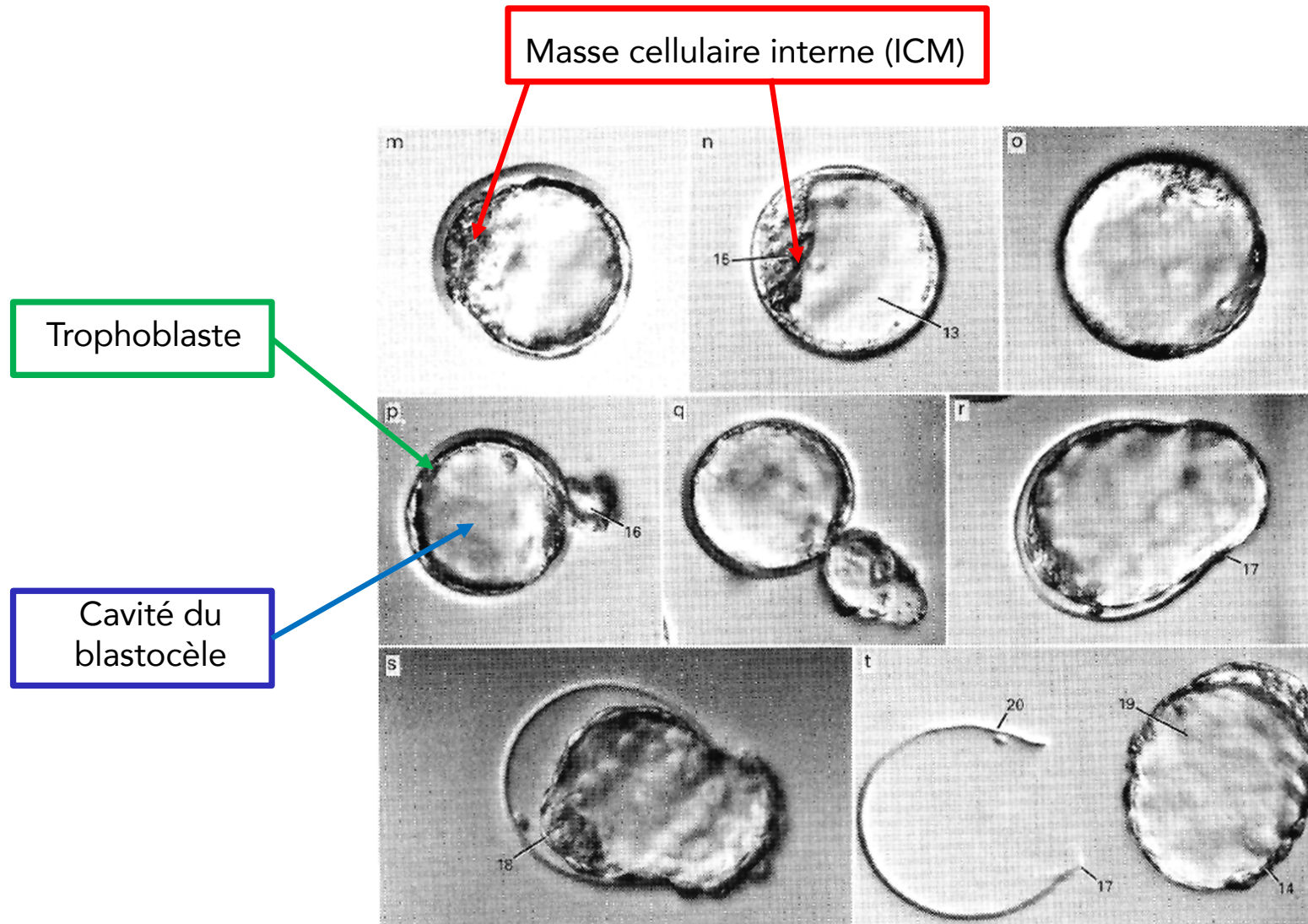


'Developmental Biology', Scott Gilbert (Sinauer) Campbell

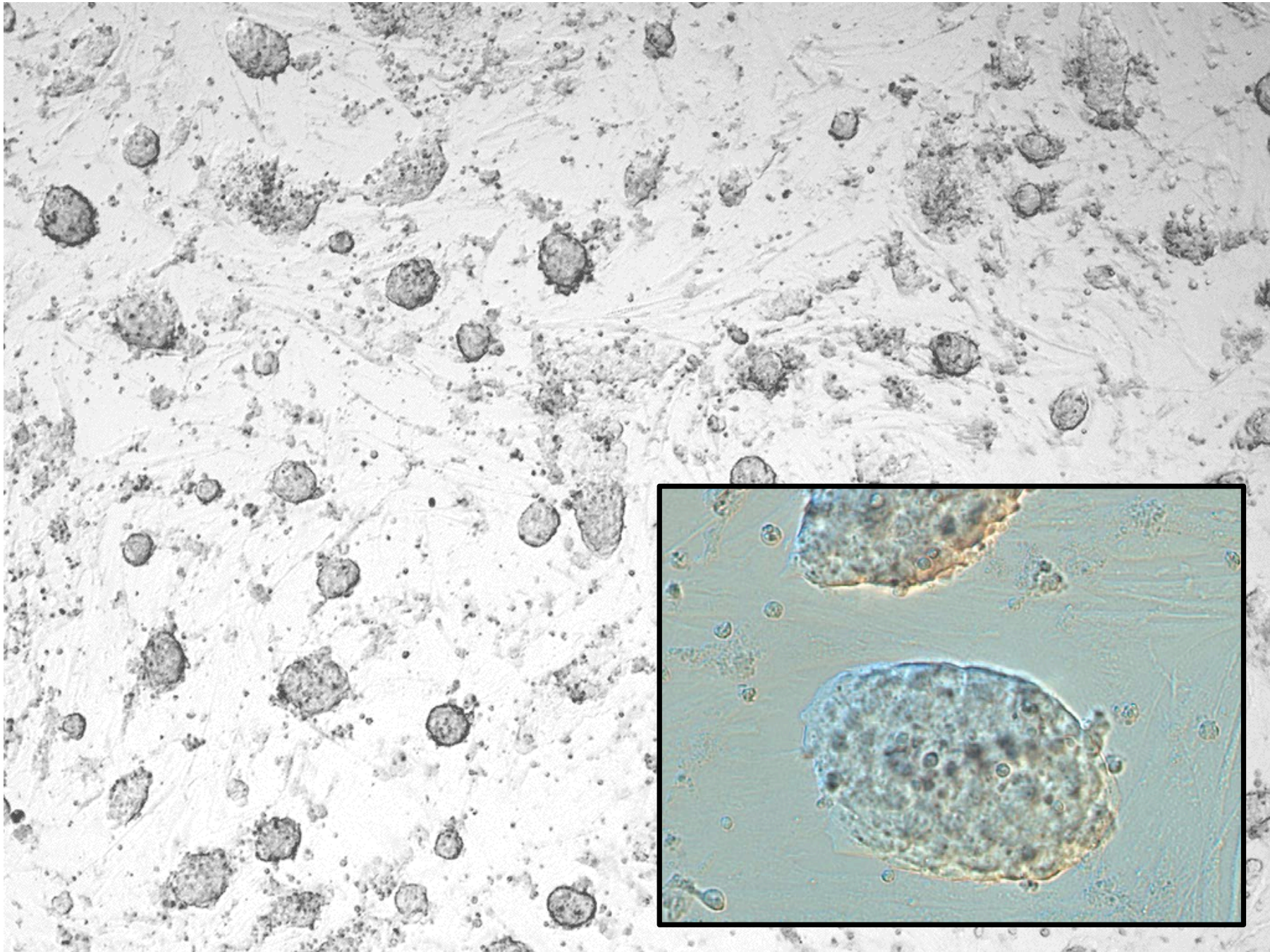
Cellules souches embryonnaires (ESc)

Emergence des cellules souches embryonnaires (début 1980's)

Blastocyste: éclosion *in vitro*, sortie de la zone pellucide



Cellules souches embryonnaires (ESc)



Cellules souches embryonnaires et souris chimères

*Production d'une souris à partir de cellules ES modifiées/ La route des cellules souches (d'autres 'routes' par les cellules souches sont possibles aujourd'hui; embryons 4n..)

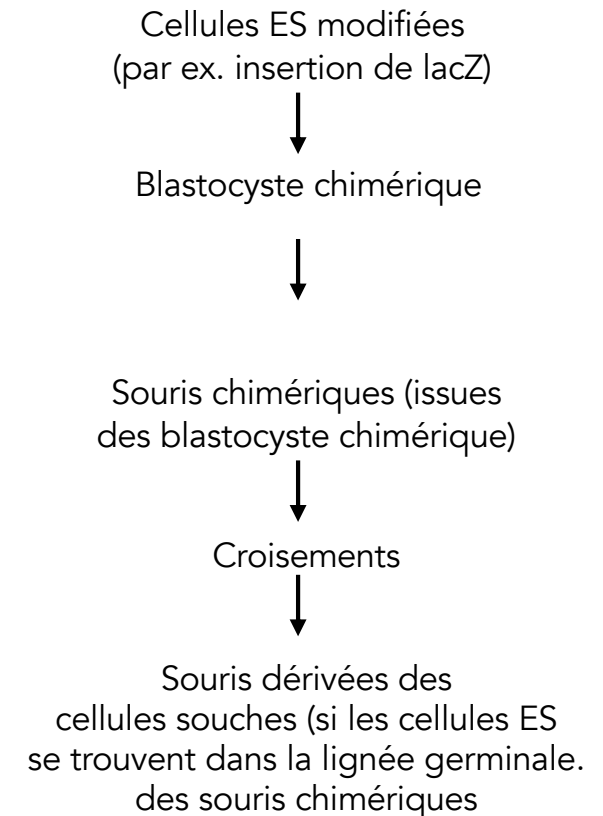
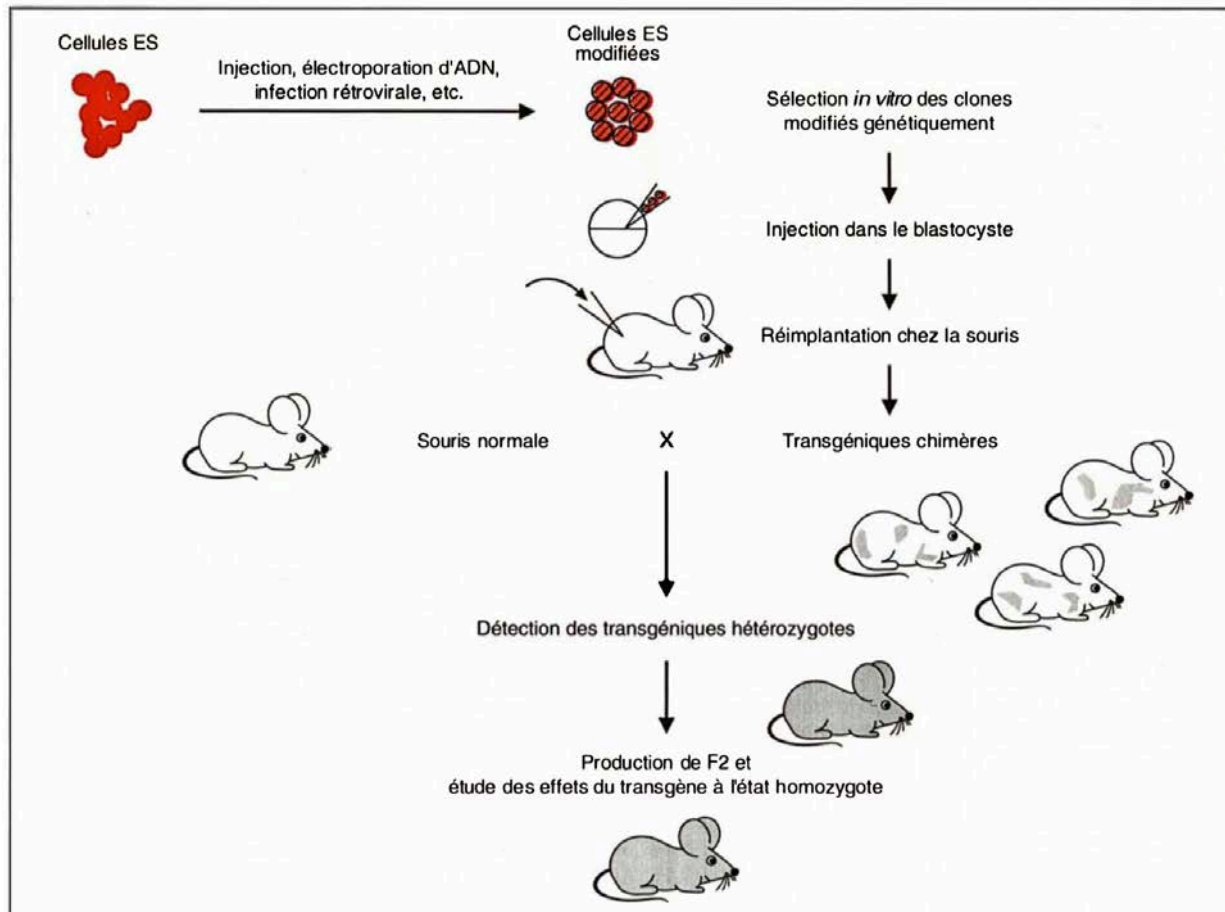


Figure 1. **Transgénèse utilisant les cellules ES.** Les cellules ES cultivées *in vitro* peuvent être modifiées génétiquement par divers moyens (mutagenèse, transfection d'ADN, infection rétrovirale, etc.). Les clones modifiés sont sélectionnés *in vitro* et injectés dans un blastocyste. Après réimplantation chez la souris, on obtient des souris chimères. Ces dernières sont croisées avec une souris normale pour identifier des souris hétérozygotes. La production de F2 permet d'étudier les effets du transgène à l'état homozygote.

DONC: production d'une souris modifiée à partir de cellules souches ES modifiées

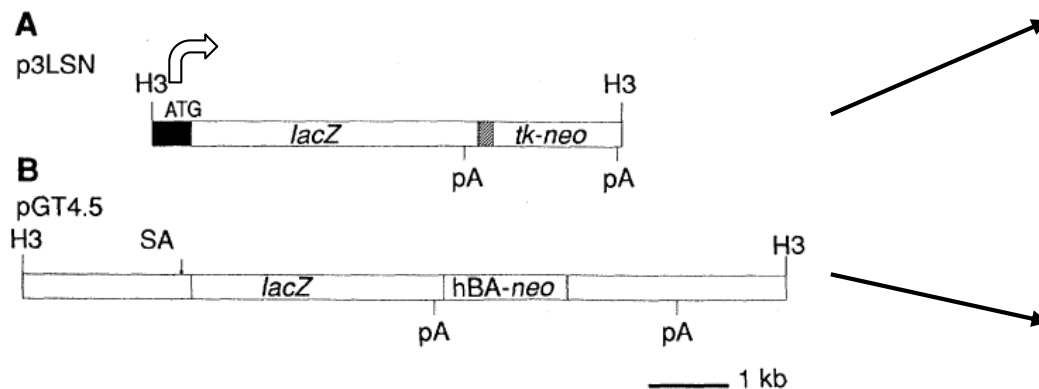
Identification des enhancers: approches historiques

*Approches par 'enhancer trap' (trappes à enhancers) et 'gene trap' (trappe à gènes) chez les mammifères par utilisation des cellules ES comme véhicule

Mouse Embryonic Stem Cells and Reporter Constructs to Detect Developmentally Regulated Genes

ACHIM GOSSLER, ALEXANDRA L. JOYNER, JANET ROSSANT,
WILLIAM C. SKARNES
Science, avril 1989

Deux vecteurs différents:



A. Trappe à enhancers, avec un promoteur *hsp68* de souris, un reporteur *lacZ*, un site de terminaison polyA, suivi par une cassette de sélection

B. Trappe à gènes, avec un morceau de gène murin (*en-2*) suivi par un reporteur *lacZ/polyA* après un site accepteur d'épissage. Puis une cassette de résistance et un signal polyA.

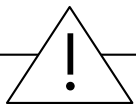
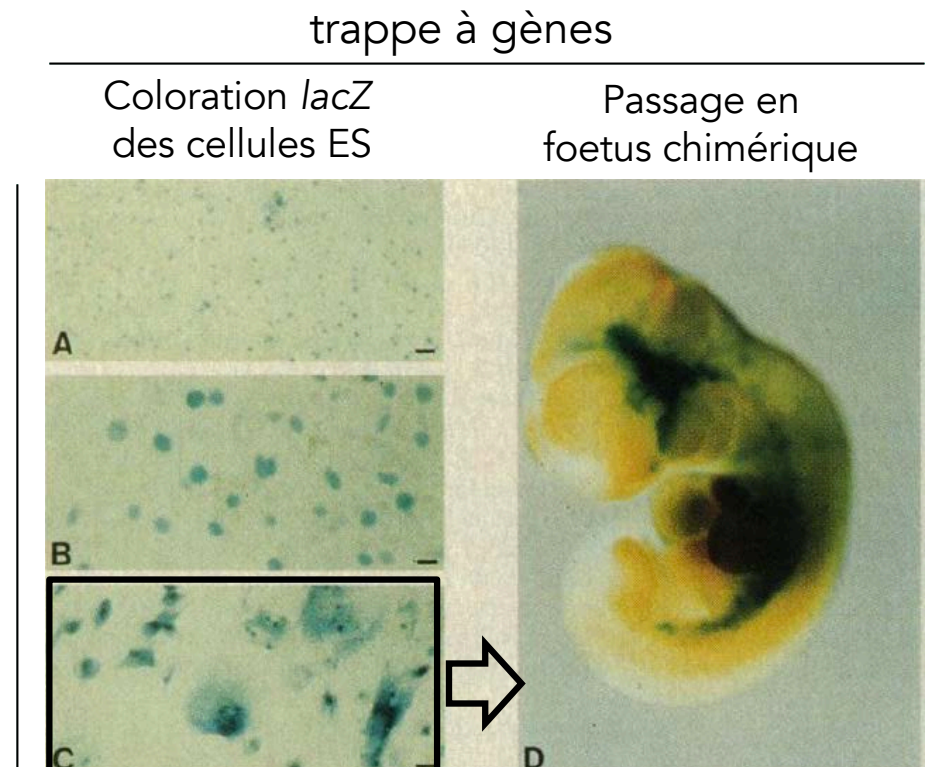
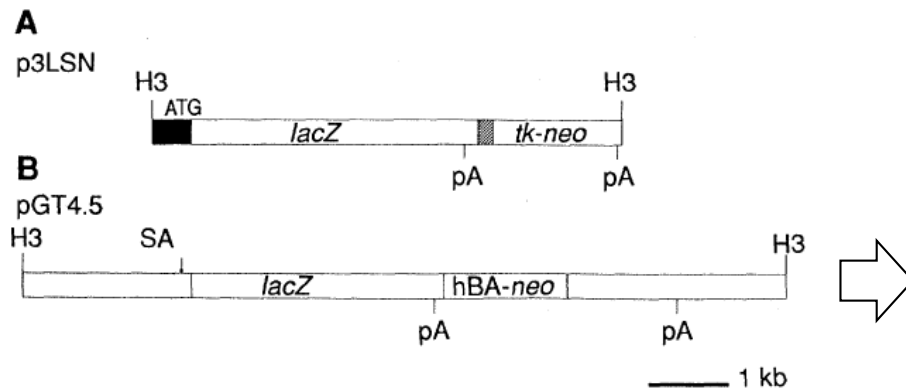
La néomycine induit une résistance des cellules ES transformées au traitement par le G418 (antibio. généticine)

Identification des enhancers: approches historiques

*Approches par 'enhancer trap' (trappes à enhancers) et 'gene trap' (trappe à gènes) chez les mammifères par utilisation des cellules ES comme véhicule

Mouse Embryonic Stem Cells and Reporter Constructs to Detect Developmentally Regulated Genes

ACHIM GOSSLER, ALEXANDRA L. JOYNER, JANET ROSSANT,
WILLIAM C. SKARNES



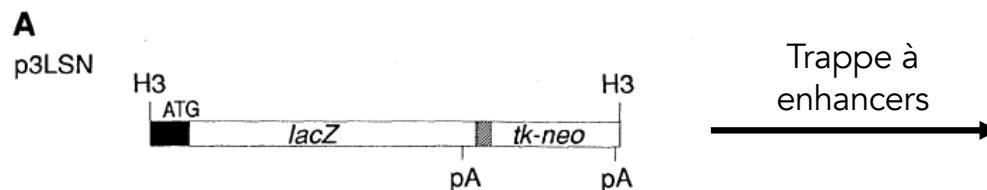
Seuls les gènes ou les enhancers actifs dans les cellules ES peuvent être piégés en utilisant la coloration *lacZ*. Donc nécessité de repiquer des clones de cellules ES au hasard (mais résistants à la néomycine) et de tester le *lacZ* dans des embryons à des âges différents

Identification des enhancers: approches historiques

*Approches par 'enhancer trap' (trappes à enhancers) et 'gene trap' (trappe à gènes) chez les mammifères par utilisation des cellules ES comme véhicule

Mouse Embryonic Stem Cells and Reporter Constructs to Detect Developmentally Regulated Genes

ACHIM GOSSLER, ALEXANDRA L. JOYNER, JANET ROSSANT,
WILLIAM C. SKARNES



Conclusion: chez les mammifères, l'approche historique 'trappe à enhancers' *in vivo* est possible mais laborieuse et pas très efficace. Approche remplacée avec l'avènement de la génomique soit par une **version plus ciblée et à haut débit**, soit par du **profilage épigénétique** conduisant aux approches actuelles.

Résultats généraux

A variety of *lacZ* activation patterns were observed in chimaeras generated from the various cell lines. Four of the five enhancer trap cell lines that did not express the *lacZ* gene in ES cells also showed no expression in day 9 embryos and were not examined further. In three gene trap cell lines, *lacZ*

The enhancer trap vector was electroporated (9) into the male ES cell line D3 (10). Sixty independent G418-resistant (*neo*^R) ES cell lines were established and were tested for *lacZ* expression. Six of these lines expressed *lacZ* in ES cells. By DNA blot analysis, 70% (11 of 16 tested) were found to contain one to two copies of the intact *lacZ* gene, indicating that as many as one in seven *neo*^R colonies express *lacZ*. This high incidence of *lacZ* expression in stem cells may indicate that we selected in part for integration events into loci that are active in ES cells because expression of *neo* was required to establish the cell lines.

Function-based identification of mammalian enhancers using site-specific integration

Diane E Dickel¹, Yiwen Zhu¹, Alex S Nord¹, John N Wylie^{2,3}, Jennifer A Akiyama¹, Veena Afzal¹, Ingrid Plajzer-Frick¹, Aileen Kirkpatrick^{4,5}, Berthold Göttgens^{4,5}, Benoit G Bruneau^{2,3,6,7}, Axel Visel^{1,8,9} & Len A Pennacchio^{1,8}

NATURE METHODS | ADVANCE ONLINE PUBLICATION | 1 (2014)

Trappe à enhancers
ciblée, fonctionnelle
et à haut-débit

Principe général:

*Identifier un segment d'ADN d'intérêt (par exemple un BAC –*Bacterial Artificial Chromosome*- contenant un gène particulier.

*Fragmenter cet ADN et le cloner en amont d'un gène reporter (protéine fluorescente), dans un vecteur de recombinaison spécifique au locus *Hprt*.

*Trier les cellules fluorescentes, dans des conditions de différenciations variables

*Isoler les cellules intéressantes et séquencer l'ADN cloné (enhancer).

Mélange entre le côté aléatoire de la *trappe à enhancer* et une approche plus ciblée dans le choix de l'ADN et plus efficace dans la détection

Function-based identification of mammalian enhancers using site-specific integration

Diane E Dickel¹, Yiwen Zhu¹, Alex S Nord¹, John N Wylie^{2,3}, Jennifer A Akiyama¹, Veena Afzal¹, Ingrid Plajzer-Frick¹, Aileen Kirkpatrick^{4,5}, Berthold Göttgens^{4,5}, Benoit G Bruneau^{2,3,6,7}, Axel Visel^{1,8,9} & Len A Pennacchio^{1,8}

NATURE METHODS | ADVANCE ONLINE PUBLICATION | 1 (2014)

Trappe à enhancers
ciblée, fonctionnelle
et à haut-débit

Principe général:

*Identifier un segment d'ADN d'intérêt (par exemple un BAC –*Bacterial Artificial Chromosome*- contenant un gène particulier.

*Fragmenter cet ADN et le cloner en amont d'un gène reporter (protéine fluorescente), dans un vecteur de recombinaison spécifique au locus *Hprt*.

Les cellules ES mâles sont mutantes pour le gène de l'*Hypoxanthine-phosphoribosyl transférase (chromosome X)*. La recombinaison du transgène reconstitue également le gène *Hprt* qui dès lors peut résister au traitement par le milieu de culture HAT. Par conséquent, seules les cellules ayant intégré le transgène au bon endroit survivront au traitement.

REVIEW INSIGHT

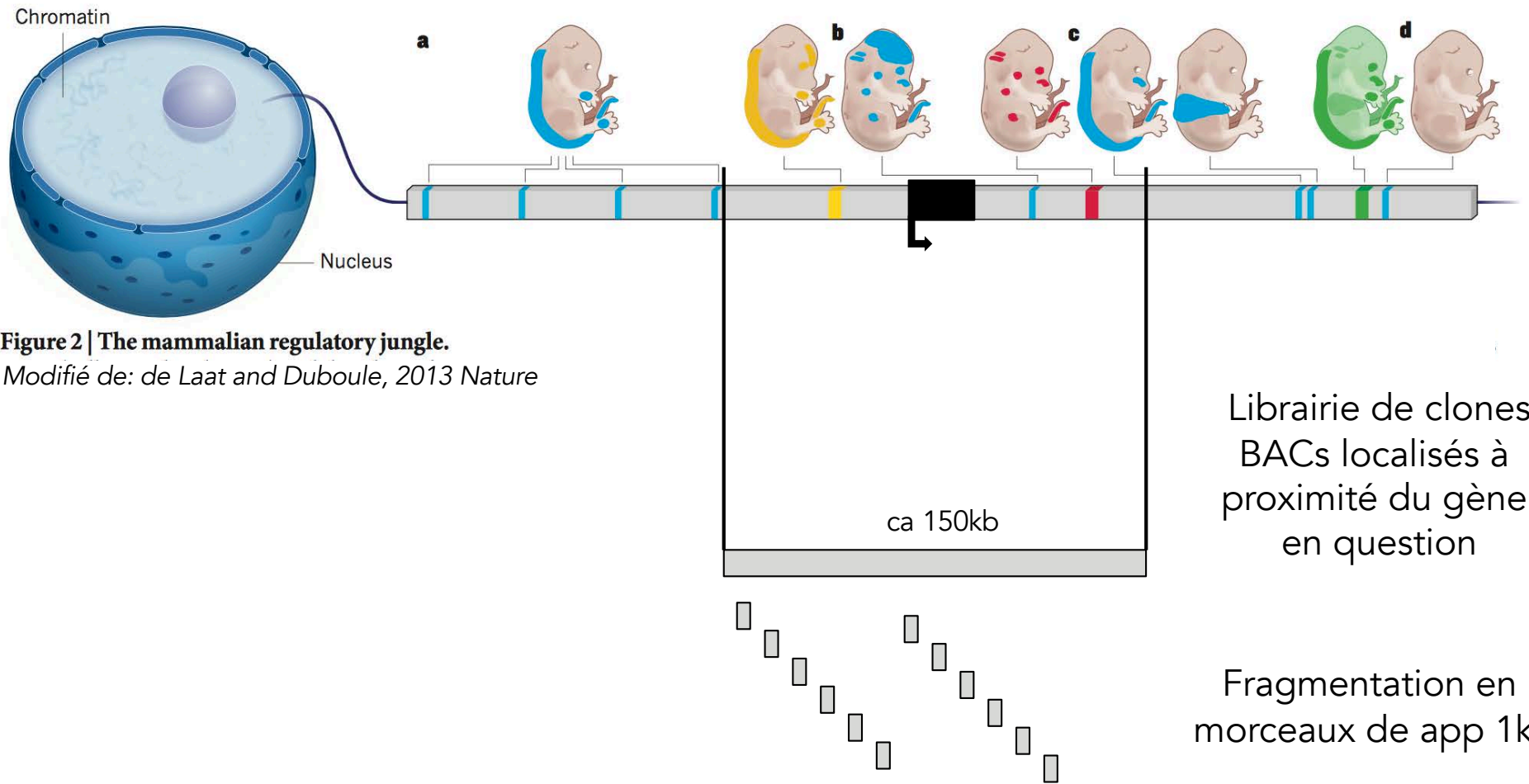


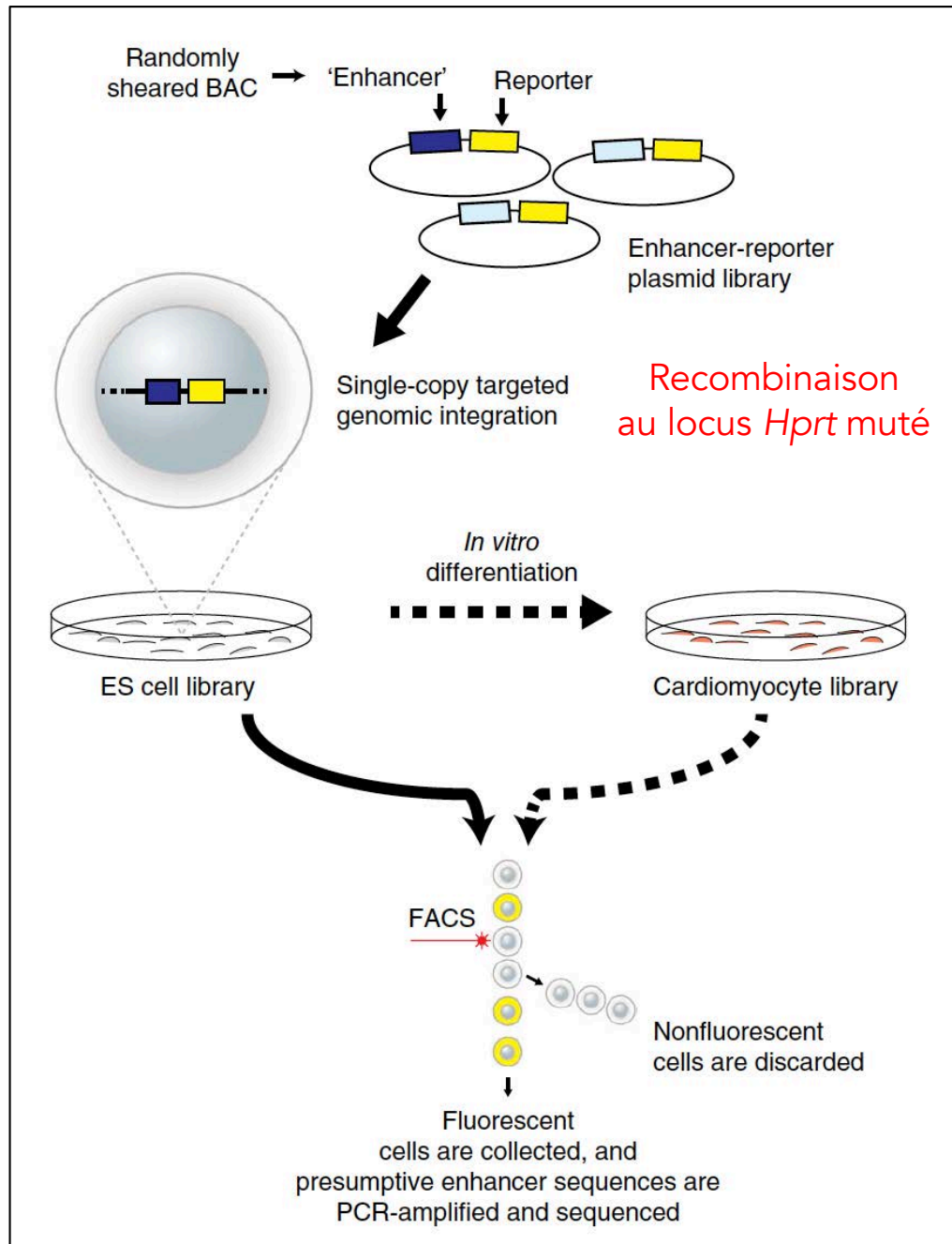
Figure 2 | The mammalian regulatory jungle.
Modifié de: de Laat and Duboule, 2013 Nature

Librairie de clones
BACs localisés à
proximité du gène
en question

Fragmentation en
morceaux de app 1kb

Identification des enhancers: approches actuelles

Dickel et al., (2014) Nature Methods



Clonage des morceaux avec des enhancers potentiels devant un reporter fluorescent



Introduction dans cellules ES et sélection HAT (*Hprt*). Copie unique toujours au même endroit...



Observation de la fluorescence avant et après différenciation des cellules ES



Triage par FACS des cellules fluorescentes et PCR de l'ADN



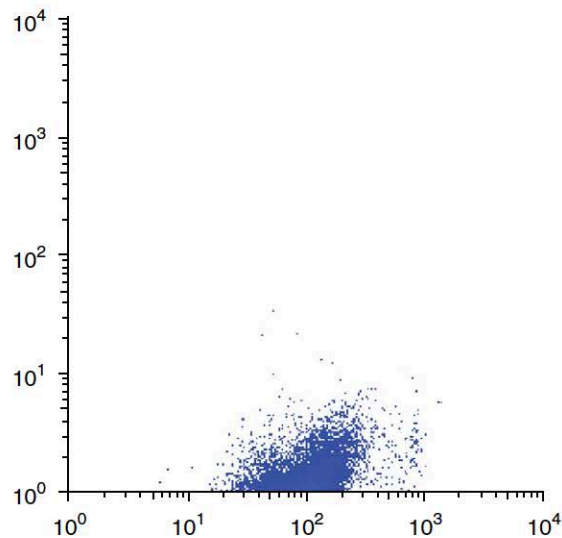
Identification de séquences enhancers spécifiques à un type cellulaire.

Identification des enhancers: approches actuelles

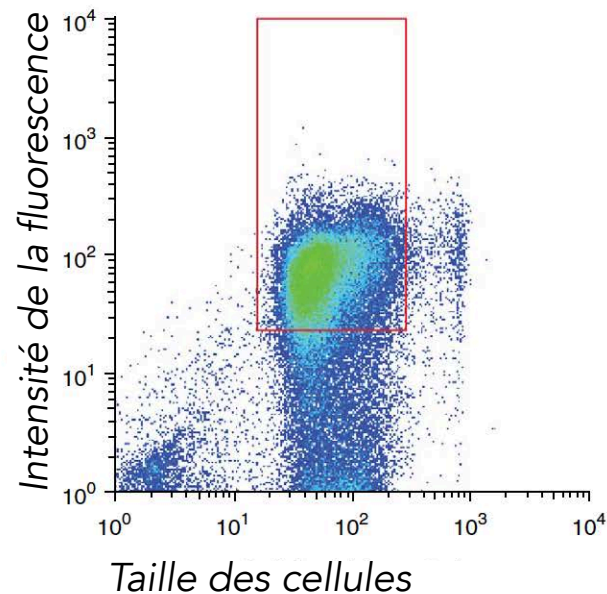
Dickel et al., (2014) Nature Methods

Trieur de cellules (*cell sorter*; FACS)

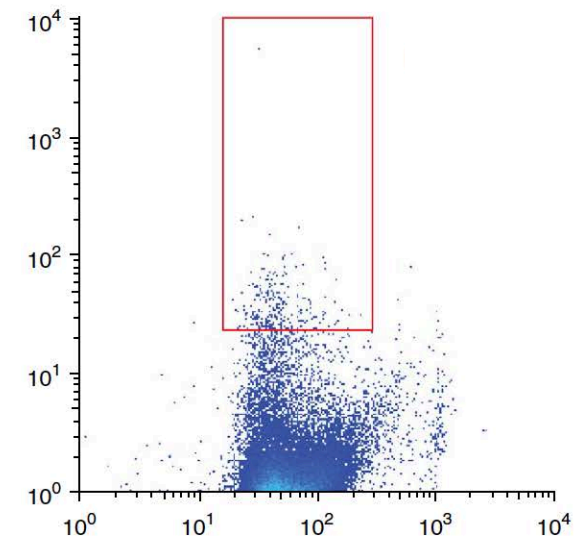
contrôle
négatif



contrôle
positif



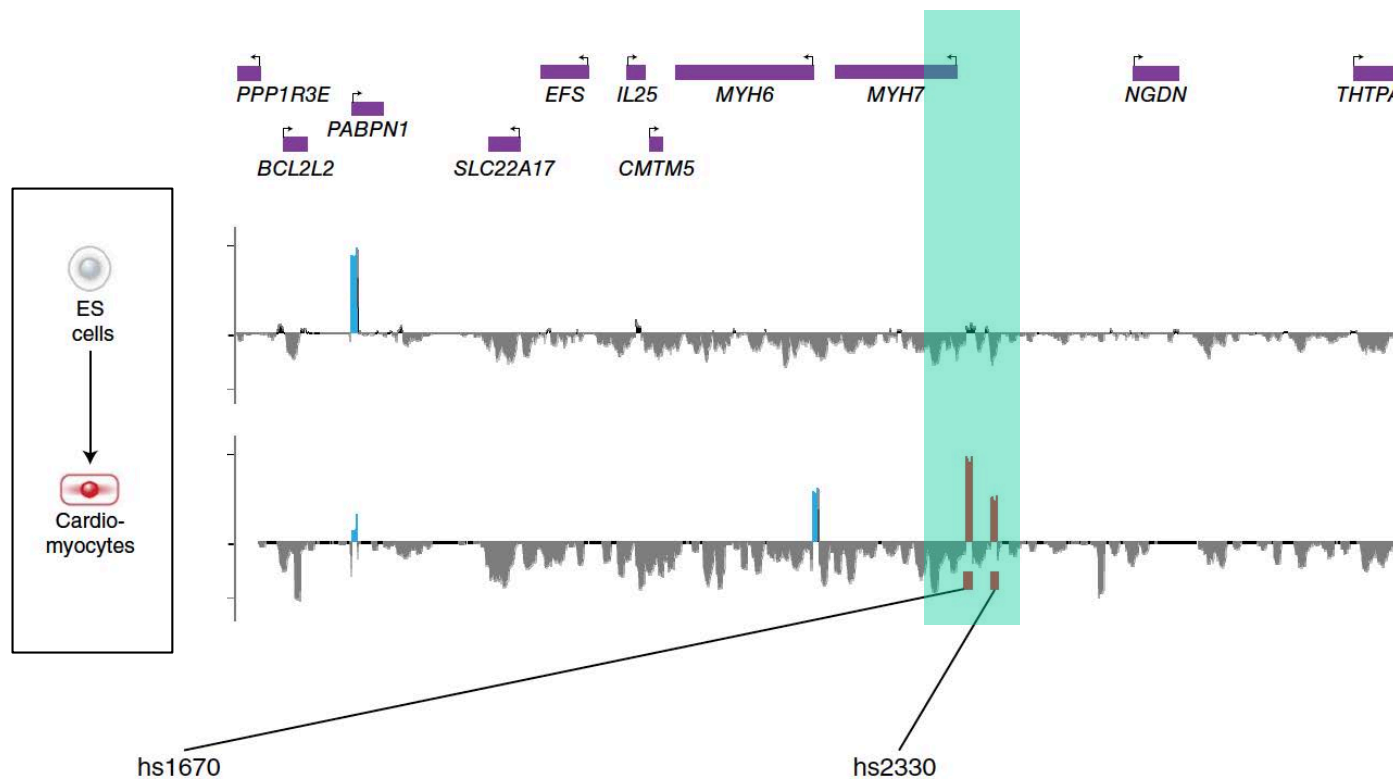
Expérience
(gène *Nanog*)



Expérience de validation du système en utilisant de l'ADN provenant du locus *Nanog*, un gène exprimé dans les cellules ES non-différenciées. Quelques cellules dans la culture ont recombinaison au locus *Hprt* un plamide contenant un enhancer de *Nanog*.

Identification des enhancers: approches actuelles

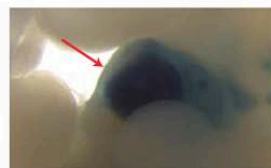
Dans ce cas précis, les deux enhancers se trouvent à proximité des gènes cibles, mais souvent la distance est bien plus grande...



Séquences d'ADN enrichies dans les fractions de cellules fluorescentes

Promoteurs

Enhancers



9/9 embryos



11/14 embryos

Validation *in embryo* par transgénèse/lacZ

Dans ce cas précis, les deux enhancers se trouvent à proximité des gènes cibles, mais souvent la distance est bien plus grande...

..d'où l'importance d'une localisation des enhancers dans les génomes qui permet également leur association avec un (des) gène(s) cible(s). Donc, nécessité d'approches permettant une '*localisation fonctionnelle*'. En effet, les enhancers peuvent se trouver à de longues distances de leurs gènes cibles, parfois même avec des gènes non-cibles entre les deux.

*Risque de se trouver avec une séquence enhancer orpheline de son gène cible

Importance de la localisation des enhancers dans les génomes, mais également de leur association avec un (des) gène(s) cible(s). Donc, nécessité d'approches permettant une '*localisation fonctionnelle*'. En effet, les enhancers peuvent se trouver à de longues distances de leurs gènes cibles, parfois même avec des gènes non-cibles entre les deux.

*Approches combinées par **profilage épigénétique et interaction physique**

Exemple historique de la nécessité d'une '*localisation fonctionnelle*'

Le cas de la mutation *limb deformity (ld)* et des gènes *formin* et *gremlin*

Nature, 1990; 'back to back'

'Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the *limb deformity* gene

**Richard P. Woychik*, Richard L. Maas*, Rolf Zeller*,
Thomas F. Vogt & Philip Leder**

Department of Genetics, Harvard Medical School,
and Howard Hughes Medical Institute, 25 Shattuck Street,
Boston, Massachusetts 02115, USA

Disruption of formin-encoding transcripts in two mutant *limb deformity* alleles

**Richard L. Maas*, Rolf Zeller*, Richard P. Woychik*,
Thomas F. Vogt & Philip Leder**

Department of Genetics, Harvard Medical School,
and Howard Hughes Medical Institute, 25 Shattuck Street, Boston,
Massachusetts 02115, USA.

Le cas de la mutation *limb deformity* (*ld*) et des gènes *formin* et *gremlin*

Nature, 1990; 'back to back'

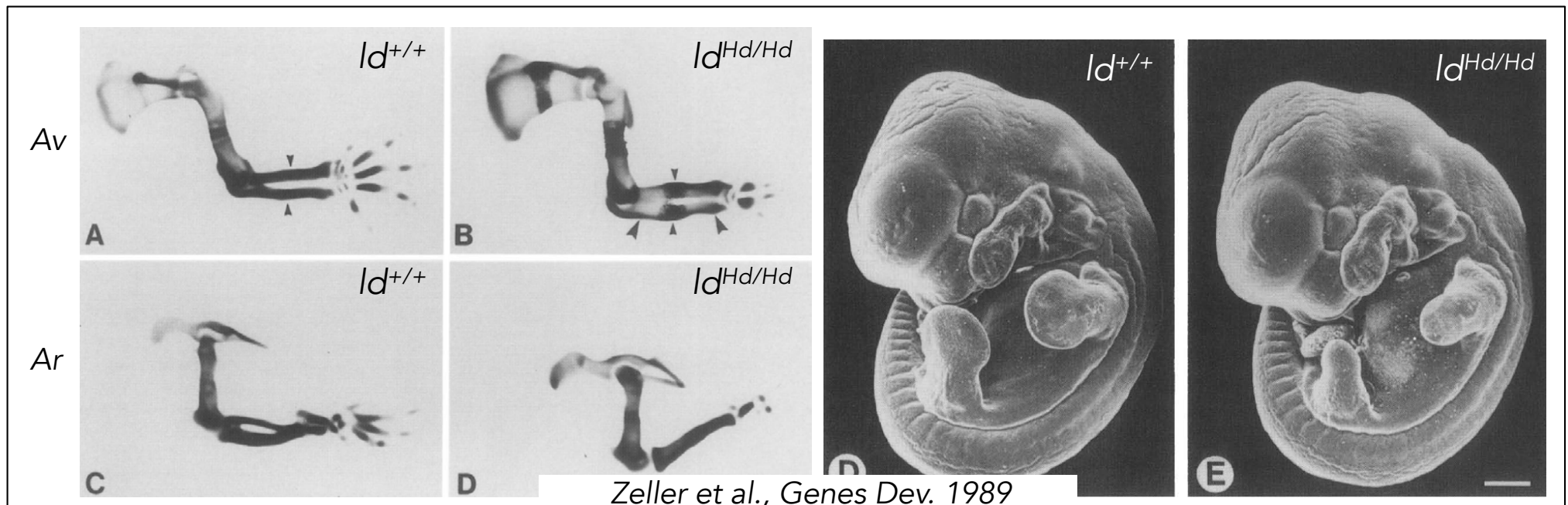
'Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the *limb deformity* gene

Richard P. Woychik*, Richard L. Maas*, Rolf Zeller*,
Thomas F. Vogt & Philip Leder

Disruption of formin-encoding transcripts in two mutant *limb deformity* alleles

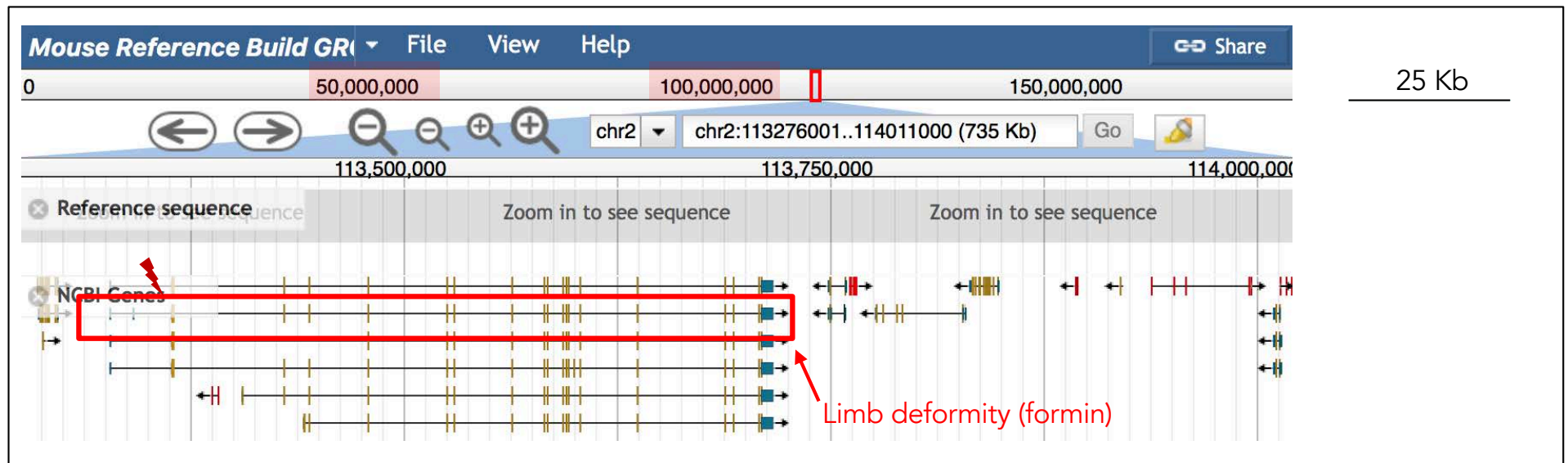
Richard L. Maas*, Rolf Zeller*, Richard P. Woychik*,
Thomas F. Vogt & Philip Leder

- *Mutagenèse par insertion de transgène au locus *limb deformity*, créant un allèle ld^{Hd}
- *Cet allèle est similaire à deux autres allèles décrits à ce locus: ld^U (1960) et ld^{OR} (1962)
- *Des allèles multiples isolés à ce locus car le phénotype anormal touche les membres



Identification des enhancers: localisation...

*Insertion dans le gène '*limb deformity*', dont les protéines sont appelées '*Formins*'

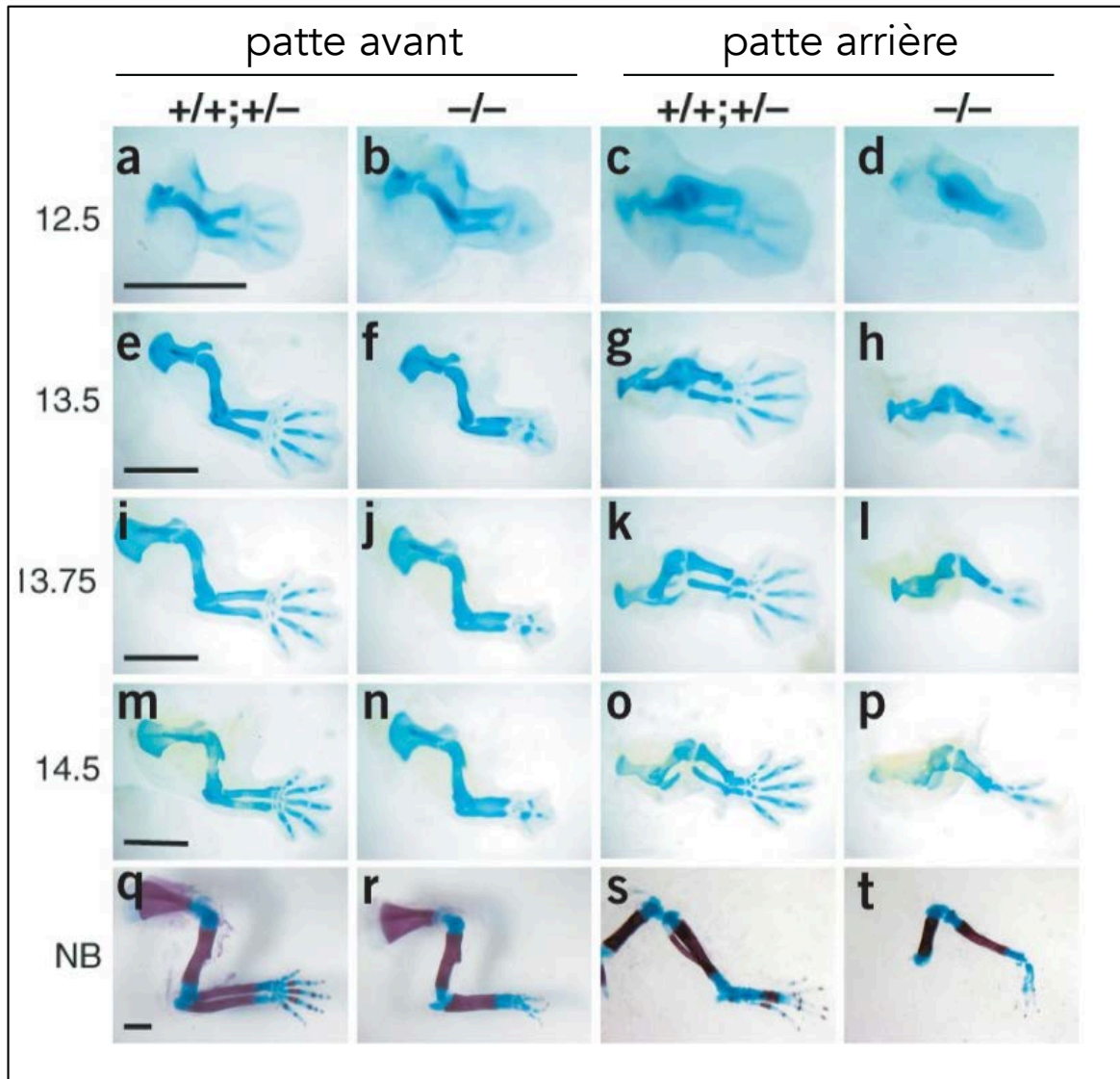


Identification des enhancers: localisation...

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

nature
genetics, 2003

Mustafa K Khokha^{1,3}, David Hsu¹⁻³, Lisa J Brunet¹, Marc S Dionne^{1,2} & Richard M Harland¹



*Pour des raisons différentes et indépendantes du gène *Ld*, le groupe de R. Harland fait une inactivation fonctionnelle d'un autre gène appelé '*Gremlin*'

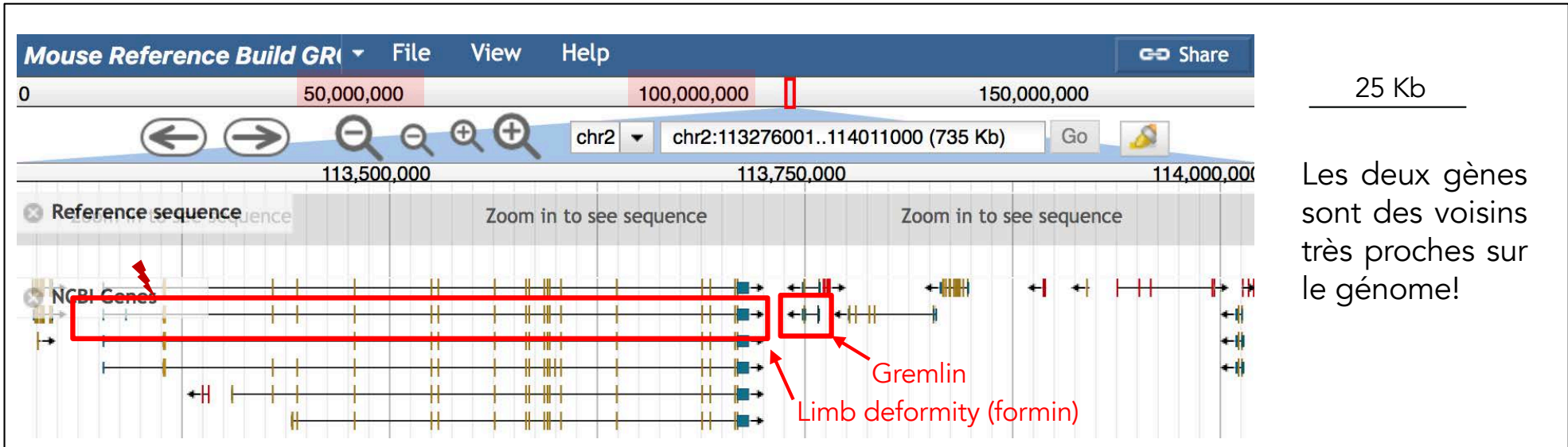
*Ces auteurs notent une grande similarité dans les altérations morphologiques des membres entre le mutant *Gremlin* et les mutant *Ld*...

Identification des enhancers: localisation...

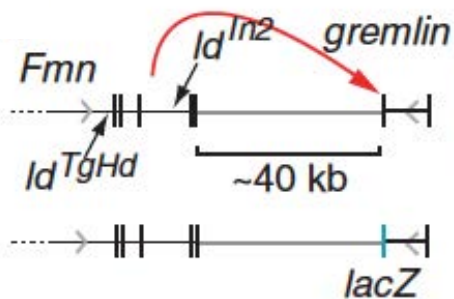
Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning

nature genetics, 2003

Mustafa K Khokha^{1,3}, David Hsu¹⁻³, Lisa J Brunet¹, Marc S Dionne^{1,2} & Richard M Harland¹



Pour vérifier cette hypothèse, Khoka et al. font un 'test de complémentation', en croisant des souris : $Gremlin^{+/-}$ avec des souris $Ld^{U/+}$ Parmi les petits, des animaux trans-hétérozygotes $Gremlin/Ld^U$



Conclusion:
Les deux mutations sont alléliques (ce sont deux mutants du même gène)

Identification des enhancers: localisation...

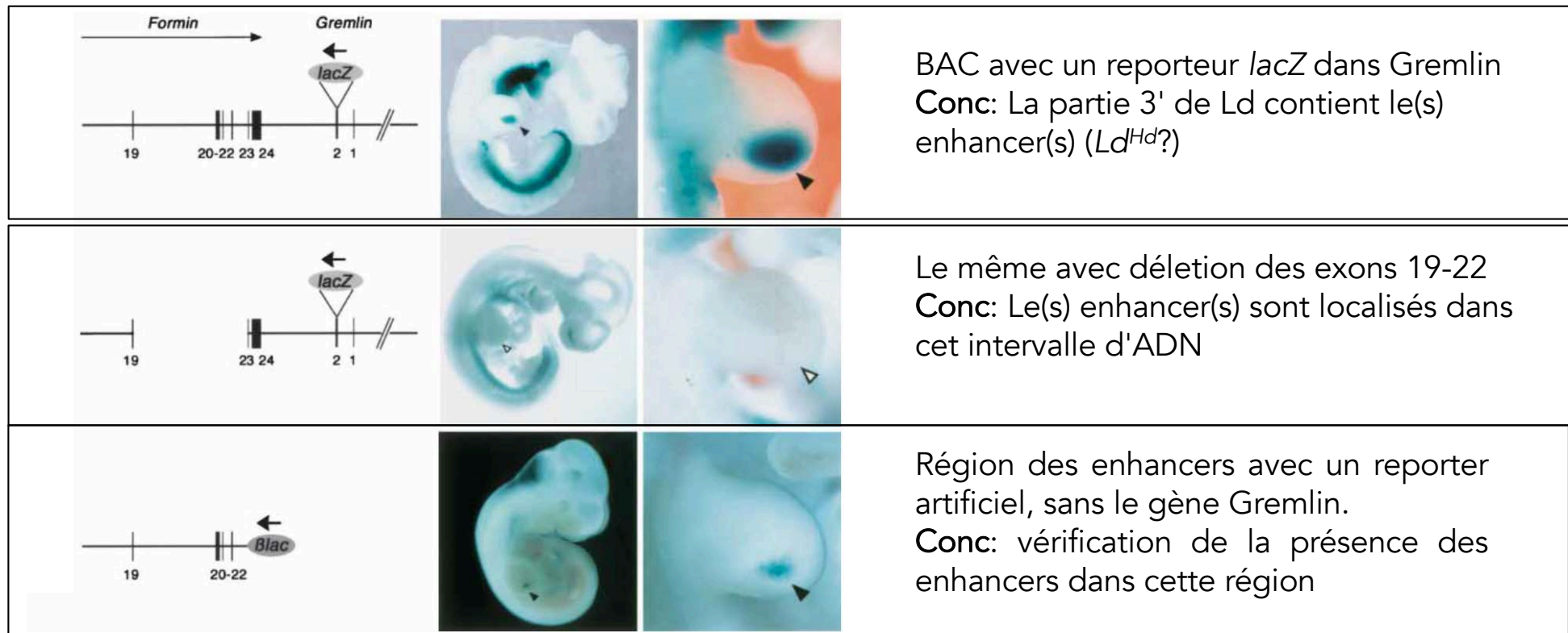
Mouse *limb deformity* mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for *Gremlin* expression

Aimée Zuniga,^{1,2} Odysse Michos,^{1,2} François Spitz,³ Anna-Pavlina G. Haramis,^{4,5} Lia Panman,² Antonella Galli,¹ Kristina Vintersten,^{4,6} Christian Klasen,⁴ William Mansfield,⁴ Sylwia Kuc,² Denis Duboule,³ Rosanna Dono,^{2,7} and Rolf Zeller^{1,8}

GENES & DEVELOPMENT 18:1553–1564 © 2004 by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Nouvelle série de délétions et de souris transgéniques au locus *Ld/Gremlin*

**Transgène BAC* (Bacterial Artificial Chromosome)



Mouse *limb deformity* mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for *Gremlin* expression

Aimée Zuniga,^{1,2} Odysse Michos,^{1,2} François Spitz,³ Anna-Pavlina G. Haramis,^{4,5} Lia Panman,² Antonella Galli,¹ Kristina Vintersten,^{4,6} Christian Klasen,⁴ William Mansfield,⁴ Sylwia Kuc,² Denis Duboule,³ Rosanna Dono,^{2,7} and Rolf Zeller^{1,8}

GENES & DEVELOPMENT 18:1553–1564 © 2004 by Cold Spring Harbor Laboratory Press

The *mouse limb deformity* (*ld*) mutations cause limb malformations by disrupting epithelial–mesenchymal signaling between the polarizing region and the apical ectodermal ridge. *Formin* was proposed as the relevant gene because three of the five *ld* alleles disrupt its C-terminal domain. In contrast, our studies establish that the two other *ld* alleles directly disrupt the neighboring *Gremlin* gene, corroborating the requirement of this BMP antagonist for limb morphogenesis. Further doubts concerning an involvement of *Formin* in the *ld* limb phenotype are cast, as a targeted mutation removing the C-terminal Formin domain by frame shift does not affect embryogenesis. In contrast, the deletion of the corresponding genomic region reproduces the *ld* limb phenotype and is allelic to mutations in *Gremlin*. We resolve these conflicting results by identifying a *cis*-regulatory region within the deletion that is required for *Gremlin* activation in the limb bud mesenchyme. This distant *cis*-regulatory region within *Formin* is also altered by three of the *ld* mutations. Therefore, the *ld* limb bud patterning defects are not caused by disruption of *Formin*, but by alteration of a global control region (GCR) required for *Gremlin* transcription. Our studies reveal the large genomic landscape harboring this GCR, which is required for tissue-specific coexpression of two structurally and functionally unrelated genes.

Quid du gène Ld et de la protéine Formin?

Formins

From Wikipedia, the free encyclopedia

Formins (formin homology proteins) are a group of [proteins](#) that are involved in the [polymerization](#) of [actin](#) and associate with the fast-growing end (barbed end) of actin filaments.^[2] Most formins are [Rho-GTPase](#) effector proteins.

Identification des enhancers: localisation...

Zuniga et al. *BMC Developmental Biology* 2012, **12**:23
<http://www.biomedcentral.com/1471-213X/12/23>



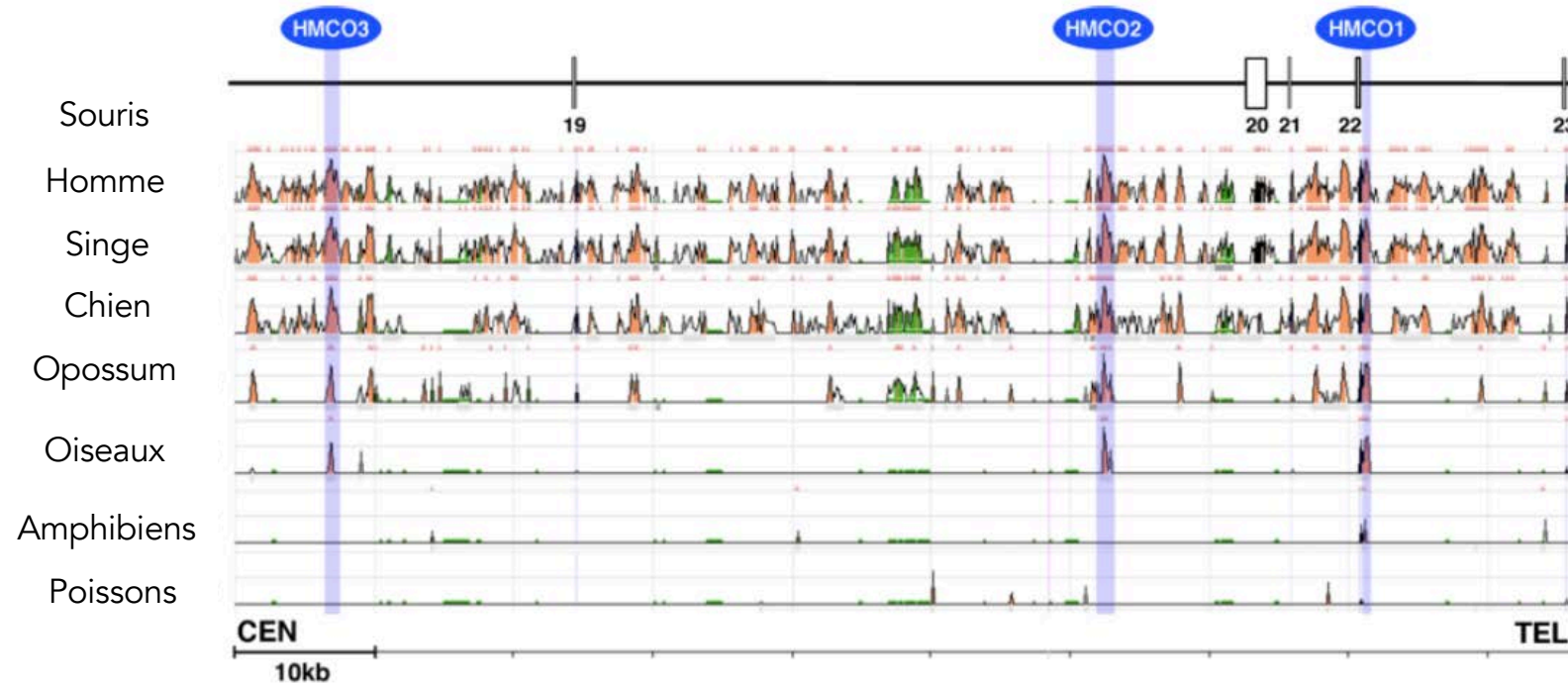
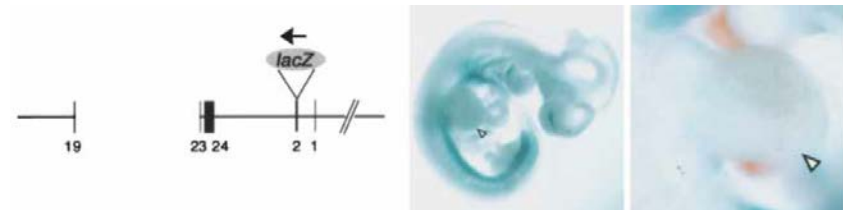
RESEARCH ARTICLE

Open Access

Conserved *cis*-regulatory regions in a large genomic landscape control SHH and BMP-regulated *Gremlin1* expression in mouse limb buds

Aimée Zuniga^{1*}, Frédéric Laurent¹, Javier Lopez-Rios¹, Christian Klasen^{2,3}, Nicolas Matt^{1,4} and Rolf Zeller^{1*}

...mais la région d'ADN concernée reste très grande...



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Conserved *cis*-regulatory regions in a large genomic landscape control SHH and BMP-regulated *Gremlin1* expression in mouse limb buds

Aimée Zuniga^{1*}, Frédéric Laurent¹, Javier Lopez-Rios¹, Christian Klasen^{2,3}, Nicolas Matt^{1,4} and Rolf Zeller^{1*}

