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 #4 (25 mai 2021)

*Résumé des points importants de la leçon 3
(syndrome de Liebenberg)
*Régulation à distance du gène *Pitx1* (fin)
*Oligosyndactylie et le gène *Gremlin*
*La mutation *Sasquatch*, Polydactylie et le gène *Shh*

2

Syndrome de Liebenberg (rappel)

'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

3

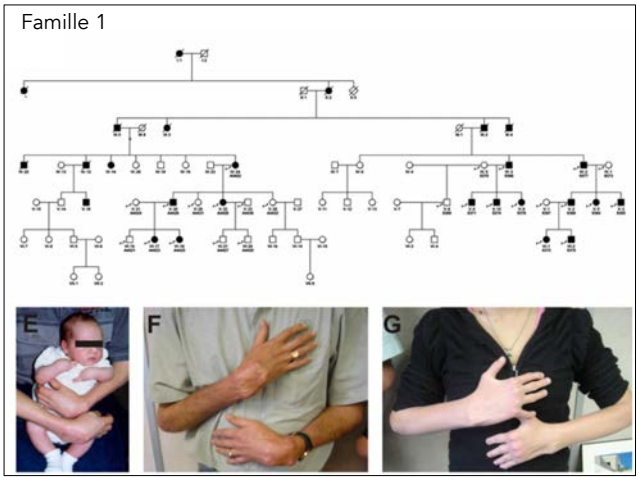
Syndrome de Liebenberg (rappel)

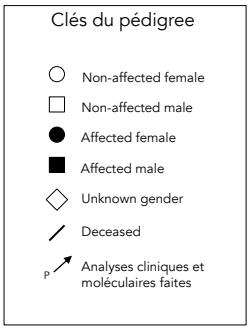
ARTICLE

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

Malte Spielmann,[1,2] Francesco Brancati,[3,4] Peter M. Krawitz,[1] Peter N. Robinson,[1] Daniel M. Ibrahim,[2,5] Martin Franke,[2] Jochen Hecht,[2,5] Silke Lohan,[1,2] Katarina Dathe,[1] Anna Maria Nardone,[4] Paola Ferrari,[4] Antonio Landi,[3] Lars Wittler,[6] Bernd Timmermann,[7] Danny Chan,[10] Ulrich Mennen,[11] Eva Klopocki,[1,2] and Stefan Mundlos[1,2,5,*]

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

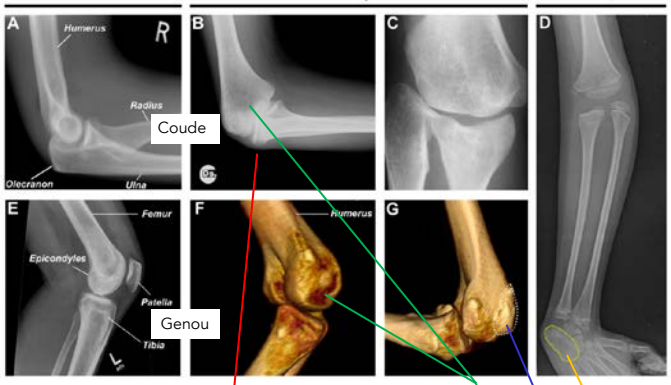


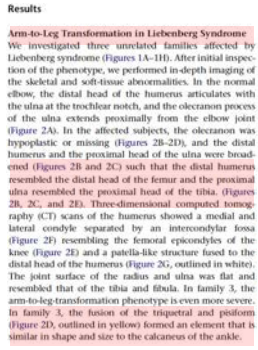


4

Syndrome de Liebenberg (rappel)

Non-affecté | Familles 1 et 2 | Famille 3





Results

Arm-to-Leg Transformation in Liebenberg Syndrome

We investigated three unrelated families affected by Liebenberg syndrome (Figures 1A–1H). 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 fused 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 triquetral 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

*Epaississement 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

5

Syndrome de Liebenberg, mécanisme (rappel)

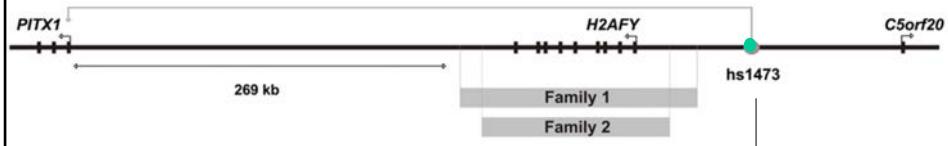
ARTICLE

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

Malte Spielmann,[1,2] Francesco Brancati,[3,4] Peter M. Krawitz,[1] Peter N. Robinson,[1] Daniel M. Ibrahim,[2,5] Martin Franke,[2] Jochen Hecht,[2,5] Silke Lohan,[1,2] Katarina Dathe,[1] Anna Maria Nardone,[4] Paola Ferrari,[4] Antonio Landi,[2] Lars Wittler,[6] Bernd Timmermann,[7] Danny Chan,[10] Ulrich Mennen,[11] Eva Klopocki,[1,2] and Stefan Mundlos[1,2,5,*]

The American Journal of Human Genetics 91, 629–635, October 5, 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.

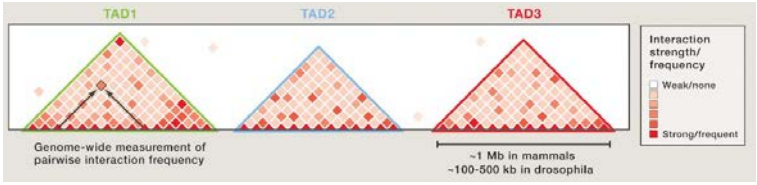
hs1473

6

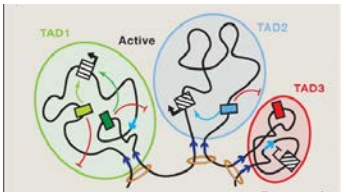
Capture de Conformation Chromosomique (rappel)

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

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



Adapté de Long, Prescot and Wysocka, Cell, 2016

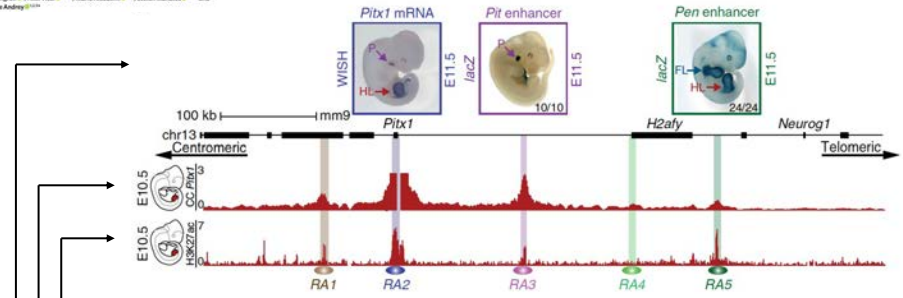


TADs: Domaines (paysages) d'action des enhancers pour une cible précise (mais quid de la causalité..?)

7

PITX1; Paysage de régulation

RA5 = hs1473 = *Pen*..



Profil de la H3K27acetylation (indiquent les gènes et enhancers actifs

Profil d'interactions en prenant le gène PITX1 comme point de départ

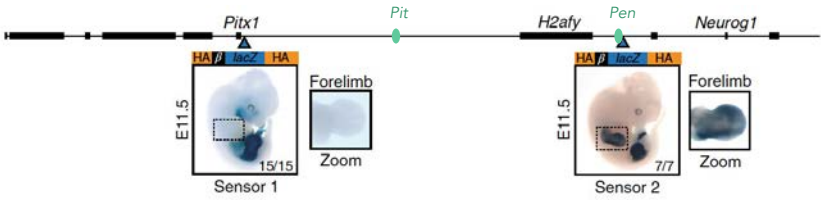
Activité fonctionnelle de PITX1 (ARNs endogènes) et de deux enhancers (*Pit* et *Pen*) en transgènes

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

8

PITX1; Pièges à enhancers

Insertion de transgènes 'sensors' (en fait ce sont des pièges à enhancers) (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

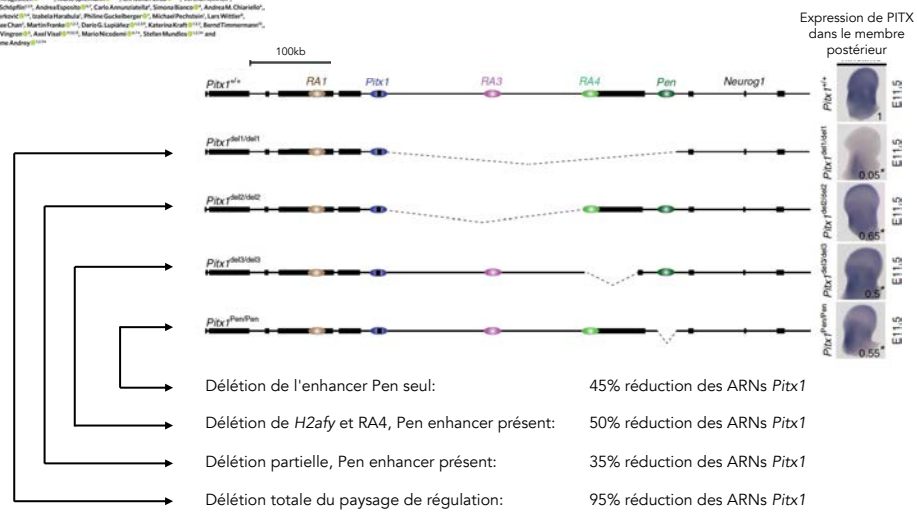
Lorsqu'intégré à proximité de l'enhancer *Pen*, le 'sensor' ne repêche plus l'activité dans l'hypophyse (qui vient de l'enhancer *Pit*) mais est exprimé fortement dans les deux membres...

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

9

PITX1; Paysage de régulation, approche génétique

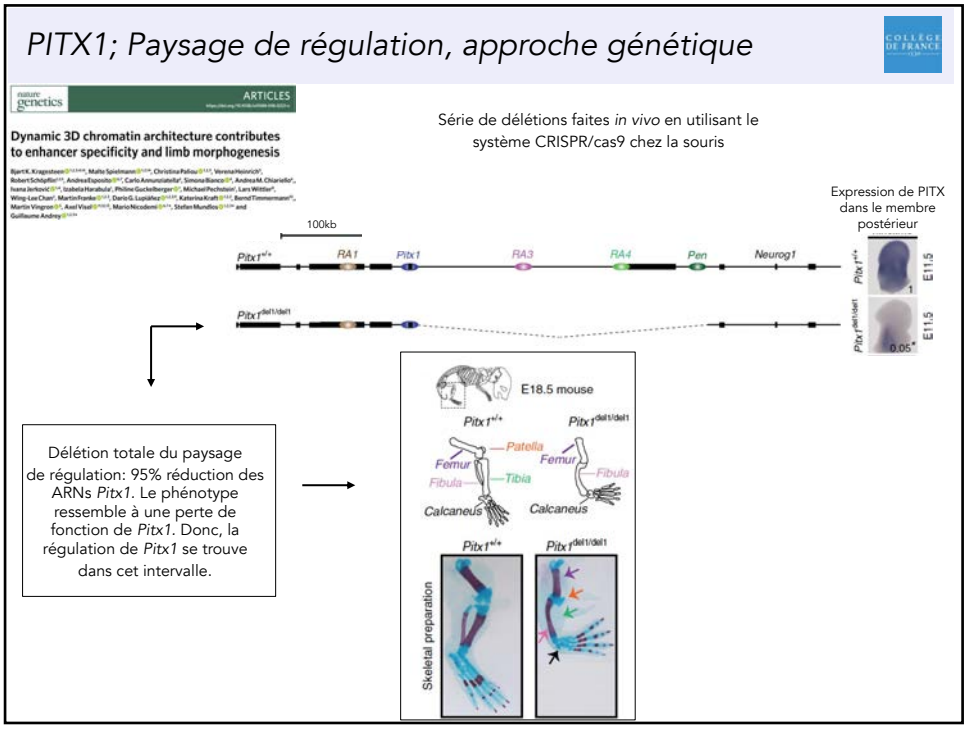
Série de délétions faites *in vivo* en utilisant le système CRISPR/cas9 chez la souris



Délétion de l'enhancer Pen seul:	45% réduction des ARNs *Pitx1*
Délétion de *H2afy* et RA4, Pen enhancer présent:	50% réduction des ARNs *Pitx1*
Délétion partielle, Pen enhancer présent:	35% réduction des ARNs *Pitx1*
Délétion totale du paysage de régulation:	95% réduction des ARNs *Pitx1*

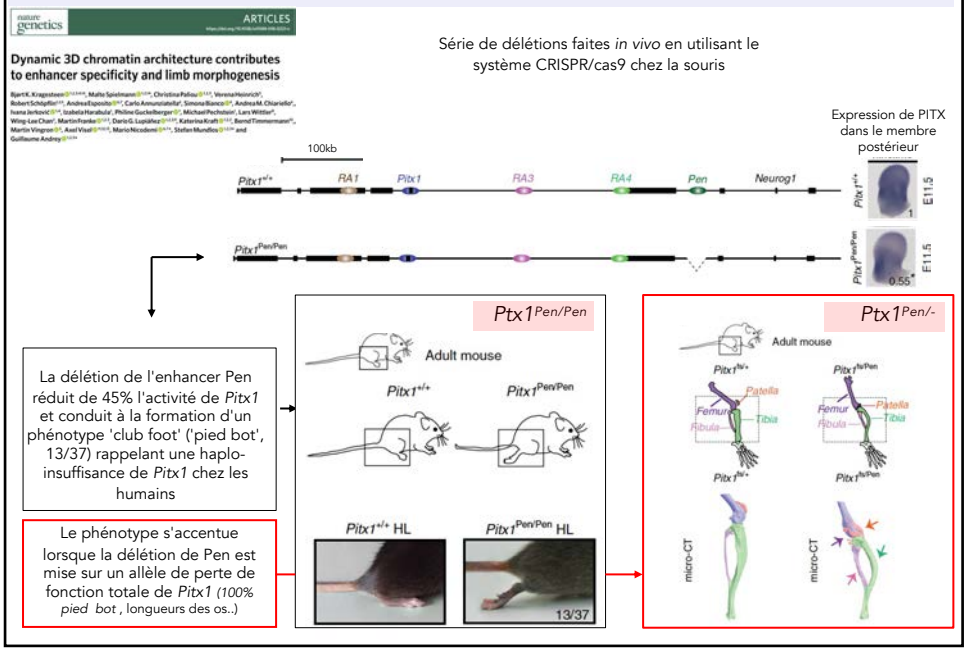
10

PITX1; Paysage de régulation, approche génétique



11

PITX1; importance de l'enhancer 'Pen'

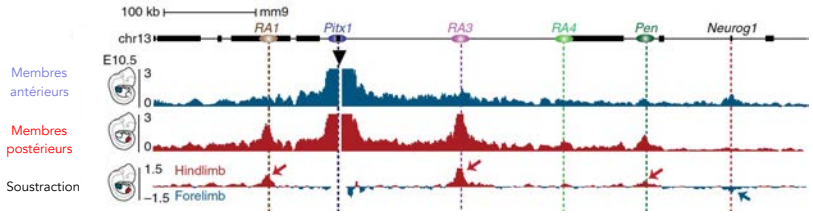


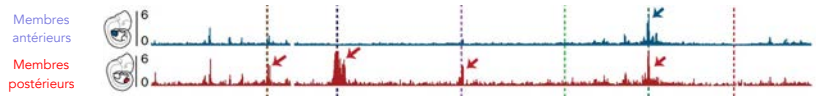
12

PITX1; structures de la chromatine

Capture Hi-C, extraction des contacts établis par *Pitx1* dans les membres antérieurs et postérieurs

↙ : Contacts très enrichis dans les membres postérieurs





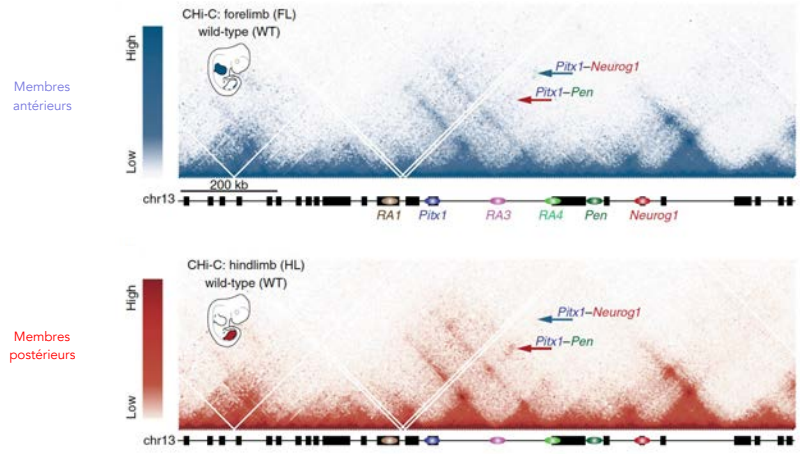
Profils ChIP-seq de H3K27Ac ('active' chromatin) dans les membres antérieurs et postérieurs

↙ : Contacts très enrichis dans les membres postérieurs

13

PITX1; structures de la chromatine, interactions au locus

Capture Hi-C, profils des contacts généraux observés au locus *Pitx1* dans les membres antérieurs et postérieurs

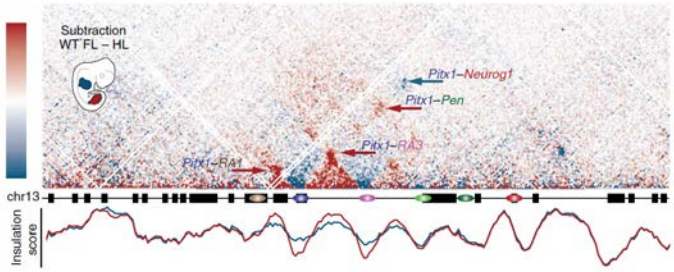


14

PITX1; structures de la chromatine, modélisation

Capture Hi-C, profils des contacts généraux observés au locus *Pitx1* dans les membres antérieurs et postérieurs

Soustraction des profils; contacts gagnés ou perdus dans les membres inférieurs



Ces profils de contacts permettent la production de modèles de chromatine en 3D (qui donnent une des représentations possibles du locus dans l'espace)

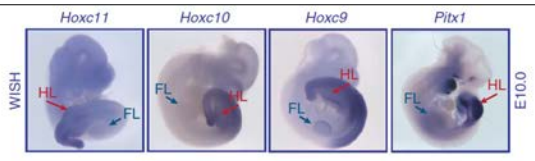
15

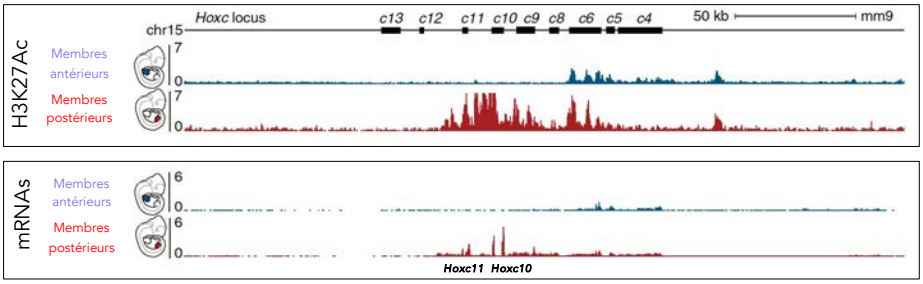
PITX1; origine de l'expression différentielle, gènes Hoxc

Recherche d'autres facteurs de transcription qui seraient exprimé dans les membres postérieurs seulement:

Les gènes *Hoxc*, en particulier *Hoxc10* et *Hoxc11*

Hybridations *in-situ*



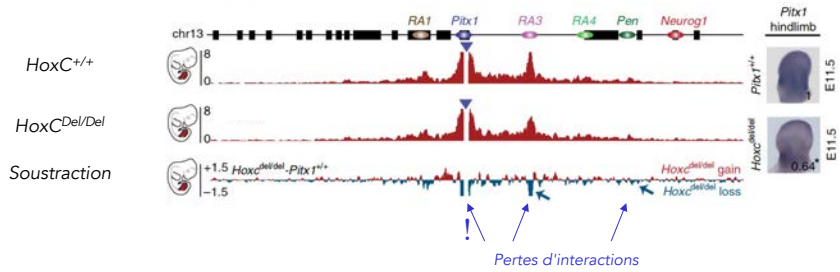


16

PITX1; origine de l'expression différentielle; Gènes Hoxc

Observation des profiles d'interactions en absence des gènes *Hoxc* (en utilisant des souris qui portent une délétion du complexe de gènes *Hoxc)*

Interactions à partir du gène *Pitx1*



Une perte d'interactions semble être observée entre le gène *Pitx1* et l'enhancer Pen mais cette perte n'est pas très robuste (36% de réduction des mARNs) et les souris délétées pour le complexe *HoxC* ne présentent pas de phénotypes dans les membres. Donc si le *HoxC* joue un rôle dans la régulation de *Pitx1*, ces gènes ne sont pas suffisant.

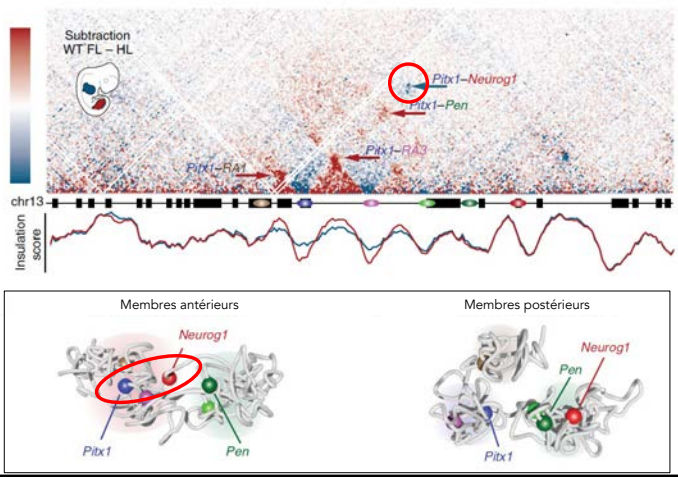
17

PITX1; Importance des contacts avec le gène Neurog1?

La perte de contact entre *Pitx1* et *Neurog1* dans l'activation de *Pitx1* (membre inférieur) semble indiquer une fonction particulière pour cette interaction

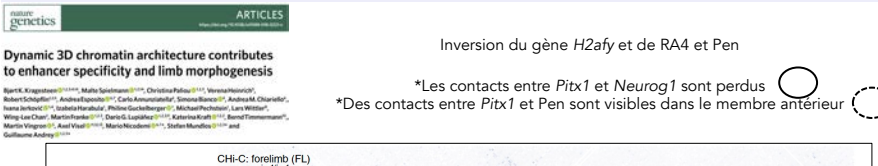
MAIS!, une délétion du gène *Neurog1* ne produit pas de contacts supplémentaires et aucune up-régulation de *Pitx1* n'est observée...

...modification de la topologie du locus en induisant une inversion qui change la position relative de *Pen* en l'éloignant de *Neurog1*



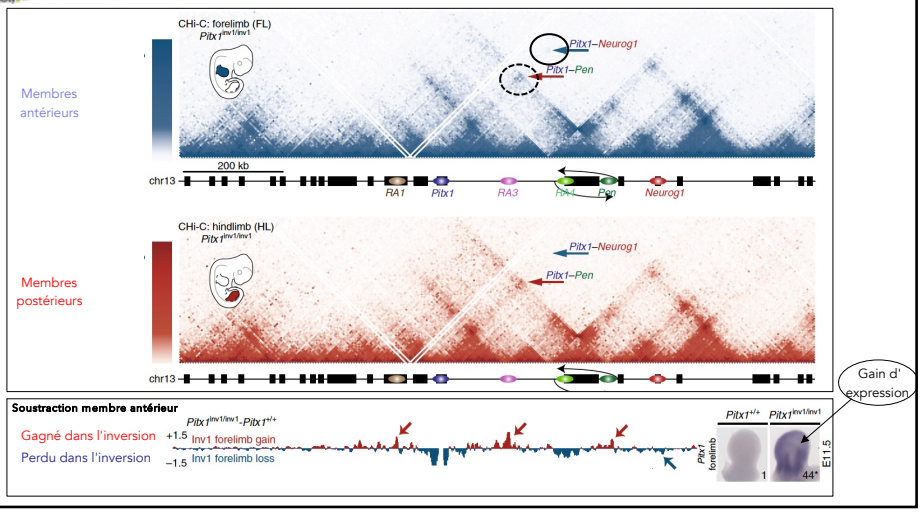
18

PITX1; Importance de la topologie?



Inversion du gène *H2afy* et de RA4 et Pen

*Les contacts entre *Pitx1* et *Neurog1* sont perdus
*Des contacts entre *Pitx1* et Pen sont visibles dans le membre antérieur



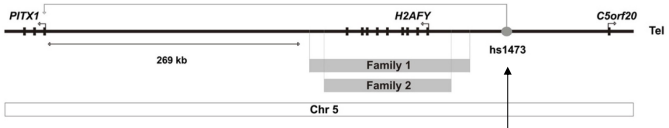
19

Syndrome de Liebenberg

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...)

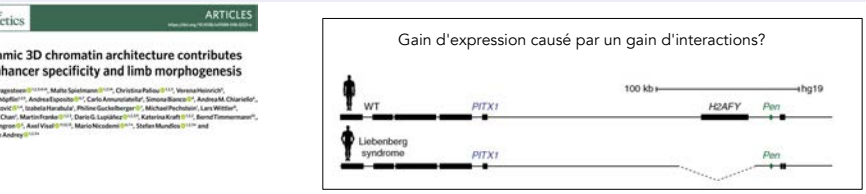
Familles 1 et 2: Délétions de tailles comparables incluant le gène H2AFY (core-histone H2A). Les délétions se trouvent à 270 kb du gène PITX1.



Pen

20

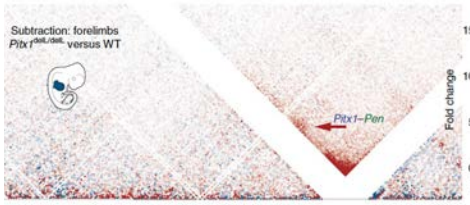
Syndrome de Liebenberg



Gain d'expression causé par un gain d'interactions?

Membres antérieurs

Soustraction Del/control

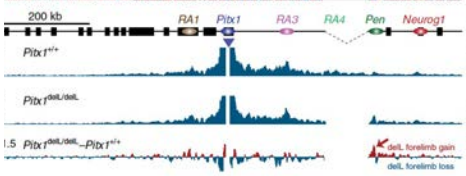


Membres antérieurs

qPCR Del/control

Membres antérieurs

Soustraction Del/control



Membres antérieurs

WISH *Pitx1* Del/control

21

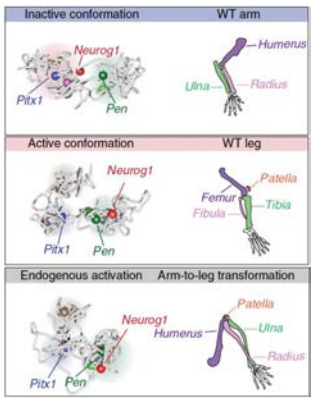
PITX1; 3D structure et régulation?

Conclusions de l'étude: *Des conformations différentes de la chromatine induisent des régulations variables de l'expression de Pitx1*

Membre antérieur:
l'enhancer Pen est éloigné de *Pitx1* en partie à cause de la présence de *Neurog1*.
Pitx1 est inactif

Membre postérieur: suite à l'action de facteurs (*HoxC?*) l'enhancer Pen est rapproché de *Pitx1*: *Pitx1 est actif*

Membre antérieur: des altérations du génome (délétion..) rapprochent *Pitx1* de Pen: *Pitx1 est actif*
Transformation partielle du bras en jambe (Liebenberg)



Critique: la relation de causalité entre la structure de la chromatine et l'expression de *Pitx1* n'est pas formellement démontrée et on ne peut pas exclure, en l'état, que les contacts variables entre *Pitx1* et l'enhancer Pen ne soient pas la source de ces structures différentes (et non leurs effets..)

22

Réseaux de gènes, pleïotropie, 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)

23

Oligosyndactylies, synostoses radio-ulnaire

Short report

Genomic rearrangements of the *GREM1-FMN1* locus cause oligosyndactyly, radio-ulnar synostosis, hearing loss, renal defects syndrome and Cenani—Lenz-like non-syndromic oligosyndactyly

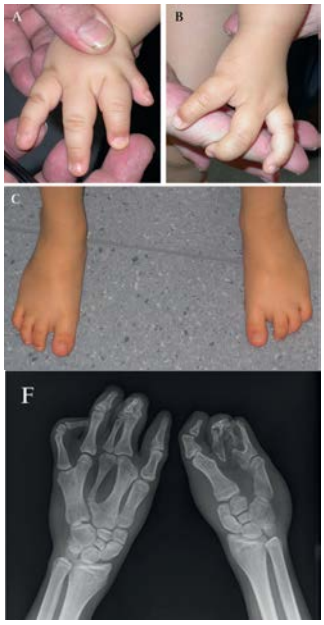
Boyan Ivanov Dimitrov,[1] Thierry Voet,[1] Luc De Smet,[2] Joris Robert Vermeesch,[1] Koen Devriendt,[1] Jean-Pierre Fryns,[1] Philippe Debeer[1,2]

J Med Genet 2010;**47**:569–574. doi:10.1136/jmg.2009.073833

Oligodactylie: Absence de doigts

Syndactylie: Fusion latérale de doigts

Synostose: Union de deux pièces osseuses normalement séparées



24

Oligosyndactylies, synostoses radio-ulnaire

Short report

Genomic rearrangements of the *GREM1-FMN1* locus cause oligosyndactyly, radio-ulnar synostosis, hearing loss, renal defects syndrome and Cenani—Lenz-like non-syndromic oligosyndactyly

Boyan Ivanov Dimitrov,[1] Thierry Voet,[1] Luc De Smet,[2] Joris Robert Vermeesch,[1] Koen Devriendt,[1] Jean-Pierre Fryns,[1] Philippe Debeer[1,2]

J Med Genet 2010;**47**:569–574. doi:10.1136/jmg.2009.073833

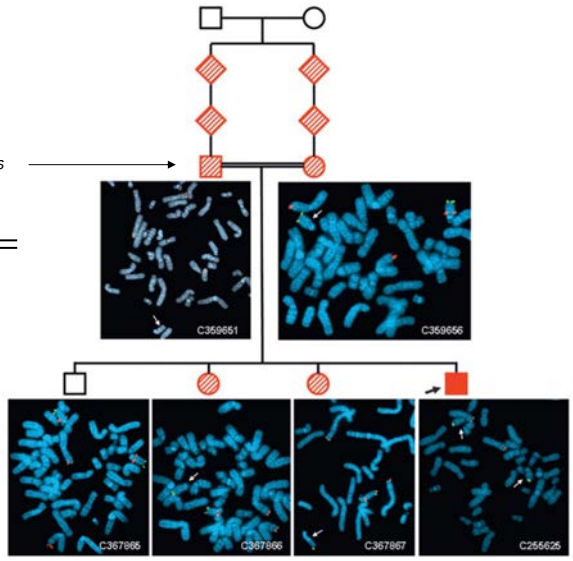
Parents porteurs sains →

Famille avec consanguinité: ═══

Deux enfants hétérozygotes et un homozygote. Utilisation de marquages fluorescents associés à des BACs

Absence du marquage sur les deux chromosomes chez C255625

Délétion homozygote



25

Délétion au locus Gremlin-Limb deformity (Formin; Fmn1)

Short report

Genomic rearrangements of the *GREM1-FMN1* locus cause oligosyndactyly, radio-ulnar synostosis, hearing loss, renal defects syndrome and Cenani—Lenz-like non-syndromic oligosyndactyly

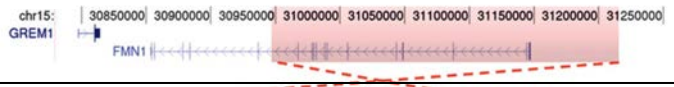
Boyan Ivanov Dimitrov,[1] Thierry Voet,[1] Luc De Smet,[2] Joris Robert Vermeesch,[1] Koen Devriendt,[1] Jean-Pierre Fryns,[1] Philippe Debeer[1,2]

J Med Genet 2010;**47**:569–574. doi:10.1136/jmg.2009.073833

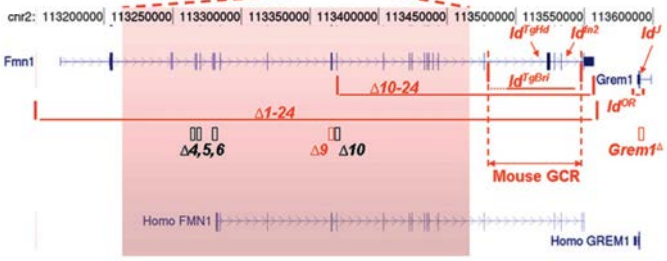
Une délétion de 246 Kb (min) sur le chromosome 15, au locus de la Formin (*Fmn1*).

Locus orthologue de la souris bien connu et saturé de mutations diverses affectant le gène Gremlin

Chr. 15 humain



Chr. 2 souris



Chr. 15 humain inversé

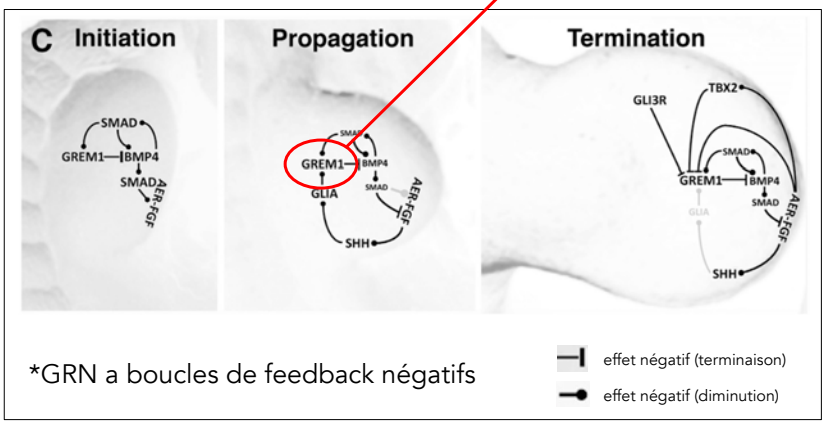
26

Croissance du membre, axe proximo-distal (et A-P..)

Dynamic and self-regulatory interactions among gene regulatory networks control vertebrate limb bud morphogenesis

Aimée Zuniga*, Rolf Zeller*

Le gène *Gremlin (Grem1)* au centre du réseau de régulation génique de la morphogenèse des membres



*GRN a boucles de feedback négatifs

effet négatif (terminaison)

effet négatif (diminution)

27

L'histoire compliquée de Gremlin et de la Formin...

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

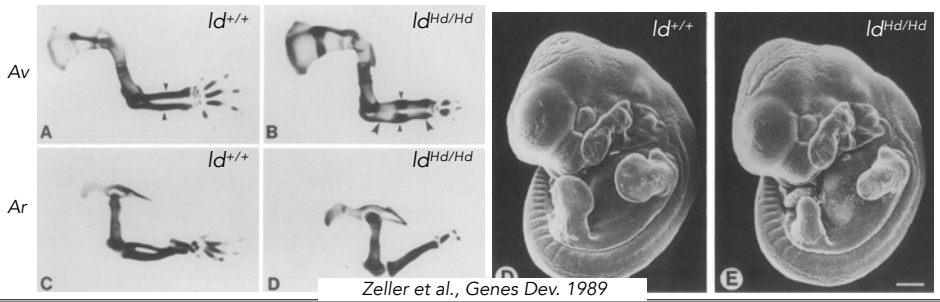
Disruption of formin-encoding transcripts in two mutant *limb deformity* alleles

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^{J} (1960) et ld^{OR} (1962)

*Des allèles multiples isolés à ce locus car le phénotype anormal touche les membres



Zeller et al., Genes Dev. 1989

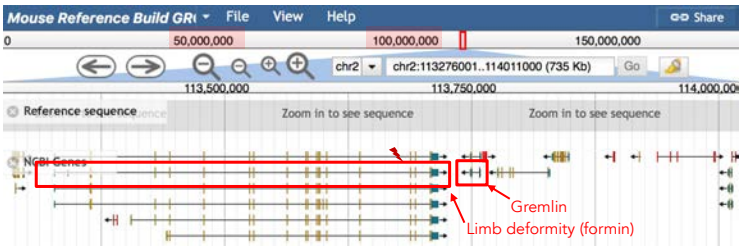
28

Identification des enhancers: localisation...

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

nature genetics, 2003

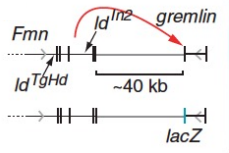
Mustafa K Khokha[1,3], David Hsu[1–3], Lisa J Brunet[1], Marc S Dionne[1,2] & Richard M Harland[1]



25 Kb

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

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



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

29

Délétion au locus Gremlin-Limb deformity (Formin; Fmn1)

Short report

Genomic rearrangements of the *GREM1-FMN1* locus cause oligosyndactyly, radio-ulnar synostosis, hearing loss, renal defects syndrome and Cenani—Lenz-like non-syndromic oligosyndactyly

Boyan Ivanov Dimitrov,[1] Thierry Voet,[1] Luc De Smet,[2] Joris Robert Vermeesch,[1] Koen Devriendt,[1] Jean-Pierre Fryns,[1] Philippe Debeer[1,2]

J Med Genet 2010;**47**:569–574. doi:10.1136/jmg.2009.073833

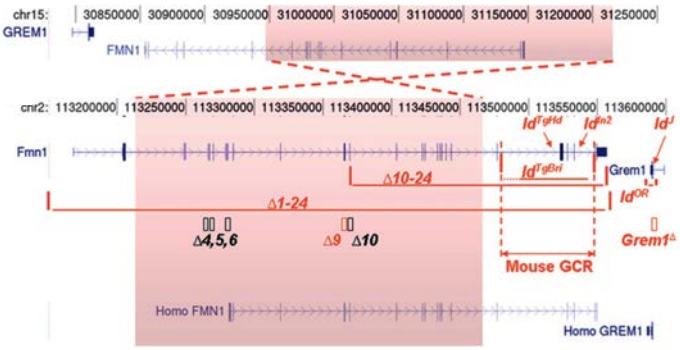
Une délétion de 246 Kb (min) sur le chromosome 15, au locus de la Formin (*Fmn1*).

Locus orthologue de la souris bien connu et saturé de mutations diverses affectant le gène Gremlin

Chr. 15 humain

Chr. 2 souris

Chr. 15 humain inversé



La délétion observée dans la famille No1 ne contient aucun des spots dont la mutation conduit à un phénotype 'Gremlin'. En plus, l'inactivation du gène de la Formin chez la souris ne produit pas de phénotype anormal. Probablement un effet inconnu sur le gène Grem1

30

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***)

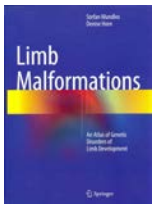
3) La polarité proximal-distal du membre (Displasies mésoméliques en 2q31)

31

Importance des anomalies des membres / classifications

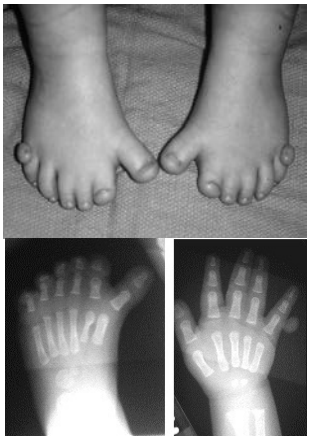
Polydactylies

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



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

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



32

Importance des anomalies des membres/ classifications

Research article | Open Access | Published: 16 November 2013

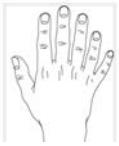
Birth prevalence for congenital limb defects in the northern Netherlands: a 30-year population-based study

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

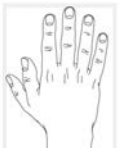
BMC Musculoskeletal Disorders **14**, Article number: 323 (2013) | Cite this article

Les polydactylies sont parmi les malformations congénitales les plus fréquentes à la naissance

Post-axiale (postérieure)



Pré-axiale (antérieure)



https://fr.wikipedia.org/wiki/Polydactylie#Polydactylie_postaxiale

CLD	Isolated CLD, n	Multiple congenital anomalies, n	CLD is part of a recognised condition, n	Total, n	Prevalence per 10 000
Polydactyly	291	45	83	419	8.4
Upper limb	228	38	63[a]	329	6.6
Preaxial	73	13	20	106	2.1
Postaxial	155	21	39	201	4.0
NOS	14	4	6	24	0.5
Lower limb	75	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	94	250	5.0
Transverse	89	17	39	145	2.9
Longitudinal	21[b]	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	58	149	3.0
Transverse	29	15	31	75	1.5
Longitudinal	23[c]	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[d]	17	0.3
NOS	1	1	0	2	0.04
NOS	0	0	1	1	0.02
Upper and lower limb	14	11	33	58	1.2
Syndactyly	126	29	77	232	4.7
Upper limb	77	17	46	140	2.8
Lower limb	59	12	46	117	2.4
NOS	0	1	0	1	0.02
Upper and lower limb	10	1	15	26	0.5
Other CLD[e]	41	34	88	163	3.3
Upper limb	18	14	66	98	2.0
Lower limb	25	22	53	100	2.0
NOS	0	1	0	1	0.02
Upper and lower limb	2	3	31	36	0.7
Multiple CLD[f]	38[g]	14[h]	49[i]	101	2.0
Total no. of cases	598	135	315	1048	21.1
Total no. of live births	587	77	159	823	16.5

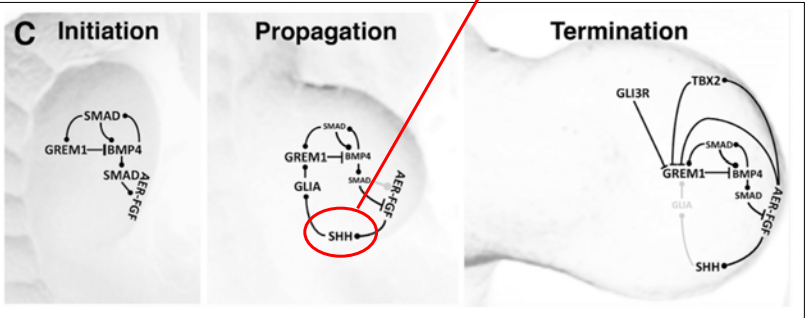
33

Croissance du membre, axe proximo-distal (et A-P..)

Dynamic and self-regulatory interactions among gene regulatory networks control vertebrate limb bud morphogenesis

Aimée Zuniga*, Rolf Zeller*

Le gène *sonic hedgehog (Shh)*
gène clé de la polarité antéro-postérieure



*GRN a boucles rétroactives + et -

effet négatif (terminaison)
effet négatif (diminution)

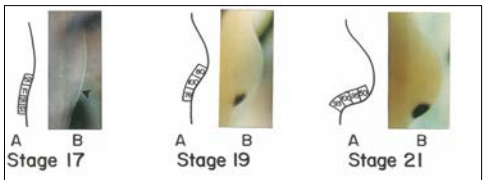
34

Croissance du membre, axe proximo-distal (et A-P..)

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

Sonic hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the ZPA

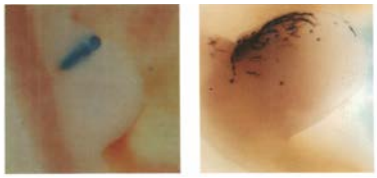
Robert D. Riddle, Randy L. Johnson, Ed Laufer, and Cliff Tabin
Department of Genetics
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts 02115

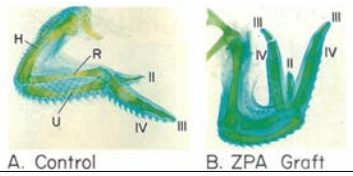


Expression de *Shh* restreinte à la partie postérieure

Une greffe de cellules exprimant *Shh* sur la face antérieure induit une duplication en miroir des structures

Greffon (bleu) Après 24 heures





A. Control B. ZPA Graft

35

Régulation du gène Shh, une histoire de mutations..

Brief Communication 97

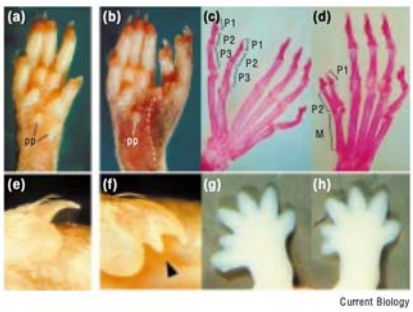
Identification of *Sonic hedgehog* as a candidate gene responsible for the polydactylous mouse mutant *Sasquatch*

James Sharpe*, Laura Lettice†, Jacob Hecksher-Sørensen†, Margaret Fox‡, Robert Hill‡ and Robb Krumlauf*

Published: 18 January 1999

Current Biology 1999, 9:97–100
http://biomednet.com/elecref/0960982200900097

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



Current Biology

Sasquatch (bigfoot) créature imaginaire au Canada

36

Régulation du gène Shh, une histoire de mutations..

Brief Communication 93

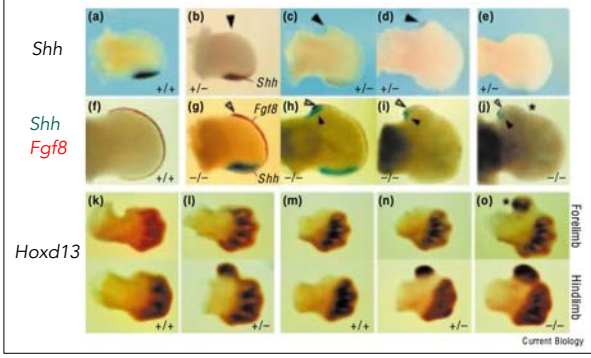
Identification of *Sonic hedgehog* as a candidate gene responsible for the polydactylous mouse mutant *Sasquatch*

James Sharpe*, Laura Lettice†, Jacob Hecksher-Sørensen†, Margaret Fox‡, Robert Hill† and Robb Krumlauf*

Published: 18 January 1999

Current Biology 1999, 9:97–100
http://biomednet.com/elecref/0960982200900097

Les souris portant cette mutation par insertion expriment *Shh* de façon ectopique (tardivement), sur l'aspect antérieur du bourgeon de membre



Sasquatch (bigfoot) créature imaginaire au Canada

37

Régulation du gène Shh, une histoire de mutations..

Brief Communication 93

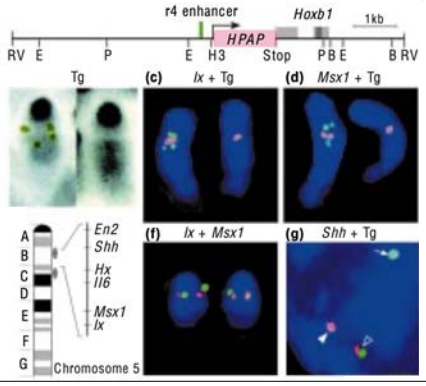
Identification of *Sonic hedgehog* as a candidate gene responsible for the polydactylous mouse mutant *Sasquatch*

James Sharpe*, Laura Lettice†, Jacob Hecksher-Sørensen†, Margaret Fox‡, Robert Hill† and Robb Krumlauf*

Published: 18 January 1999

Current Biology 1999, 9:97–100
http://biomednet.com/elecref/0960982200900097

Plusieurs sondes fluorescentes sont utilisées pour des hybridations sur le chromosome 5 afin de préciser la localisation du transgène



Sasquatch (bigfoot) créature imaginaire au Canada

Le Tg total est utilisé comme sonde fluorescente.

Transgène:
Gène contrôle:

Transgène:
Shh:

(Il y a une deuxième copie du Tg intégrée ailleurs..)

38

Régulation du gène Shh, une histoire de mutations..

Brief Communication 93

Identification of *Sonic hedgehog* as a candidate gene responsible for the polydactylous mouse mutant *Sasquatch*

James Sharpe*, Laura Lettice†, Jacob Hecksher-Sørensen†, Margaret Fox‡, Robert Hill† and Robb Krumlauf*

Published: 18 January 1999

Current Biology 1999, 9:97–100
http://biomednet.com/elecref/0960982200900097

Sasquatch (bigfoot) créature imaginaire au Canada

Conclusions

Despite these similarities in the limb, transgene expression has not been detected in the floor plate, lung, gut or whisker barrels, which are other normal sites of *Shh* expression. Expression of *Shh* itself in these sites was unchanged in *Sq* mutants (Figure 4 and data not shown). Therefore, the interaction between *Shh* and the transgene is specifically restricted to the limb.

These observations strongly suggest that, unlike previous hemimelia–luxate mutants, the *Sq* phenotype is caused by a direct interference with the *cis* regulation of *Shh*. This may be effected by interference with specific limb regulatory elements, or by interruption of a general chromatin configuration important for limb-specific regulation.

Conc: Une interférence soit avec la régulation de Shh dans les membres, soit avec la formation d'une structure de la chromatine

39

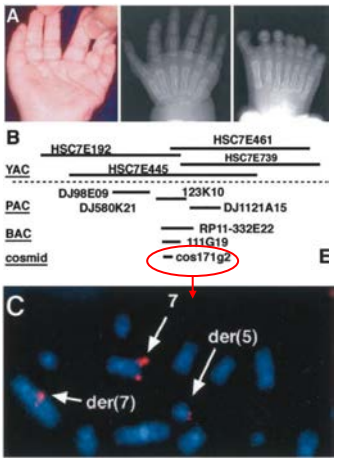
Régulation du gène Shh, une histoire de mutations..

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

Laura A. Lettice[a,b], Taizo Horikoshi[b,c,d], Simon J. H. Heaney[a,b], Marijke J. van Baren[b,e], Herma C. van der Linde[e], Guido J. Breedveld[e], Marijke Joosse[e], Nurten Akarsu[f], Ben A. Oostra[e], Naoto Endo[g], Minoru Shibata[g], Mikio Suzuki[h], Eiichi Takahashi[h], Toshikatsu Shinka[i], Yutaka Nakahori[i], Dai Ayusawa[j], Kazuhiko Nakabayashi[k], Stephen W. Scherer[b], Peter Heutink[e], Robert E. Hill[a,l], and Sumihare Noji[c]

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

Un patient présentant une polydactylie pré-axiale



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

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

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

40

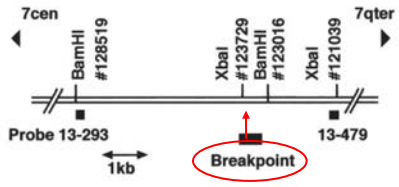
Régulation du gène Shh, une histoire de mutations..

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

Laura A. Lettice[a,b], Taizo Horikoshi[b,c,d], Simon J. H. Heaney[a,b], Marijke J. van Baren[b,e], Herma C. van der Linde[a], Guido J. Breedveld[a], Marijke Joosse[a], Nurten Akarsu[f], Ben A. Oostra[a], Naoto Endo[g], Minoru Shibata[g], Mikio Suzuki[h], Eiichi Takahashi[h], Toshikatsu Shinka[i], Yutaka Nakahori[i], Dai Ayusawa[d], Kazuhiko Nakabayashi[h], Stephen W. Scherer[e], Peter Heutink[a], Robert E. Hill[b,1], and Sumihare Noji[c]

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

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



La cartographie fine révèle un point de cassure localisé entre les exons 5 et 6 du gène *Lmbr1*, lui-même localisé à ca. 1 Mb de *Shh*l

Analyse du gène *Lmbr1* chez de nombreux patients présentant des polydactylies pré-axiales et aucune mutation n'est trouvée dans les exons.

(Fig. 1*B*). Sequencing the ends of the cosmid insert identified the genomic fragment as lying inside one of the genes (originally given the designation C7orf2 (5) within the genetically defined critical region for PPD. This gene is the orthologue of the mouse *Lmbr1* gene (14). Southern blot analysis of DNA from a lymphoblastoid cell line further refined the site of the breakpoint (Fig. 1*D*). A number of repeat-free STSs including 13–293 and 13–479 were PCR-amplified and used as probes. This analysis showed that the translocation breakpoint is located in a 714-bp *Bam*HI/*Xba*I fragment residing between exons 5 and 6 of *LMBR1* without an accompanying large deletion (Fig. 1*E*). This

41

Connection Shh, Polydactylie, Lmbr1 et Sasquatch..

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

Laura A. Lettice[a,b], Taizo Horikoshi[b,c,d], Simon J. H. Heaney[a,b], Marijke J. van Baren[b,e], Herma C. van der Linde[a], Guido J. Breedveld[a], Marijke Joosse[a], Nurten Akarsu[f], Ben A. Oostra[a], Naoto Endo[g], Minoru Shibata[g], Mikio Suzuki[h], Eiichi Takahashi[h], Toshikatsu Shinka[i], Yutaka Nakahori[i], Dai Ayusawa[d], Kazuhiko Nakabayashi[h], Stephen W. Scherer[e], Peter Heutink[a], Robert E. Hill[b,1], and Sumihare Noji[c]

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

Analyse de point d'insertion du Tg dans les souris *Sasquatch:*

Souris *Ssq/Ssq*

↓

Librairies génomique

↓

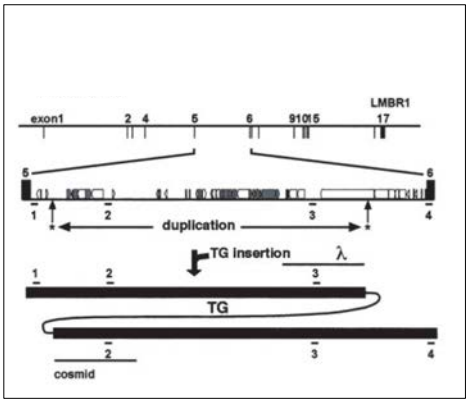
Criblage avec le Tg

↓

Isolation d'un clone contenant un des cotés de l'insertion

↓

Séquençage et identification du gène...*Lmbr1*



*L'insertion du Tg a produit une duplication partielle de séquences introniques entre les exons 5 et 6 du gène *Lmbr*1. Toutefois, chez les souris mutantes, la transcription de *Lmbr1* ne semble pas être affectée

42

Connection Shh, Polydactylie, Lmbr1 et Sasquatch..

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

Laura A. Lettice[a,b], Taizo Horikoshi[b,c,d], Simon J. H. Heaney[a,b], Marijke J. van Baren[b,e], Herma C. van der Linde[e], Guido J. Breedveld[e], Marijke Joosse[e], Nurten Akarsu[f], Ben A. Oostra[e], Naoto Endo[g], Minoru Shibata[g], Mikio Suzuki[g], Eiichi Takahashi[g], Toshikatsu Shinka[c], Yutaka Nakahori[c], Dai Ayusawa[c], Kazuhiko Nakabayashi[d], Stephen W. Scherer[a], Peter Heutink[e], Robert E. Hill[a,1], and Sumihare Noji[c]

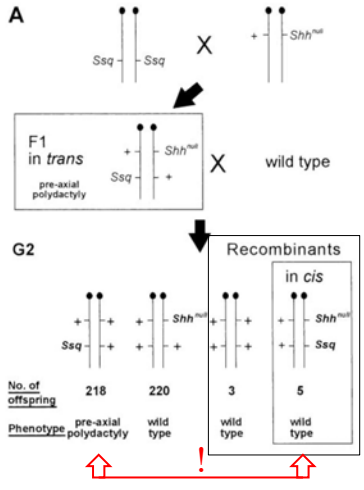
7548–7553 | PNAS | May 28, 2002 | vol. 99 | no. 11

L'effet de *Sasquatch* sur *Shh* s'exerce-t-il en *cis* ou en *trans*?

Test génétique *cis/trans*

Animaux trans-hétérozygotes entre *Sasquatch* et un allèle 'nul' de *Shh*

Les recombinaisons meïotiques redistribuent les allèles



(1 Mb = app 1 centi-Morgan i.e. 1% de recombinaison...)

Phénotypes

Conclusion: l'effet est en *cis*

43

Shh et régulation à longue distances

Identification of *Sonic hedgehog* as a candidate gene responsible for holoprosencephaly

E. Belloni[1], M. Muenke[3], E. Roessler[3], G. Traverso[1], J. Siegel-Bartelt[1], A. Frumkin[1], H.F. Mitchell[3], H. Donis-Keller[4], C. Helms[4], A.V. Hing[4], H.H.Q. Heng[1], B. Koop[5], D. Martindale[5], J.M. Rommens[1,2], L.-C. Tsui[1,2] & S.W. Scherer[1]

Le portail des maladies rares et des médicaments orphelins

Holoprosencéphalie

Contribuer

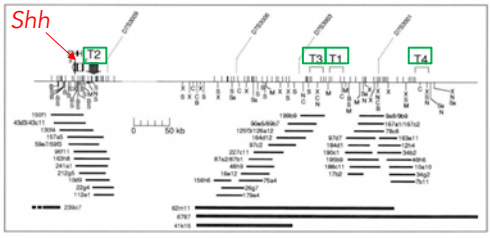
Définition

L'holoprosencéphalie (HPE) est une malformation cérébrale complexe due à un défaut de clivage médian du prosencéphale, survenant entre le 18e et le 28e jour de gestation, touchant le cerveau antérieur et le visage, à l'origine de manifestations neurologiques et d'anomalies faciales de degré variable.

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

Différents types d'holoprosencéphalies humaines (HPE's) dont les 'HPE3' (de type 3) qui sont alors associées a chromosome 7q36 (...). Et *Shh* est exprimé dans des régions du cerveau en développement qui pourraient correspondre au phénotypes observés avec, comme extrêmes, des anophtalmies ou même des cyclopies

but it is possible that these chromosome rearrangments exert a long-range position effect, decreasing expression of *SHH*, by separating distant *cis*-acting regulatory elements from *SHH* or by juxtaposing the gene near a chromatin-mediated silencing region such as the telomere[9,10]. Recent examples of putative position effects include *GLI3* in Grieg's cephalopolysyndactyly[21], *SOX9* in campomelic dysplasia[22] and *PAX6* in aniridia[23], suggesting a potentially significant mechanism in human genetic disease. Variations in the severity of the HPE phenotype may be related to the amount of SHH protein produced from the normal and rearranged chromosomes and influenced by other genetic factors.



Points de cassures de translocations

44