

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

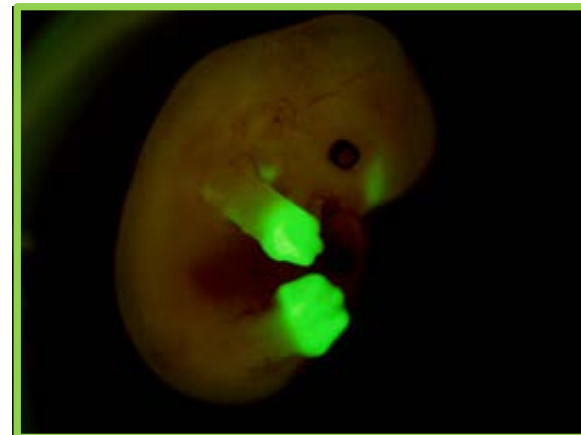
Cours 2019-2020: Régulation génétique et développement des mammifères:
Les séquences enhancers (Cours #3, 26 mai 2020)



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

Merci aux équipes
techniques!



EPFL



 @Duboule
 @CdF1530



**Identification par pièges à enhancers (pré-requis, transgénèse, élément P, détection par LacZ*

**Détection d'enhancers chez le fœtus par l'utilisation du gène lacZ*

**Extension du piège à enhancers chez les mammifères (souris) par la voie des cellules souches embryonnaires*

**Méthodes actuelles; piège à enhancers ciblé et à haut débit*

**Difficulté de lier les enhancers à leurs gènes cibles; régulation à grande distance (exemple des gènes Ld et Gremlin)*

Identification des enhancers: approches historiques

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

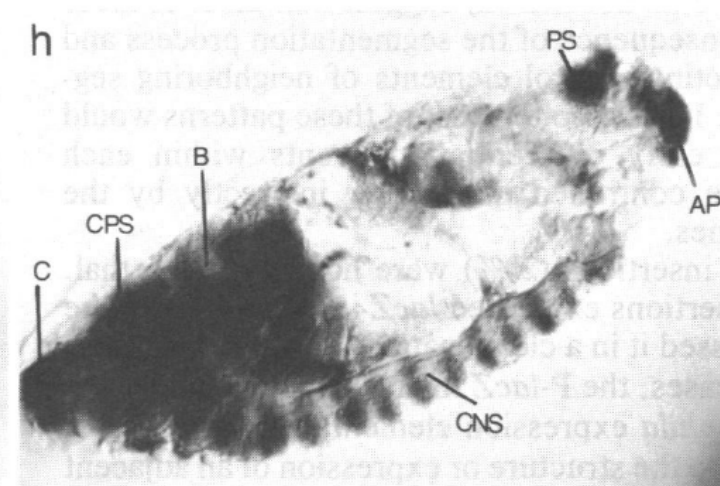
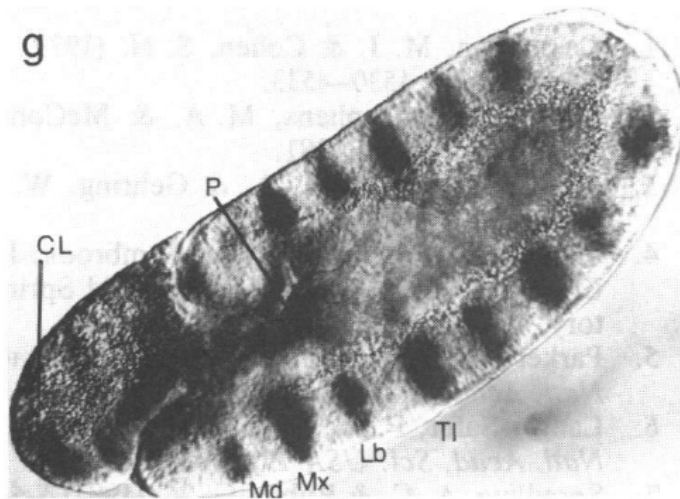
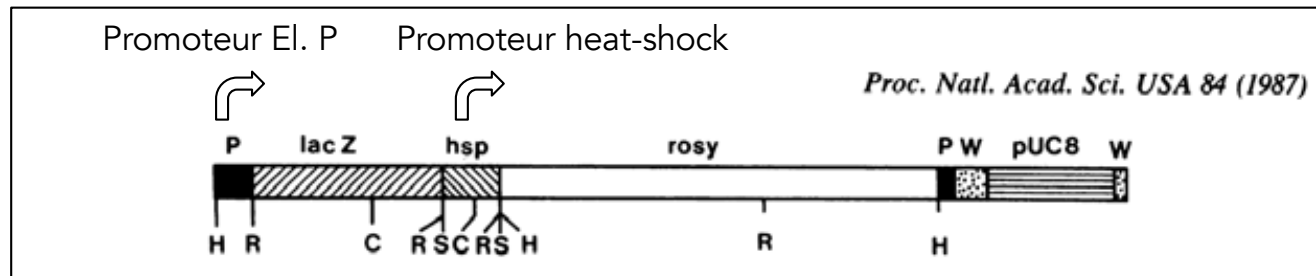
Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*

(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



Enhancer spécifique à la partie postérieure de chaque segment

**Identification par pièges à enhancers (pré-requis, transgénèse, élément P, détection par LacZ*

**Détection d'enhancers chez le foetus mammifère par l'utilisation du gène lacZ*

**Extension du piège à enhancers chez les mammifères (souris) par la voie des cellules souches embryonnaires*

**Méthodes actuelles; piège à enhancers ciblé et à haut débit*

**Difficulté de lier les enhancers à leurs gènes cibles; régulation à grande distance (exemple des gènes Ld et Gremlin)*

Identification des enhancers: approches historiques

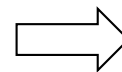
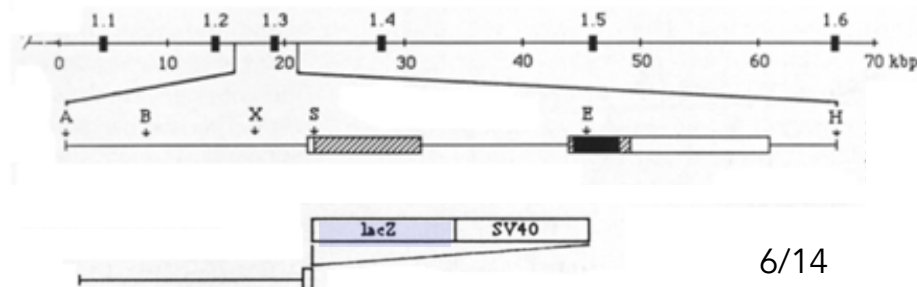
*En 1988, la Coloration *lacZ* in embryo (*in toto*) permet d'observer directement la spécificité spatio-temporelle du fonctionnement d'un gène/enhancer

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



**Identification, pièges à enhancers (pré-requis, transgénèse, élément P, détection par LacZ*

**Détection d'enhancers chez le foetus mammifère par l'utilisation du gène lacZ*

**Extension du piège à enhancers chez les mammifères (souris) par la voie des cellules souches embryonnaires*

**Méthodes actuelles; piège à enhancers ciblé et à haut débit*

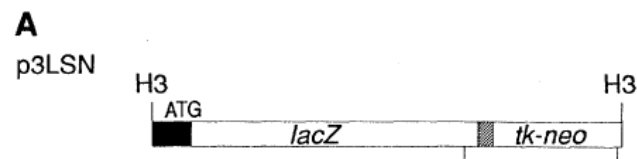
**Difficulté de lier les enhancers à leurs gènes cibles; régulation à grande distance (exemple des gènes Ld et Gremlin)*

Identification des enhancers: approches historiques

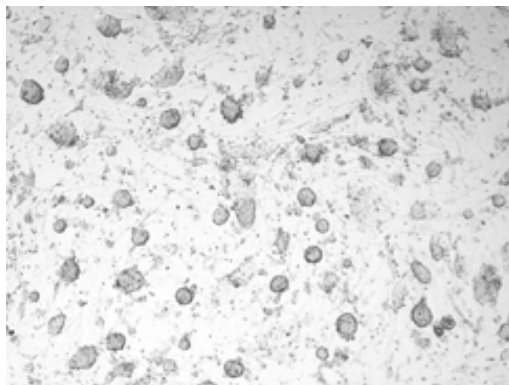
*Approches par 'enhancer trap' (piège à enhancers) et 'gene trap' (piège à gènes) chez les mammifères par utilisation des cellules ES comme véhicule

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

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



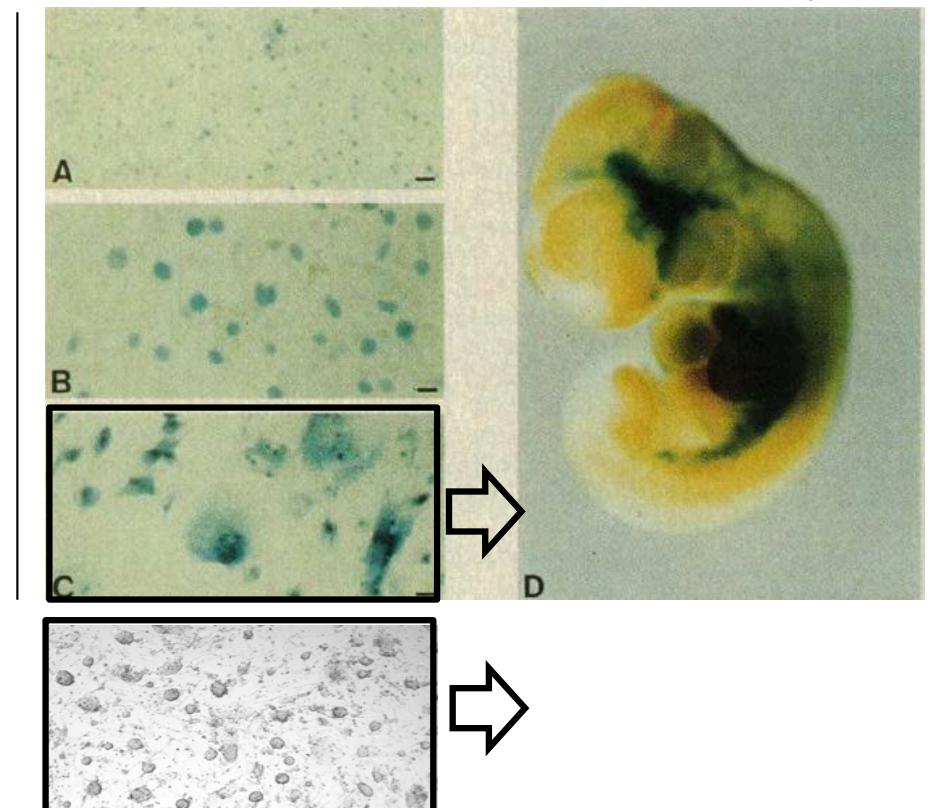
Introduction dans des
cellules ES



trappe à gènes

Coloration *lacZ*
des cellules ES

Passage en
foetus chimérique



**Identification, pièges à enhancers (pré-requis, transgénèse, élément P, détection par LacZ*

**Détection d'enhancers chez le foetus mammifère par l'utilisation du gène lacZ*

**Extension du piège à enhancers chez les mammifères (souris) par la voie des cellules souches embryonnaires*

**Méthodes actuelles; piège à enhancers ciblé et à haut débit*

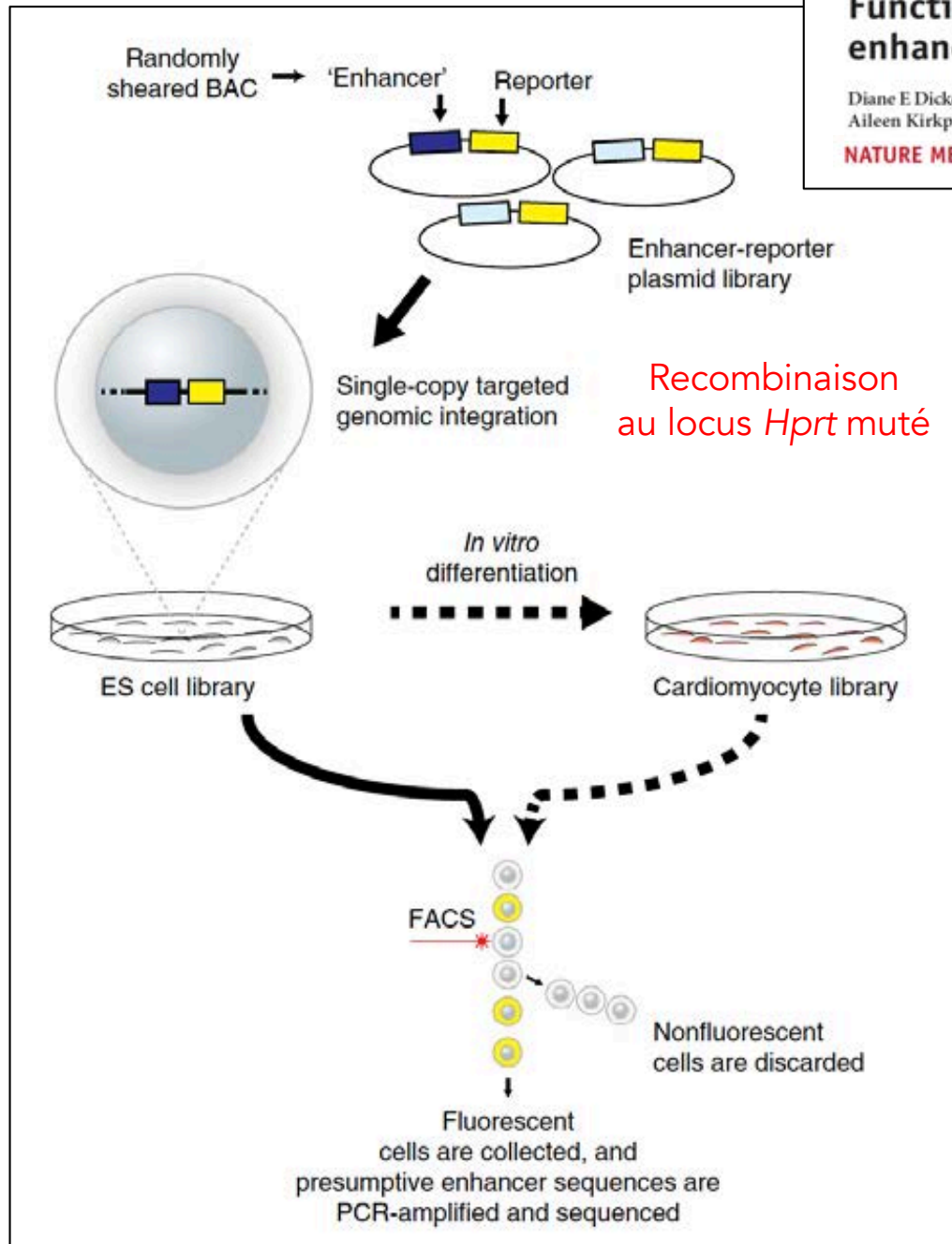
**Difficulté de lier les enhancers à leurs gènes cibles; régulation à grande distance (exemple des gènes Ld et Gremlin)*

Identification des enhancers: approches actuelles

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)



⇒ Clonage des morceaux contenant des enhancers potentiels devant un gène 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 particulier.

**Identification, pièges à enhancers (pré-requis, transgénèse, élément P, détection par LacZ*

**Détection d'enhancers chez le foetus mammifère par l'utilisation du gène lacZ*

**Extension du piège à enhancers chez les mammifères (souris) par la voie des cellules souches embryonnaires*

**Méthodes actuelles; piège à enhancers ciblé et à haut débit*

***Difficulté de lier les enhancers à leurs gènes cibles; régulation à grande distance (exemple des gènes Ld et Gremlin)**

Identification des enhancers: localisation...

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

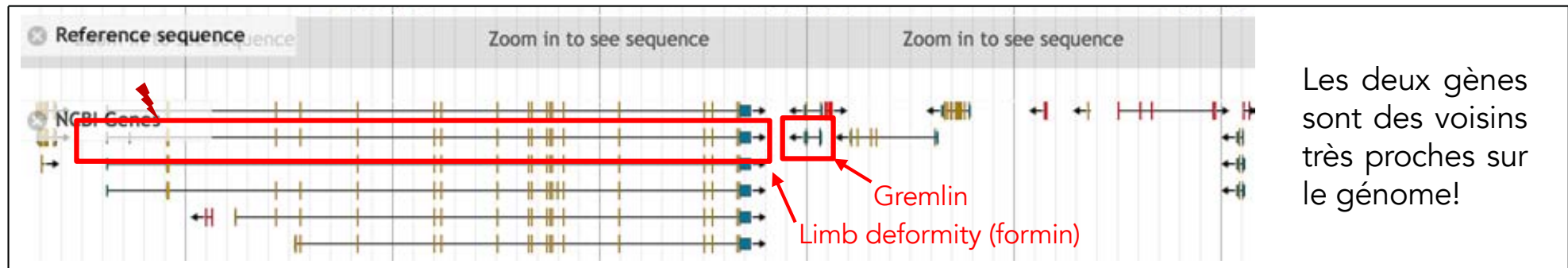
Mustafa K Khokha^{1,3}, David Hsu¹⁻³, Lisa J Brunet¹, Marc S Dionne^{1,2} & Richard M Harland¹

nature
genetics, 2003

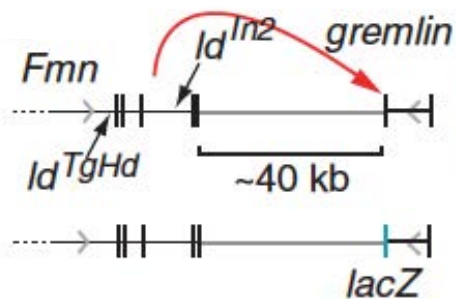
Mouse *limb deformity* mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for *Gremlin* expression

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



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)

**Comment trouver et identifier des enhanceurs?*

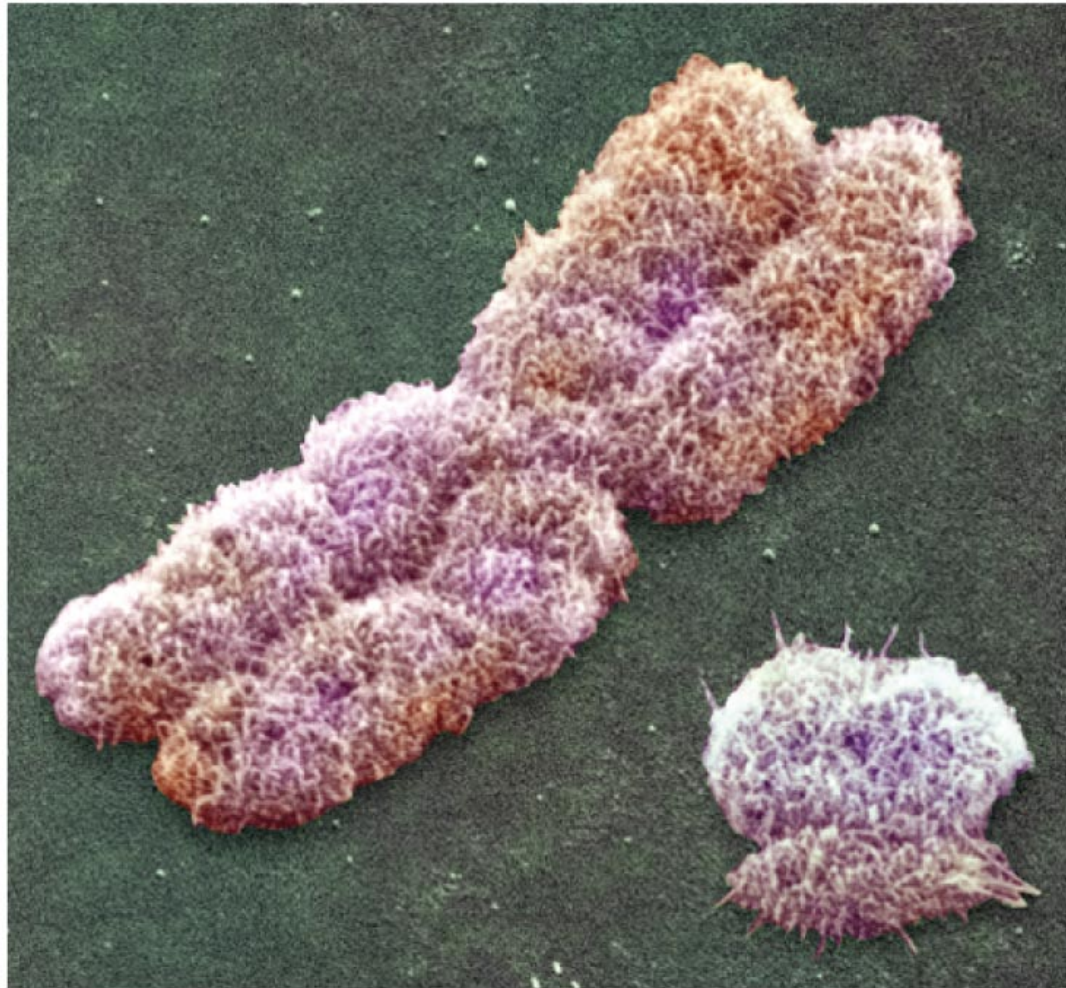
Profilage épigénétique

- 1) Modifications post-traductionnelles des histones*
- 2) Liaison de protéines indicatrices de séquences enhanceurs*
- 3) Accessibilité de la chromatine*

Identification des enhanceurs: approches actuelles

*Approches par profilage épigénétique

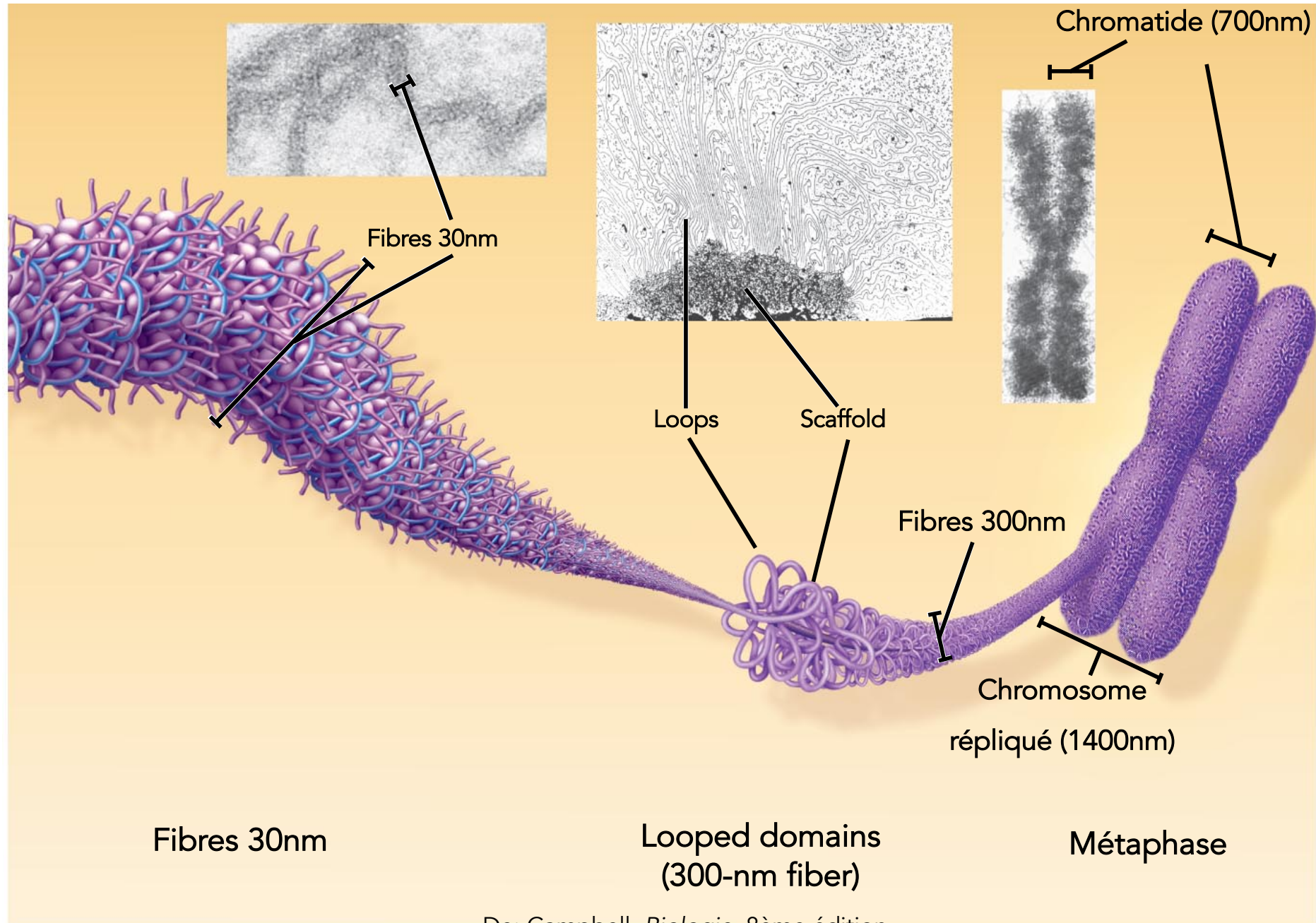
*Approche par interaction physique (souvent combinées)



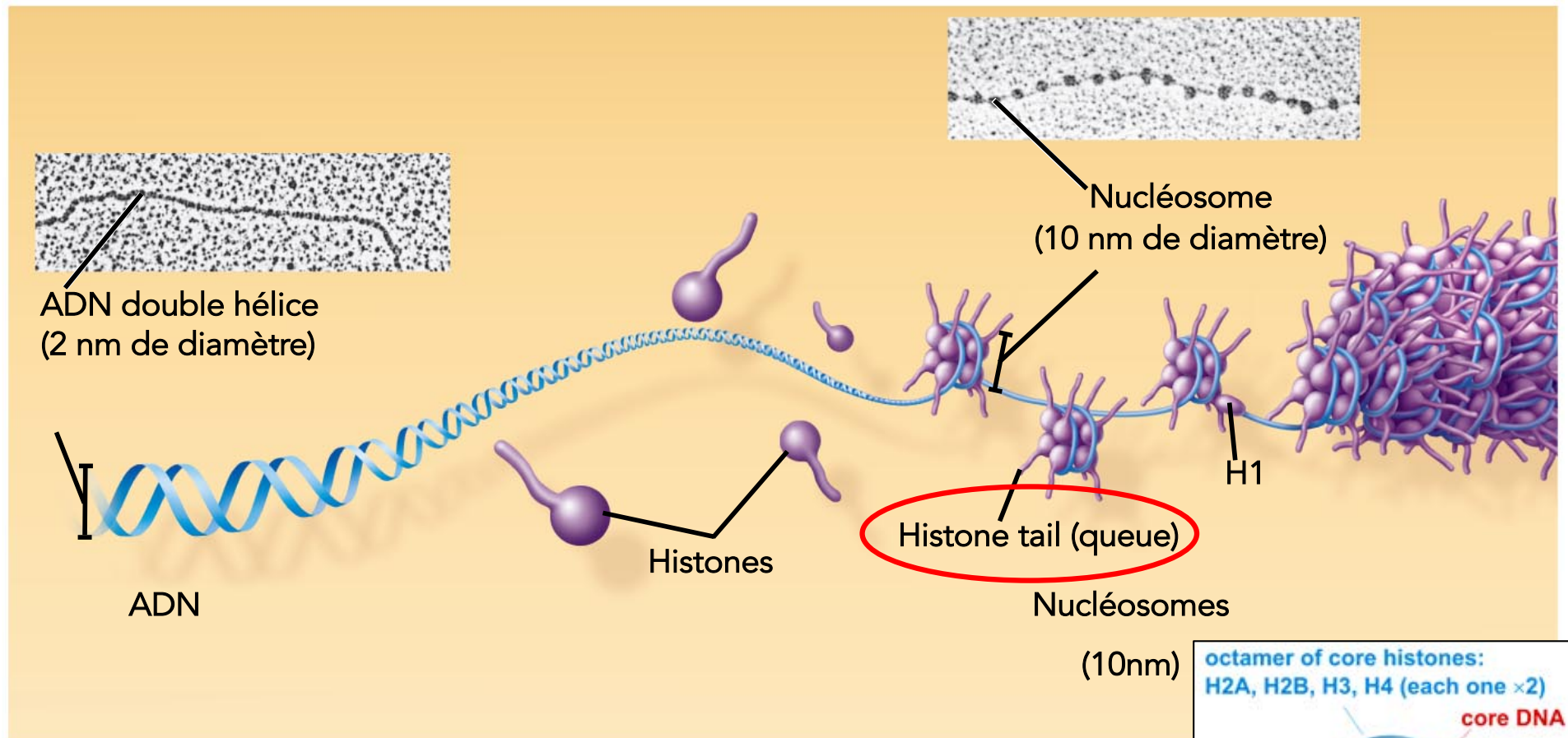
Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

De: Campbell, *Biologie*, 8ème édition

Identification des enhancers: Chromosomes, chromatine



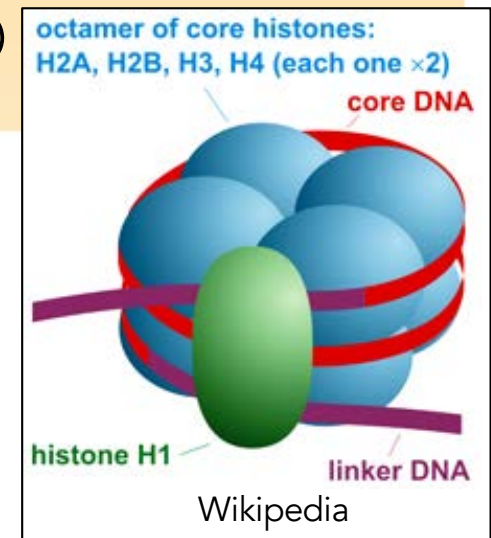
Identification des enhancers: Chromosomes, chromatine



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

De: Campbell, *Biologie*, 8ème édition

- *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...



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

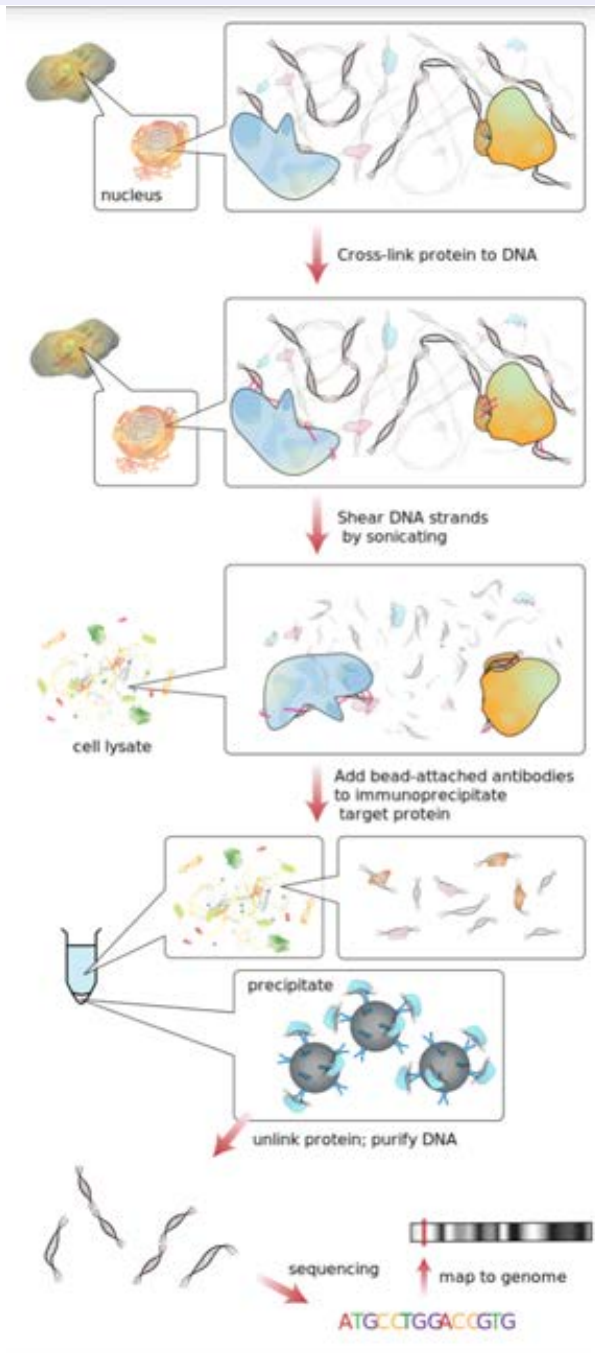


- H3K27ac —————> Chromatine active (gènes transcrits, enhancers..)
- H3K27me1
- H3K27me2
- H3K27me3 —————> Chromatine inactive (gènes non-transcrits)

- *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)

ChIP-seq (Immuno-précipitation de chromatine suivie de séquençage ADN)

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



*Protéines liées à l'ADN (facteurs de transcription, histones etc..)



*Cross-linking (traitement induisant des liens protéines-ADN) (liaisons chimiques fortes)



*Casser l'ADN en de petits morceaux



*Immuno-précipiter avec un anticorps spécifique sur bille



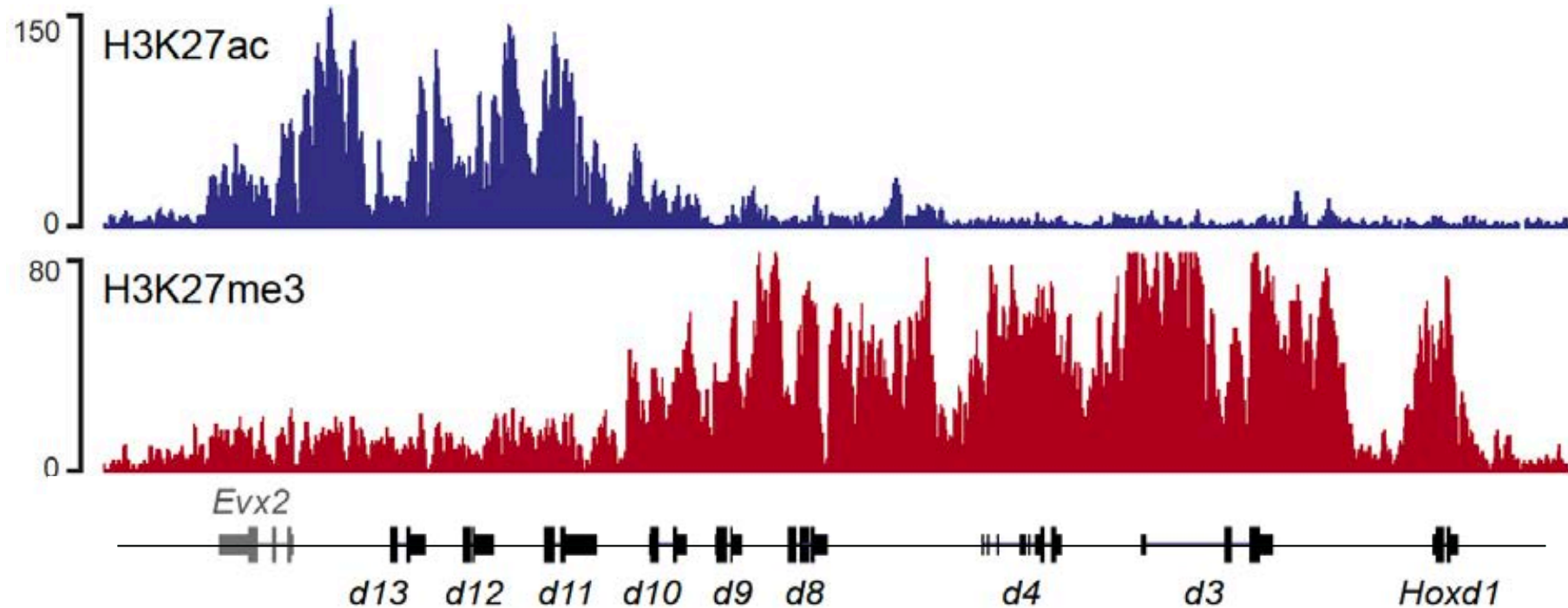
*Relâcher et isoler les fragments d'ADN



*Séquencer les fragments et aligner sur le génome

ChIP-seq (domaines actifs; domaines inactifs)

Exemple: gènes du cluster *Hoxd*, cellules d'organes génitaux d'un foetus de souris à 15.5 jours



A complex regulatory landscape involved in the development of mammalian external genitals

Ana Rita Amândio¹, Lucille Lopez-Delisle¹, Christopher Chase Bolt¹,
Bénédicte Mascrez², Denis Duboule^{1,2,3*}

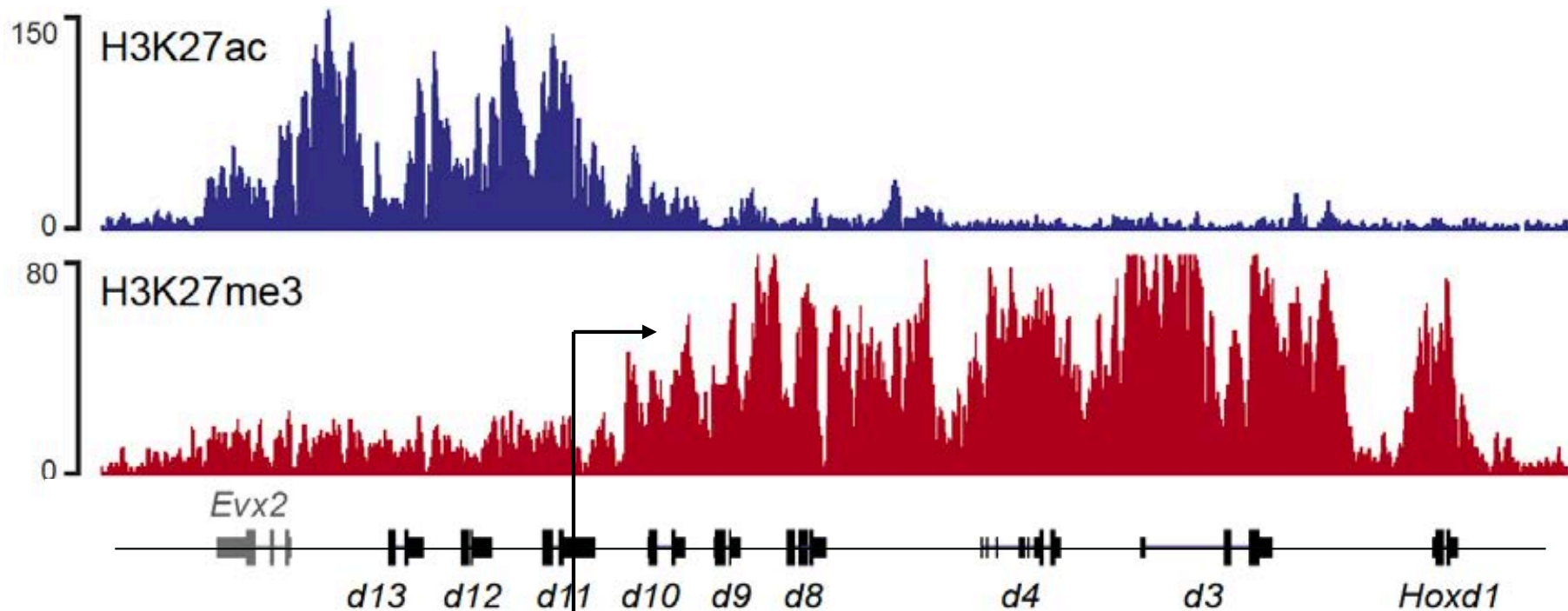
¹School of Life Sciences, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland; ²Department of Genetics and Evolution, University of Geneva, Geneva, Switzerland; ³Collège de France, Paris, France

Amandio et al. (2020)



ChIP-seq (domaines actifs; domaines inactifs)

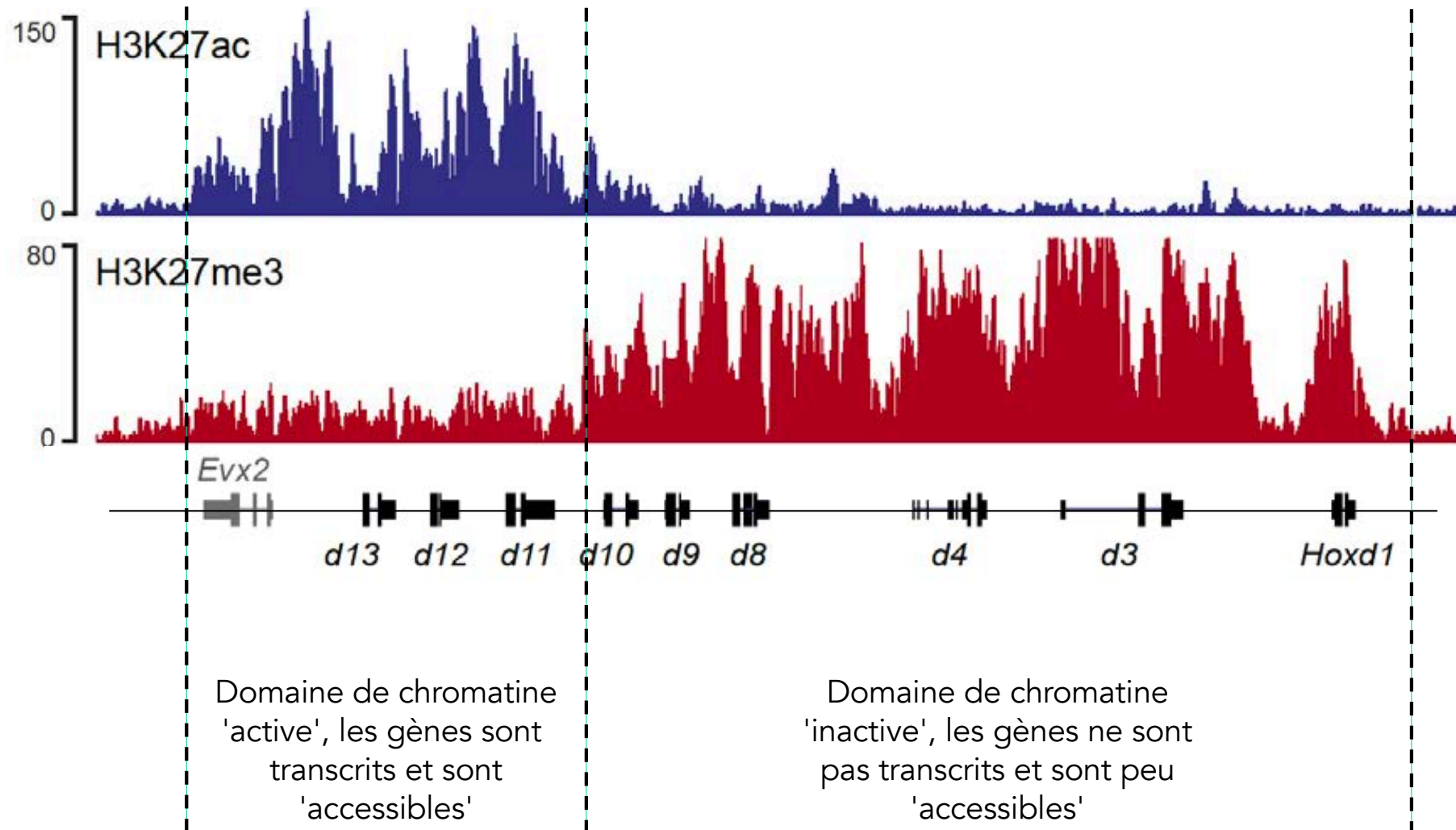
Exemple: gènes du cluster *Hoxd*, cellules d'organes génitaux d'un foetus de souris à 15.5 jours



La hauteur des pics reflète le nombre de fragments d'ADN séquencés correspondant à la séquence génomique de l'intervalle d'ADN

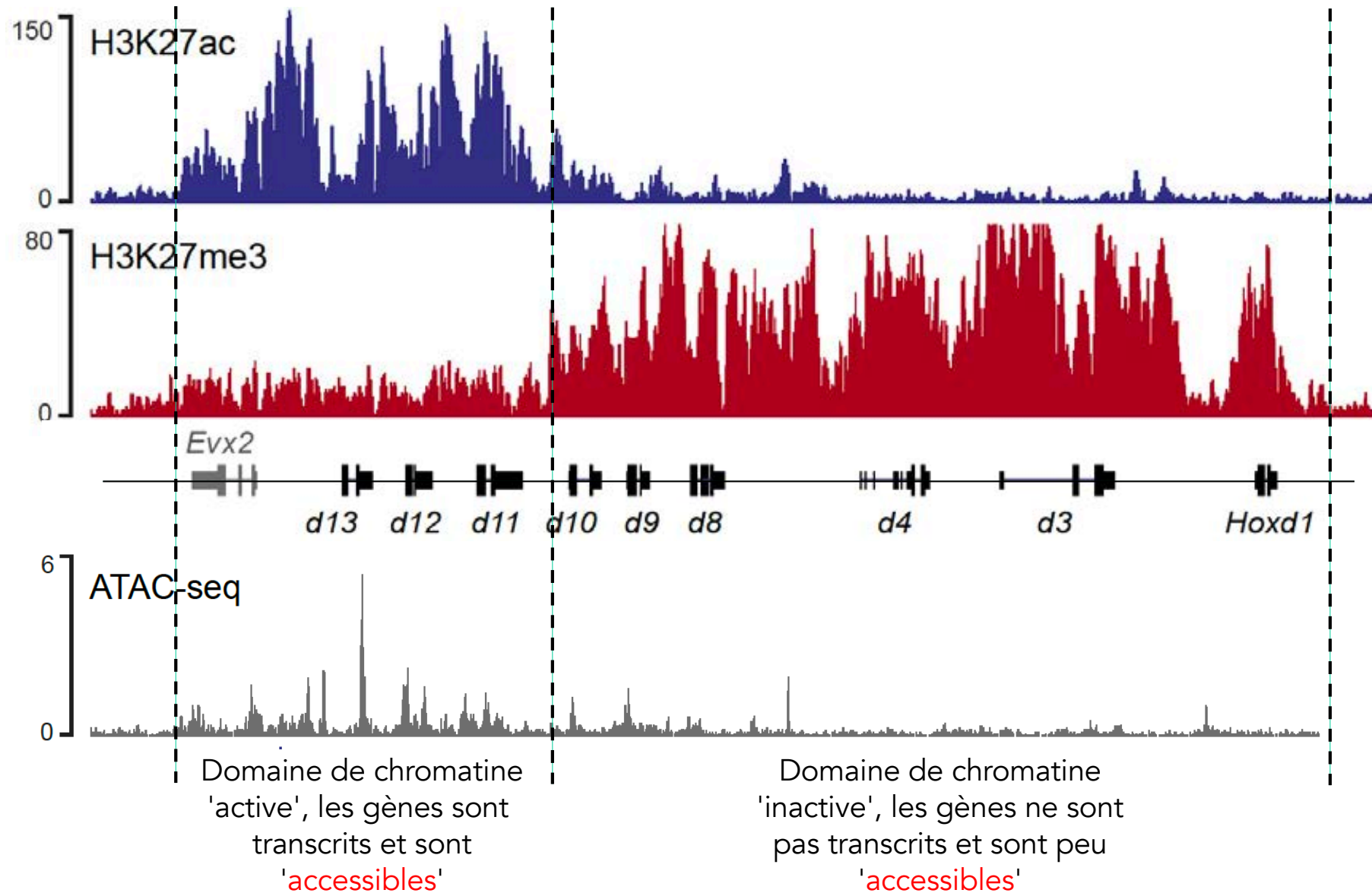
ChIP-seq (domaines actifs; domaines inactifs)

Exemple: gènes du cluster *Hoxd*, cellules d'organes génitaux d'un foetus de souris à 15.5 jours



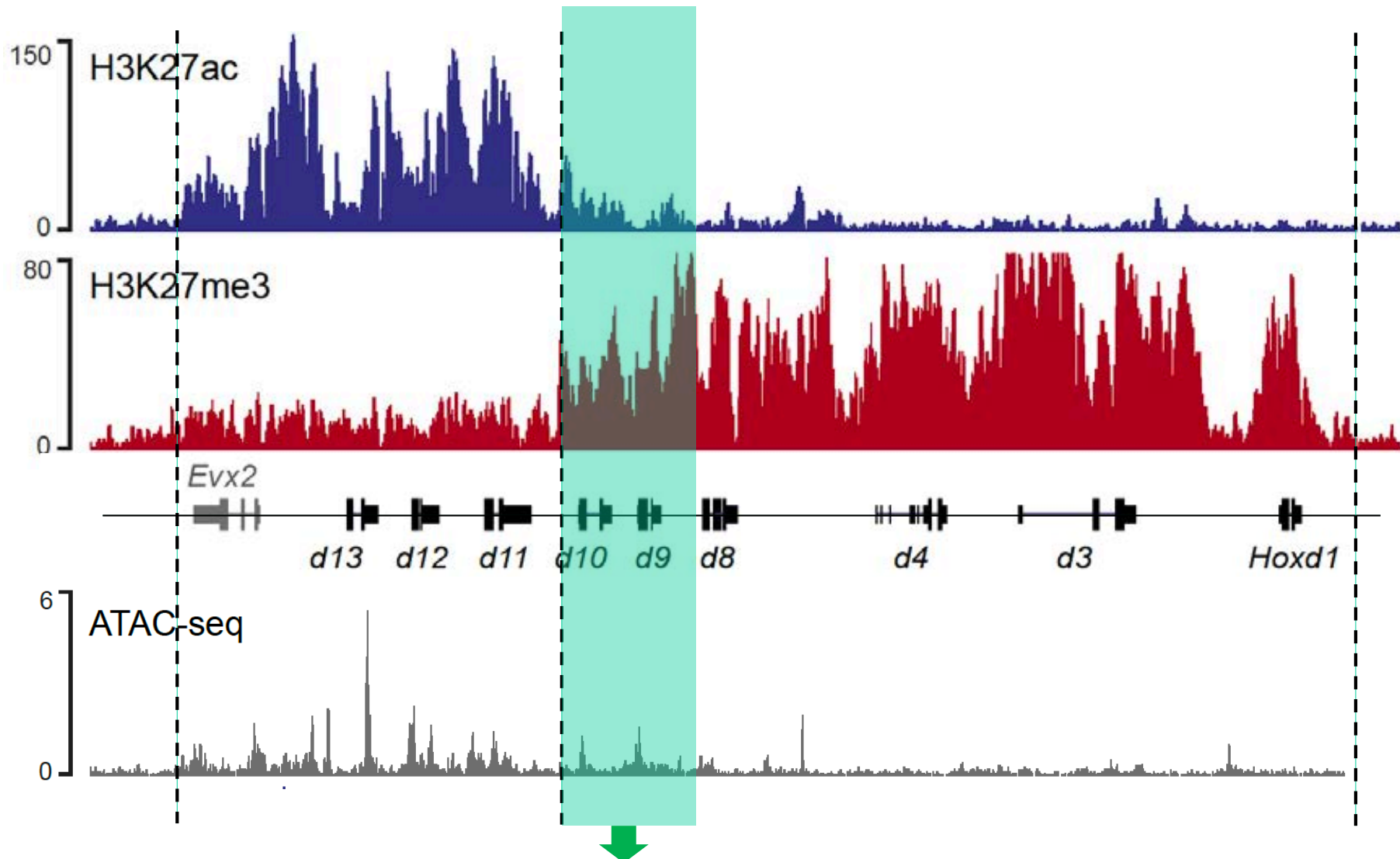
ChIP-seq (domaines actifs; domaines inactifs)

Exemple: gènes du cluster *Hoxd*, cellules d'organes génitaux d'un foetus de souris à 15.5 jours



ChIP-seq (domaines actifs; domaines inactifs)

Exemple: gènes du cluster *Hoxd*, cellules d'organes génitaux d'un foetus de souris à 15.5 jours

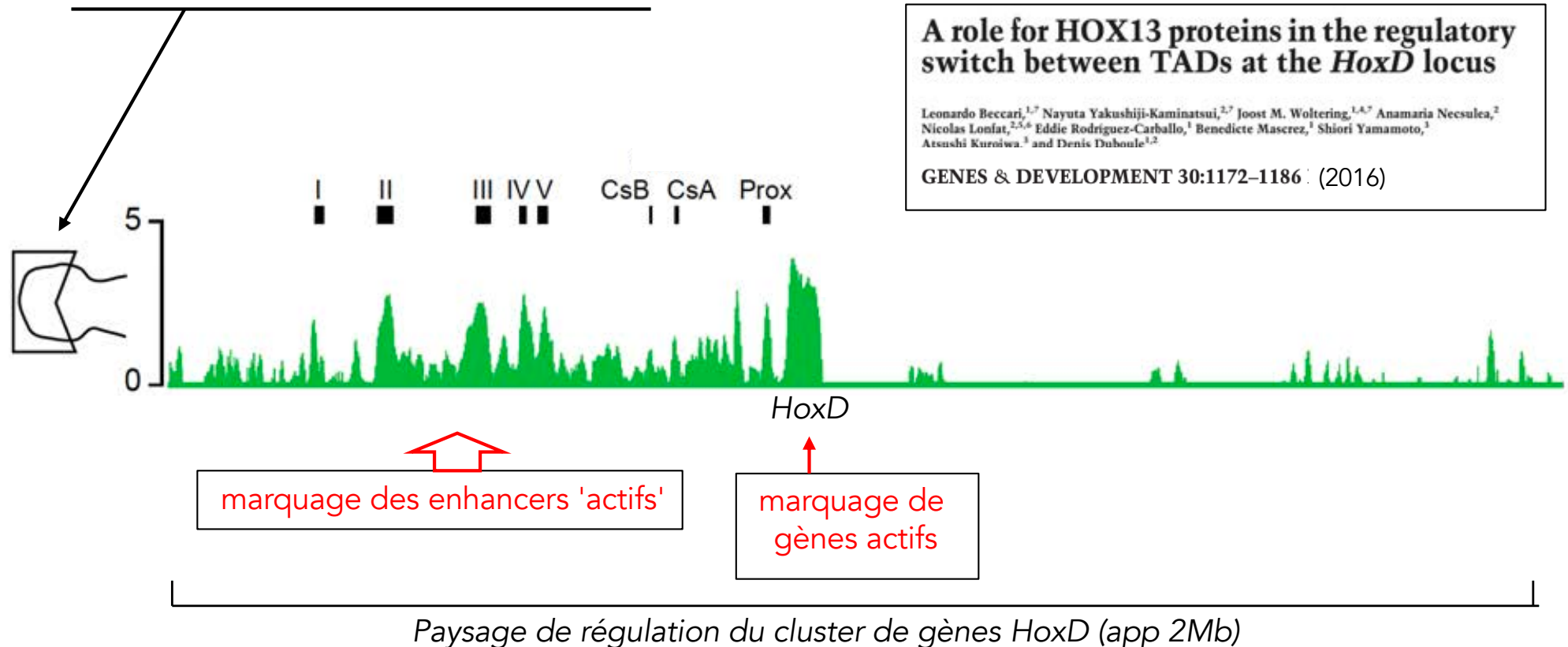


Les deux modifications sont détectées car mélange de cellules...

ChIP-seq (Marquage des enhancers)

*La modification de l'Histone H3 $H3K27ac$ (acétylation) marque également les **séquences enhancers**

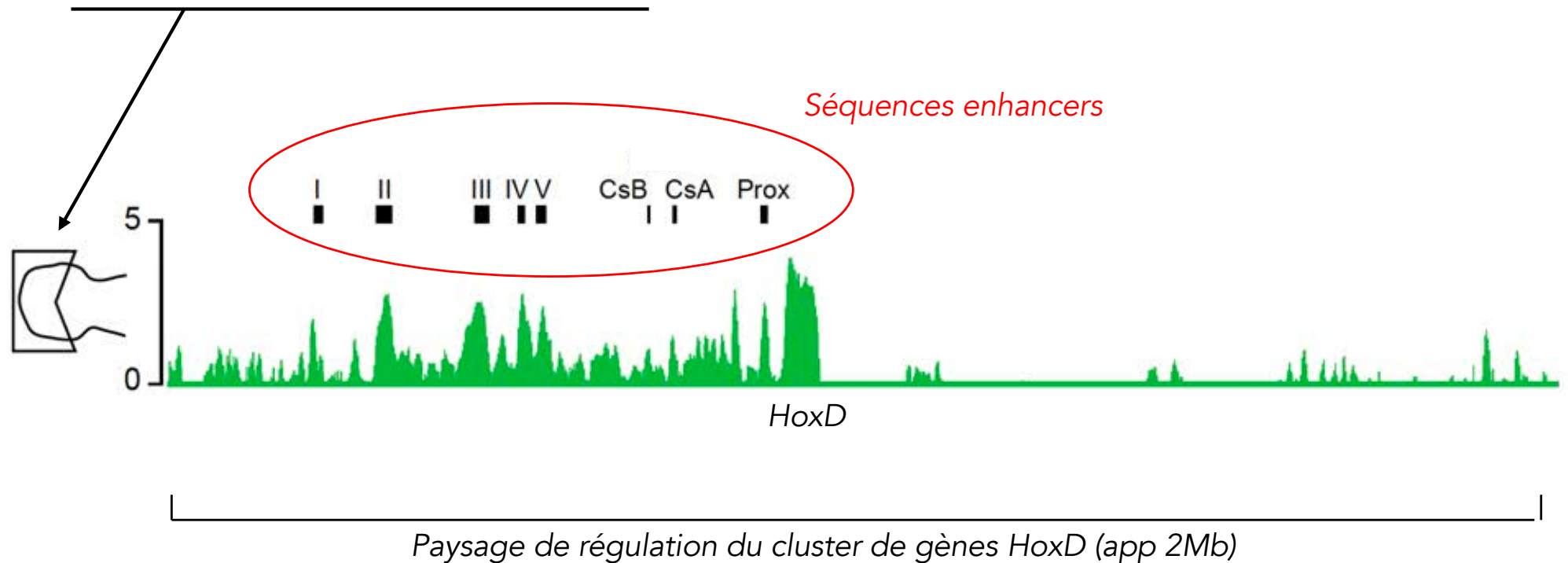
Exemple avec le cluster de gènes *Hoxd* et des cellules de la partie distale du bourgeon de membre



ChIP-seq (Marquage des enhancers)

*La modification de l'Histone H3 $H3K27ac$ (acétylation) marque également les séquences enhancers

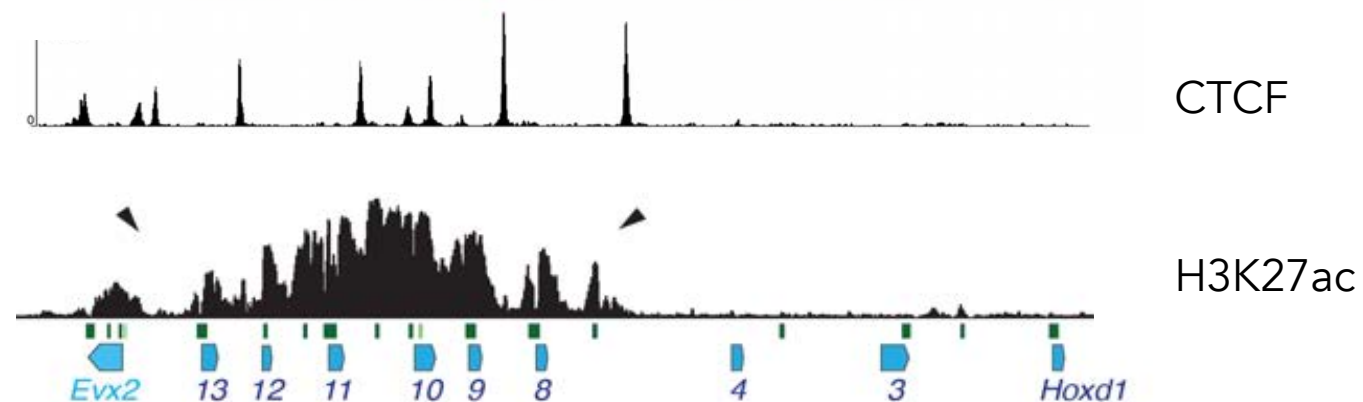
Exemple avec le cluster de gènes *Hoxd* et des cellules de la partie distale du bourgeon de membre



Les séquences enhancers actives dans les cellules de bourgeons de membre distale sont toutes positionnées du côté centromérique du cluster de gènes. **Polarisation de la régulation.**

ChIP-seq avec des protéines spécifiques

*L'approche en ChIP-seq permet aussi d'utiliser des anticorps contre des protéines qui lient les séquences de régulation (signaux mieux discriminés car le marquage ne touche pas chaque nucléosome..)



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

Exemple avec l'utilisation de la **protéine p300**, Visel et al. *Nature* 2009

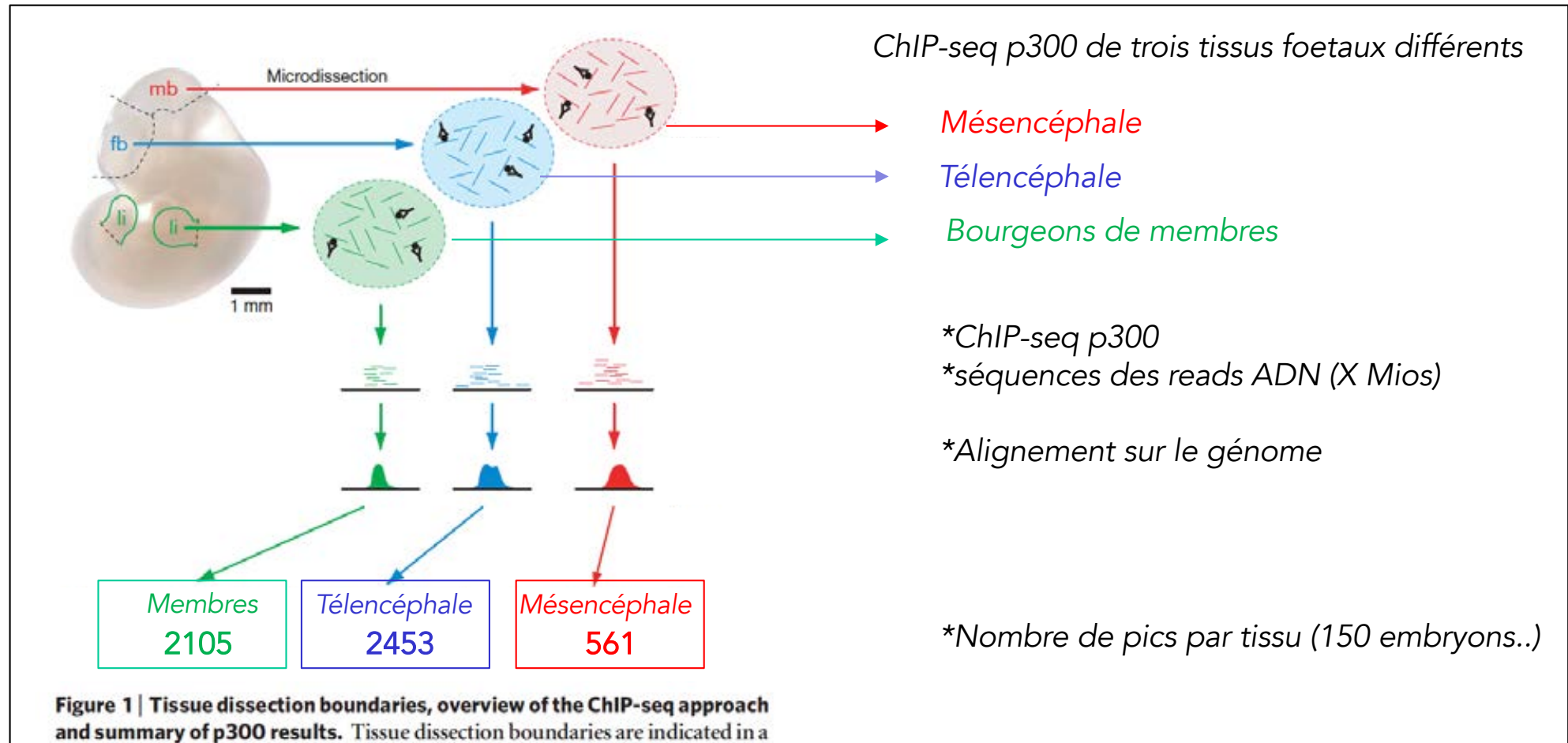
ChIP-seq de p300 (acétyltransférase)

ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers

Axel Visel^{1*}, Matthew J. Blow^{1,2*}, Zirong Li³, Tao Zhang², Jennifer A. Akiyama¹, Amy Holt¹, Ingrid Plajzer-Frick¹, Malak Shoukry¹, Crystal Wright², Feng Chen², Veena Afzal¹, Bing Ren³, Edward M. Rubin^{1,2} & Len A. Pennacchio^{1,2}

Nature, 2009 ©2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

La protéine p300 est une acétyl-transférase et un co-activateur transcriptionnel localisée entre autre sur les séquences enhancers actives et indispensable pendant le développement embryonnaire



ChIP-seq de p300 (acétyltransférase)

ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers

Axel Visel^{1*}, Matthew J. Blow^{1,2*}, Zirong Li³, Tao Zhang², Jennifer A. Akiyama¹, Amy Holt¹, Ingrid Plajzer-Frick¹, Malak Shoukry¹, Crystal Wright², Feng Chen², Veena Afzal¹, Bing Ren³, Edward M. Rubin^{1,2} & Len A. Pennacchio^{1,2}

Nature, 2009 ©2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

La protéine p300 est une acétyl-transférase et un co-activateur transcriptionnel localisée entre autre sur les séquences enhancers active et indispensable pendant le développement embryonnaire

Télocéphale Mésencéphale Membres

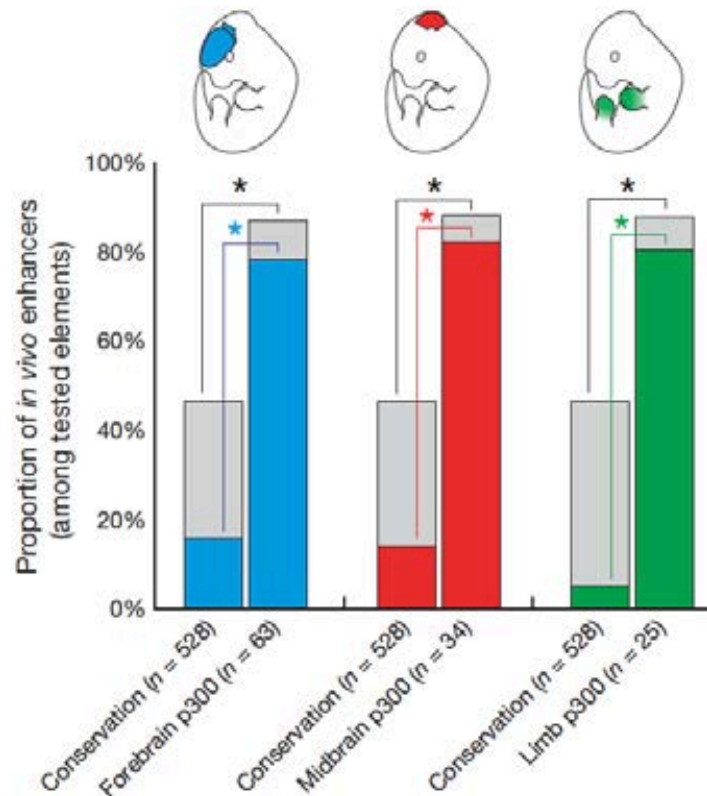


Figure 2 | p300 binding accurately predicts enhancers and their tissue-specific activity patterns. Bar height indicates the frequency of *in vivo*

*Vérification des pics enhancers par transgénèse *in vivo*

*Quand on utilise la conservation de séquence ADN comme critère, entre 5 et 20% de positifs

*Quand on utilise les pics p300 comme critère, app 80% de positifs!

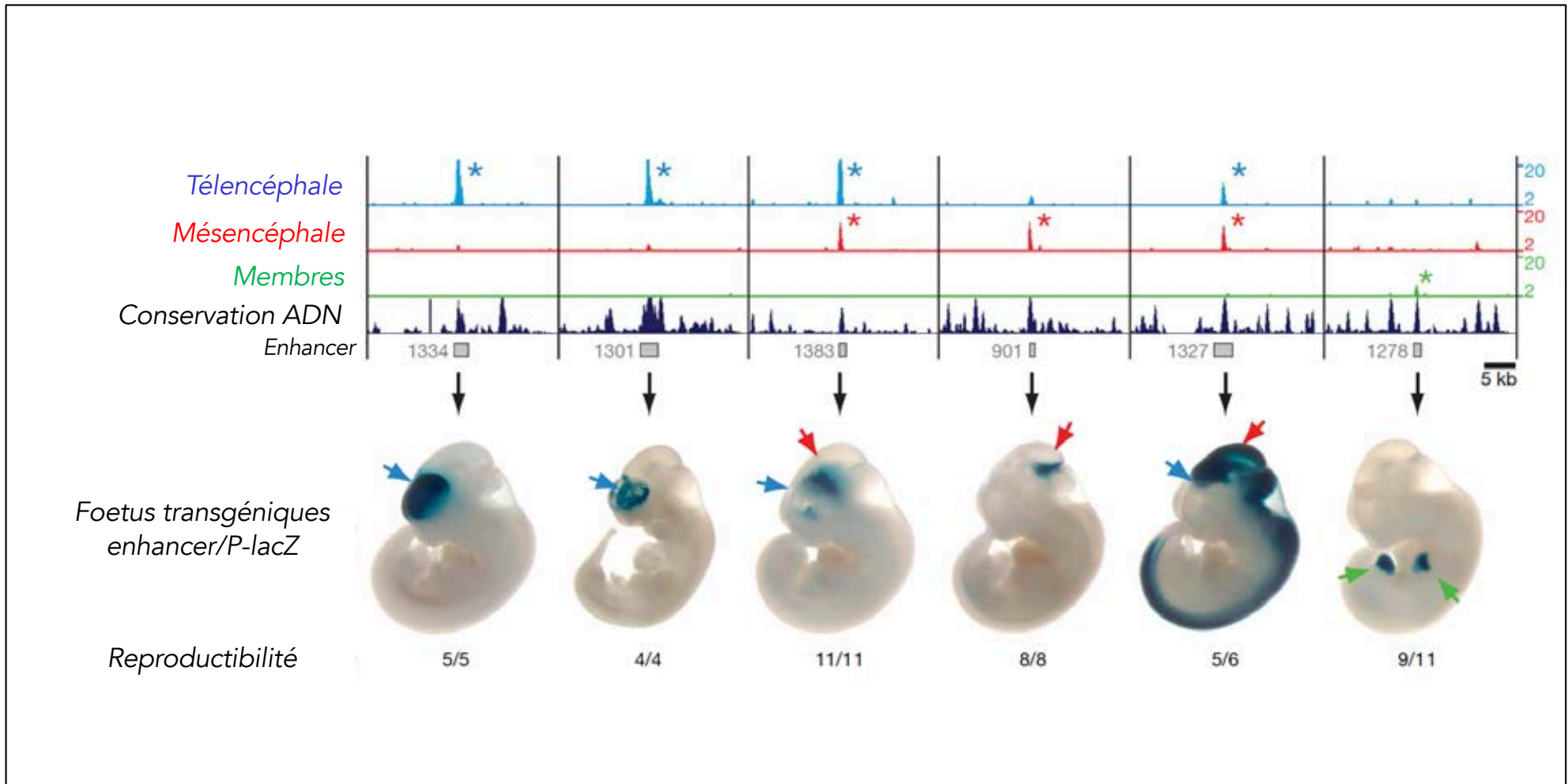
ChIP-seq de p300 (acétyltransférase)

ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers

Axel Visel^{1*}, Matthew J. Blow^{1,2*}, Zirong Li³, Tao Zhang², Jennifer A. Akiyama¹, Amy Holt¹, Ingrid Plajzer-Frick¹, Malak Shoukry¹, Crystal Wright², Feng Chen², Veena Afzal¹, Bing Ren³, Edward M. Rubin^{1,2} & Len A. Pennacchio^{1,2}

Nature, 2009 ©2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

La protéine p300 est une acétyl-transférase et un co-activateur transcriptionnel localisée entre autre sur les séquences enhancers active et indispensable pendant le développement embryonnaire



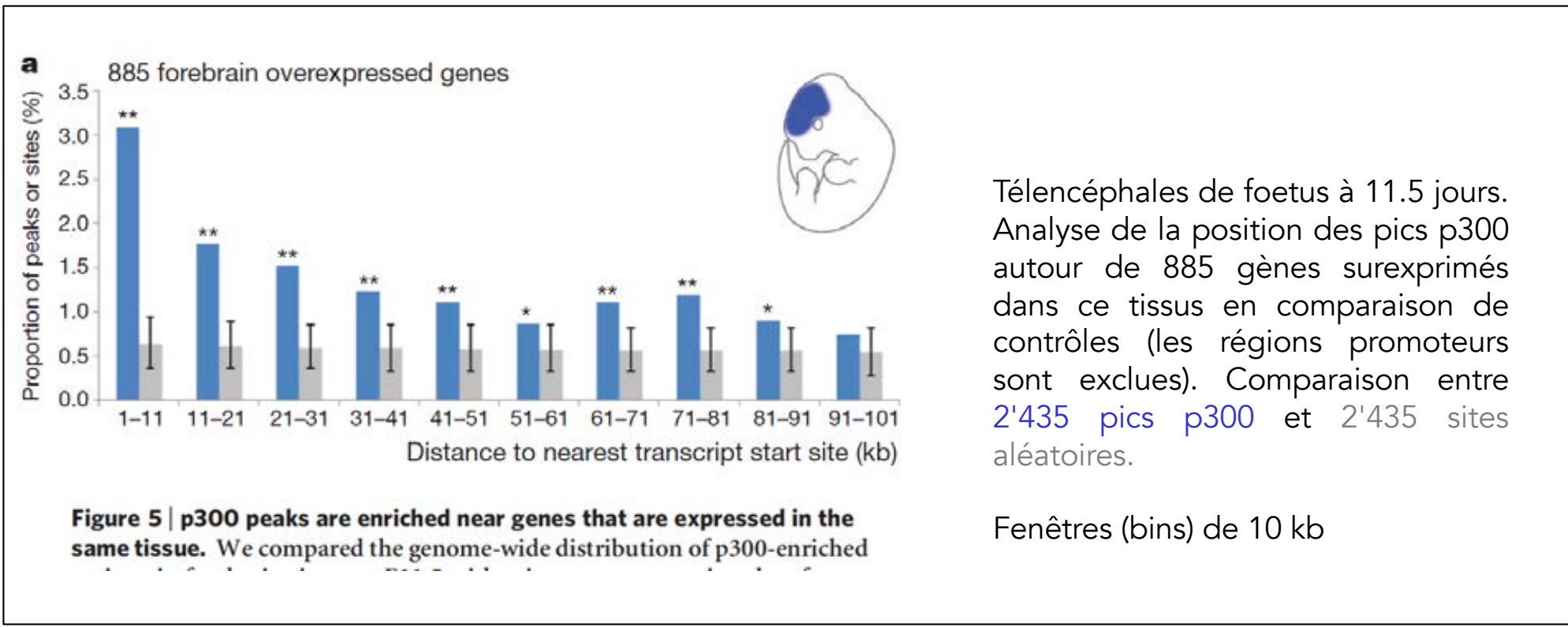
ChIP-seq de p300 (acétyltransférase)

ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers

Axel Visel^{1*}, Matthew J. Blow^{1,2*}, Zirong Li³, Tao Zhang², Jennifer A. Akiyama¹, Amy Holt¹, Ingrid Plajzer-Frick¹, Malak Shoukry¹, Crystal Wright², Feng Chen², Veena Afzal¹, Bing Ren³, Edward M. Rubin^{1,2} & Len A. Pennacchio^{1,2}

Nature, 2009 ©2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

La protéine p300 est une acétyl-transférase et un co-activateur transcriptionnel localisée entre autre sur les séquences enhancers active et indispensable pendant le développement embryonnaire



Télocéphales de foetus à 11.5 jours. Analyse de la position des pics p300 autour de 885 gènes surexprimés dans ce tissu en comparaison de contrôles (les régions promoteurs sont exclues). Comparaison entre 2'435 pics p300 et 2'435 sites aléatoires.

Fenêtres (bins) de 10 kb

ChIP-seq de p300 (acétyltransférase)

ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers

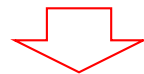
Axel Visel^{1*}, Matthew J. Blow^{1,2*}, Zirong Li³, Tao Zhang², Jennifer A. Akiyama¹, Amy Holt¹, Ingrid Plajzer-Frick¹, Malak Shoukry¹, Crystal Wright², Feng Chen², Veena Afzal¹, Bing Ren³, Edward M. Rubin^{1,2} & Len A. Pennacchio^{1,2}

Nature, 2009 ©2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

La protéine p300 est une acétyl-transférase et un co-activateur transcriptionnel localisée entre autre sur les séquences enhancers active et indispensable pendant le développement embryonnaire

Conclusions

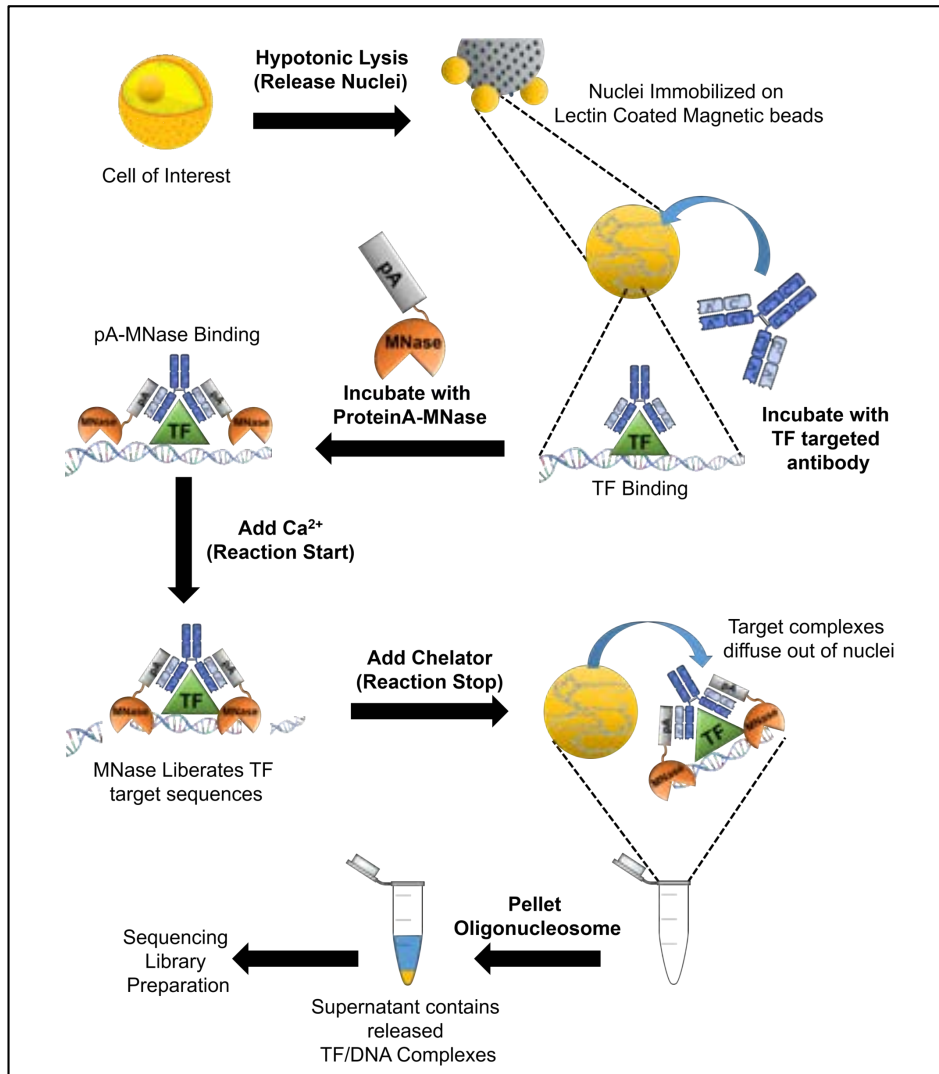
A major yet unresolved quest in decoding the human genome is the identification of the regulatory sequences that control the spatial and temporal expression of genes. Distant-acting transcriptional enhancers are particularly challenging to uncover because they are scattered among the vast non-coding portion of the genome. Evolutionary sequence constraint can facilitate the discovery of enhancers, but fails to predict when and where they are active *in vivo*. Here we present the results of chromatin immunoprecipitation with the enhancer-associated protein p300 followed by massively parallel sequencing, and map several thousand *in vivo* binding sites of p300 in mouse embryonic forebrain, midbrain and limb tissue. **We tested 86 of these sequences in a transgenic mouse assay, which in nearly all cases demonstrated reproducible enhancer activity in the tissues that were predicted by p300 binding. Our results indicate that *in vivo* mapping of p300 binding is a highly accurate means for identifying enhancers and their associated activities, and suggest that such data sets will be useful to study the role of tissue-specific enhancers in human biology and disease on a genome-wide scale.**



...nos résultats indiquent que la cartographie *in vivo* des sites de liaison de p300 est un moyen précis pour identifier les enhancers et leurs activités. Ces résultats suggèrent que de tels datasets seront utiles pour étudier le rôle des enhancers tissus-spécifiques dans la biologie humaine normale et dans certaines pathologies, à l'échelle du génome entier.

Limitations du ChIP-seq et améliorations (Cut & Run)

*Néanmoins, l'approche en ChIP-seq nécessite l'utilisation d'un nombre de cellules relativement conséquent (150 embryons pour p300), qui peut rendre cette approche difficile pour des raisons logistiques.



*Des améliorations récentes peuvent pallier ces limitations jusqu'à un certain point, comme par exemple l'approche *Cut & Run* qui utilise une protéine A conjuguée à une activité de nucléase micrococcocale (MNase) qui va digérer l'ADN lié par une protéine et son anticorps, ce qui permettra de le séquencer par la suite. Méthode récente développée par le laboratoire de S. Henikoff sur la base et le principe des travaux de U. Laemmli au début des années 2000 (ChIC and ChEC).

Méthode plus sensible mais ...

ATAC-seq ('Assay for transposase-accessible chromatin using sequencing')

La chromatine présente des états d'accessibilité différents

- *Chromatine fermée: Les facteurs n'accèdent pas aux séquences d'ADN
- *Chromatine permissive: Des facteurs peuvent accéder et réorganiser la chromatine
- *Chromatine ouverte: la transcription peut se faire

Ces états peuvent être révélés par l'accessibilité d'un transposon

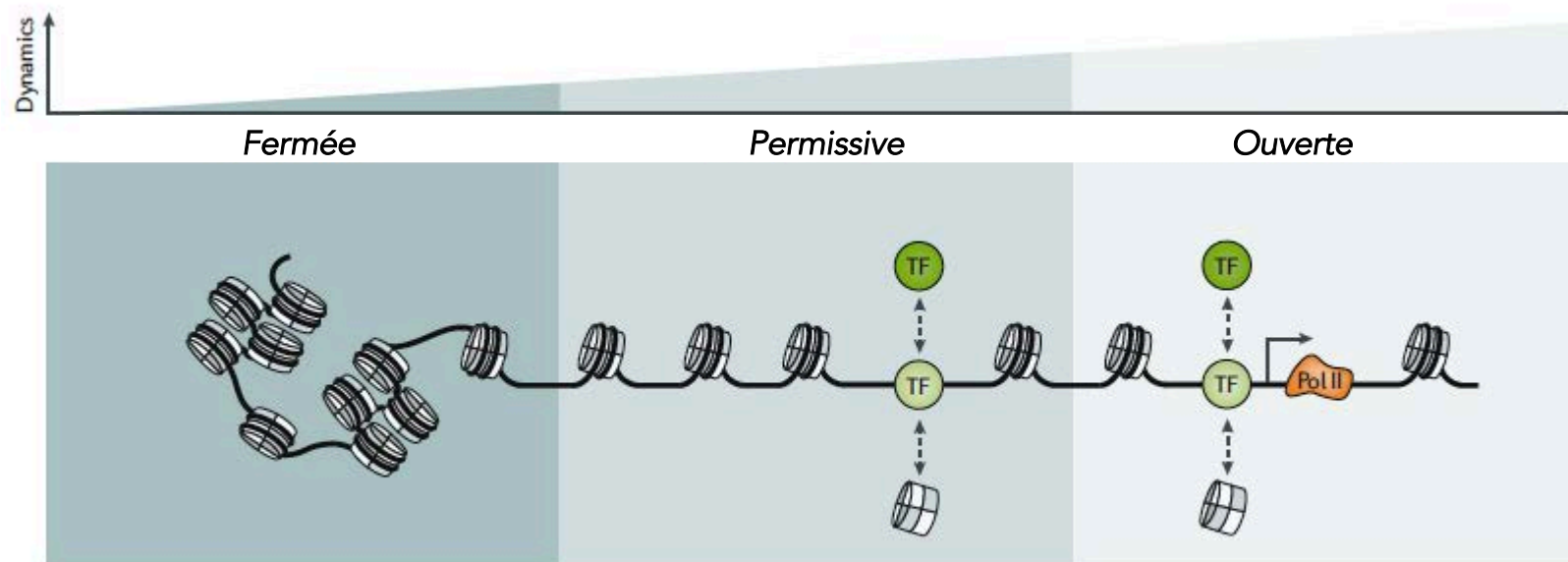


Fig. 1 | A continuum of accessibility states broadly reflects the distribution of chromatin dynamics across the genome. In contrast to closed chromatin, permissive chromatin is sufficiently dynamic for transcription factors to initiate sequence-specific accessibility remodelling and establish an open chromatin conformation (illustrated here for an active gene locus). Pol II, RNA polymerase II; TF, transcription factor.

ATAC-seq ('Assay for transposase-accessible chromatin using sequencing')

Buenrostro et al., (2013) *Nature Methods* 10: 1213-1218
(Grenleaf and Chang laboratories, Stanford)

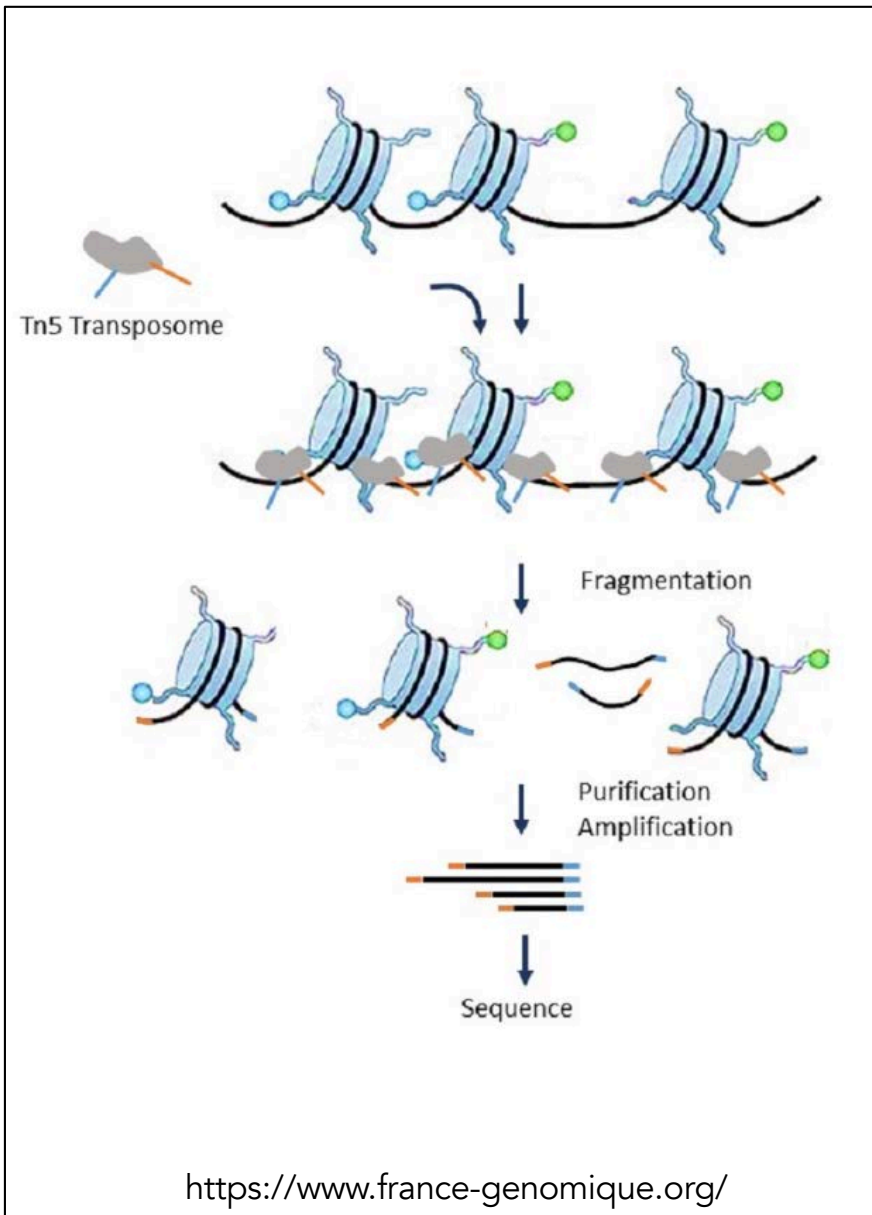
Transposase du Tn5 mutante hyperactive

La transposase peut aller dans les région accessibles, ouvertes de la chromatine

La transposase coupe et 'tague' les région accessibles, ('tagmentation')

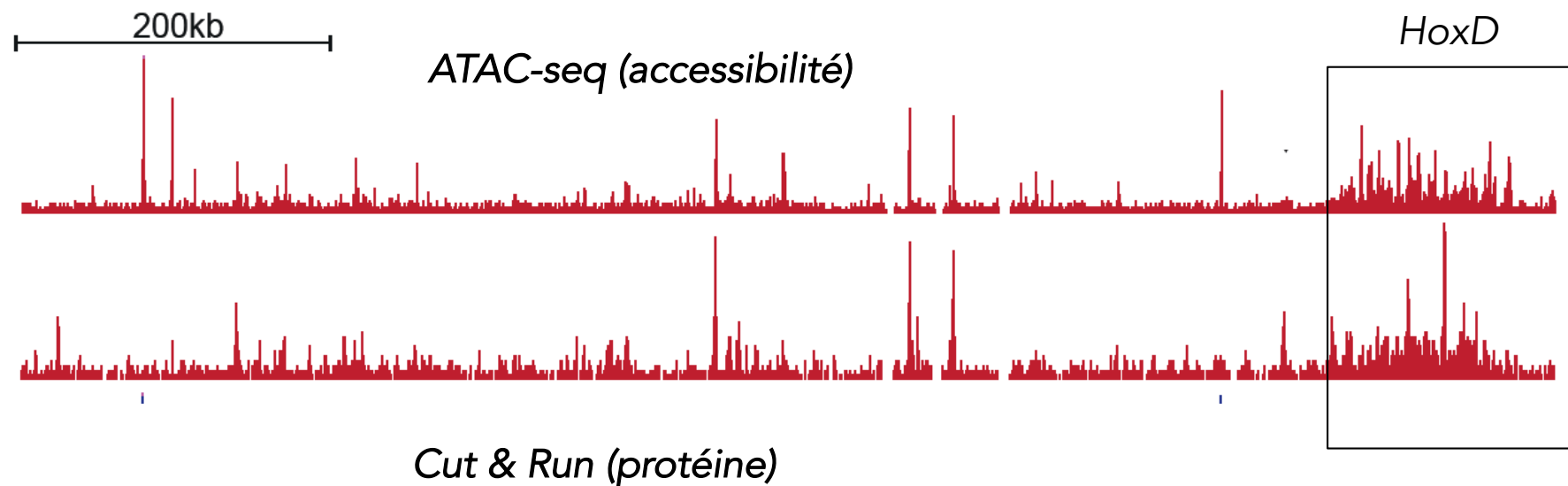
L'ADN coupé et tagué est purifié, séquencé et aligné sur le génome

Pas d'anticorps, pas d'extraction, pas de sonication...
(possible avec une cellule unique)



ATAC-seq ('Assay for transposase-accessible chromatin using sequencing')

Exemple: Région régulatrice (paysage) du complexe de gènes *HoxD*

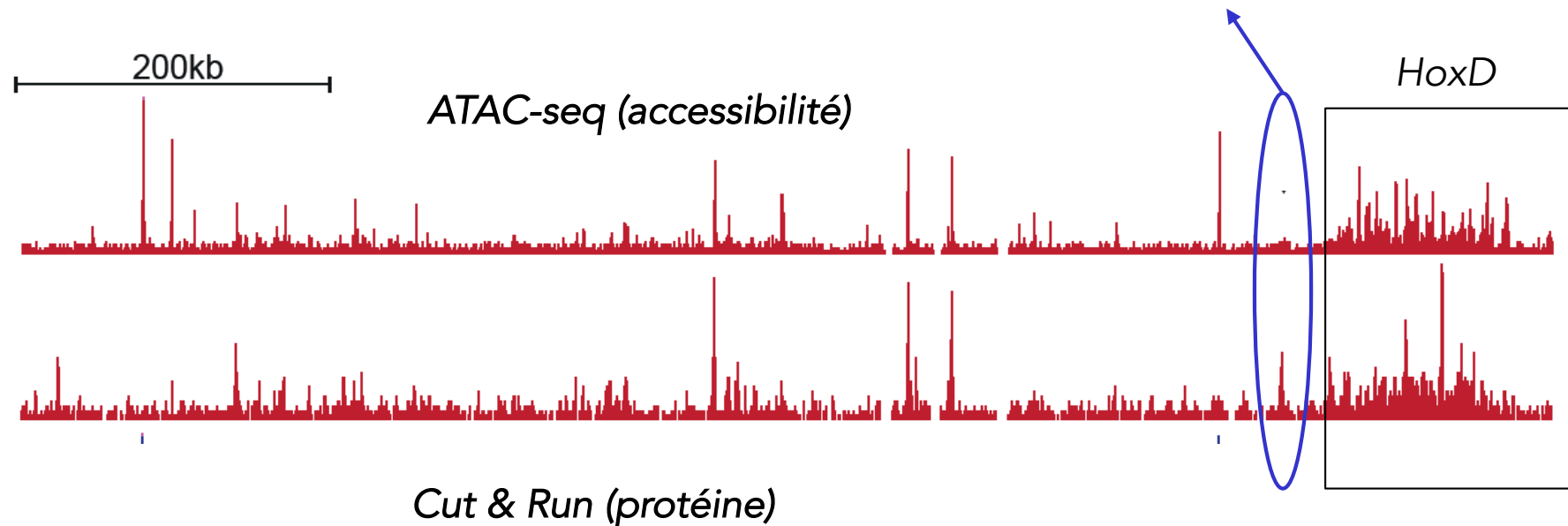


La convergence des deux analyses permet d'identifier des sites potentiels de liaisons de facteurs nécessaires au contrôle de l'expression des gènes cibles

ATAC-seq ('Assay for transposase-accessible chromatin using sequencing')

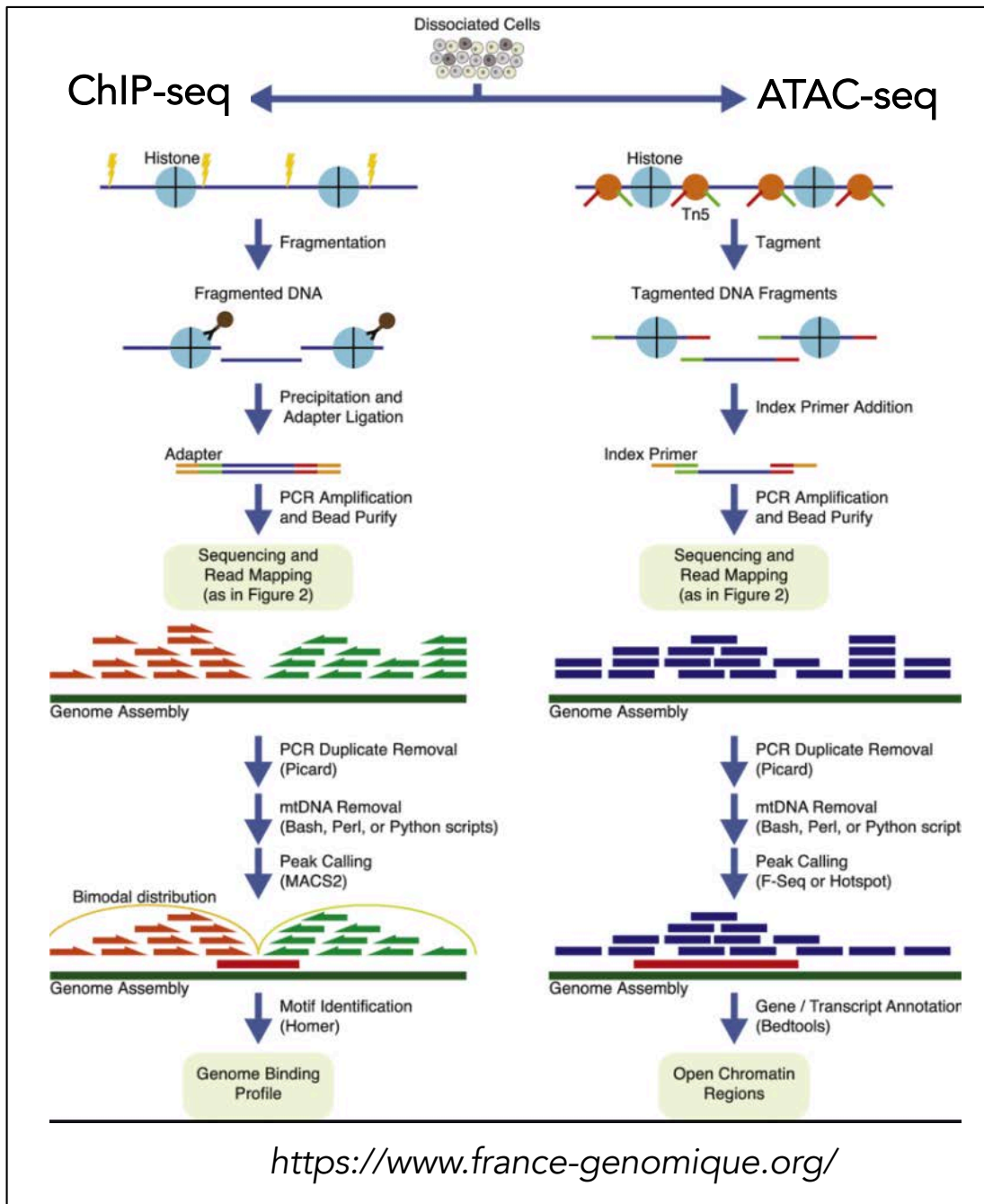
Exemple: Région régulatrice (paysage) du complexe de gènes *HoxD*

La protéine semble être liée avant que la chromatine ne soit accessible (causalité?) 'Effet pionnier'



La convergence des deux analyses permet d'identifier des sites potentiels de liaisons de facteurs nécessaires au contrôle de l'expression des gènes cibles

ChIP-seq versus ATAC-seq (signaux différents)



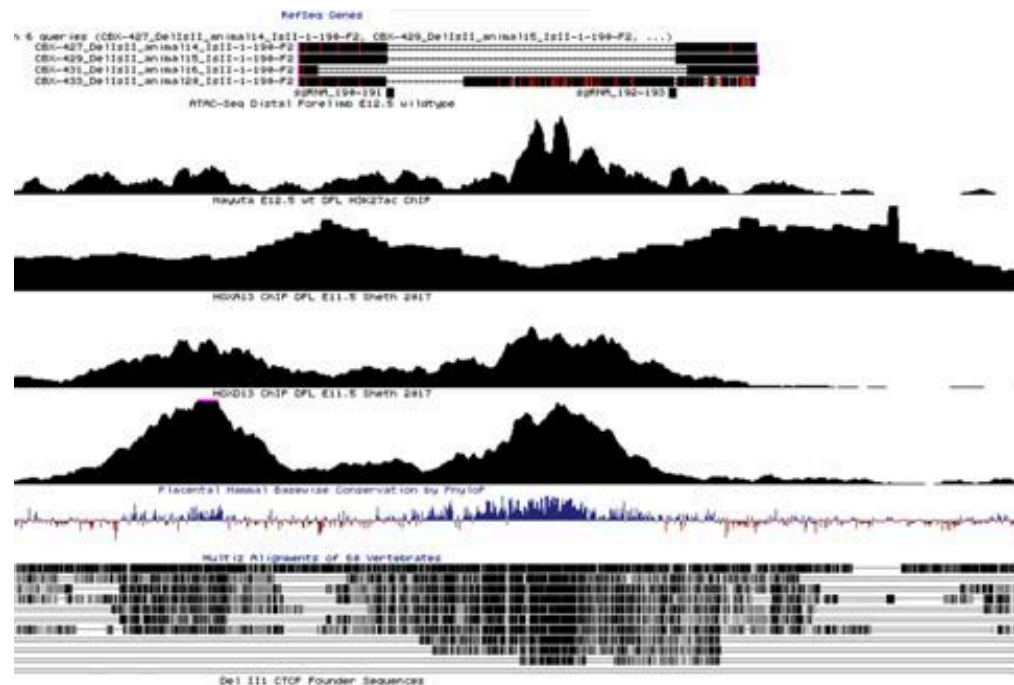
La distribution des séquences d'ADN sera différente selon la technique, ce qui apporte une confirmation supplémentaire à la spécificité de la liaison



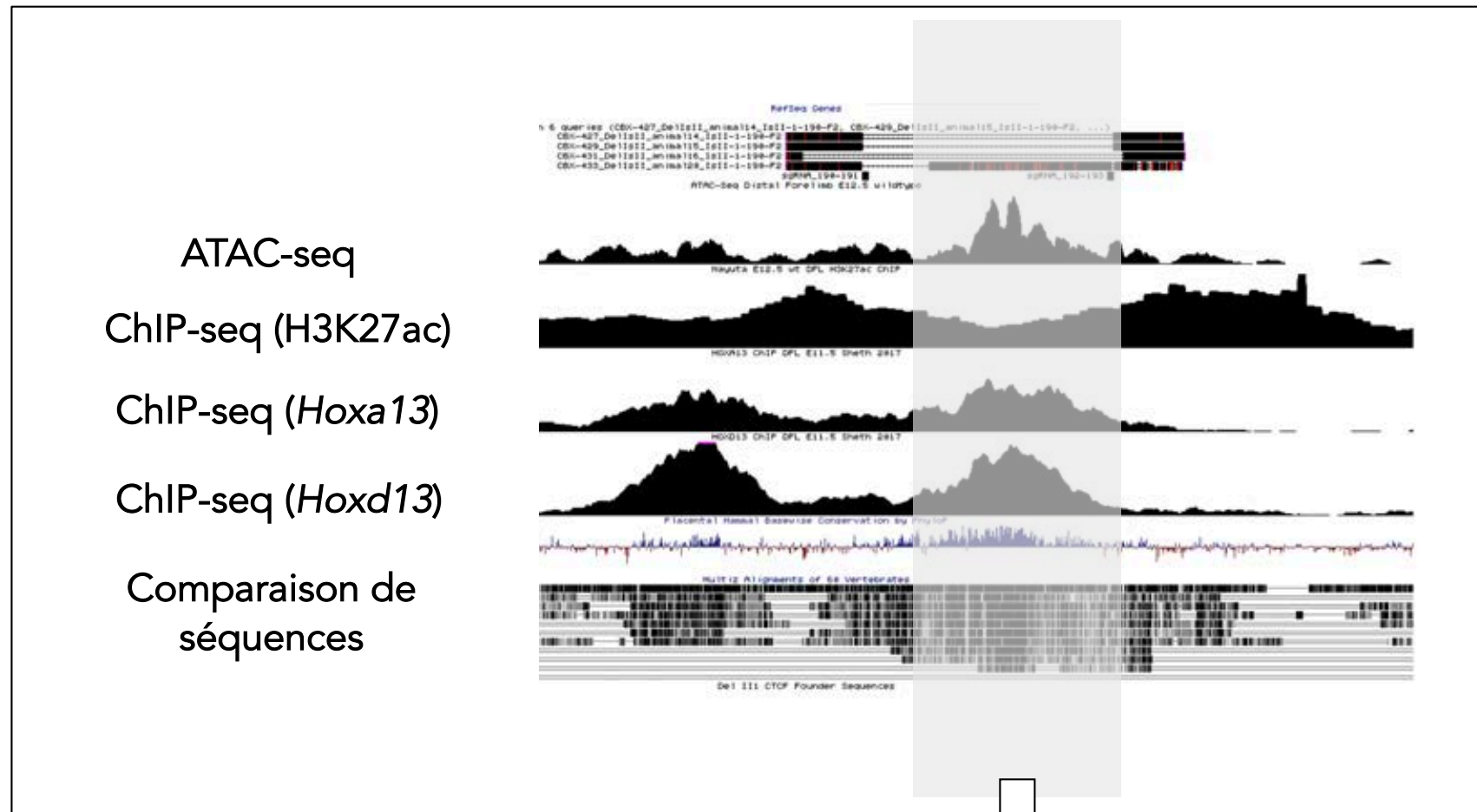
Les enhanceurs détectés sont utilisés de façons différentes dans chaque type cellulaire, dans chaque organe. Par conséquent, les profils obtenus seront différents selon le type cellulaire, selon la spécificité de tel ou tel enhanceur. Ce sont des profils de nature épigénétique, qui ne peuvent pas être établis une fois pour toute, comme une séquence génomique. Ces profils varient, avec l'activité des gènes.

Exemple: Liaison de deux facteurs de transcription (*Hoxa13* et *Hoxd13*) à une séquence enhancer localisée sur le chromosome 2 murin.

ATAC-seq
ChIP-seq (H3K27ac)
ChIP-seq (*Hoxa13*)
ChIP-seq (*Hoxd13*)
Comparaison de
séquences



Exemple: Liaison de deux facteurs de transcription (*Hoxa13* et *Hoxd13*) à une séquence enhancer localisée sur le chromosome 2 murin.

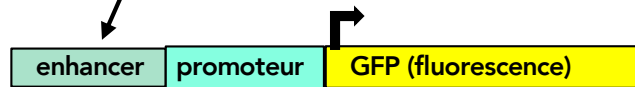
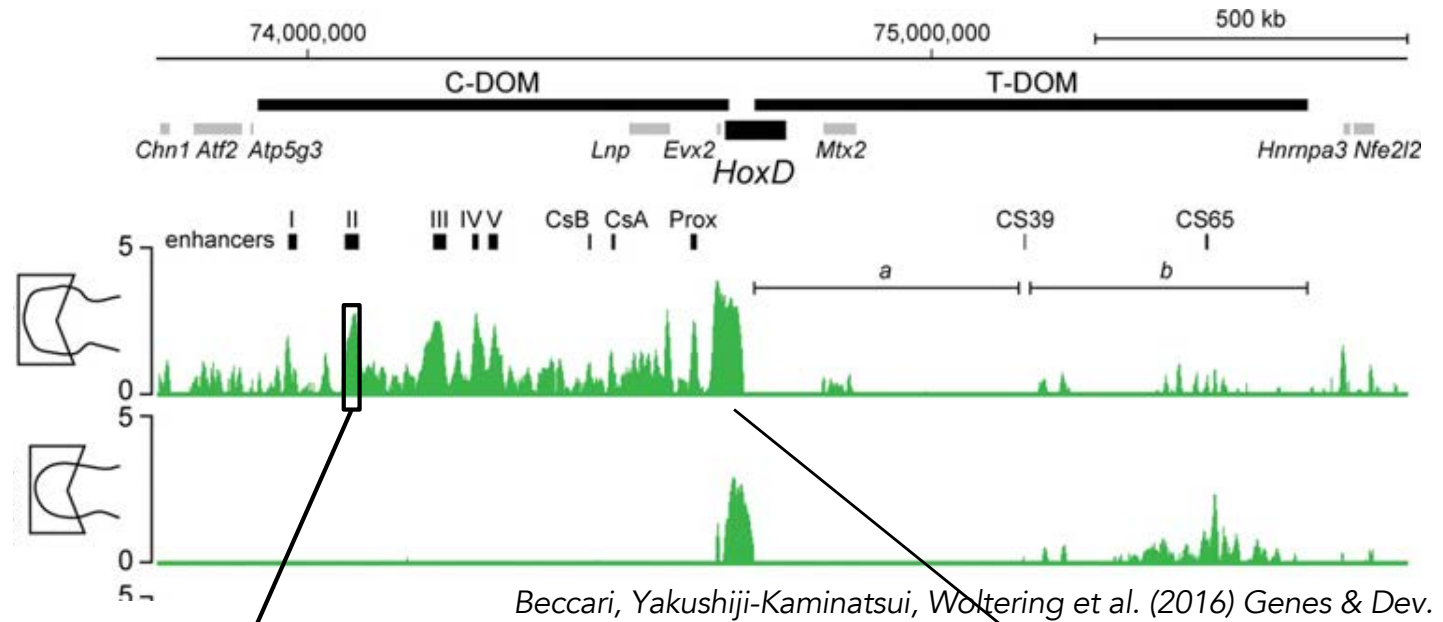


Validation par transgénèse (souris)

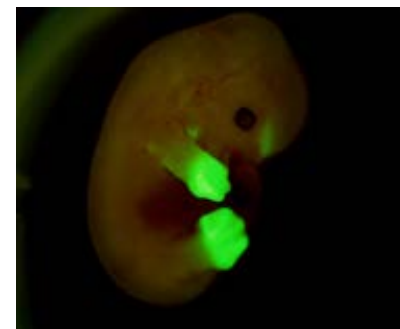
Analyse d'une modification épigénétique de la chromatine:

H3K27ac
(acétylation de la lysine #27 des histones H3)

Construction d'un transgène 'reporter' avec un promoteur hétérogène et une protéine fluorescente



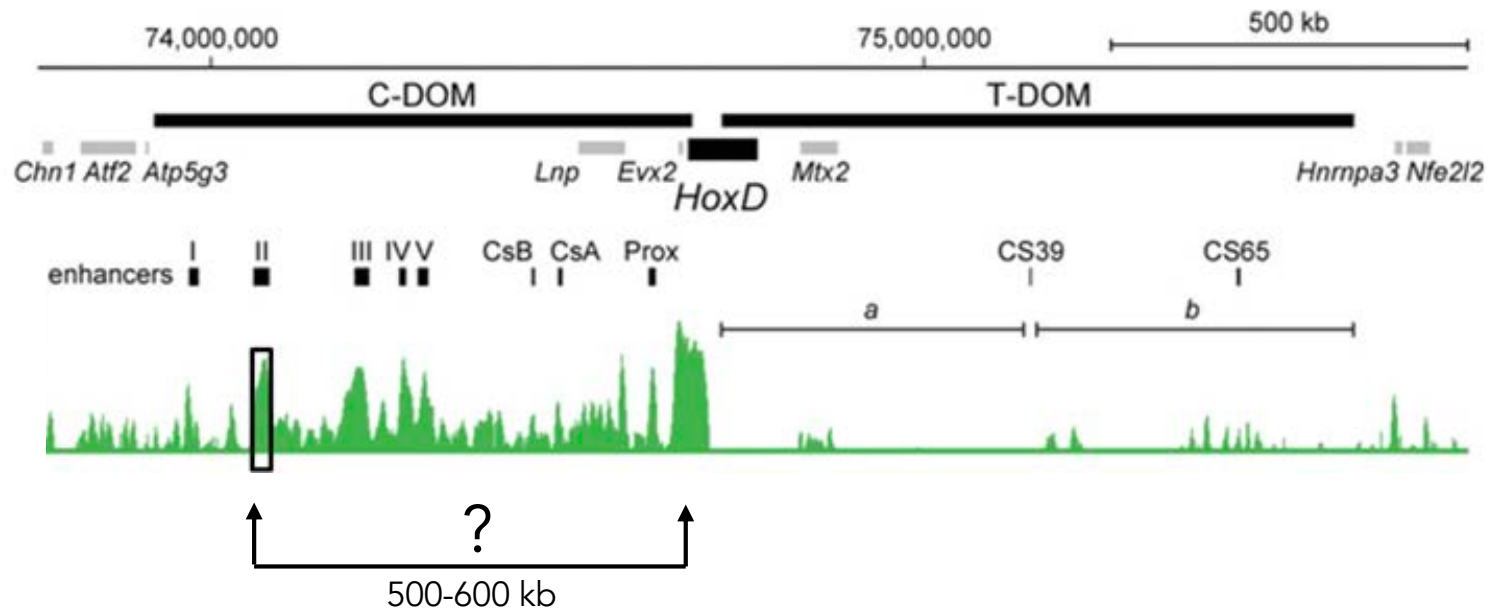
enhancer



gène cible



Contacts enhancers-promoteurs à grande distance?



- *Comment trouver et identifier les gènes cibles?
- *Comment fonctionner à grande distance?

Contacts (interactions) dans l'espace par formation de boucles (loops)

Contacts entre enhanceurs-promoteurs par looping

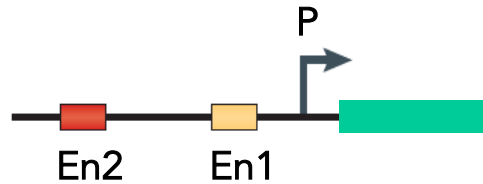
Mais comment fonctionne un enhancer à une telle distance du gène cible?

Par un rapprochement non-stochastique dans l'espace (formation de 'loops')

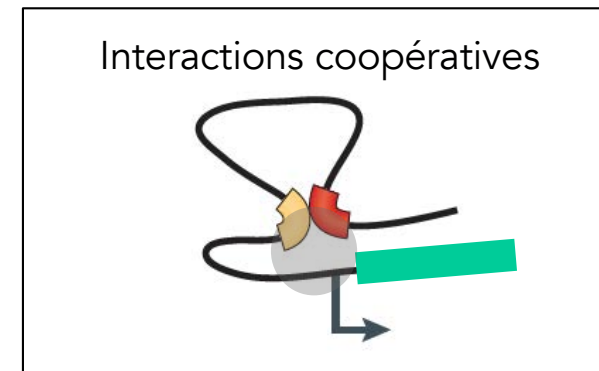
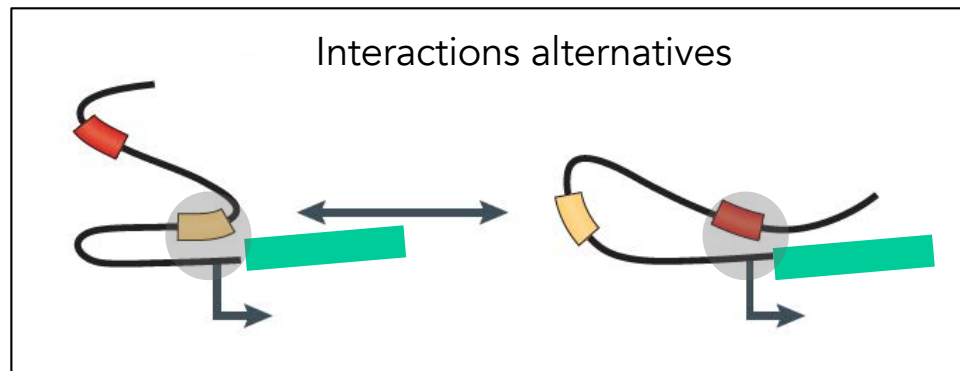
P: Promoteur

En1: Enhancer 1

En2: Enhancer 2



Adapté de Spitz and Furlong, *Nature Rev. Genetics*, 2012



En1 et En2 peuvent avoir des spécificités cellulaires différentes ou similaires, selon les cas (pleiotropie ou redondance fonctionnelle..)

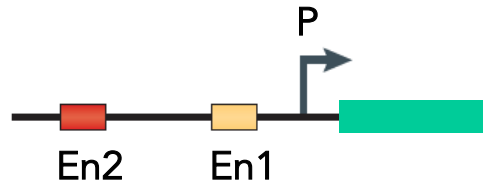
Mais comment visualiser ces interactions spatiales de façon expérimentale?

Contacts entre enhanceurs-promoteurs par looping

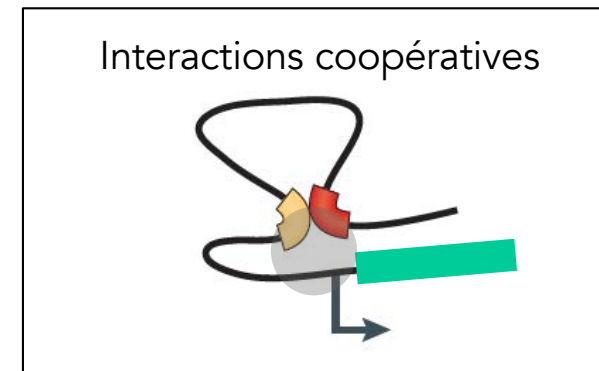
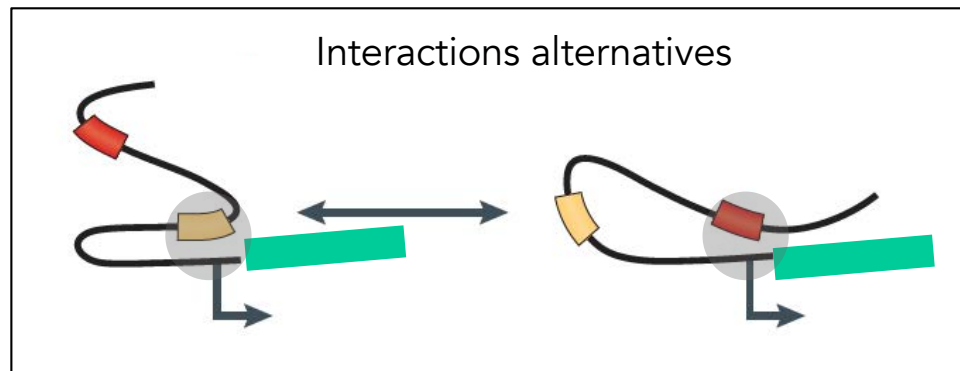
Mais comment fonctionne un enhancer à une telle distance du gène cible?

Par un rapprochement non-stochastique dans l'espace (formation de 'loops')

P: Promoteur
En1: Enhancer 1
En2: Enhancer 2



Adapté de Spitz and Furlong, Nature Rev. Genetics, 2012



*Approches par Captures de Conformations Chromosomiques
(3C, 4C, 5C...HiC...et leurs dérivés)*

15 FEBRUARY 2002 VOL 295 SCIENCE www.sciencemag.org

Capturing Chromosome Conformation

Job Dekker,^{1*} Karsten Rippe,² Martijn Dekker,³ Nancy Kleckner¹

We describe an approach to detect the frequency of interaction between any two genomic loci. Generation of a matrix of interaction frequencies between sites on the same or different chromosomes reveals their relative spatial disposition and provides information about the physical properties of the chromatin fiber. This methodology can be applied to the spatial organization of entire genomes in organisms from bacteria to human. Using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, we could confirm known qualitative features of chromosome organization within the nucleus and dynamic changes in that organization during meiosis. We also analyzed yeast chromosome III at the G₁ stage of the cell cycle. We found that chromatin is highly flexible throughout. Furthermore, functionally distinct AT- and GC-rich domains were found to exhibit different conformations, and a population-average 3D model of chromosome III could be determined. Chromosome III emerges as a contorted ring.

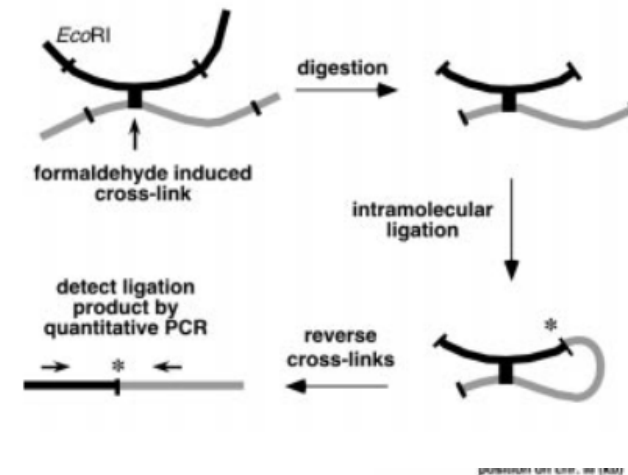


Fig. 1. The Chromosome Conformation Capture (3C) methodology. (A) Schematic of the assay: formaldehyde cross-linking, Eco RI digestion, intramolecular ligation mediated detection of ligation products after reversal of the cross-links. The asterisk newly formed restriction site. (B) Determination of the cross-linking frequency of

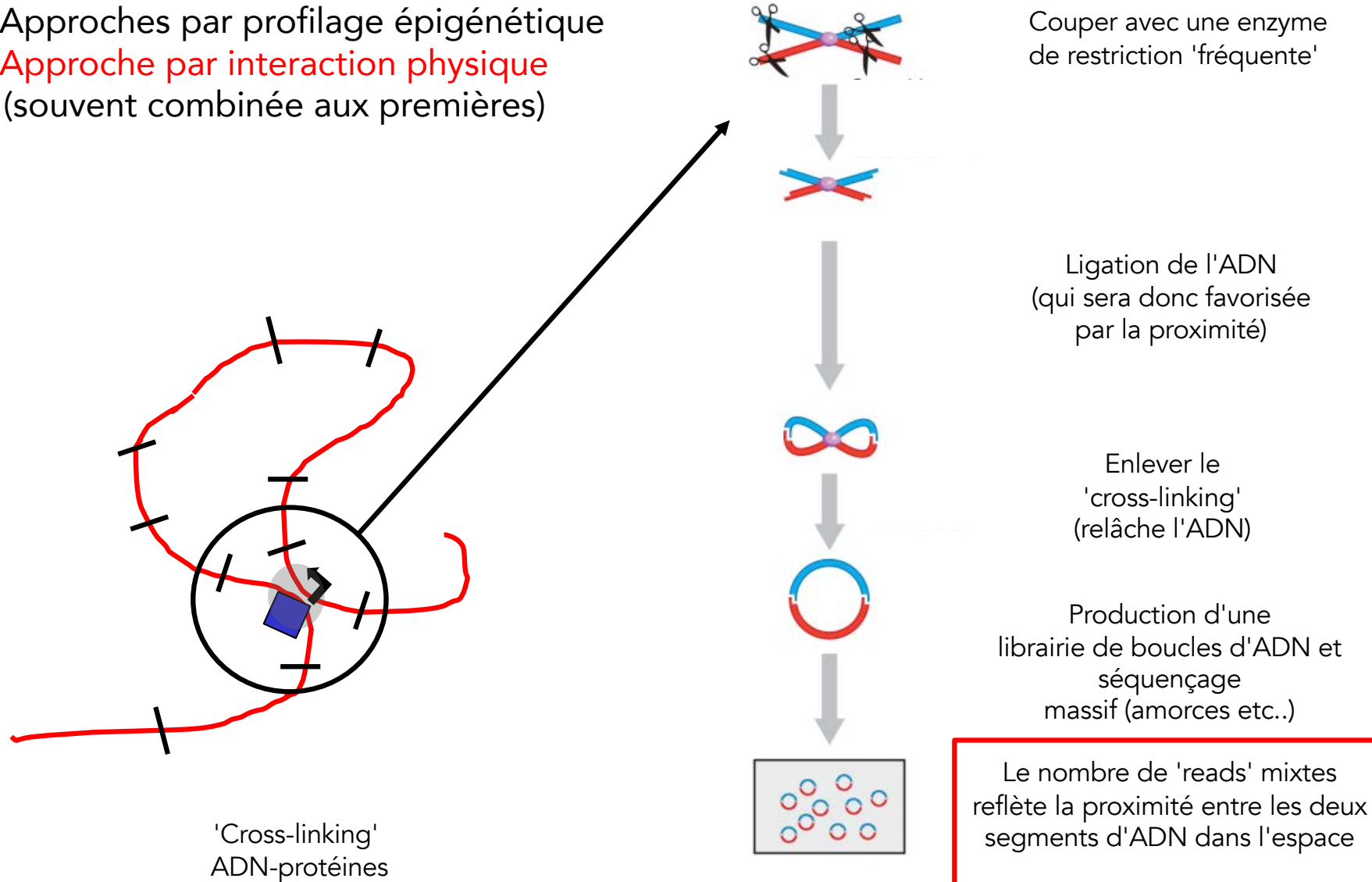
La proximité des fragments d'ADN après cross-linkage va **augmenter leur probabilité de se recoller après ligation**. Si l'on connaît les fragments d'ADN en question, on pourra amplifier le fragment 'recollé' et voir si **sa fréquence est supérieure à une fréquence de ligation aléatoire (3C)**

Chromosome Conformation Capture

Mais comment fonctionne un enhancer à une telle distance du gène cible?

*Approches par profilage épigénétique

***Approche par interaction physique**
(souvent combinée aux premières)

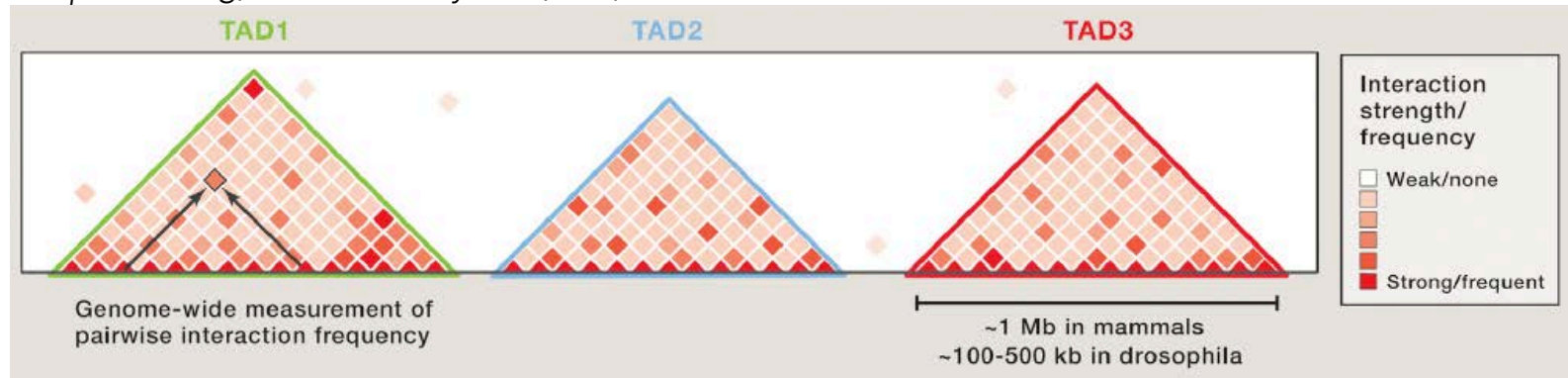


Chromosome Conformation Capture (TAD)

- *Carte globale des interactions de la chromatine
- *Topologically Associating Domains (TADs, 2012)
- *B. Ren, E. Heard, J. Dekker, G. Cavalli labs

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

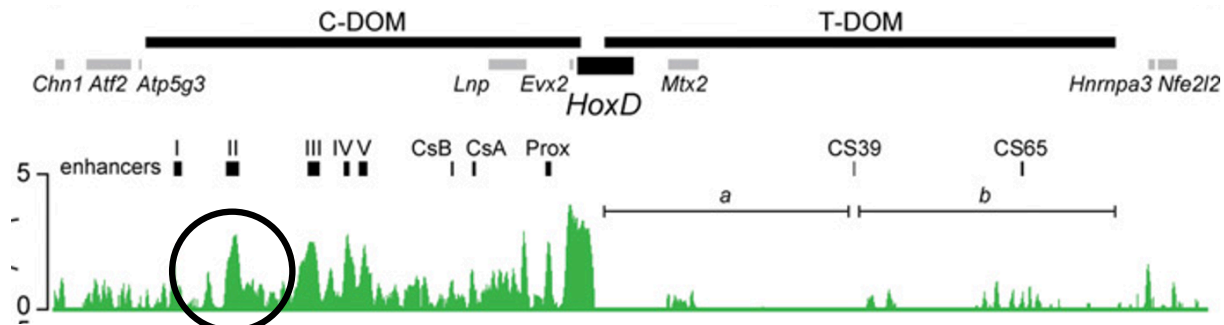
Adapté de Long, Prescott and Wysocka, Cell, 2016



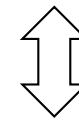
- *Le nombre de reads est représenté par l'intensité de la couleur
- *Une carte des interactions au niveau du génome entier (ici sur 2-3 mégabases)



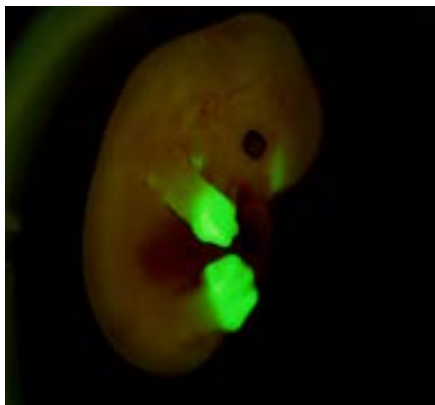
TADs et paysages de régulation



*Profile épigénétique de H3K27ac



*Profile d'interactions de chromatine

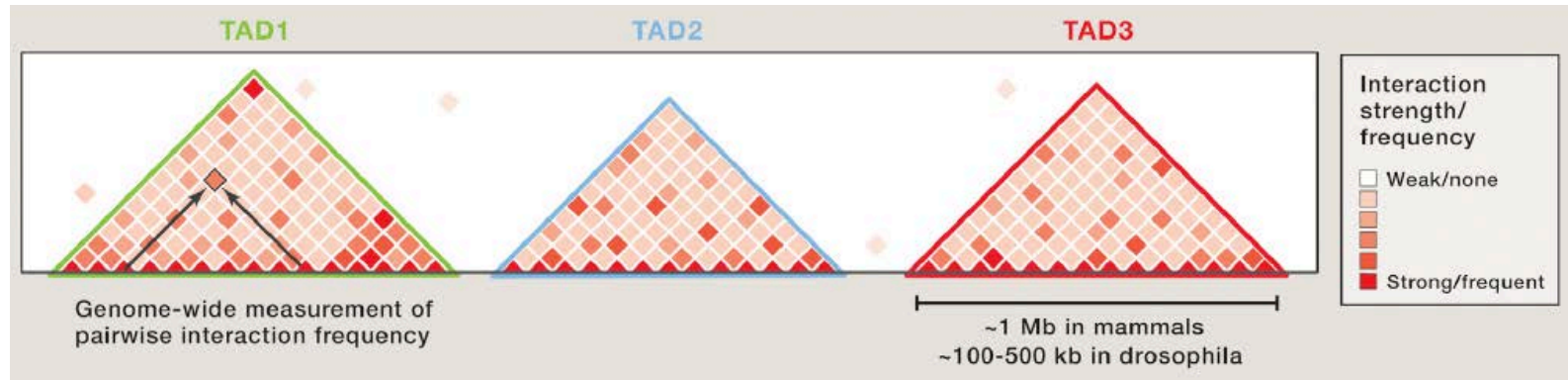


Chase Bolt,
EPFL Lausanne

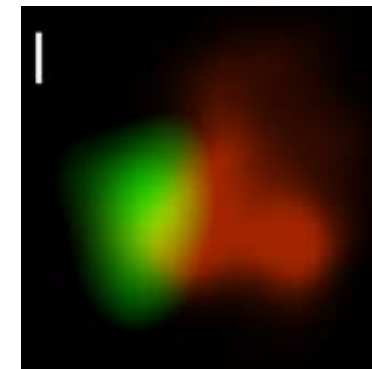
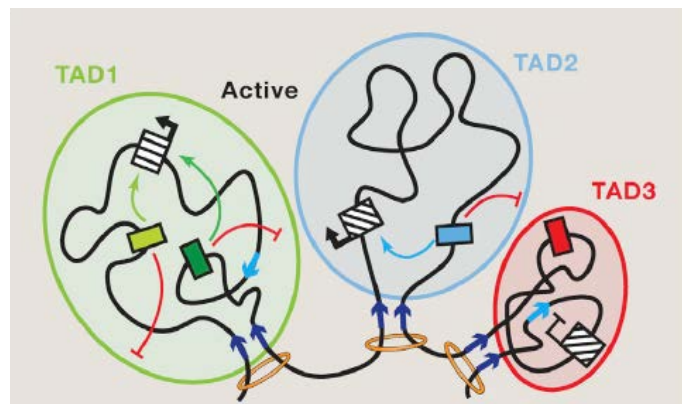
TADs et paysages de régulation

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

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

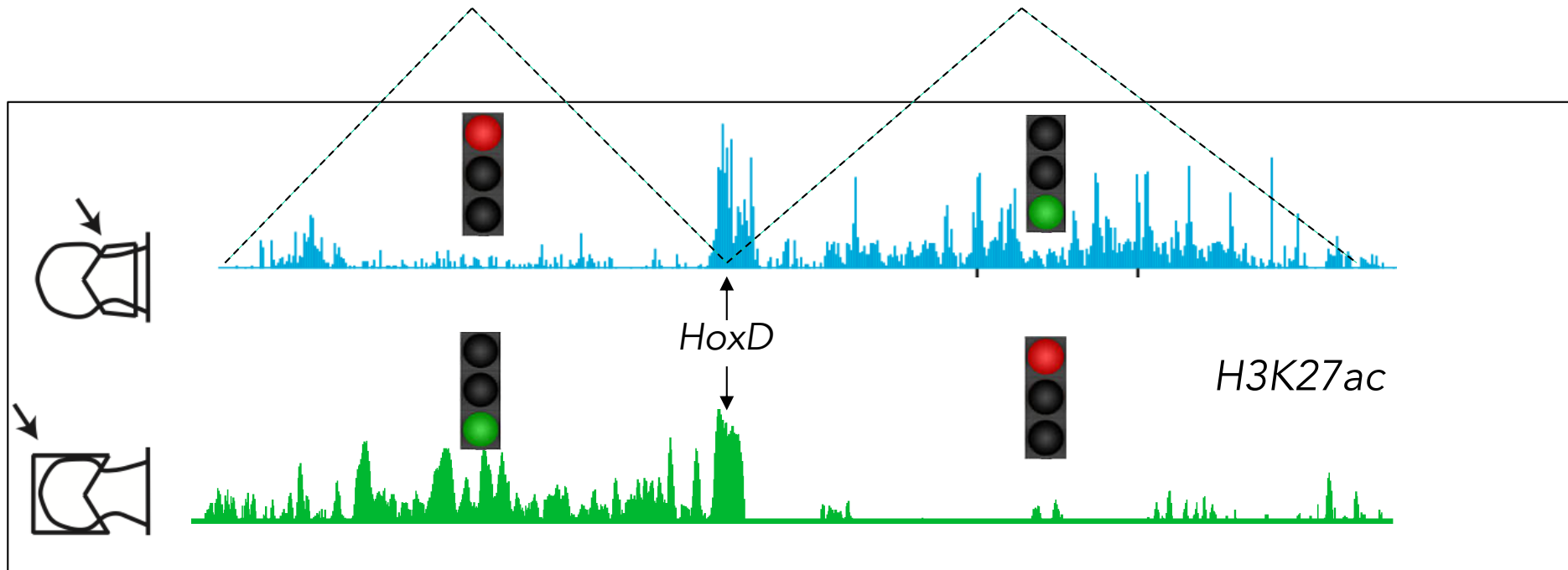


Adapté de Long, Prescott and Wysocka, Cell, 2016

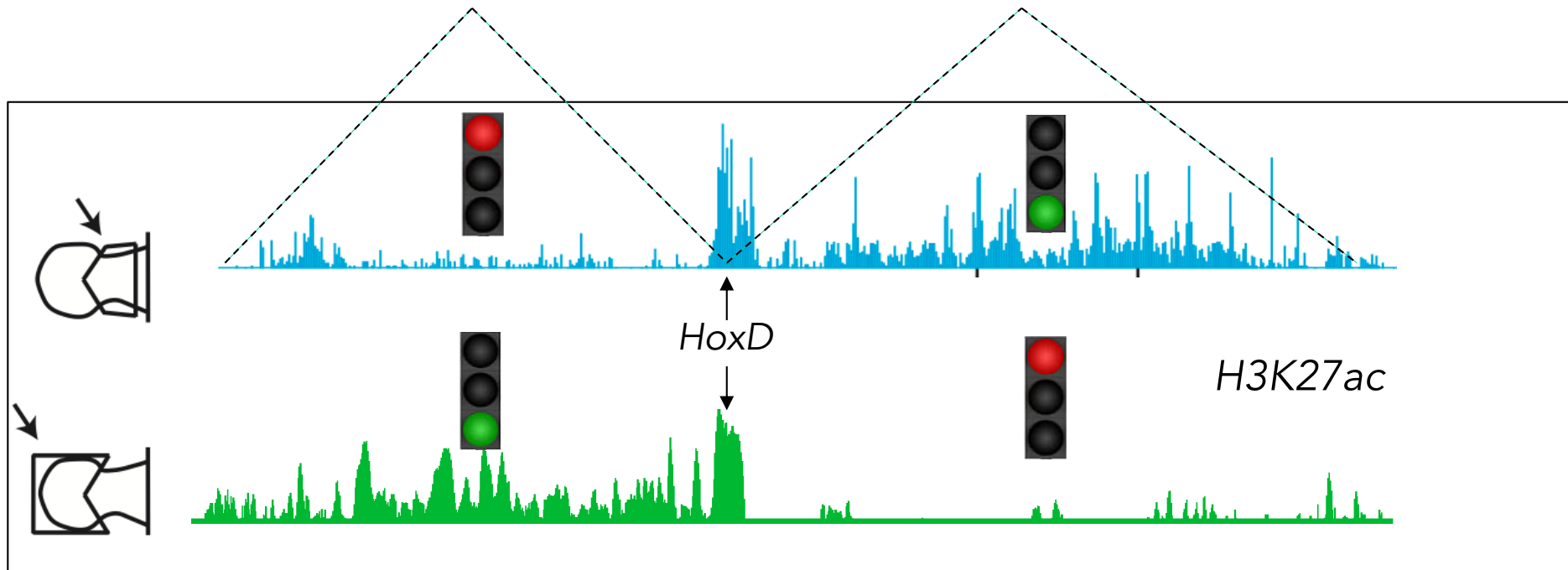


Pierre Fabre et al. (2016)
(marquages de BACs entiers)

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



*Les paysages de régulations/TADs se comportent de façon cohérente et sont actifs ou inactifs alternativement, dans des champs cellulaires différents au sein de la même structure en développement (le bourgeon des membres)

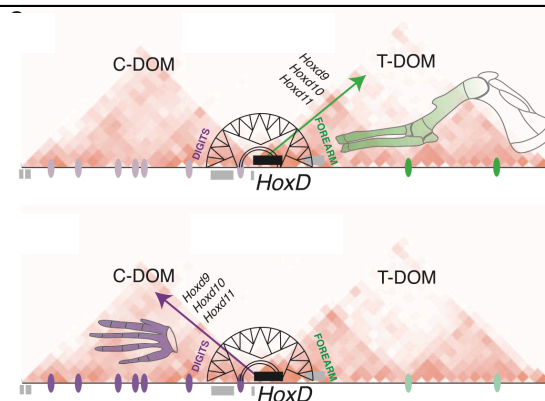


*Les paysages de régulations/TADs se comportent de façon cohérente et sont actifs ou inactifs alternativement, dans des champs cellulaires différents au sein de la même structure en développement (le bourgeon des membres)

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

Guillaume Andrey, Thomas Montavon, Bénédicte Mascrez, Federico Gonzalez, Daan Noordermeer, Marion Leleu, Didier Trono, François Spitz, Denis Duboule*

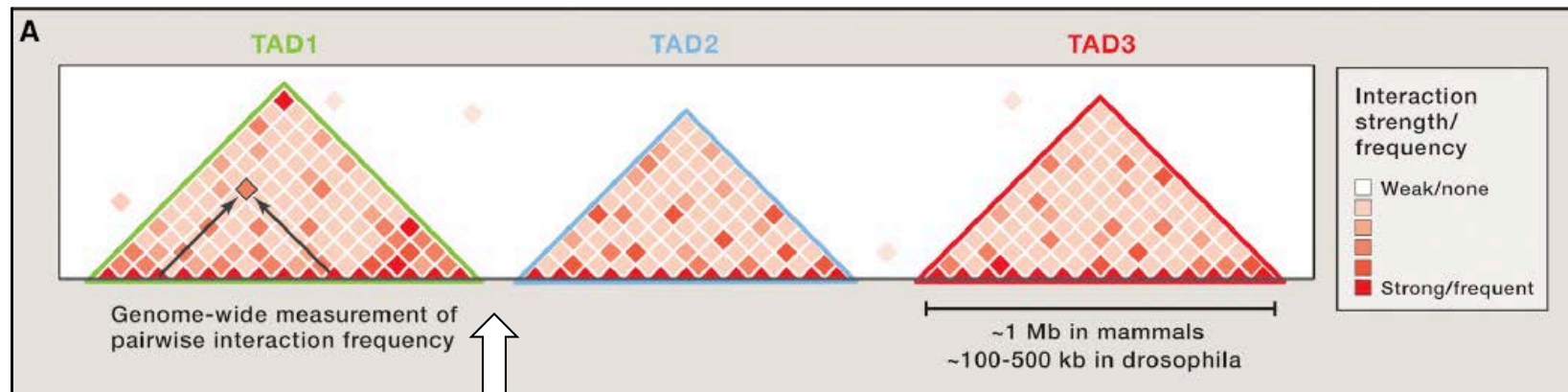
www.sciencemag.org **SCIENCE** VOL 340 7 JUNE 2013



CTCF et définition des domaines de régulation

*Les TADs pourraient agir comme des structures chromatinienne permettant de 'maximiser', d'augmenter la fréquence de contacts entre des enhancers et des promoteurs, de définir un champs d'action particulier pour des enhancers et leur(s) gène(s) cible(s).

Adapté de Long, Prescott and Wysocka, Cell, 2016



Enrichissement pour des sites de liaison à la protéine CTCF, une protéine impliquée dans les architectures de la chromatine

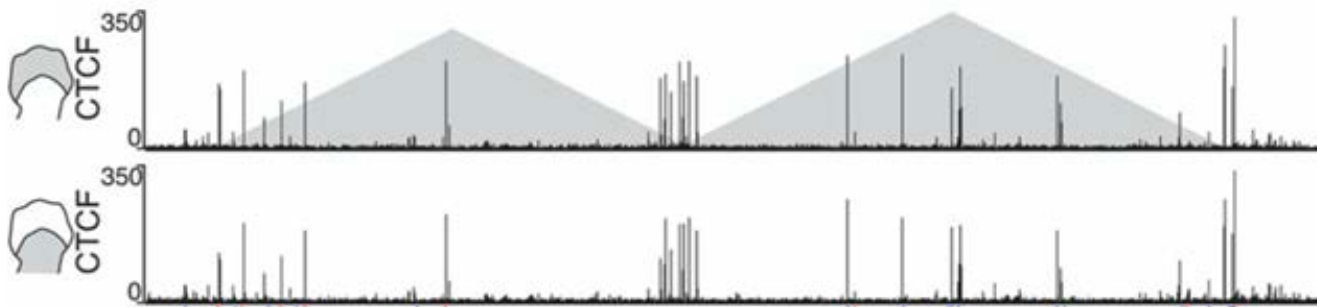
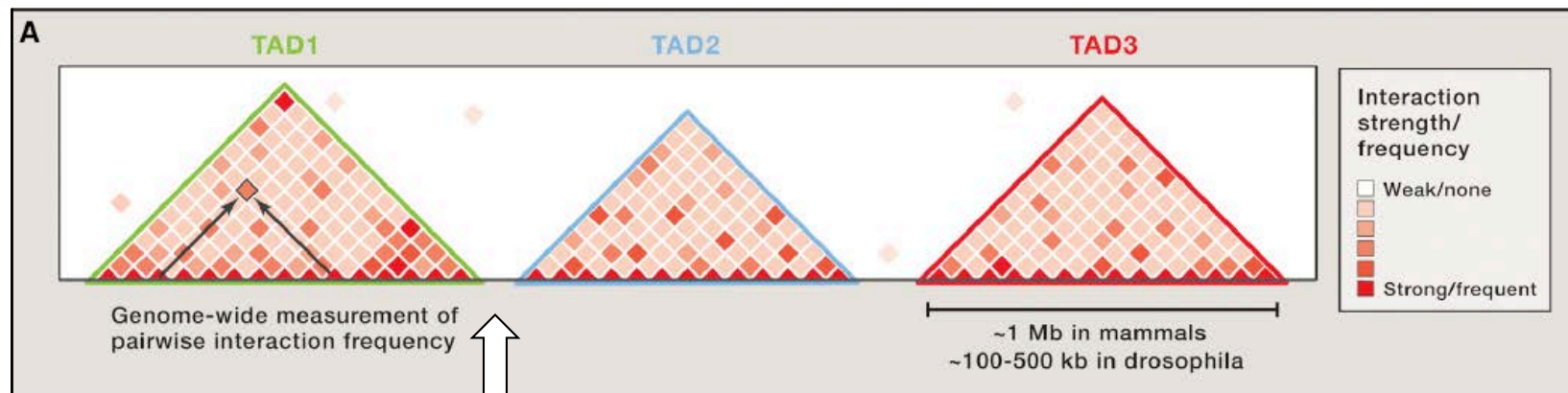
Dixon et al. (2012)
(Bing Ren)

CTCF: Protéine à 11 'doigts de zinc' (CCCTC-binding Factor), se liant directement à l'ADN, impliquée dans l'organisation spatiale de la structure de la chromatine

CTCF et définition des domaines de régulation

*Les TADs pourraient agir comme des structures chromatinienne permettant de 'maximiser', d'augmenter la fréquence de contacts entre des enhancers et des promoteurs, de définir un champs d'action particulier pour des enhancers et leur(s) gène(s) cible(s).

Adapté de Long, Prescott and Wysocka, Cell, 2016



*Sites CTCF enrichis aux 'frontières' entre TADs

*Distribution conservée dans des types cellulaires différents

Dixon et al. (2012)
(Bing Ren)

The *HoxD* cluster is a dynamic and resilient TAD boundary controlling the segregation of antagonistic regulatory landscapes

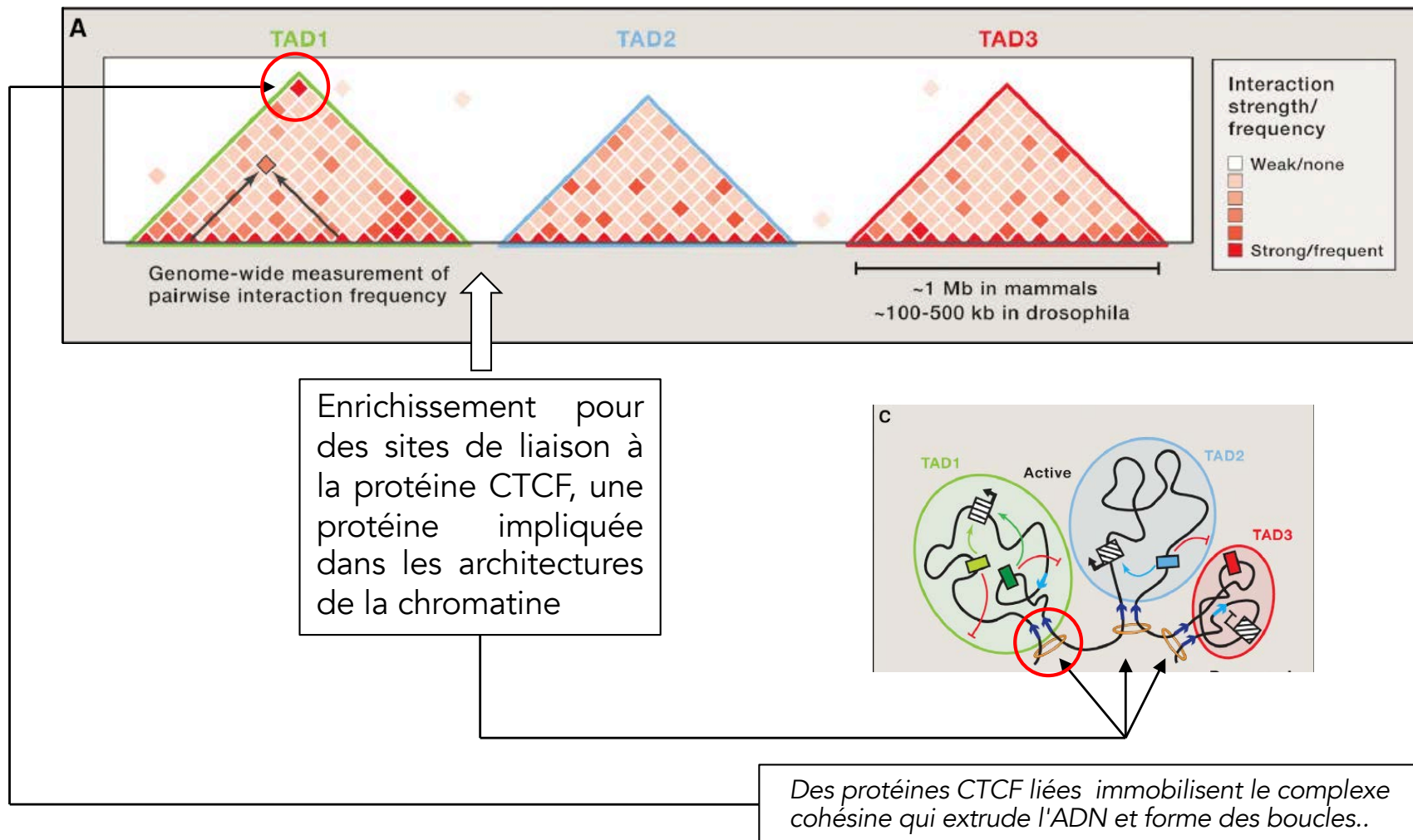


Rodriguez-carballo et al. (2017)

CTCF et définition des domaines de régulation

*Les TADs pourraient agir comme des structures chromatinienne permettant de 'maximiser', d'augmenter la fréquence de contacts entre des enhancers et des promoteurs, de définir un champs d'action particulier pour des enhancers et leur(s) gène(s) cible(s).

Adapté de Long, Prescott and Wysocka, Cell, 2016



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

Laura A. Lettice¹, Simon J.H. Heaney¹, Lorna A. Purdie¹, Li Li², Philippe de Beer³, Ben A. Oostra², Debbie Goode⁴, Greg Elgar⁴, Robert E. Hill^{1,*} and Esther de Graaff²

Human Molecular Genetics, 2003, Vol. 12, No. 14

Unequivocal identification of the full composition of a gene is made difficult by the cryptic nature of regulatory elements. Regulatory elements are notoriously difficult to locate and may reside at considerable distances from the transcription units on which they operate and, moreover, may be incorporated into the structure of neighbouring genes. The importance of regulatory mutations as the basis of human abnormalities remains obscure. Here, we show that the chromosome 7q36 associated preaxial polydactyly, a frequently observed congenital limb malformation, results from point mutations in a *Shh* regulatory element. *Shh*, normally expressed in the ZPA posteriorly in the limb bud, is expressed in an additional ectopic site at the anterior margin in mouse models of PPD. Our investigations into the basis of the ectopic *Shh* expression identified the enhancer element that drives normal *Shh* expression in the ZPA. The regulator, designated ZRS, lies within intron 5 of the *Lmbr1* gene 1 Mb from the target gene *Shh*. The ZRS drives the early spatio-temporal expression pattern in the limb of tetrapods. Despite the morphological differences between limbs and fins, an equivalent regulatory element is found in fish. The ZRS contains point mutations that segregate with polydactyly in four unrelated families with PPD and in the *Hx* mouse mutant. Thus point mutations residing in long-range regulatory elements are capable of causing congenital abnormalities, and possess the capacity to modify gene activity such that a novel gamut of abnormalities is detected.

*Familles montrant une polydactylie pré-axiale (7q36)

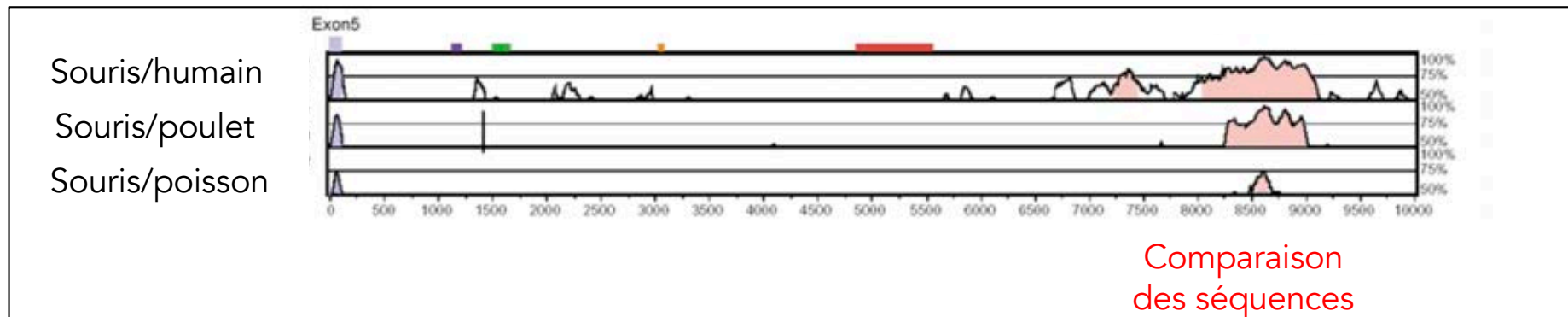
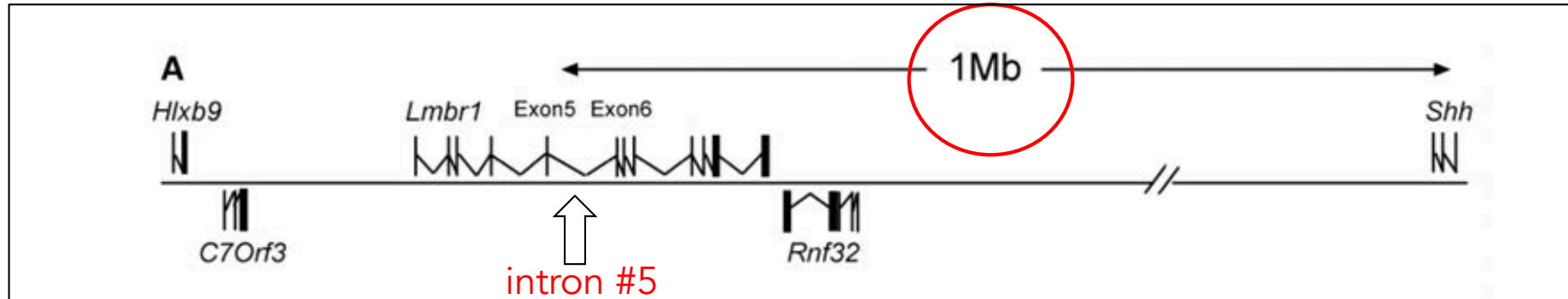
*Insertion d'un transgène chez la souris dans la région synténique (*Sasquash*, insertion cartographiée sur le chromosome 5 murin)

Enhancers à distance: L'exemple Sonic Hedgehog (Shh)

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

Laura A. Lettice¹, Simon J.H. Heaney¹, Lorna A. Purdie¹, Li Li², Philippe de Beer³, Ben A. Oostra², Debbie Goode⁴, Greg Elgar⁴, Robert E. Hill^{1,*} and Esther de Graaff²

Ssq maps to mouse chromosome 5 and corresponds to the preaxial polydactyly (PPD) locus on human chromosome 7q36 (8). PPD in human is one of the most frequently observed congenital hand malformations and patients present with a range of limb phenotypes from triphalangeal thumb to one, two or sometimes three extra digits on hands and/or feet (9–13). Analysis of both a *de novo* chromosomal translocation breakpoint in a patient with PPD and the site of transgenic insertion in *Ssq* identified lesions within intron 5 of the *Lmbr1* gene (8). *Lmbr1* is physically linked to *Shh* and intron 5 lies at a distance of 1 Mb (a genetic distance of 1.8 cM) upstream from *Shh*. Genetic analysis confirmed that, despite this distance, a *cis*-acting regulator is responsible for the preaxial polydactyly phenotype in *Ssq* and therefore PPD (8).

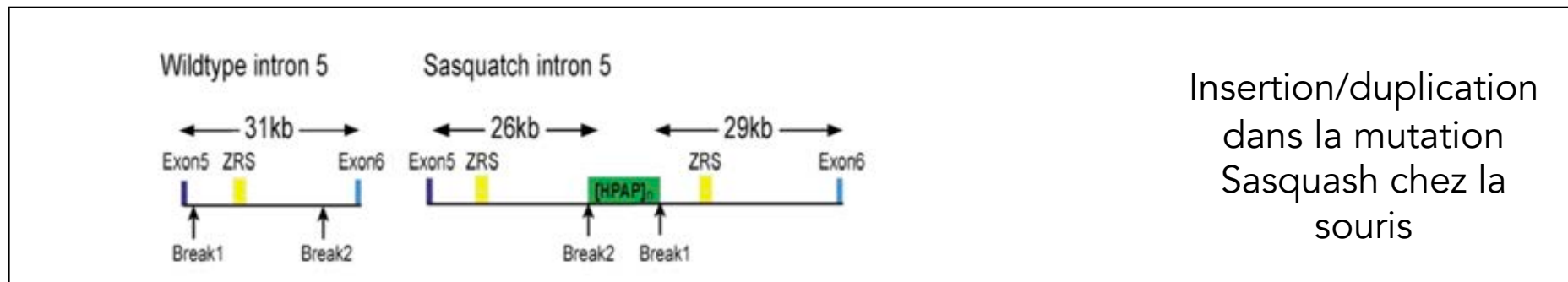
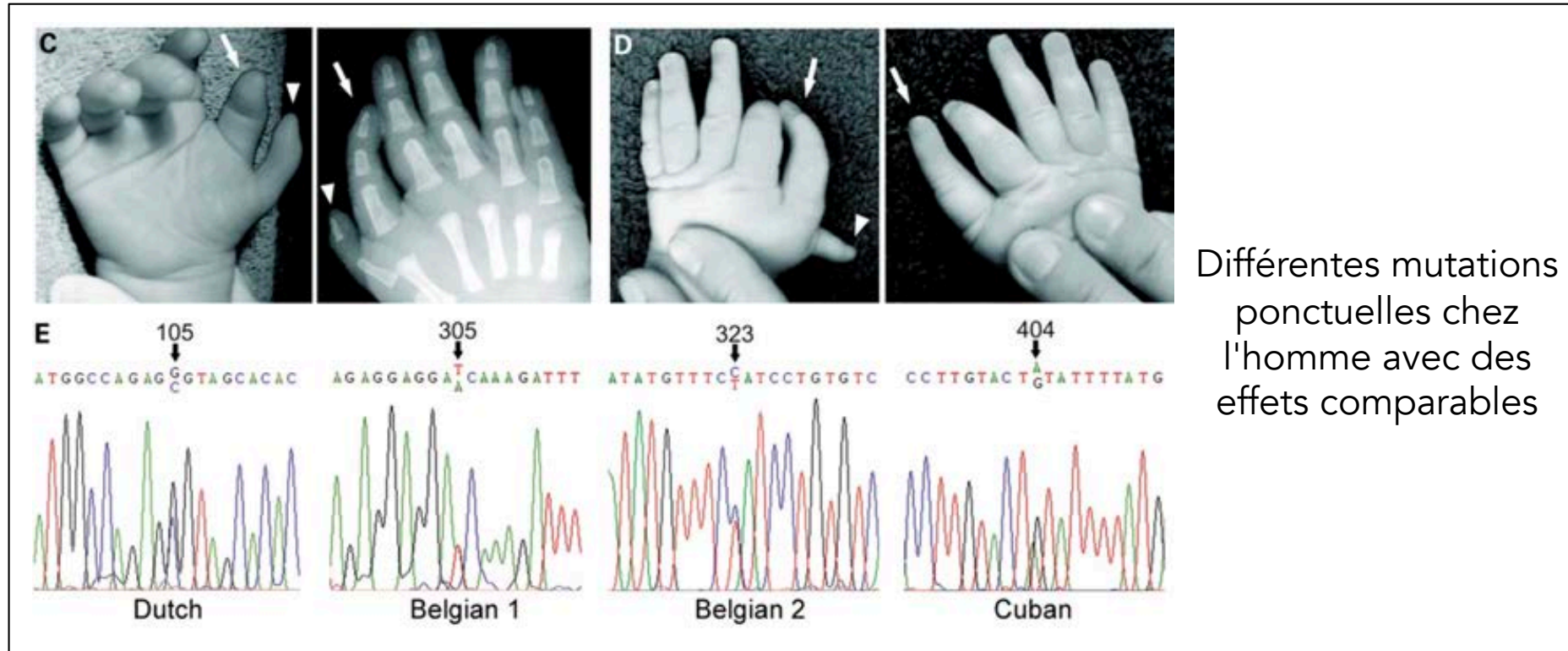


Enhancers à distance: L'exemple Sonic Hedgehog (Shh)

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

Laura A. Lettice¹, Simon J.H. Heaney¹, Lorna A. Purdie¹, Li Li², Philippe de Beer³, Ben A. Oostra², Debbie Goode⁴, Greg Elgar³, Robert E. Hill^{1,*} and Esther de Graaff²

La mutation modifie l'expression de *Shh* dans la Zone of Polarizing Activity (ZPA) du bourgeon de membre. L'enhancer sera donc appelé : **ZRS** (ZPA Regulatory Sequence)

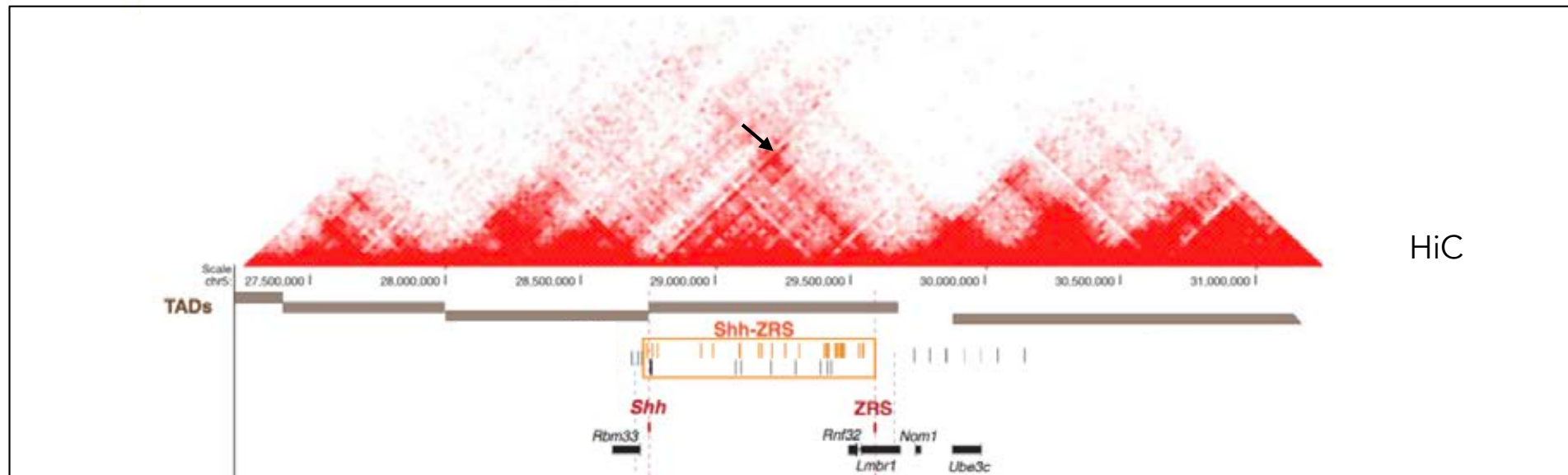


Enhancers à distance: L'exemple Sonic Hedgehog (Shh)

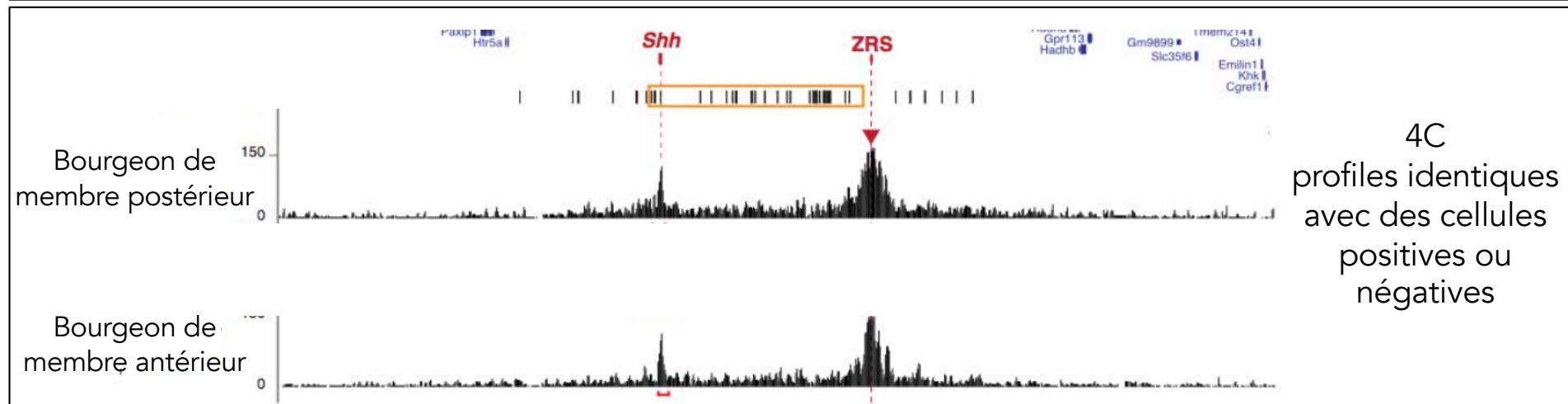
The *Shh* Topological Domain Facilitates the Action of Remote Enhancers by Reducing the Effects of Genomic Distances

Developmental Cell
Article

Orsolya Symmons,^{1,3} Leslie Pan,¹ Silvia Remeseiro,¹ Tugce Aktas,^{1,4} Felix Klein,² Wolfgang Huber,² and François Spitz^{1,2} (2016)



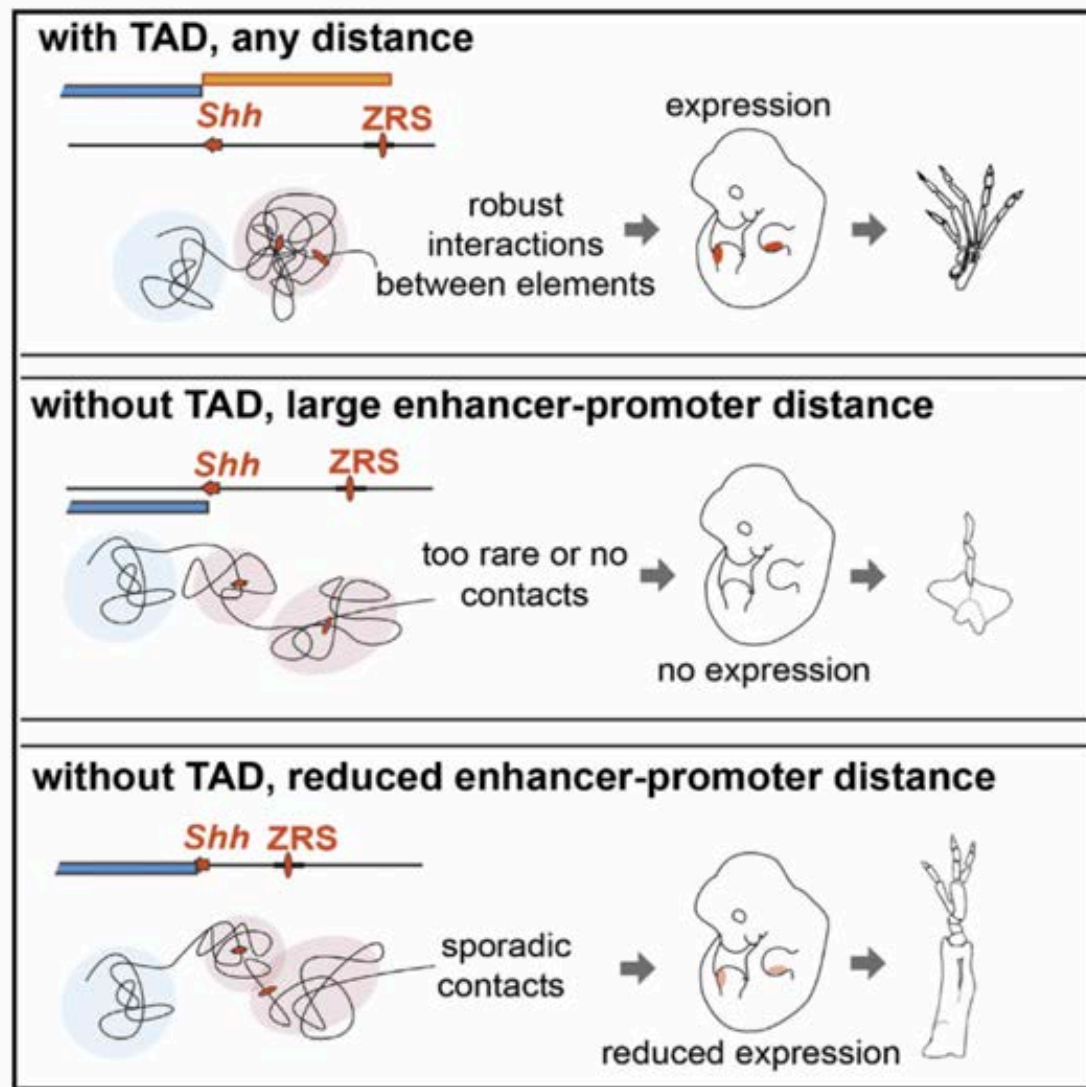
HiC



4C
profils identiques
avec des cellules
positives ou
négatives

Enhancers à distance: L'exemple Sonic Hedgehog (Shh)

*Diverses modifications du paysage de régulation (ingénierie chromosomique) vont révéler une série de conclusions:



*La structure TAD favorise les contacts entre la ZRS et le gène *Shh*

*Sans TAD, la fréquence des contacts diminue

*Changer les distances entre la ZRS et *Shh* à l'intérieur du TAD n'a pas d'effet marqué

*Rapprocher la ZRS du gène *Shh* en absence du TAD peu partiellement compenser la perte de contacts

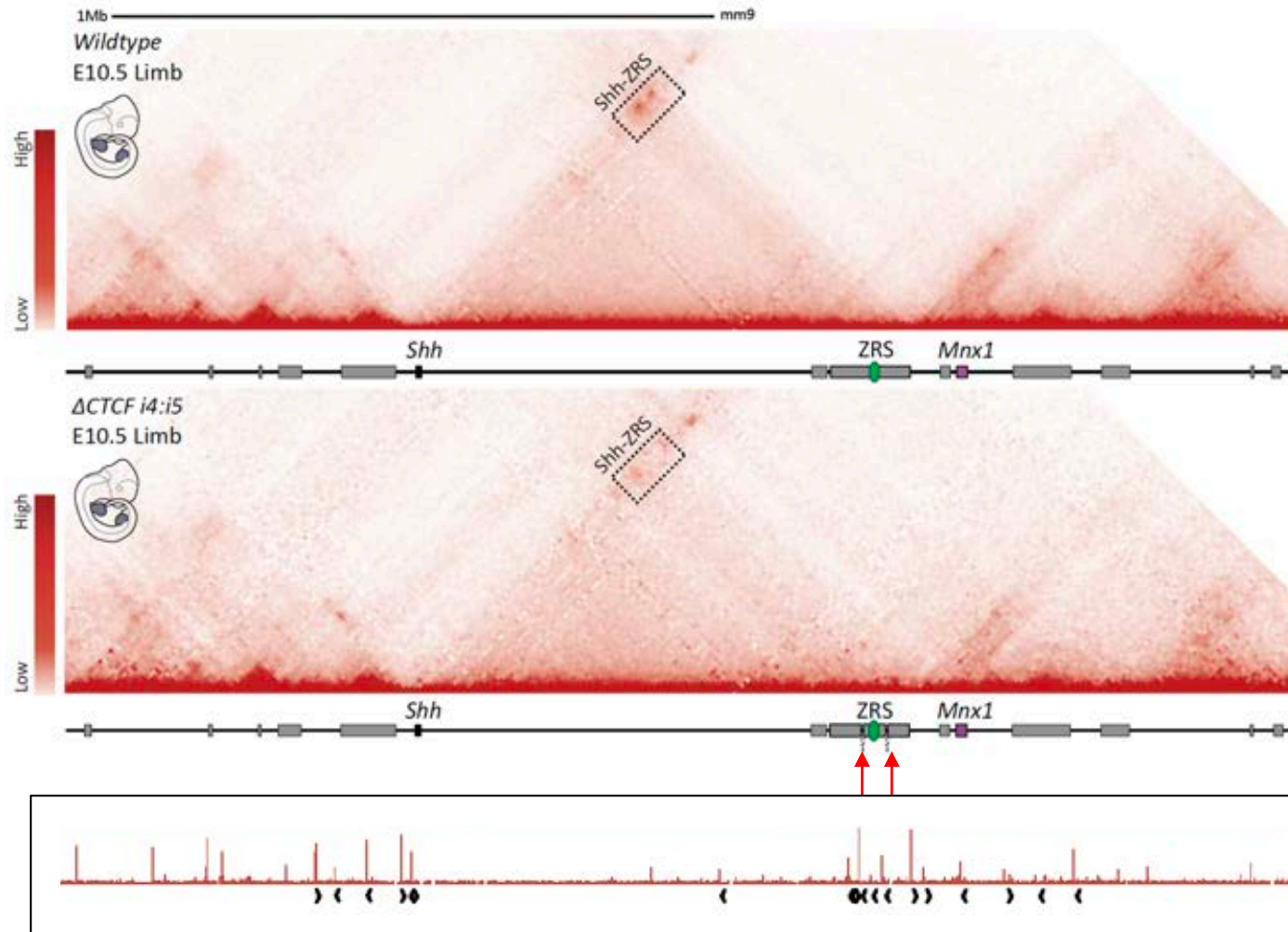
Enhancers à distance: L'exemple Sonic Hedgehog (Shh)

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

Christina Paliou^{a,b}, Philine Guckelberger^a, Robert Schöpflin^{a,c}, Verena Heinrich^d, Andrea Esposito^{a,f,g}, Andrea M. Chiariello^{a,f}, Simona Bianco^{a,f}, Carlo Annunziatella^{a,f}, Johannes Helmuth^{h,1}, Stefan Haas^d, Ivana Jerković^{a,2}, Norbert Brieske^a, Lars Wittler^a, Bernd Timmermann^a, Mario Nicodemi^{a,f,g}, Martin Vingron^d, Stefan Mundlos^{a,b,c,3}, and Guillaume Andrey^{a,b,3,4}

12390-12399 | PNAS | June 18, 2019 | vol. 116 | no. 25

*La délétion (CRISPR-cas9) de deux sites CTCF autour de la ZRS diminue fortement les contacts avec le gène *Shh*



contrôle

double mutant CTCF autour de la ZRS ↑

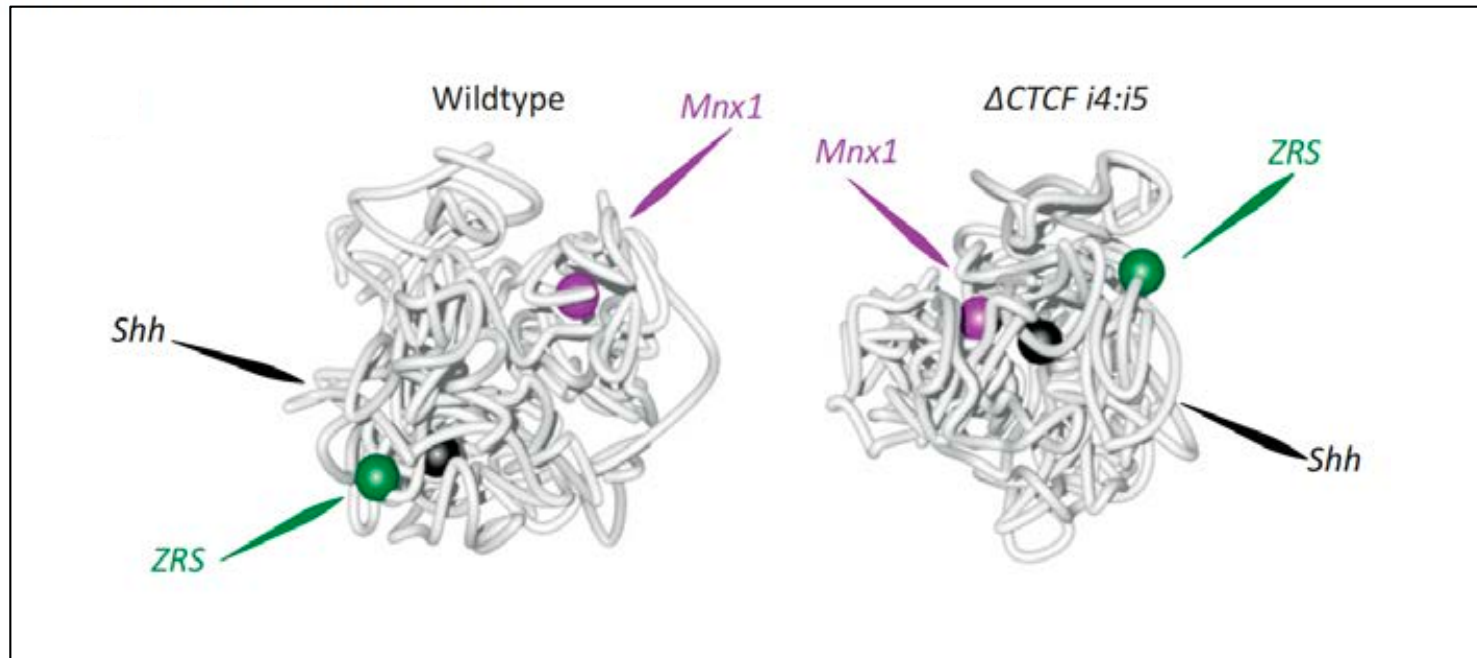
CTCF

Enhancers à distance: L'exemple Sonic Hedgehog (*Shh*)

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

Christina Paliou^{a,b}, Philine Guckelberger^a, Robert Schöpflin^{a,c}, Verena Heinrich^d, Andrea Esposito^{a,f,g}, Andrea M. Chiariello^{a,f}, Simona Bianco^{a,f}, Carlo Annunziatella^{a,f}, Johannes Helmuth^{h,1}, Stefan Haas^d, Ivana Jerković^{a,2}, Norbert Brieske^a, Lars Wittler^a, Bernd Timmermann^a, Mario Nicodemi^{a,f,g}, Martin Vingron^d, Stefan Mundlos^{a,b,c,3}, and Guillaume Andrey^{a,b,3,4}

12390–12399 | PNAS | June 18, 2019 | vol. 116 | no. 25



*Un modèle de polymère 3D (basé sur les résultats Hi-C) suggère un changement de proximité entre la ZRS et *Shh* en absence des deux sites CTCF

*Cependant, une réduction de seulement 50% des mRNAs est observée et aucun phénotype.. (autres sites CTCF..)