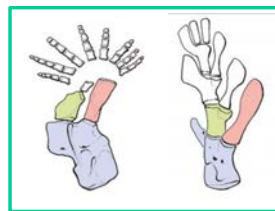


*Denis Duboule*

Collège de France  
Chaire Internationale

*Evolution des Génomes et du Développement*

[Denis.Duboule@college-de-france.fr](mailto:Denis.Duboule@college-de-france.fr)



 @Duboule

 @CdF1530

Images: Nobu Tamura; Chase Bolt, Michael Coates

1



**Gènes du développement et évolution. La transition  
des nageoires aux membres des tétrapodes**

**Cours #2, 24 mai 2022, 17h**

Rappel des notions du cours #1, définition et profondeurs des homologies,  
développement du membre chirodien, initiation, élongation et établissement  
des axes. condensation et segmentation des modèles cartilagineux et origine  
des population de cellules progénitrices



2

Denis Duboule

2021-2022

**Gènes du développement et évolution. La transition  
des nageoires aux membres des tétrapodes**

Déroulé du cours

**Cours 1:** Des nageoires aux membres, introduction, définitions des membres ptérygiens et chirodiens, notions de phylogénèse des animaux à membres paires, fossiles.

**Cours 2:** Homologies 'classiques', 'profondes', 'super-profondes', développement embryonnaire des membres tétrapodes, développement de l'appareil cartilagineux, branchements et segmentation

**Cours 3:** Développement des membres ptérygiens (nageoires), AER versus AEF, squelette dermique (exo-) versus squelette endochondral (endo-), origine de l'exo-squelette

**Cours 4:** Utilisation de marqueurs génétiques, gènes Hox et marquages cellulaires, inactivations fonctionnelles et mutagenèse chez le poisson-zèbre

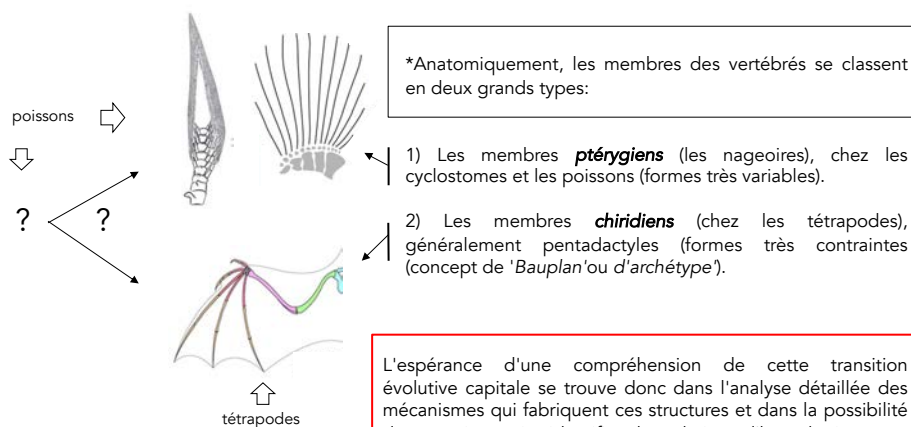
**Cours 5:** L'études d'espèces 'intermédiaires', poisson-spatule, roussette, poissons à poumons, nous éclaire-t-elle sur les homologies possibles?

**Cours 6:** Homologies super-profondes (mécanistiques, régulatives..) et conservation des régulations dans les membres ptérygiens et chirodiens. Conclusions

3

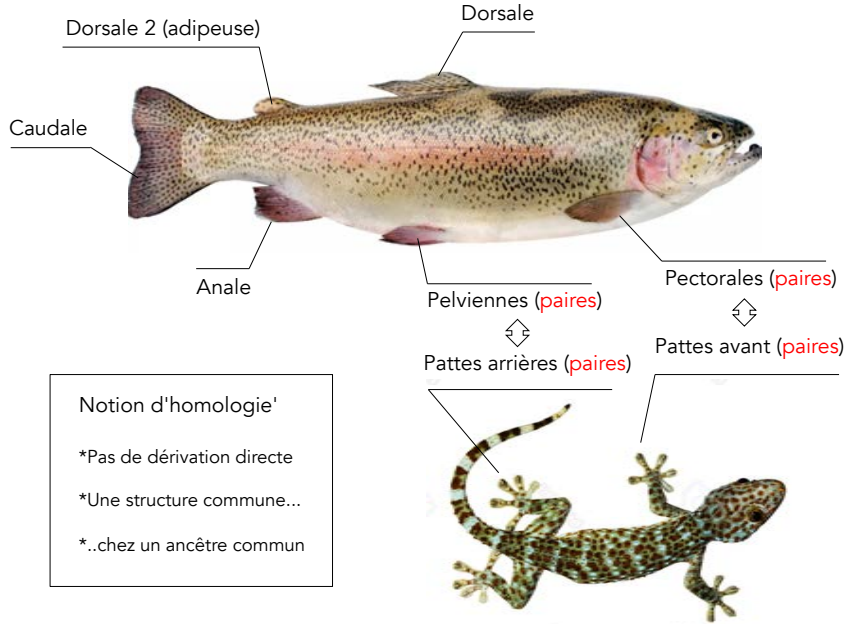
Résumé de l'épisode précédent; définitions, question

⚠ Dans ce cours, il ne sera question que des membres paires supérieurs (bras, pattes avant, ailes, nageoires pectorales..)



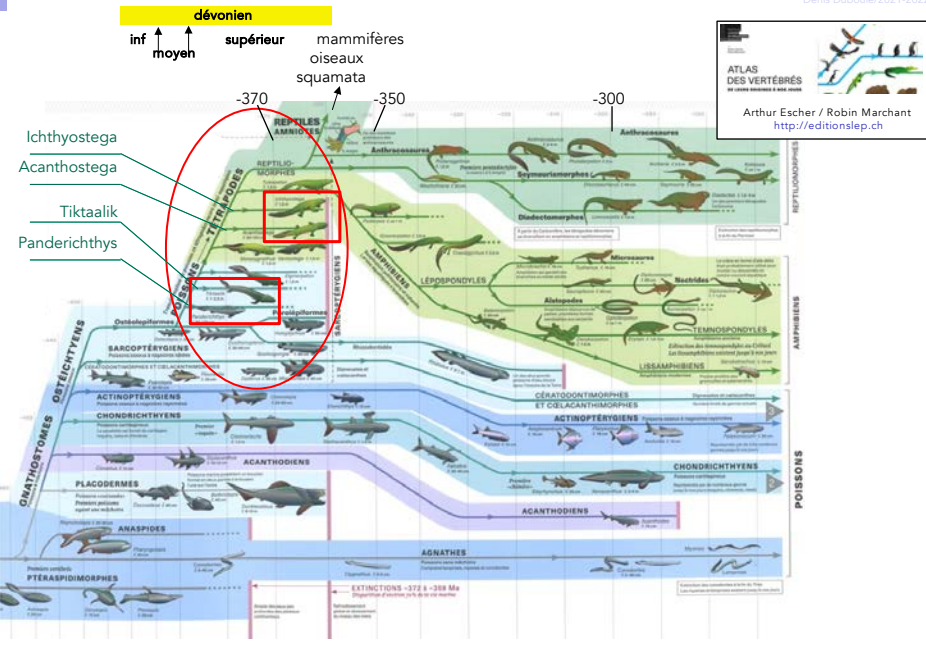
4

## Résumé de l'épisode précédent; définitions, question



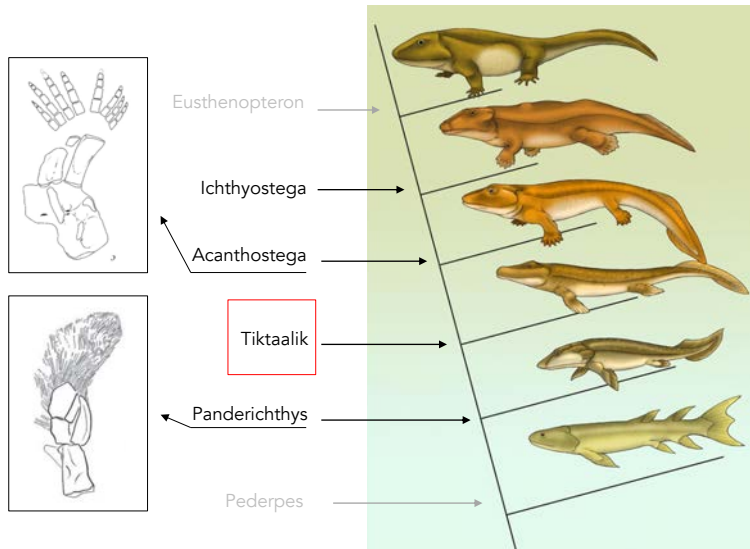
5

## Résumé de l'épisode précédent; Phylogénie



6

## Résumé de l'épisode précédent; Paléontologie



⚠ Ce sont là bien entendu des reconstructions à partir de fossiles d'animaux disparus...

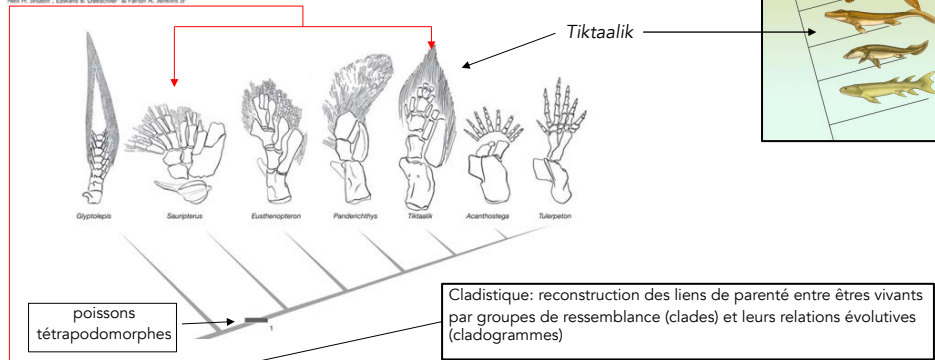
7

## Résumé de l'épisode précédent; Tiktaalik

### ARTICLES

#### The pectoral fin of *Tiktaalik roseae* and the origin of the tetrapod limb

Neil H. Shubin<sup>1</sup>, Edward B. Daeschler<sup>1</sup> & Farish A. Jenkins<sup>2\*</sup>



**Figure 4 | Cladogram of the pectoral fins of taxa on the tetrapod stem.**  
Unlike other tetrapodomorph fishes (1), *Tiktaalik* has reduced the unjointed lepidotrichia, expanded the radials to a proximal, intermediate and distal series, and established multiple transverse joints in the distal fin. The fin also retains a mosaic of features seen in basal taxa. The central axis of enlarged endochondral bones is a pattern found in basal sarcopterygians and accords with hypotheses that a primitive fin axis is homologous to autopodial bones

of the tetrapod limb. In some features, *Tiktaalik* is similar to ~~fish~~ dentists such as *Sauripterus*. These similarities, which are probably homoplastic, include the shape and number of radial articulations on the pinnare, the presence of extensive and branched endochondral radials, and the retention of unjointed lepidotrichia. Figures redrawn and modified from Glyptolepis<sup>21</sup>, *Eusthenopteron*<sup>22</sup>, *Panderichthys*<sup>23</sup>, *Acanthostega*<sup>24</sup> and *Tulerpeton*<sup>25</sup>.

Des traits similaires sans origine commune...

8

## Résumé de l'épisode précédent; Tiktaalik



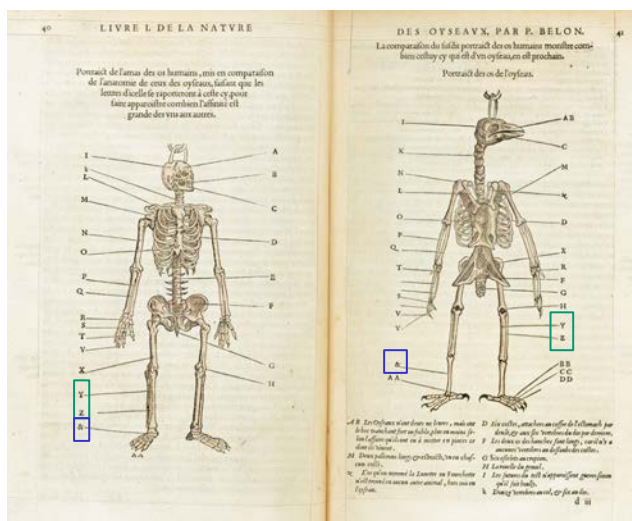
Tweet du 20 mai 2022, museum de Chicago (> 100K followers..)

Tiktaalik, un poisson vieux de 375 millions d'années, que ses '**nageoires de type membre**' permirent de s'aventurer sur la terre ferme. C'est un **fossile transitionnel clé** qui montre **comment** un poisson ancien put évoluer en animaux terrestres, incluant les humains (trad. DD).

9

## Résumé de l'épisode précédent; concept d'homologie

1) '**Homologie classique**' (structures issues de la même structure ancestrale)



Pierre Belon du Mans  
(1517-1564)  
Anatomie comparée

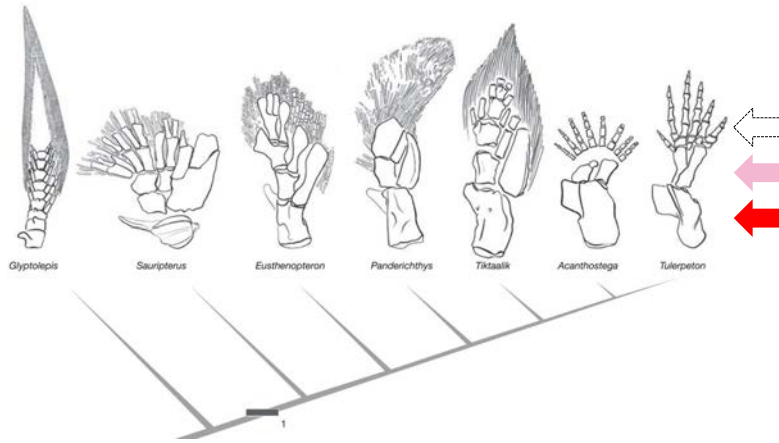
(André Vésale (1514-1564)  
Anatomie humaine

  Tibia, péroné

  Tarsométatarsaire  
(fusion du tarse -cheville- et du métatarsaire -pied- des mammifères)

10

## Résumé de l'épisode précédent; concept d'homologie



11

## Homologie, homologie, homologie et homologie

### Homologie (évolution)

➡ Pour les articles homonymes, voir *Homologie*.

⚠ Ne doit pas être confondu avec *Analogie (évolution)*.



En biologie de l'évolution, une **homologie** désigne un lien évolutif entre deux traits (en général anatomiques) observés chez deux espèces différentes, qui est dû au fait que toutes deux l'ont hérité d'un ancêtre commun. Ces traits sont alors dits **homologues**. Ce peut être des caractères anatomiques, ou moléculaires (*protéines* homologues). Ce terme s'étend aussi aux séquences génétiques (de l'ADN).

Le terme homologie est un concept fondamental pour la biologie en ce qui concerne l'organisation d'un organisme. Il est aussi un sujet très flou et complexe car il est expliqué différemment selon la communauté scientifique. L'homologie a été identifiée, par Hall en 2000, comme l'un des cinq éléments le plus important dans le domaine de développement évolutif. Au niveau de la *biologie évolutive du développement*, le terme homologie est utilisé pour expliquer les structures similaires et répétitives d'un organisme à travers plusieurs générations. Selon Van Valen, *l'homologie est la correspondance provoquée par une continuité de l'information pour des structures au sein d'un organisme ou entre des organismes*. Le concept d'homologie est peu connu et peu développé par les biologistes, surtout au niveau moléculaire. Malgré les nombreuses définitions décrivant l'homologie, il n'y en a encore aucune qui est acceptée par tous les biologistes. Ne pas confondre avec la définition d'homologie du domaine en biologie comparative et évolutionnaire.

1) '*Homologie*' (structures issues de la même structure ancestrale)

2) '*Homologie profonde*' (formalisée par Shubin, Tabin and Carroll, 1997, revue 2009); structures différentes (non-homologues) issues de l'utilisation de réseaux de *gènes* et de leurs interactions mises au point à l'origine pour une structure qui n'est pas sensu stricto 'homologue')

3) '*Homologie super-profonde mécanistique*' (formalisée par Wagner et Collègues, notion de ChIMs..)

4) '*Homologie super-profonde ontologique*' (structures 'homologues' produites suite à l'évolution de systèmes de régulations spécifiques à la fonction (nouveau, structure..)

12



# Homologie 'profonde' 1.0 ('deep homology')

NATURE | VOL 388 | 14 AUGUST 1997

Nature © Macmillan Publishers Ltd 1997

review article

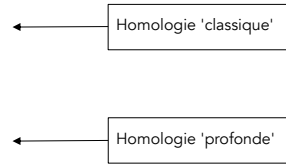
2) 'Homologie profonde'

## Fossils, genes and the evolution of animal limbs

Neil Shubin, Cliff Tabin & Sean Carroll

The morphological and functional evolution of appendages has played a crucial role in the adaptive radiation of tetrapods, arthropods and winged insects. The origin and diversification of fins, wings and other structures, long a focus of palaeontology, can now be approached through developmental genetics. Modifications of appendage number and architecture in each phylum are correlated with regulatory changes in specific patterning genes. Although their respective evolutionary histories are unique, vertebrate, insect and other animal appendages are organized by a similar genetic regulatory system that may have been established in a common ancestor.

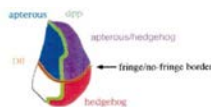
Determination of whether two structures are homologous depends on the hierarchical level at which they are compared<sup>103-105</sup>. For example, bird wings and bat wings are analogous as wings, having evolved independently for flight in each lineage. However, at a deeper hierarchical level that includes all tetrapods, they are homologous as forelimbs, being derived from a corresponding appendage of a common ancestor. Similarly, we suggest that whereas vertebrate and insect wings are analogous as appendages, the genetic mechanisms that pattern them may be homologous at a level including most protostomes and deuterostomes. Furthermore, we propose that the regulatory systems that pattern extant arthropod and vertebrate appendages patterned an ancestral outgrowth and that these circuits were later modified during the evolution of different types of animal appendages. Animal limbs would be, in a sense, developmental 'paralogues' of one another; modification and redeployment of this ancient genetic system in different contexts produced the variety of appendages seen in Recent and fossil animals. □



13

# Homologie 'profonde' 1.0 ('deep homology')

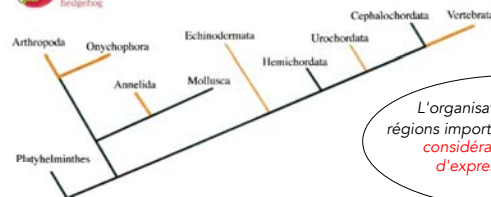
Disque imaginal de patte de mouche



Bourgeon de patte de tétrapode



Aucune structure commune n'existait comme point de départ de ces deux types d'appendices



L'organisation générale des régions importantes est 'conservée', considérant les domaines d'expression géniques

The second model is that some of these genes or circuits were components of an ancestral genetic regulatory system that was used to pattern a structure in the common ancestor of vertebrates and arthropods. This ancestral structure need not have been homologous to arthropod or vertebrate limbs; the regulatory system could have originally patterned any one of a number of outgrowths of the body wall in a primitive bilaterian for example. The genes themselves were initially involved in other developmental events; the key step in animal limb evolution was the establishment of an integrated genetic system to promote and pattern the development of certain outgrowths. Once established, this system provided the genetic and developmental foundation for the evolution of structures as diverse as fins, antennae and lobopodia.

\*Etablir un système génétique intégré qui pourra être utilisé pour promouvoir à la fois l'extension d'appendices divers et leur patterning, sans que ceux-ci ne soient homologues sensu stricto

\*Q: Les modifications génétiques et de régulations de ce système intégré sont-elles nécessairement intégrées ?  
L'homologie profonde reste-t-elle toujours profonde?

14

# Homologie 'profonde' 2.0 ('deep homology')

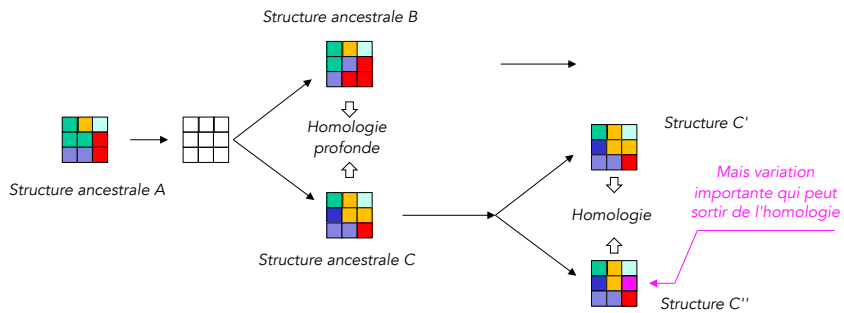
INSIGHT REVIEW

NATURE | Vol 457 | 12 February 2009 | doi:10.1038/nature07891

## Deep homology and the origins of evolutionary novelty

Neil Shubin<sup>1,2</sup>, Cliff Tabin<sup>3</sup> & Sean Carroll<sup>4</sup>

Do new anatomical structures arise *de novo*, or do they evolve from pre-existing structures? Advances in developmental genetics, palaeontology and evolutionary developmental biology have recently shed light on the origins of some of the structures that most intrigued Charles Darwin, including animal eyes, tetrapod limbs and giant beetle horns. In each case, structures arose by the modification of pre-existing genetic regulatory circuits established in early metazoans. The deep homology of generative processes and cell-type specification mechanisms in animal development has provided the foundation for the independent evolution of a great variety of structures.



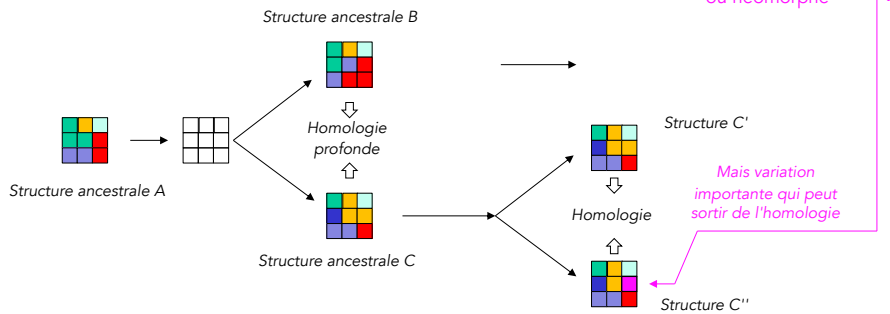
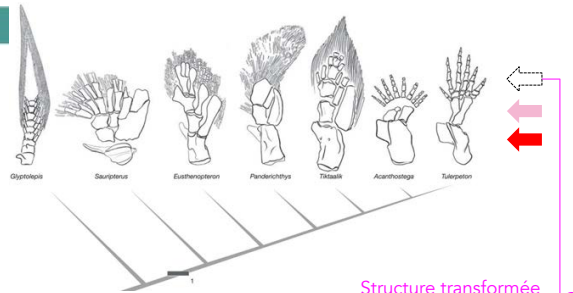
15

# Homologie 'profonde' 2.0 ('deep homology')

INSIGHT REVIEW

## Deep homology and the origins of evolutionary novelty

Neil Shubin<sup>1,2</sup>, Cliff Tabin<sup>3</sup> & Sean Carroll<sup>4</sup>

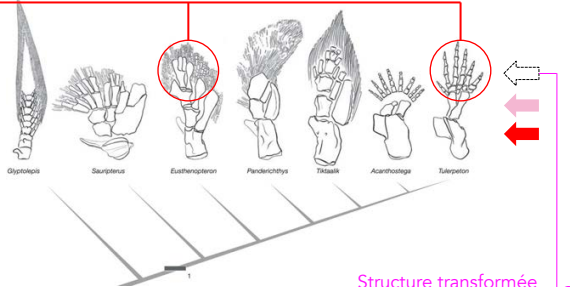


16



## Homologie 'super-profonde'

Si ces structures se développent de la même façon, suite aux activités de cellules et de gènes identiques et à des contrôles identiques des unes et des autres, alors seulement pourra-t-on parler de leur homologie



Pour répondre à cette question, il faut creuser dans les mécanismes qui produisent ces différentes parties, comprendre les détails fins des régulations génétiques mises en oeuvre afin de décider si il s'agit là de transformations sur la base d'homologies ou alors d'éléments néomorphes. En d'autres termes, il faut rechercher les **homologies ontologiques**, définies comme étant produites non pas par l'expression de la même batterie de gènes et de protéines, mais par des phénomènes communs de régulations.

Cela implique naturellement la compréhension 1) du développement des structures concernées et 2) des chaînes de régulations géniques qui y sont spécifiquement associées.

17

## Homologie 'super-profonde' mécanistique



Review

Reframing research on evolutionary novelty and co-option: Character identity mechanisms versus deep homology

James DiFrisco<sup>1</sup>, Günter P. Wagner<sup>2,3,4,\*</sup>, Alan C. Love<sup>5,6\*</sup>

<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.03.030>

'empiriquement': qui relève de l'expérience scientifique concrète

### ABSTRACT

A central topic in research at the intersection of development and evolution is the origin of novel traits. Despite progress on understanding how developmental mechanisms underlie patterns of diversity in the history of life, the problem of novelty continues to challenge researchers. Here we argue that research on evolutionary novelty and the closely associated phenomenon of co-option can be reframed fruitfully by: (1) specifying a conceptual model of mechanisms that underwrite character identity, (2) providing a richer and more empirically precise notion of co-option that goes beyond common appeals to "deep homology", and (3) attending to the nature of experimental interventions that can determine whether and how the co-option of identity mechanisms can help to explain novel character origins. This reframing has the potential to channel future investigation to make substantive progress on the problem of evolutionary novelty. To illustrate this potential, we apply our reframing to two case studies: treehopper helmets and beetle horns.

..proposer une notion de la co-option plus riche et plus empiriquement précise, qui va au delà de l'évocation commune (pratique) à une 'homologie profonde' (trad. DD)

18

# Homologie 'super-profonde' mécanistique



Review  
Reframing research on evolutionary novelty and co-option: Character identity mechanisms versus deep homology  
James DiFrisco<sup>1</sup>, Günter P. Wagner<sup>2,3,4,5\*</sup>, Alan C. Love<sup>5,6\*</sup>  
<https://doi.org/10.1016/j.semedb.2022.03.030>

Concept de 'ChIMs': 'Character Identity Méchanisms':  
Définition d'une batterie de mécanismes qui peuvent définir l'identité d'un caractère...

According to Shubin and colleagues, deep homology describes "the sharing of the genetic regulatory apparatus that is used to build morphologically and phylogenetically disparate animal features" [66]. For two body parts to possess deep homology, (1) their development must depend on at least some of the same genetic regulatory features, and (2) the body parts are not recognized as homologous or "would not be considered homologous by previous strict definitions" [67]. One of the most well-known examples of deep homology was the discovery that homologous regulatory genes (*eyeless/Pax-6/Aniridia*) are involved in eye development in *Drosophila*, mice, and humans (respectively) [68].

Définition de l'homologie profonde' essentiellement basée sur l'examen de patrons d'expression géniques et est donc incomplète et théorétiquement biaisée



Besoin de critères plus mécanistiques



ChIMs

The ChIM model augments past theoretical work in developmental evolution by identifying a mechanistic basis for the individuality and distinctness of characters [25,41,42]. By controlling the activation of

# Homologie 'super-profonde' mécanistique



Review  
Reframing research on evolutionary novelty and co-option: Character identity mechanisms versus deep homology  
James DiFrisco<sup>1</sup>, Günter P. Wagner<sup>2,3,4,5\*</sup>, Alan C. Love<sup>5,6\*</sup>  
<https://doi.org/10.1016/j.semedb.2022.03.030>

Concept de 'ChIMs': 'Character Identity Méchanisms':  
Définition d'une batterie de mécanismes qui peuvent définir l'identité d'un caractère...

For example, it broadens consideration beyond gene regulatory networks (GRNs) within cells as the exclusive or definitive mode of developmental causality [36,39,40] by taking into account factors like protein-protein interaction, non-coding RNA, and the role of cell-cell signaling interactions and extracellular matrix in the organization of complex tissues and organs. This is reflected in the conceptual shift to the abstract notion of "mechanisms" instead of individual genes or networks as the primary locus of control for character identity. Most

Les cellules (et non pas les gènes) sont les 'causes proximales' du développement et une considération plus générale des mécanismes cellulaires est nécessaire pour établir des 'homologies...



- \*interactions entre protéines
- \*ARNs non codant
- \*Signalisation inter-cellulaire
- \*Role de la matrice extra-cellulaire
- ....

# Homologie 'super-profonde' mécanistique



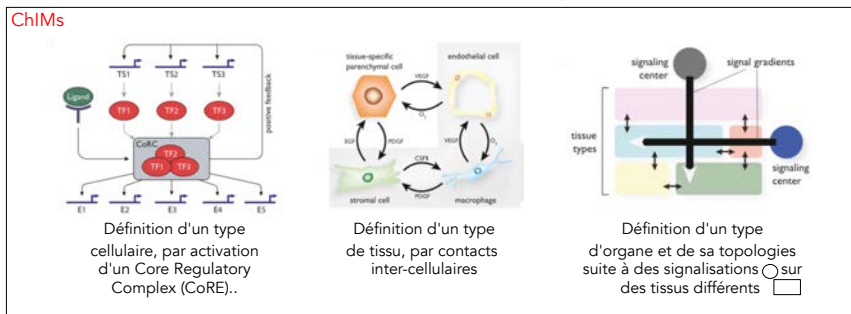
Review

Reframing research on evolutionary novelty and co-option: Character identity mechanisms versus deep homology

James DiFrisco<sup>1</sup>, Günter P. Wagner<sup>1,2,3,4,5,\*</sup>, Alan C. Love<sup>1,6,\*</sup>

<https://doi.org/10.1016/j.semedb.2022.03.030>

Although similarity of gene expression can be indicative of shared underlying molecular identities, it is too weak a criterion to distinguish between serial homology and novelty arising from the co-option of some genes or other developmental mechanisms. Because transcriptomic data is fundamentally descriptive, alone it does not provide causal linkages between gene transcripts and other mechanistic components.



21

# Homologie 'super-profonde' 'ontologique'

\*Essayer de remonter en amont des mécanismes cellulaires et génétiques pour définir des systèmes de régulation des gènes, fortement associés à la construction et/ou au fonctionnement de la structure considérée, afin de voir si ces systèmes sont conservés dans les structures potentiellement 'homologues'.

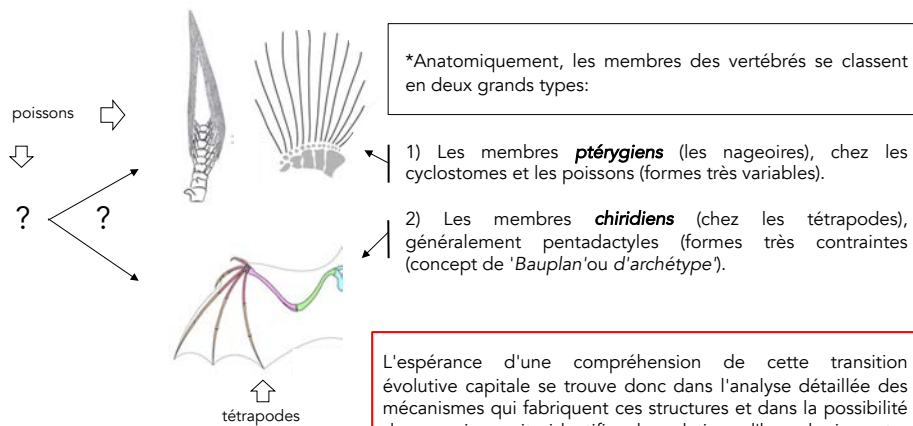
\*Voir si une approche fonctionnelle de ces régulations (pas exemple des modifications ou leur suppression) donne des effets comparables dans ces structures, exclusivement.

\*Cela pourrait toujours n'être 'qu'un phénomène de co-option' mais la probabilité diminue à chaque niveau d'analyse de l'homologie.

\*La transition de la nageoire au membre chirodien en donne un illustration parlante.

22

## Comprendre l'origine embryonnaire des structures



L'espérance d'une compréhension de cette transition évolutive capitale se trouve donc dans l'analyse détaillée des mécanismes qui fabriquent ces structures et dans la possibilité de pouvoir ensuite identifier des relations d'homologies entre ces mécanismes afin de pouvoir à la fois proposer un point de départ, puis le schéma de transformation le plus probable ET le mieux soutenu par les différents corpus de résultats...

23

## Le développement des membres et des nageoires

Les questions principales sont celles de la *croissance* et de l'*organisation* de ces structures dans le temps.

Plus particulièrement:



- 1) D'où sortent les appendices?
- 2) Comment fixer leur nombre?
- 3) Mécanismes de croissance?
- 4) Organisation et polarités:
  - \*Antéro-postérieure
  - \*Proximo-distale
  - \*Dorso-ventrale
- 5) Séquences d'ossifications
- 6) Linéages cellulaires (scRNA-seq)

\*Certains aspects du développement des membres des mammifères et des oiseaux ont également été traités dans le cours du Collège de France 2020-2021, cours centré sur les syndromes génétiques impliquant les membres.  
<https://www.college-de-france.fr/site/denis-duboule/course-2020-2021.htm>

24

## Les membres des tétrapodes

Les membres sont des dérivés mésodermique, de la lame latérale

Tôt au cours du développement apparaissent trois types généraux de tissus, les 'feuilletts germinatifs' dont dériveront tous nos types cellulaires et nos tissus futurs.

L'endoderme (Endon, en dedans); l'ectoderme (Ektos, au dehors) et le mésoderme (Mesos, médian).

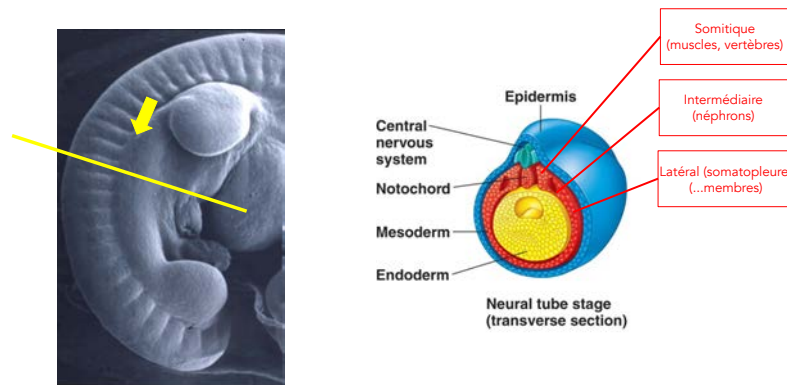
ECTODERM	MESODERM	ENDODERM
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epidermis of skin and its derivatives (including sweat glands, hair follicles)</li> <li>• Epithelial lining of mouth and anus</li> <li>• Cornea and lens of eye</li> <li>• Nervous system</li> <li>• Sensory receptors in epidermis</li> <li>• Adrenal medulla</li> <li>• Tooth enamel</li> <li>• Epithelium of pineal and pituitary glands</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Notochord</li> <li>• Skeletal system</li> <li>• Muscular system</li> <li>• Muscular layer of stomach and intestine</li> <li>• Excretory system</li> <li>• Circulatory and lymphatic systems</li> <li>• Reproductive system (except germ cells)</li> <li>• Dermis of skin</li> <li>• Lining of body cavity</li> <li>• Adrenal cortex</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epithelial lining of digestive tract</li> <li>• Epithelial lining of respiratory system</li> <li>• Lining of urethra, urinary bladder, and reproductive system</li> <li>• Liver</li> <li>• Pancreas</li> <li>• Thymus</li> <li>• Thyroid and parathyroid glands</li> </ul>

Campbell, 8ème édition

25

## Origine embryologique des membres

Les membres sont des dérivés mésodermique, de la lame latérale



Le développement précoce des embryons vertébrés consiste à organiser ces trois feuilletts embryonnaires avec la bonne géométrie. De là découlera la suite de l'organisation et de la morphogenèse des embryons

26

# Initiation des membres

Received 12 December 2020 | Revised 23 January 2021 | Accepted 23 January 2021  
DOI: 10.1002/dv.4638

REVIEW *Developmental Dynamics* WILEY

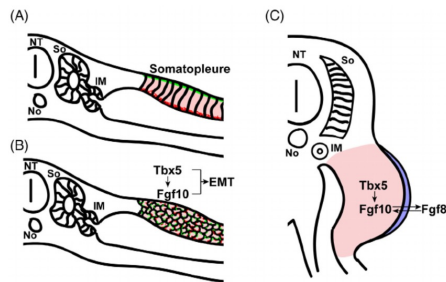
## Limb positioning and initiation: An evolutionary context of pattern and formation

Samantha R. Royle<sup>1,2</sup> | Clifford J. Tabin<sup>1</sup> | John J. Young<sup>3</sup>

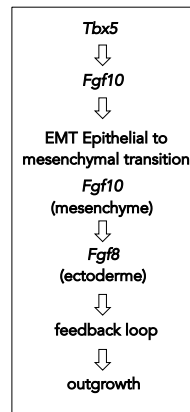
Les molécules clés:

**Tbx4,5:** (T-Box facteurs de transcription 4, 5), app 15 Tbx facteurs lient une T box TCACACCT et régulent la transcription de gènes cibles

**Fgf8, Fgf10:** Facteurs de croissance des fibroblastes (23 différents). Molécules de signalisation intercellulaire (ligands) qui lient 4 récepteurs différents (FGFR1-FGFR4). Effets multiples (division cellulaire...). Signalisation principalement par la voie Jak/Stat



**FIGURE 1** Schematic illustration of limb initiation in amniotes. A. The cells of the somatopleure are initially arranged in a regular, columnar, pattern with apical Actin (green) and basal Laminin (red). B. *Tbx5* induces *Fgf10* in the limb forming region which causes an epithelial to mesenchymal transition. Actin and Laminin lose their polarized expression patterns. C. *Fgf10* in the mesenchyme induces *Fgf8* in the ectoderm of the limb bud, setting up a feedback loop which leads to limb outgrowth. So, somite; IM, intermediate mesoderm; NT, neural tube; No, Notochord; Pink: Somatopleure, Blue: Ectoderm, Red: Actin, Green: Laminin. See text for references



27

# Positions et initiation des membres

Received 12 December 2020 | Revised 23 January 2021 | Accepted 23 January 2021  
DOI: 10.1002/dv.4638

REVIEW *Developmental Dynamics* WILEY

## Limb positioning and initiation: An evolutionary context of pattern and formation

Samantha R. Royle<sup>1,2</sup> | Clifford J. Tabin<sup>1</sup> | John J. Young<sup>3</sup>



### Abstract

Before limbs or fins, can be patterned and grow they must be initiated. Initiation of the limb first involves designating a portion of lateral plate mesoderm along the flank as the site of the future limb. Following specification, a myriad of cellular and molecular events interact to generate a bud that will grow and form the limb. The past three decades has provided a wealth of understanding on how those events generate the limb bud and how variations in them result in different limb forms. Comparatively, much less attention has been given to the earliest steps of limb formation and what impacts altering the position and initiation of the limb have had on evolution. Here, we first review the processes and pathways involved in these two phases of limb initiation, as determined from amniote model systems. We then broaden our scope to examine how variation in the limb initiation module has contributed to biological diversity in amniotes. Finally, we review what is known about limb initiation in fish and amphibians, and consider what mechanisms are conserved across vertebrates.

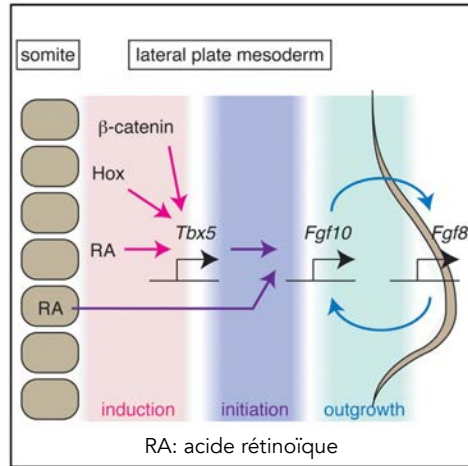
### KEYWORDS

Evo-Devo, genetic networks, heterochrony, limb development, limb positioning

28



## Positionnement des membres (3 phases)

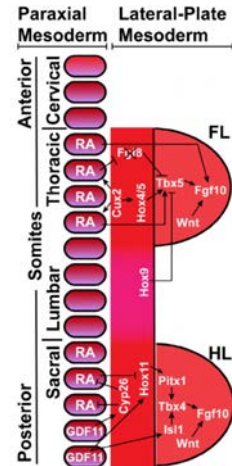


### Cell Reports

RA Acts in a Coherent Feed-Forward Mechanism with Tbx5 to Control Limb Bud Induction and Initiation

Satoko Nishimoto, Susan M. Wilde, Sophie Wood, Malcolm P.O. Logan

Article



Received 20 November 2020 | Revised 20 November 2021 | Accepted 20 November 2021

DOI: 10.1002/celr.144

WILEY

Limb positioning and initiation: An evolutionary context of pattern and formation

Samantha K. Royle<sup>1,2</sup> | Clifford J. Tabin<sup>1,2</sup> | John J. Young<sup>2</sup>

29

## Croissance et 'patterning' (organisation) des membres

© 2020. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2020) 147, dev177956. doi:10.1242/dev.177956

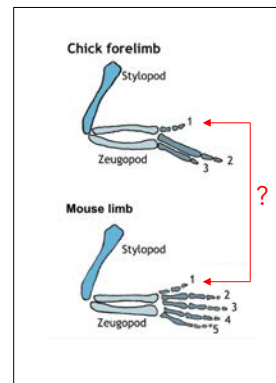
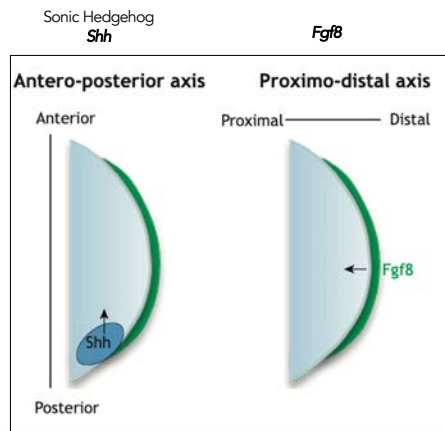
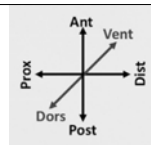
### REVIEW

Establishing the pattern of the vertebrate limb

Caitlin McQueen and Matthew Towers\*

Structure en 3D

- \*Proximo-distal
- \*Antéro-postérieur
- \*Dorso-ventral



30

# Croissance du membre, axe proximo-distal

© 2020. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2020) 147, doi:10.1098/dev.177956

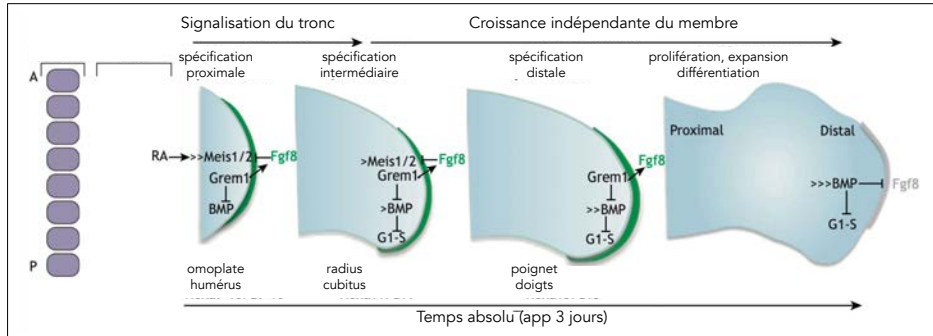
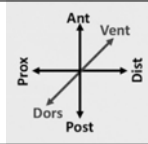
REVIEW

Establishing the pattern of the vertebrate limb

Callin McQueen and Matthew Towers\*

Structure en 3D

\*Proximo-distal



\*Deux systèmes coordonnés:

- 1) système d'expansion et de croissance distale
- 2) système de spécification progressive

31

# Croissance du membre, axe proximo-distal

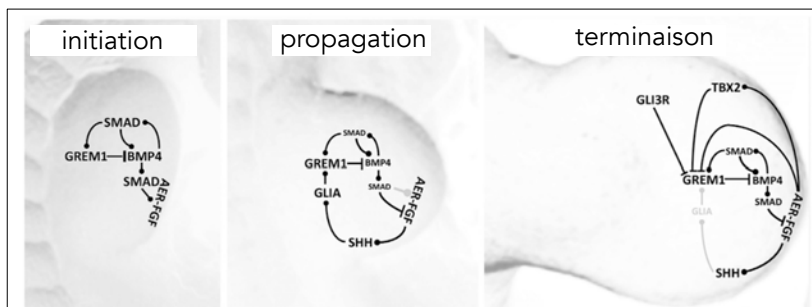
Dynamic and self-regulatory interactions among gene regulatory networks control vertebrate limb bud morphogenesis

Aimée Zuniga\*, Rolf Zeller\*  
Developmental Genetics, Department Biozentrum, University of Basel, Basel, Switzerland  
\*Correspondence: zeller@biozentrum.unibas.ch, zeller@unibas.ch

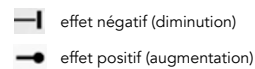
Current Topics in Developmental Biology, Volume 139  
ISSN 0076-2153  
https://doi.org/10.1016/j.ctdb.2020.102.010

- 1) système d'expansion et de croissance distale

\*BMP4 est un membre de la famille TGFbeta, qui signale par l'intermédiaire des protéines smad  
\*Gremlin est un inhibiteur de BMP4



\*GRN a boucles de rétroaction



32

## Croissance du membre, axe proximo-distal

DOI: 10.1038/nature07085 · Corpus ID: 2222422

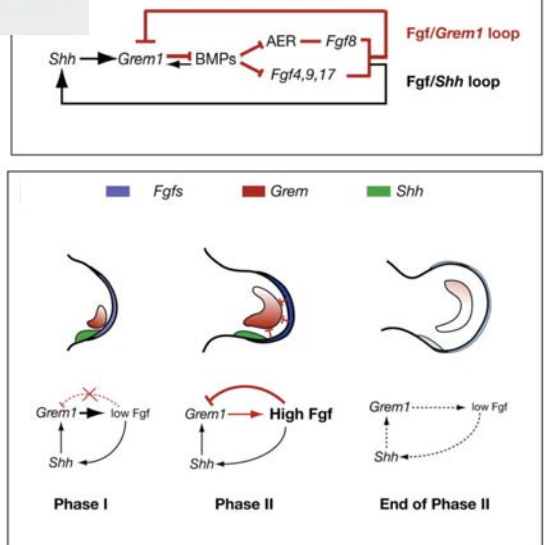
### An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth

A. Verheijen, X. Shi · Published 2008 · Biology, Medicine · Nature

Au début, boucle positive qui stimule la production de *Fgf* dans l'AER. Cependant, l'accumulation de trop de *Fgf* dans cette structure va engendrer une boucle négative qui, en inhibant l'inhibiteur de BMP va conduire à une rétraction de l'AER, en parallèle à l'éloignement des cellules exprimant Gremlin de cette AER...

Ce système contient les éléments nécessaires à la balance entre l'initiation de la croissance de la structure, sa persistance et sa terminaison

Un système auto-entretenu, qui contient les éléments de sa propre dynamique



33

## Croissance du membre, axe proximo-distal

© 2020. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2020) 147, doi:10.1242/dev.177966

REVIEW

Establishing the pattern of the vertebrate limb

Callitn McQueen and Matthew Towers\*

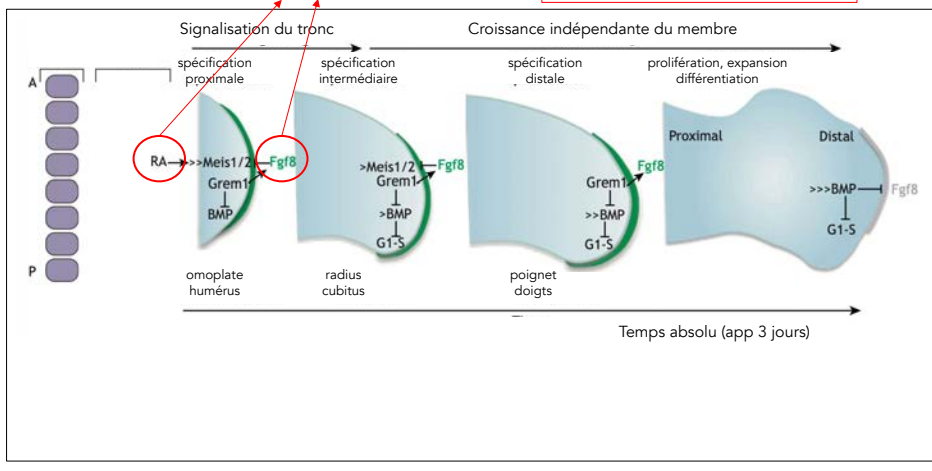
Diffusible signals, not autonomous mechanisms, determine the main proximodistal limb subdivision.

Roselló-Díez A<sup>1</sup>, Ros MA<sup>1</sup>, Torres M<sup>1</sup>

Author information ▶

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

Actions opposées de deux systèmes →



34

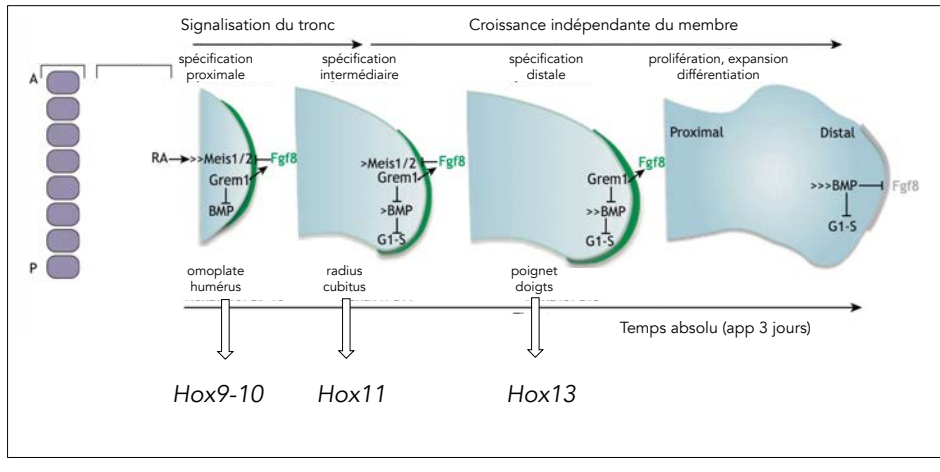
## Croissance du membre, axe proximo-distal

© 2020. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2020) 147, doi:10.1098/dev.177996

REVIEW

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

### 2) système de spécification des 'segments' du membre



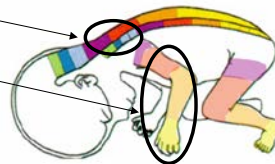
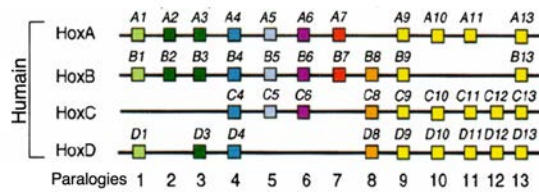
35

## La double fonction des gènes Hox dans les membres

1) Détermination de la position sur l'axe AP

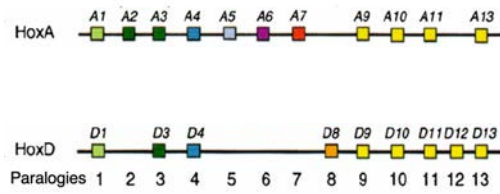
Moreau et al., J. Gros (2019)  
Current Biology, PMID: 30554902

2) Croissance et organisation



36

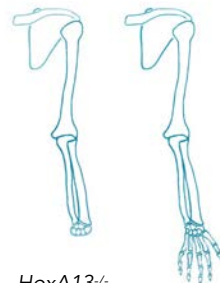
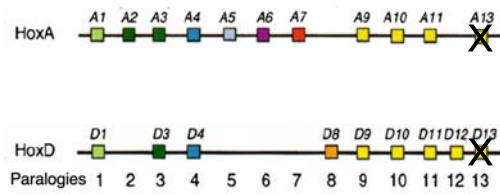
## Gènes *Hox* et organisation des membres (*HoxA/HoxD*)



Capecchi, Chambon, Duboule laboratories; from Zakany and Duboule, 2007

37

## Gènes *Hox* et organisation des membres (*HoxA/HoxD*)

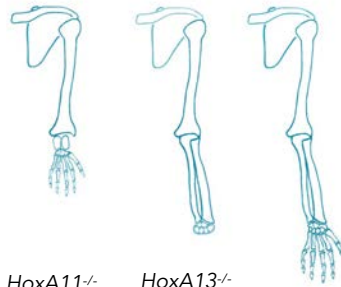
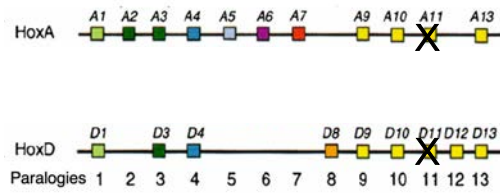


*HoxA13*<sup>-/-</sup>  
*HoxD13*<sup>-/-</sup>

Capecchi, Chambon, Duboule laboratories; from Zakany and Duboule, 2007, Fromental-Ramain et al., 1996

38

## Gènes *Hox* et organisation des membres (*HoxA/HoxD*)

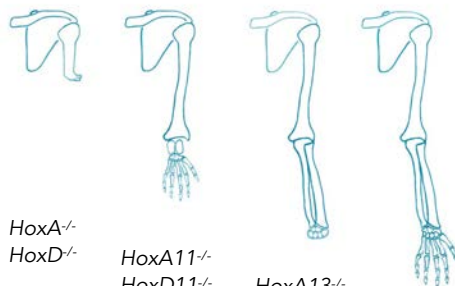
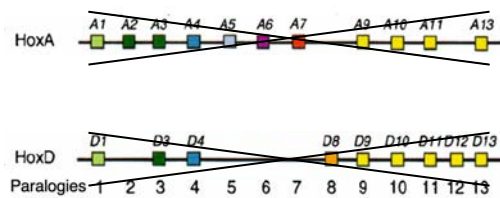


*HoxA11*<sup>-/-</sup> *HoxA13*<sup>-/-</sup>  
*HoxD11*<sup>-/-</sup> *HoxD13*<sup>-/-</sup>

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

39

## Gènes *Hox* et organisation des membres (*HoxA/HoxD*)



*HoxA*<sup>-/-</sup> *HoxD*<sup>-/-</sup> *HoxA11*<sup>-/-</sup> *HoxD11*<sup>-/-</sup> *HoxA13*<sup>-/-</sup> *HoxD13*<sup>-/-</sup>

Capecchi, Chambon, Duboule laboratories; from Zakany and Duboule, 2007; Kmita et al., 2005

40



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

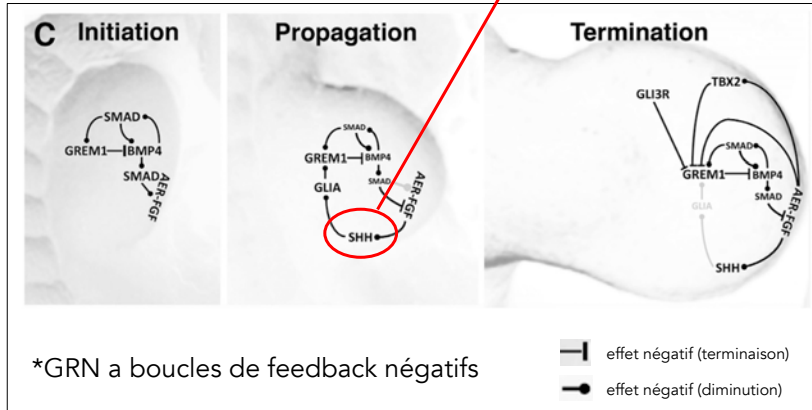
Dynamic and self-regulatory interactions among gene regulatory networks control vertebrate limb bud morphogenesis

Aimée Zuniga\*, Rolf Zeller\*  
Developmental Genetics, Department Botanical, University of Basel, Basel, Switzerland  
\*Correspondence: zuniga@unibas.ch; zeller@unibas.ch

Current Topics in Developmental Biology, Volume 139  
ISSN 0070-2153  
https://doi.org/10.1016/j.ctdb.2020.02.005

© 2020 Elsevier Inc.  
All rights reserved.

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



41

## Sonic hedgehog (*Shh*) et l'axe antéro-postérieur

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

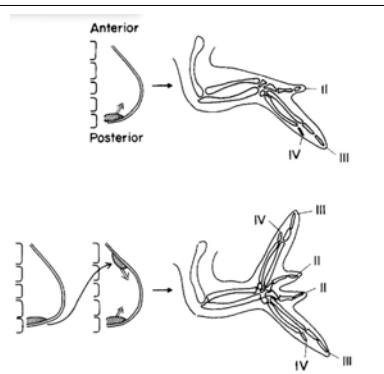
### Sonic hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the ZPA

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

ZPA: Zone of Polarizing Activity  
(Zone à Activité Polarisante)

ZPA: Expériences de Saunders et Gasseling dans les années 1960-70 qui consistent à greffer dans la partie antérieure du bourgeon de membre du poulet, des cellules provenant de la partie postérieure.

Le résultat est une duplication en miroir de la partie distale du membre. Par conséquent, ces cellules postérieures ont une activité 'polarisante'. Quelle est la nature de cette activité?



42

## Sonic hedgehog (*Shh*) et l'axe antéro-postérieur

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

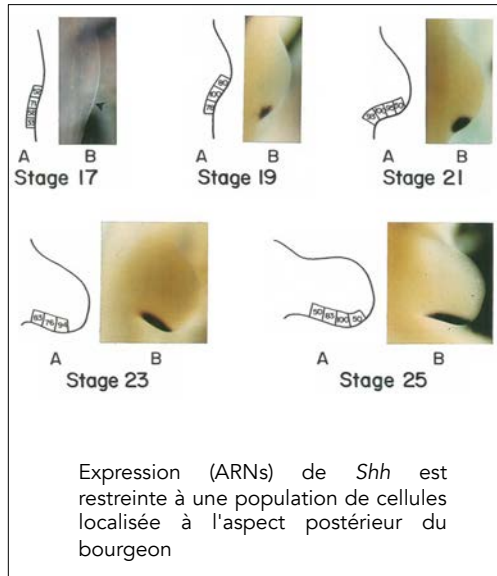
### Sonic hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the ZPA

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



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

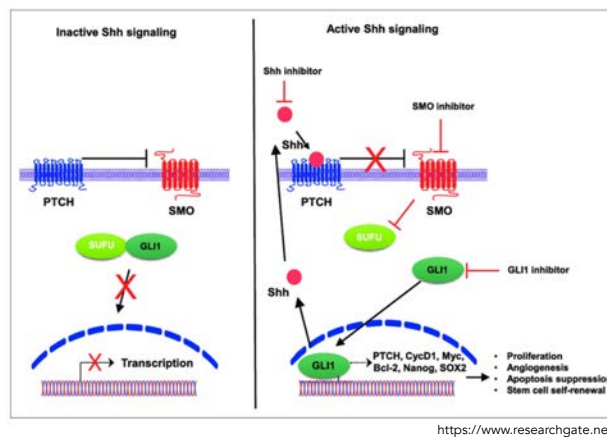
Le clonage original (1993) est fait en utilisant le gène Hedgehog (*hh*) de la *Drosophila melanogaster*, par homologie, un gène qui est exprimé dans les cellules postérieures de chaque segment de la l'embryon de mouche.



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

43

## La voie de signalisation hedgehog



\*Liaison de la protéine hedgehog à son récepteur *Patched* (*Ptch*), qui 'libère' l'activité de signalisation de *smoothened* (famille des récepteur couplés aux protéines G (RCPG))

\*Par une chaîne de transduction du signal, cela va permettre au facteur de transcription GLI de rentrer dans le noyau, lier l'ADN et activer des gènes cibles

44

## Sonic hedgehog est l'activité polarisante de la ZPA

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

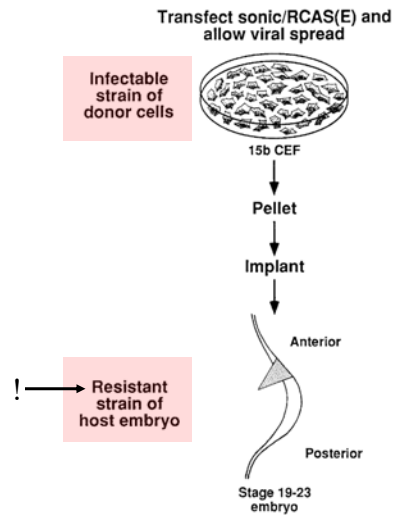
### Sonic hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the ZPA

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

\*La protéine SHH peut-elle être l'activité polarisante présente dans la ZPA?

\*Expérience de gain de fonction dans la partie antérieure du bourgeon d'aile de poulet.

\*Virus répliquatif RCAS. Greffon fait de fibroblastes de poulet infectés par le virus/Shh



45

## Sonic hedgehog est l'activité polarisante de la ZPA

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

### Sonic hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the ZPA

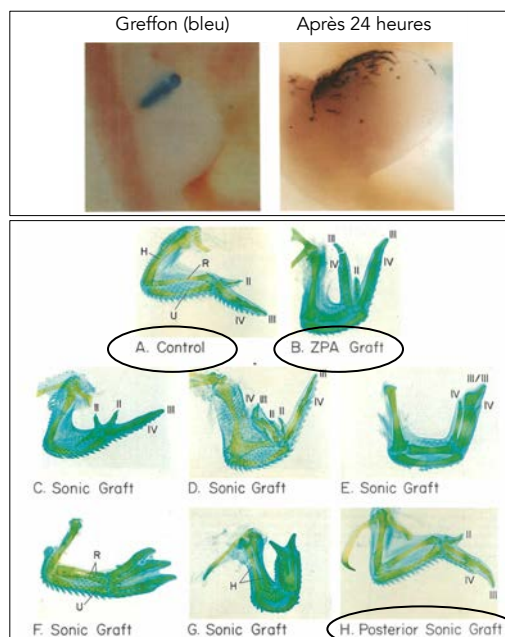
Robert D. Riddle, Randy L. Johnson, Ed Laufer,  
and Cliff Tabin  
Department of Genetics  
Harvard Medical School  
Boston, Massachusetts 02115

Conclusion:

\*La protéine SHH seule est capable de reproduire une grande partie de l'effet d'une greffe de ZPA.

\*La protéine SHH est l'activité polarisante découverte par Saunders et Gasseling.

\*Par conséquent, la polarité antéro-postérieure est fixée par la localisation des ARNs *Shh* dans la partie postérieure du bourgeon de membre.

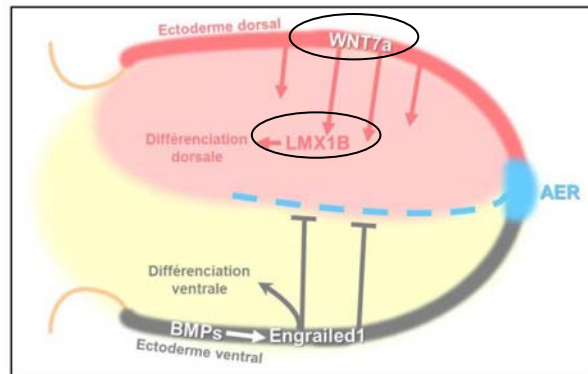


46

## Polarité dorso-ventrale

\*La polarité dorso-ventrale est initiée par l'expression de *Wnt7a* dans l'ectoderme dorsal, alors que l'ectoderme ventral exprime *engrailed1*

\*le signal *Wnt7a* active la transcription du gène *LMX1B* qui est le déterminant de la polarité DV



Florence Petit <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01159394> (d'après Loomis et al., 1998)

47

## La voie de signalisation Wnt

Published in  
**CELLULAR NEUROSCIENCE**

REVIEW ARTICLE  
published: 11 March 2015  
doi: 10.3389/fncel.2015.00006

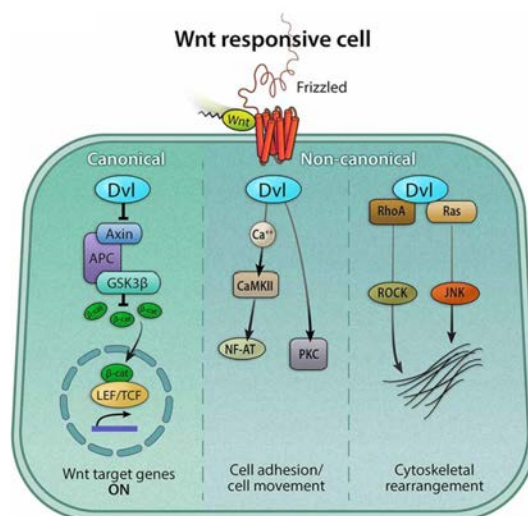
**Making sense of Wnt signaling—linking hair cell regeneration to development**

Lina Jansson, Grace S. Kim and Alan G. Cheng\*

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, School of Medicine, Stanford University, Stanford, CA, USA

\*Un même récepteur (*Frizzled*) mais des voies différentes. Une 'canonique' utilisant la bêta-caténine comme agent principal, et d'autres voies 'non-canonique' qui n'utilisent pas cette molécule.

\*Dans l'ectoderme dorsal, la signalisation Wnt semble passer par une voie non-canonique bien que cela ne soit pas encore totalement clair.



48

## Lmx1b, effecteur de la polarité dorso-ventrale



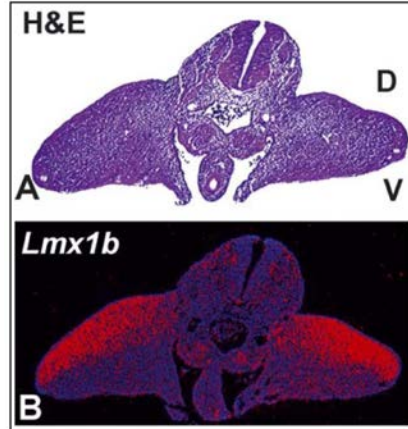
### Lmx1b expression during joint and tendon formation: localization and evaluation of potential downstream targets

Sandra D. Dreyer<sup>a,b</sup>, Takuji Naruse<sup>c</sup>, Roy Morello<sup>b</sup>, Bernhard Zabel<sup>a</sup>, Andreas Winterpacht<sup>a</sup>, Randy L. Johnson<sup>d</sup>, Brendan Lee<sup>b,e</sup>, Kerby C. Oberg<sup>c,f,\*</sup>

H&E: Coloration hematoxyline et éosine, sur coupe

Révélation des ARNs *Lmx1b* par hybridation in situ sur coupe avec une sonde marquée par un isotope.

Spécificité d'expression dorsale, exclusivement



49

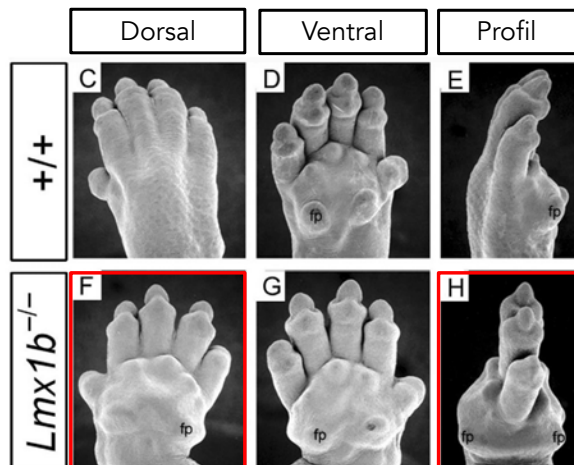
## Lmx1b, effecteur de la polarité dorso-ventrale

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

Haisu Chen<sup>1</sup>, Yi Lun<sup>1</sup>, Dmitry Ochinnikov<sup>1</sup>, Hiroki Kokubo<sup>1</sup>, Kerby C. Oberg<sup>2</sup>, Carmen V. Pepicelli<sup>3</sup>, Lin Gan<sup>1</sup>, Brendan Lee<sup>3</sup> & Randy L. Johnson<sup>1</sup>

\*Une mutation induite dans le gène *Lmx1b* et qui inactive totalement fonction produit des membres qui ont deux faces ventrales...

\*Ce gène est donc bien le déterminant principal de la polarité dorso-ventrale.



50

## La construction cellulaire du membre



Evolutionary Biology pp 319-387 | Cite as 1986

### A Morphogenetic Approach to the Origin and Basic Organization of the Tetrapod Limb

Authors

Authors and affiliations

Neil H. Shubin, Pere Alberch

Two complementary approaches underlie the study of evolutionary morphology—one a direct result of the Darwinian revolution, the other with roots that can be traced back to pre-Darwinian times. The former focuses on the issue of diversity and the origin of adaptation. Morphological change is depicted as a chronological progression of various combinations of adaptations and preadaptations (e.g., Bock, 1977). To define a morphological adaptation one has to focus on the relationships between form and function, i.e., on the selective pressures that fuel evolutionary change. This approach is dominated by an attempt to characterize the organism–environment interrelationship via the concept of natural selection as the driving force for morphological diversification. Conversely, the second approach, adopted in this work, seeks the structural and morphogenetic unity within diverse forms irrespective of the functional or adaptive differences between them. Essentially typological, its method goes back to the ideas of the German *Naturphilosophie* and French transcendental schools of morphology (Russell, 1916), and it addresses the ordered diversity of forms from the perspective of internal organization.

Rechercher une unité morphologique à travers une approche purement descriptive des mécanismes de la formation des modèles cartilagineux, de leurs branchements et de leur chronologie...

51

## La construction cellulaire du membre



Evolutionary Biology pp 319-387 | Cite as 1986

### A Morphogenetic Approach to the Origin and Basic Organization of the Tetrapod Limb

Authors

Authors and affiliations

Neil H. Shubin, Pere Alberch

Deux façons complémentaires d'approcher l'étude de l'évolution des morphologies. La première est le résultat direct de la révolution darwinienne, l'autre trouve ses racines dans des temps pré-darwiniens. La première se concentre sur les questions de diversité et de l'origine des adaptations. Les changements de morphologies sont considérés comme des progressions chronologiques d'adaptations et de pré-adaptations [...] Cette approche est dominée par [...] le concept de sélection naturelle.

Inversément, la seconde approche (celle prise dans ce travail) recherche l'unité morphologique parmi des formes diverses sans tenir compte de leurs différences fonctionnelles ou adaptatives. Cette méthode 'typologique' reprend les idées de la *Naturphilosophie* Allemande [...] et étudie la diversité des formes avec une perspective sur l'organisation interne.

*Naturphilosophie* est à prendre au sens du romantisme Allemand (et non pas une 'philosophie de la nature'), une philosophie (Schelling, Goethe, Novalis..., fin XVIIIème, mi-XVIIIème) qui émerge en réaction aux visions mécanistes se développant alors (la physique, les mathématiques, Newton... † 1727) remettant au centre une vision inclusive du vivant, d'une organisation générale du monde. Cette vision persiste aujourd'hui (dans une certaine mesure) face aux abus d'arguments explicatifs basés sur des concepts par trop réductionnistes (le gène...)

52



## La construction par branchement et segmentation

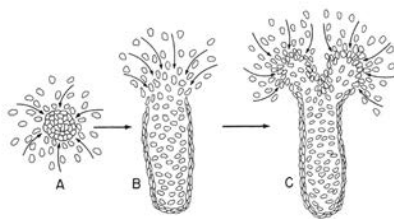
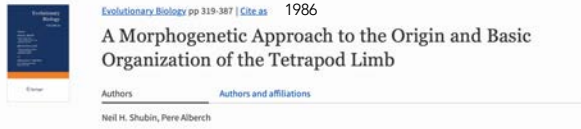


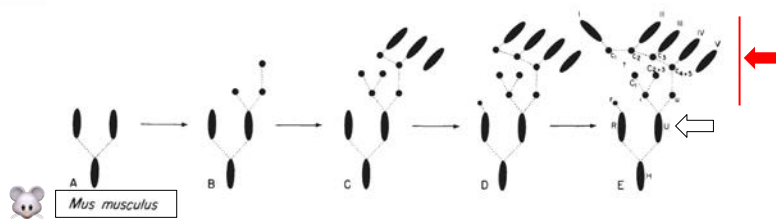
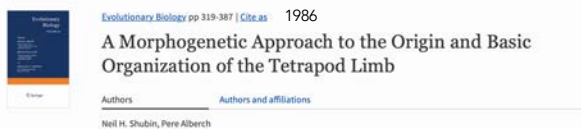
FIG. 5. The growth of a cartilage condensation as a result of local, physicochemical mechanisms of morphogenesis. (A) Initially, cells are recruited to the chondrogenic focus from all surrounding areas. The size, rate of growth, and position of this condensation within the limb bud are the result of perturbations of the parameters discussed in Oster *et al.* (1985). For example, cells may tend to aggregate toward one focus because of a local breakdown of constituents of extracellular matrix (for example, hyaluronate). In these initial stages of condensation, the Aniken patterns have not yet developed; cells are roughly the same size and shape. This is termed a *de novo* condensation. (B) Development of the Aniken pattern with its associated flattened, concentric preperichondrial zone, which is hypothesized to mechanically constrain growth along the lateral axis without a correspondingly large increase in width; cells are added to the condensation at its distal end. (C) A change in any of the parameters controlling cartilage condensation (changes in the ECM, size of the domain, or in the contractile machinery of the cells) can cause a mathematical bifurcation to occur. This will result in an alteration in the pattern of condensation: in the case depicted here, two foci of condensation will arise from the single proximal one. Each of these centers will function as an independent center of cartilage-cell condensation. This corresponds to a "branching event." These patterns of the formation of cartilage condensations result in identifiable patterns of connectivity between certain developing elements. As in (C), the proximal condensation possess more mature Aniken patterns than the two distal ones that arise from it. Later in development, these embryonic connections will sever and cavitate during joint formation.

Un système de morphogénèse cellulaire porté par le développement de condensation cartilagineuses (qui plus tard seront ossifiées) progressant du proximal vers le distal en suivant une série de branchements

- \*Condensation
- \*Extension distale du modèle cartilagineux
- \*Branchement suite à des modifications de paramètres

53

## La construction par branchement et segmentation



Patterns de connectivité, branchements et segmentation chez la souris. Les lignes représentent les 'connections embryologiques'. On observe une asymétrie par laquelle la plupart des condensations de l'autopode et du mésopode ← dérivent de la condensation postérieure (Ulna/Cubitus) ←

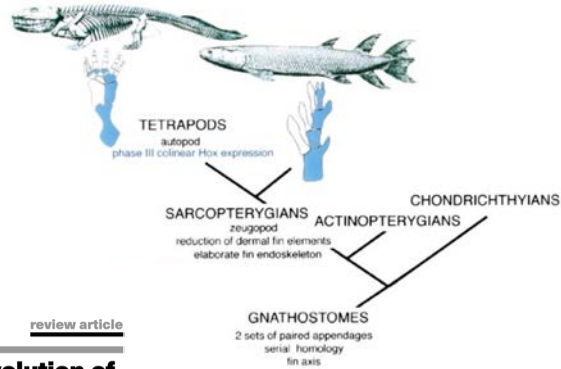
\*Structure avec un avec un axe proximo-distal faisant un coude de la partie postérieure (post-axiale) vers l'antérieur. Dans ce schéma, les doigts proviennent tous de la partie post-axiale.

54

## Déviation de l'axe métaptérygien chez les tétrapodes

Repliement de l'axe métaptérygien en parallèle avec l'apparition des doigts et du mésopode, largement à partir de l'aspect postérieur des condensations

**Metapterygium**: axe créé par le prolongement postérieur de la série de cartilages radiaux des nageoires paires, très développé chez les Sarcoptérygiens



review article

### Fossils, genes and the evolution of animal limbs

Neil Shubin, Cliff Tabin & Sean Carroll

The morphological and functional evolution of appendages has played a crucial role in the adaptive radiation of tetrapods, arthropods and winged insects. The origin and diversification of fins, wings and other structures, long a focus of palaeontology, can now be approached through developmental genetics. Modifications of appendage number and architecture in each phylum are correlated with regulatory changes in specific patterning genes. Although their respective evolutionary histories are unique, vertebrate, insect and other animal appendages are organized by a similar genetic regulatory system that may have been established in a common ancestor.

NATURE | VOL 388 | 14 AUGUST 1997

Nature © Macmillan Publishers Ltd 1997

55

## La construction par branchement et segmentation

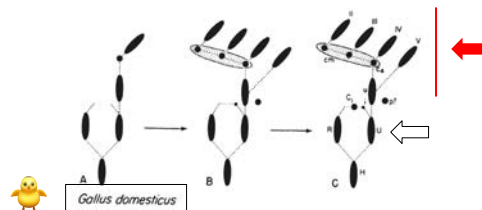


Evolutionary Biology pp 319-387 | Cite as 1986

### A Morphogenetic Approach to the Origin and Basic Organization of the Tetrapod Limb

Authors Authors and affiliations

Neil H. Shubin, Pere Alberch



Même plan de base ('Bauplan', archétype) montrant une asymétrie identique à celle observée chez les mammifères avec l'autopode dérivant de la condensation postérieure de l'ulna (cubitus). Il y a cependant des différences (secondaires) touchant le mésopode (variations dans la segmentation, persistance de fusions etc..).

Dans tous les cas, cette vue mécanistique du développement des membres (qui bien entendu se superpose -par causes et effets- à la vue génétique, implique un passage obligé par le mésopode lors de la construction de l'autopode. Cela permet aussi de produire en même temps les éléments de l'autopode (doigts) et la machinerie de leur articulation, qui est bien entendu nécessaire de co-évoluer... (ce dernier point n'est pas discuté par les auteurs suite à leur position théorique exposée précédemment)

56

## La construction par branchement et segmentation



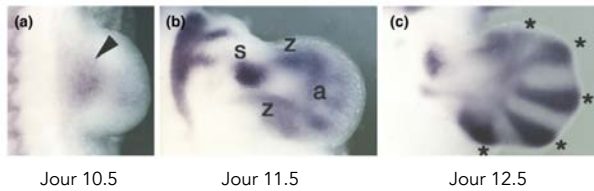
2006

Full text provided by www.sciencedirect.com  
ScienceDirect

**The role of TGFβs and Sox9 during limb chondrogenesis**  
Yasuhiko Kawakami<sup>1</sup>, Joaquín Rodríguez-León<sup>2</sup> and Juan Carlos Izpisua Belmonte<sup>1,2</sup>

Review > Curr Opin Cell Biol. 2006 Dec;18(6):723-9. doi: 10.1016/j.ccb.2006.10.007.

Expression du gène Sox9



Ces phénomènes mécaniques de condensations cartilagineuses se passent dans des territoires cellulaires qui ont eux-mêmes une histoire développementale faite de voies de différenciation différentes, à partir de cellules 'primordiales' différentes. La compréhension de cette succession d'évènements cellulaires ainsi qu'une vue comparative pourraient également informer sur la conservation de ces mécanismes entre espèces et sur leurs homologues.

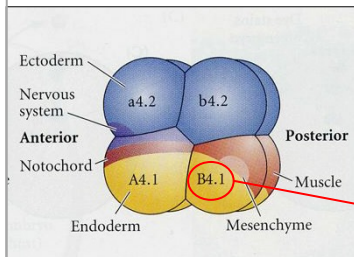
COMMENT RECONSTRUIRE LES PARCOURS CELLULAIRES ET LEURS HISTOIRES?

57

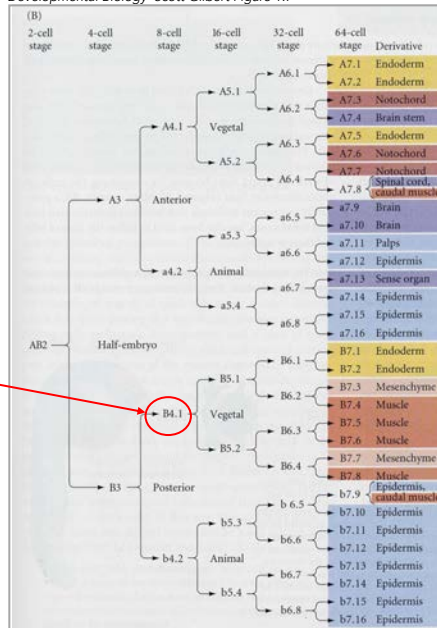
## Les débuts du linéage cellulaire

Edwin Grant Conklin (1863-1952)  
Styela (genre, urochordés)  
Théorie de l'embryon mosaïque 1905

Notion de '**carte présomptive**', qui représente le potentiel futur des cellules en terme de différenciation



'Developmental Biology' Scott Gilbert Figure 1.7

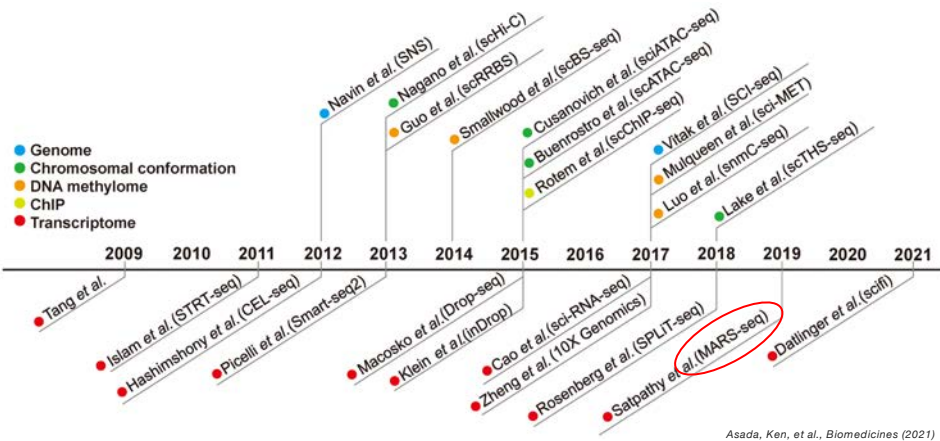


58

## Séquençage d'ARNs de cellules uniques (scRNA-seq)

### Brève histoire d'une technologie révolutionnaire

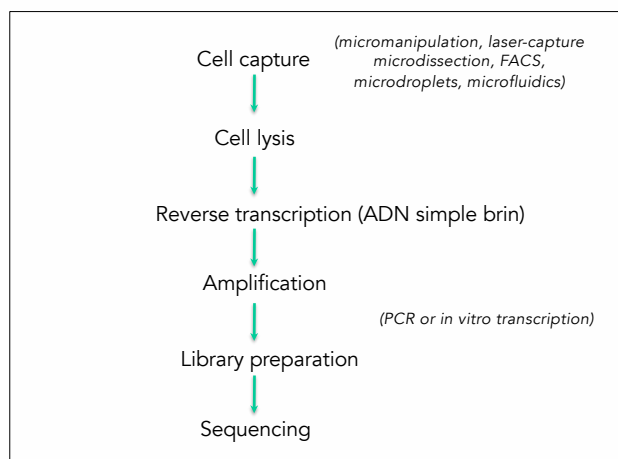
- \*Les cellules se caractérisent par la panoplie d'ARNs qu'elles produisent
- \*La possibilité de décrire ces ARNs dans des cellules uniques permet donc de les classer et ainsi d'établir à la fois leurs liens de parenté et leurs histoires développementales



59

## Séquençage d'ARNs de cellules uniques (scRNA-seq)

### Single-cell RNA-seq experimental workflow (le même principe général pour de nombreux protocoles)



Comment différencier les cellules les unes des autres?

Courtesy of Gioele La Manno, EPFL

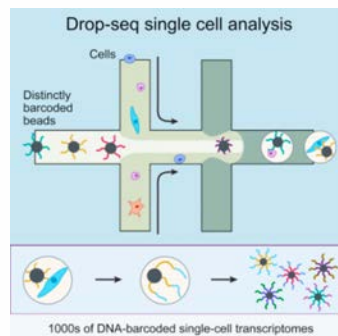
60

## Séquençage d'ARNs de cellules uniques (scRNA-seq)

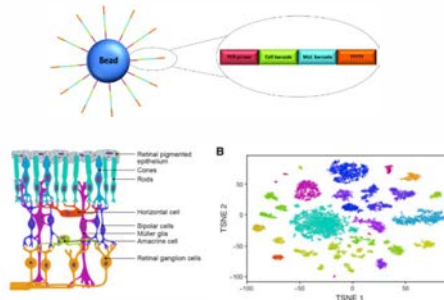
### Droplet-based microfluidics

Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual cells

L'idée est de rajouter des barcodages différents aux ARNs provenant de cellules différentes



The technical revolution of sequencing thousands cells in a single experiment



Courtesy of Gioele La Manno, EPFL

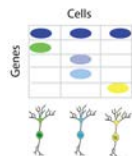
61

## Séquençage d'ARNs de cellules uniques (scRNA-seq)

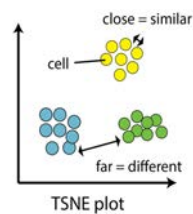
Localisation des cellules dans un "espace d'expression" génique

Distribution par regroupement ('clustering') des cellules en fonction des gènes qu'elles expriment (ARNs)

Exemples de gènes exprimés différemment



Regroupement (clustering) par similarités d'expression



Courtesy of Gioele La Manno, EPFL

62

# Atlas cellulaires



HUMAN CELL ATLAS



FLY CELL ATLAS

About  
The Fly Cell Atlas is a comprehensive resource of single-cell transcriptomic data for the fruit fly Drosophila melanogaster. It provides a detailed view of the cell types and their gene expression profiles in the fly, which can be used to study the evolution of cell types and the underlying genetic mechanisms.

Cell Atlas of Worms

A Cell Atlas of Worm

The C. elegans transcriptome at single-cell resolution



Wu et al. | *Science* 2017 | First reported single-cell RNA-seq of *C. elegans* larvae at ~50x transcriptomic coverage using a combinatorial indexing approach (sci-RNA-seq)

Cell

Resource

nature  
International journal of science

Article | Published: 10 July 2019

## A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors

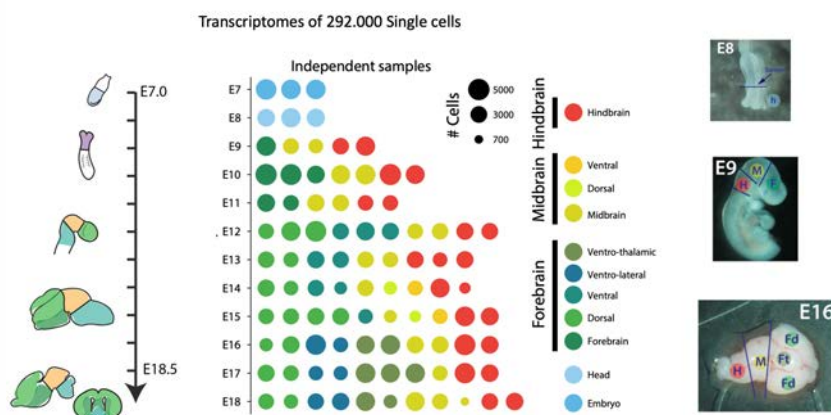
Nadim Alizarani, Antonio Saviano, Sagor, Laurent Maillly, Sarah Durand, Joop S. Herman, Patrick Pessaux, Thomas F. Baumert & Dominic Grün

## A Single-Cell Atlas of the Tumor and Immune Ecosystem of Human Breast Cancer

Johanna Wagner, Maria Anna Rapaczynski, Stéphanie Chevrier, Tobias Anzlinger, Claus Langfelder, August Dykens, Martin Pees, Annette Ramaswamy, Simone Muenst, Sevas Deniz Soysal, Andrea Jacobs, Jonas Windhager, Ramna Shina, Marisa van den Broek, Konstantin Johannes Dedes, Maria Rodriguez Martinez, Walter Paul Weyer, and Bernd Bodenmeyer

# Atlas cellulaires

Un exemple d'atlas cellulaire; le cerveau du fœtus de souris

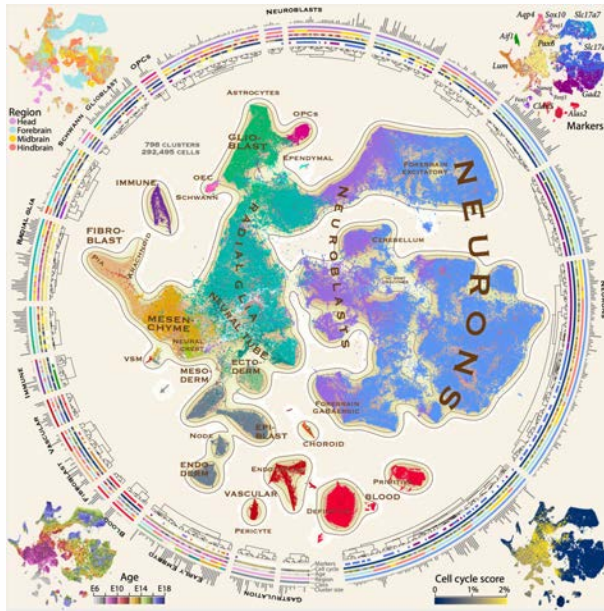


Courtesy of Gioele La Manno, EPFL



## Atlas cellulaires

Un exemple d'atlas cellulaire; le cerveau du fœtus de souris



\*Plusieurs types de représentations incluant les distributions des cellules, leurs origines, leurs niveaux de différenciation...

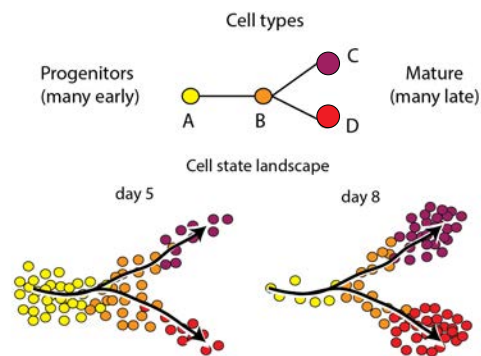
\*Possibilités de corrélations (âge avec activité mitotique etc..)

Courtesy of Gioele La Manno, EPFL

65

## Dynamique des populations cellulaires

Etude de la dynamique des populations cellulaires en exploitant leurs asynchronicités  
Analyses de pseudo-time



Courtesy of Gioele La Manno, EPFL

66

## Application au membre de la souris

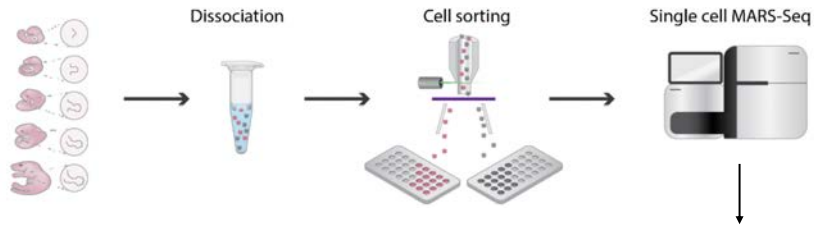


### Single-cell atlas of mouse limb development reveals a complex spatiotemporal dynamics of skeleton formation

Svetlana Markman, Mor Zada, Eyal David, Amir Giladi, Ido Amit, Elazar Zelzer  
doi: <https://doi.org/10.1101/2022.05.07.490557>

This article is a preprint and has not been certified by peer review [what does this mean?]

pre-print déposé sur une plateforme d'open access avant reviewing



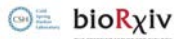
### MARS-Seq



MARS-Seq profiles the transcriptional dynamics of single cells in an automated and massively parallel workflow with high resolution. MARS-Seq can be used with in vivo samples containing a wide variety of different cell subpopulations. Single cells are first isolated into individual wells using FACS. Each cell is lysed, and the 3' ends of mRNAs are annealed to unique molecular identifiers containing a T7 promoter. The mRNA is reverse-transcribed to generate the first cDNA strand and treated with exonuclease I to remove leftover RT primers. Next, the cellular lysates are pooled together and converted to double-stranded cDNA. The DNA strands are transcribed to RNA and treated with DNase to remove leftover DNA templates in the mixture. The RNA strands are fragmented and annealed to sequencing adapters, followed by RT to generate barcoded cDNA libraries that are ready for sequencing.

67

## Différents types cellulaires (E10.5-E14.5)

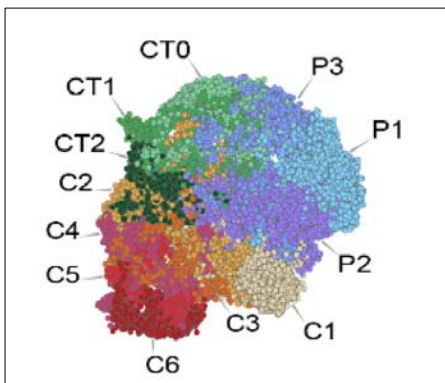


### Single-cell atlas of mouse limb development reveals a complex spatiotemporal dynamics of skeleton formation

Svetlana Markman, Mor Zada, Eyal David, Amir Giladi, Ido Amit, Elazar Zelzer  
doi: <https://doi.org/10.1101/2022.05.07.490557>

This article is a preprint and has not been certified by peer review [what does this mean?]

pre-print déposé sur une plateforme d'open access avant reviewing



Clustering total: tous âges confondus

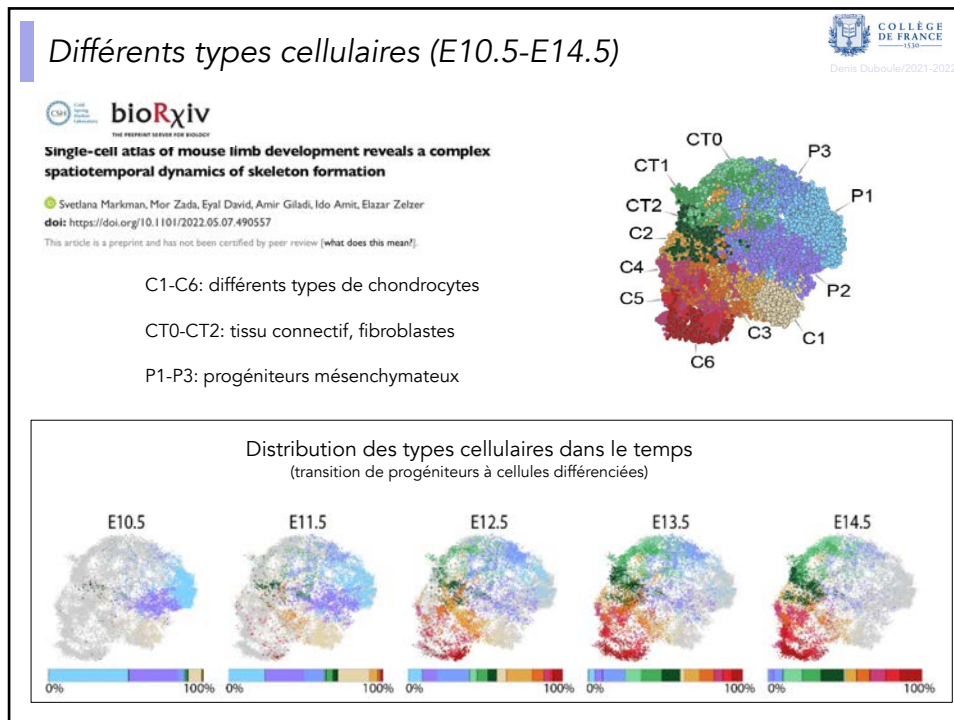
C1-C6: différents types de chondrocytes

CT0-CT2: tissu connectif, fibroblastes

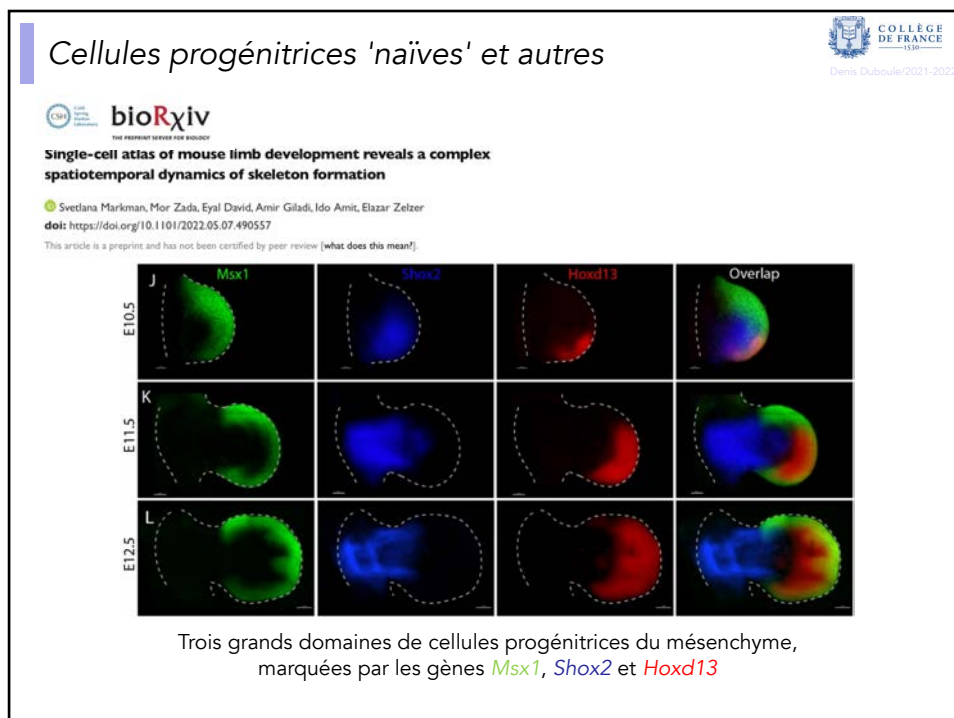
P1-P3: progéniteurs mésenchymateux

Les sous-classes sont séparées par certains gènes marqueurs différentiellement exprimés

68



69



70

## Séquences d'apparition des modèles cartilagineux



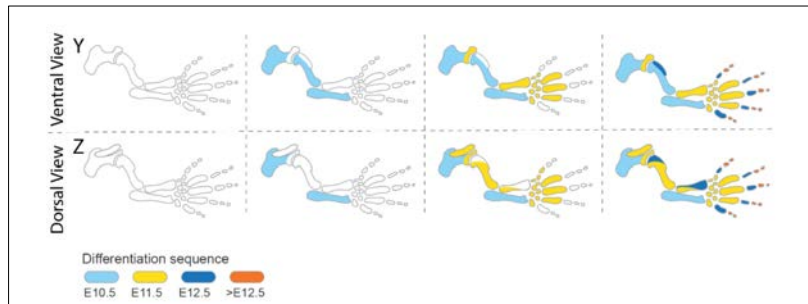
Single-cell atlas of mouse limb development reveals a complex spatiotemporal dynamics of skeleton formation

Svetlana Markman, Mor Zada, Eyal David, Amir Giladi, Ido Amit, Elazar Zelzer  
doi: <https://doi.org/10.1101/2022.05.07.490557>

This article is a preprint and has not been certified by peer review [what does this mean?]

Les cellules *Msx1* sont les progénitrices naïves, dont dérivent les cellules *Shox2* et *Hoxd13*-positives

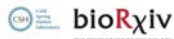
Marquage de ces cellules afin d'observer la séquence temporelle des lignées cellulaires: utilisation d'un marquage contrôlable dans le temps: **CreERT2; Rosa26-tdTomato**



Une séquence qui ne correspond pas exactement au modèle classique proximo-distal (méta's...)

71

## scRNAs-seq des membres de la souris, conclusions



Single-cell atlas of mouse limb development reveals a complex spatiotemporal dynamics of skeleton formation

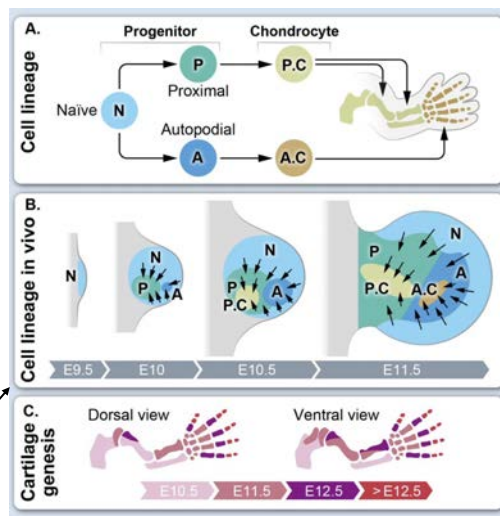
Svetlana Markman, Mor Zada, Eyal David, Amir Giladi, Ido Amit, Elazar Zelzer  
doi: <https://doi.org/10.1101/2022.05.07.490557>

This article is a preprint and has not been certified by peer review [what does this mean?]

Des dérivations des futures populations cellulaires proximales et distales en parallèle plutôt qu'en série, à partir de la population naïve initiale.

Dans ce contexte, la partie distale n'est pas 'rajoutée' de façon terminale mais évolue en même temps que la partie proximale. Des analyses du même type en utilisant des nageoires variées pourraient être informatives quant à la présence (concomitante ou pas) de ces deux populations cellulaires (homologie au niveau des types cellulaires et de leurs trajectoires développementales (CHIMs).

Notion de 'carte présomptive'



72