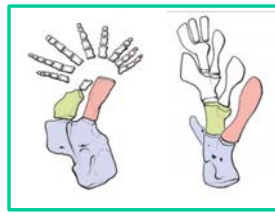


Denis Duboule

Collège de France
Chaire Internationale
Evolution des Génomes et du Développement

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 #3, 31 mai 2022, 17h

Rappel des notions du cours #2, introduction au modèle du poisson-zèbre, développement de la nageoire pectorale, endosquelette et exosquelette, approches expérimentales de la formation et de l'origine de l'exosquelette



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'exosquelette

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

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

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

3

Résumé de l'épisode précédent; Homologies

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 les plus importants 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..))

4

Résumé de l'épisode précédent; Développement du membre

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>

5

Résumé de l'épisode précédent; Les axes du membre

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

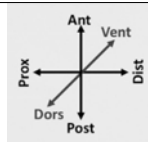
REVIEW

Establishing the pattern of the vertebrate limb

Caitlin McQueen and Matthew Towers*

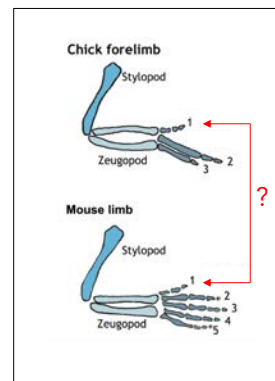
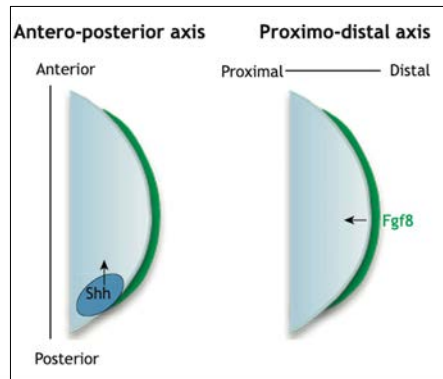
Structure en 3D

- *Proximo-distal
- *Antéro-postérieur
- *Dorso-ventrale



Sonic Hedgehog
Shh

Fgf8



6

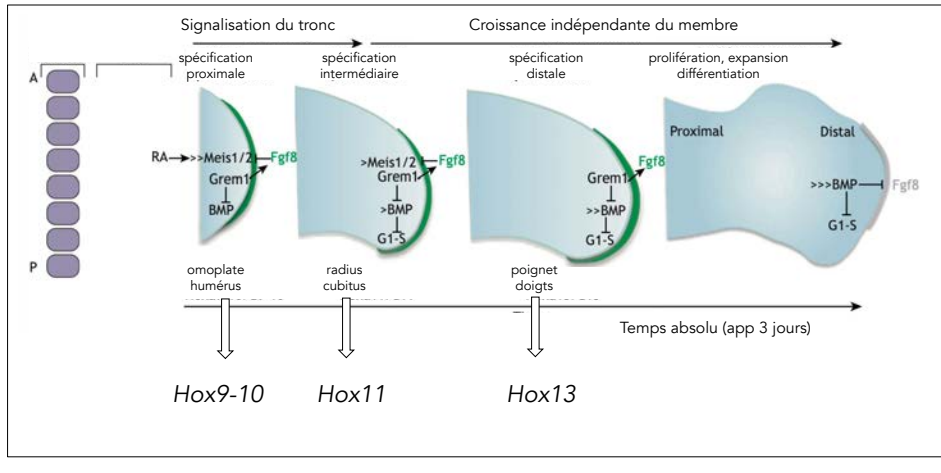
Résumé de l'épisode précédent; Croissance distale

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

REVIEW

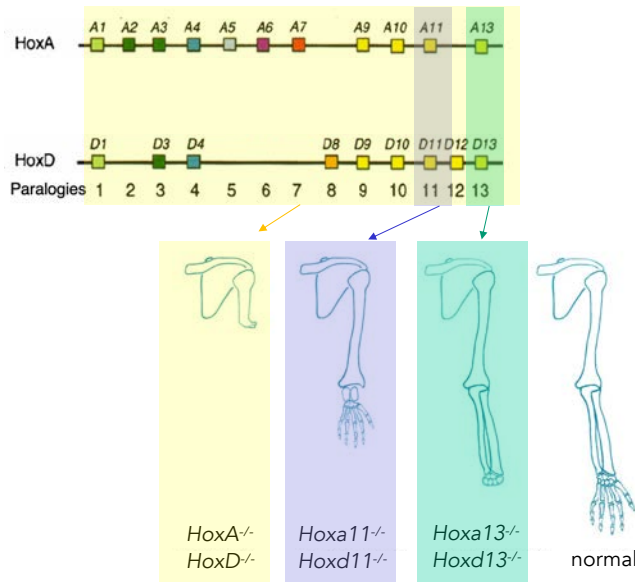
Establishing the pattern of the vertebrate limb
Caitlin McQueen and Matthew Towers*

2) système de spécification des 'segments' du membre



7

Résumé de l'épisode précédent; Fonctions des gènes Hox



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

8

Résumé de l'épisode précédent; Polarité antéro-postérieure

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

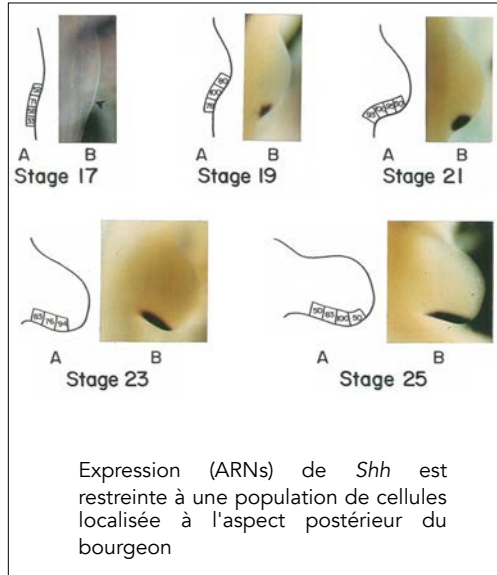
Sonic hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the ZPA

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 l'embryon de mouche.



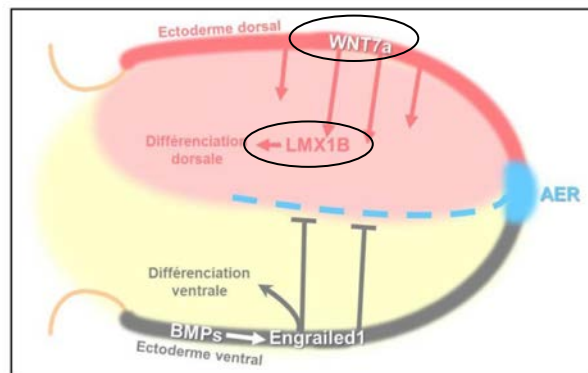
Expression (ARNs) de *Shh* est restreinte à une population de cellules localisée à l'aspect postérieur du bourgeon

9

Résumé de l'épisode précédent; 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)

10

Résumé de l'épisode précédent; Polarité dorso-ventrale

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

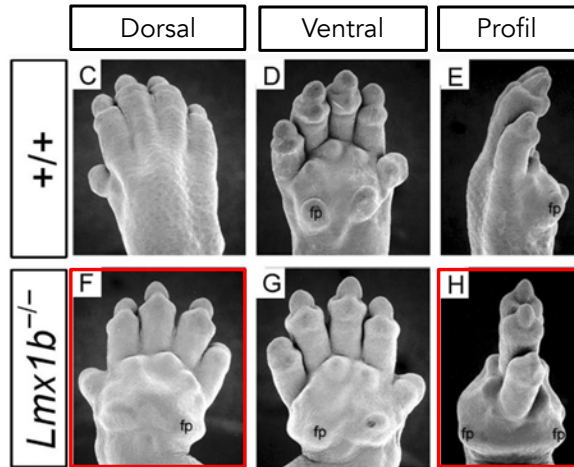
Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of *LMX1B* in human nail patella syndrome

Haisu Chen¹, Yi Lun¹, Dmitry Ovchinnikov¹, Hiroki Kokubo¹, Kerby C. Oberg², Carmen V. Pepicelli¹, Lin Gan¹, Brendan Lee³ & Randy L. Johnson¹

*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.

*Polarités PD et AP semblent toutefois relativement bien préservées !!



11

Résumé de l'épisode précédent; Modèles cartilagineux

Evolutionary Biology pp 319-387 | Cite as 1986
A Morphogenetic Approach to the Origin and Basic Organization of the Tetrapod Limb
Authors: Neil H. Shubin, Pere Alberch

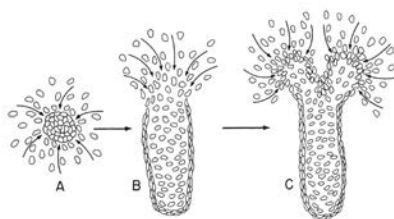


FIG. 5. The growth of a cartilage condensation as a result of local, physicochemical mechanisms of morphogenesis. (A) Initially, cells are recruited to the chondrogenic focus from all surrounding areas. The size, rate of growth, and position of this condensation within the limb bud are the result of 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 morphogenèse 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

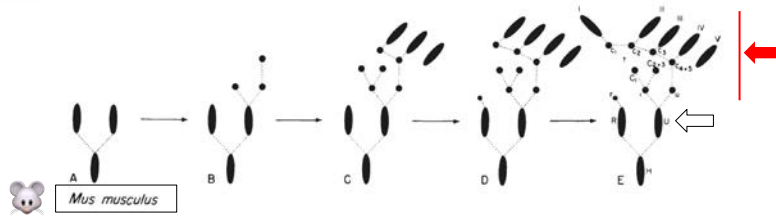
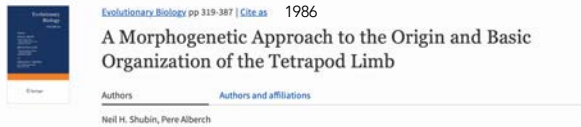
*Condensation

*Extension distale du modèle cartilagineux

*Branchement suite à des modifications de paramètres

12

Résumé de l'épisode précédent; Branchements, segmentation



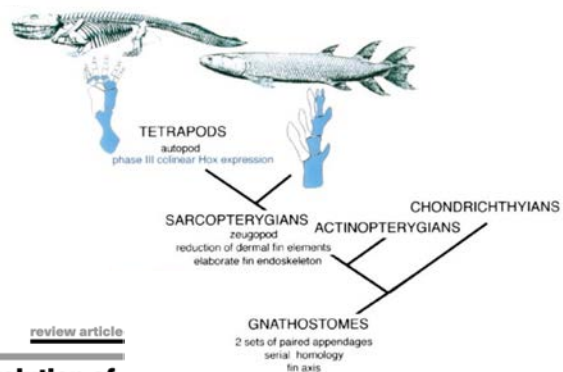
Patterns de connectivité, branchements et segmentation chez la souris. Les lignes représentent les 'connections embryologiques'. On observe une asymmétrie par laquelle la plupart des condensations de l'autopode et du mésopode (post-axiale) vers l'antérieure. Dans ce schéma, les doigts proviennent tous de la partie post-axiale.

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

Résumé de l'épisode précédent; Axe métaptérygien

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



Fossils, genes and the evolution of animal limbs

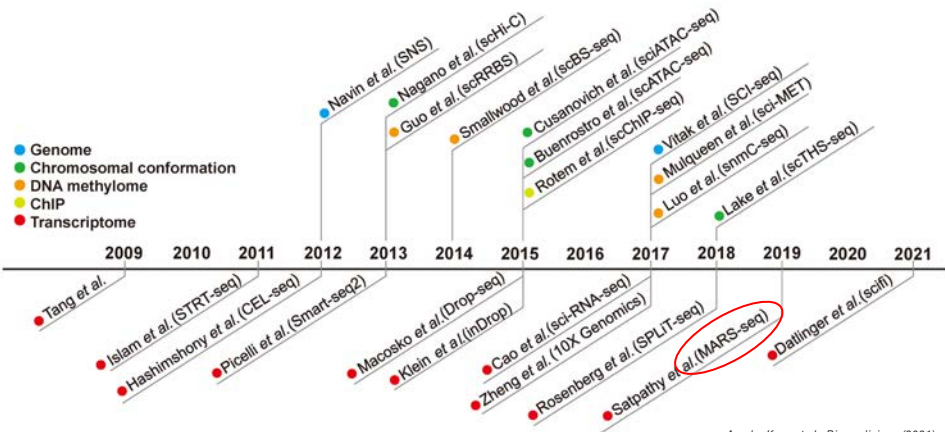
Neil Shubin, Cliff Tabin & Sean Carroll

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 paleontology, 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.

Résumé de l'épisode précédent; RNA-seq de cellules uniques

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



Asada, Ken, et al., *Biomedicines* (2021)

15

Résumé de l'épisode précédent; RNA-seq de cellules uniques

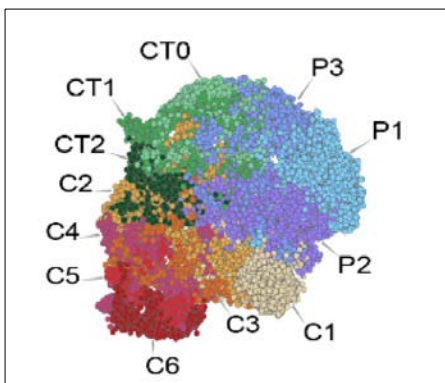


Single-cell atlas of mouse limb development reveals a complex spatiotemporal dynamics of skeleton formation

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

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

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



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 différenciellement exprimés

16

Résumé de l'épisode précédent; *Linéages cellulaires 2.0*



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 Zelter

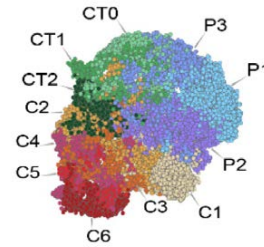
doi: <https://doi.org/10.1101/2022.05.07.490557>

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

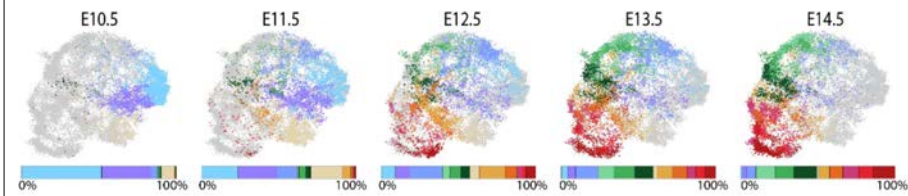
C1-C6: différents types de chondrocytes

CT0-CT2: tissu connectif, fibroblastes

P1-P3: progéniteurs mésenchymateux

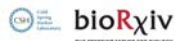


Distribution des types cellulaires dans le temps
(transition de progéniteurs à cellules différenciées)



17

Résumé de l'épisode précédent; *Cellules progénitrices*

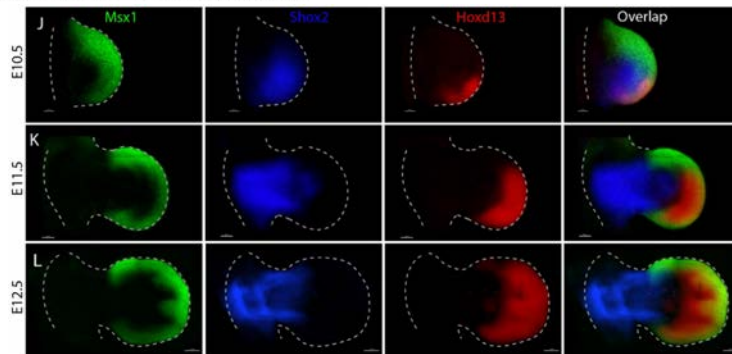


Single-cell atlas of mouse limb development reveals a complex spatiotemporal dynamics of skeleton formation

Svetlana Markman, Mor Zada, Eyal David, Amir Giladi, Ido Amit, Elazar Zelter

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?]



Trois grands domaines de cellules progénitrices du mésenchyme, marquées par les gènes *Msx1*, *Shox2* et *Hoxd13*

18

Résumé de l'épisode précédent; Carte présomptive



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

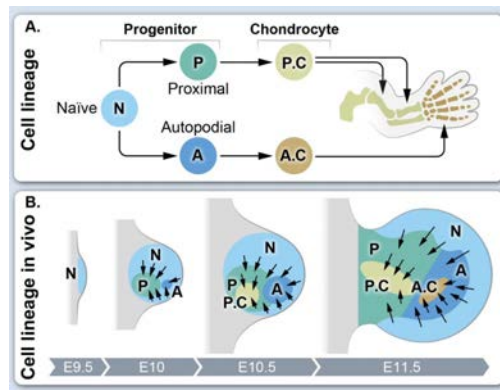
Svetlana Markman, Mor Zada, Eyal David, Amir Giladi, Ido Amit, Elazar Zelzer
doi: <https://doi.org/10.1101/2022.05.07.490557>

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 'linéage cellulaire'



Notion de 'carte présomptive'

19

Notion de gène 'marqueur'

Research article

3003

Analysis of *Msx1*; *Msx2* double mutants reveals multiple roles for *Msx* genes in limb development

Yvan Lallemand, Marie-Anne Nicola*, Casto Ramos^{1,†}, Antoine Bach¹, Cécile Saint Clément and Benoît Robert¹

Unité de Génétique Moléculaire de la Morphogénèse, Institut Pasteur, URA 2578 du CNRS, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris, Cedex 15, France

*These authors contributed equally to this work.

[†]Present address: Depto de Biología Celular, Facultad de Biología, Av. Diagonal, 645, 08071 Barcelona, Spain

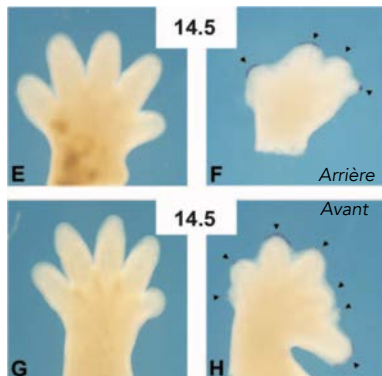
¹Present address: INSERM U1079, Neurobiologie et Thérapeutique Expérimentale, Hôpital de la Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

¹Author for correspondence (e-mail: robert@pasteur.fr)

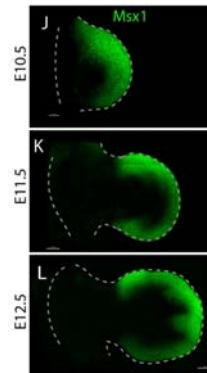
Accepted 25 April 2020

Il existe aussi un gène *Msx3* mais qui ne fonctionne pas dans les membres (mais dans le CNS..)

Contrôle $Msx1^{-/-}; Msx2^{-/-}$



Les gènes *Msx1* et *Msx2* sont exprimés dans cette population de cellules progénitrices 'naïves' mais ils ne sont pas la cause proximale de l'existence de cette population. Ce sont des gènes 'marqueurs' qui peuvent donc être utilisés pour identifier cette population.



20

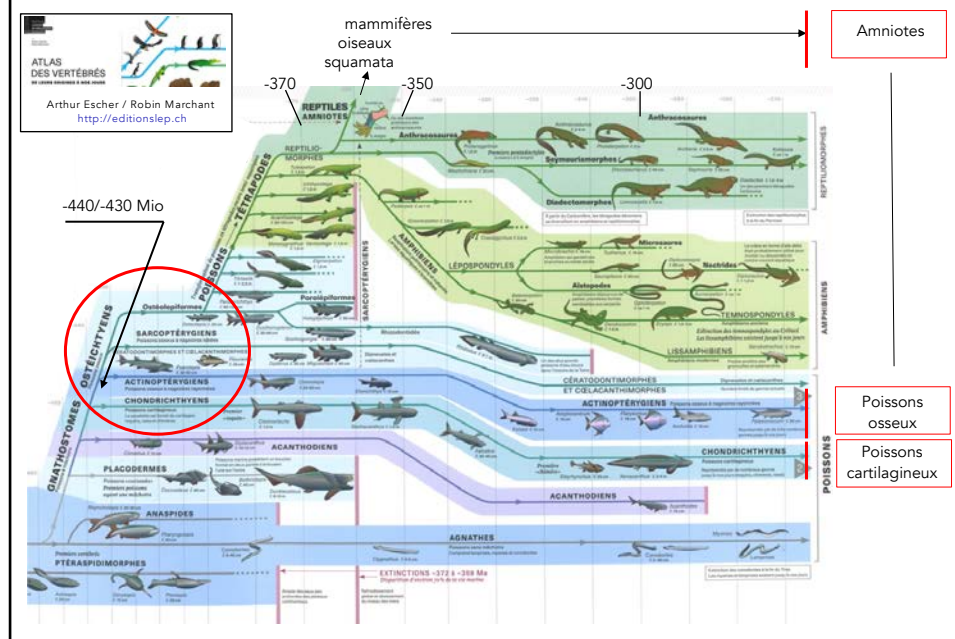
Le développement des nageoires

Les nageoires paires sont d'une très grande variété chez les poissons actuels et il est donc nécessaire de faire des choix de systèmes modèles qui sont généralement dictés par un mélange de critères 'adaptatifs' (une nageoire montrant des particularités intéressantes) et 'expérimentaux' (possibilité de séries embryonnaires, développement observable, modifications génétiques possibles..).

Il est essentiel de garder à l'esprit une vue phylogénétique de la question et de bien réaliser qu'aucune des formes actuelles ne peut représenter une forme ancestrale des membres ptérygiens 'homologues' aux membres des tétrapodes, et cela que l'on considère les poissons osseux ou cartilagineux.

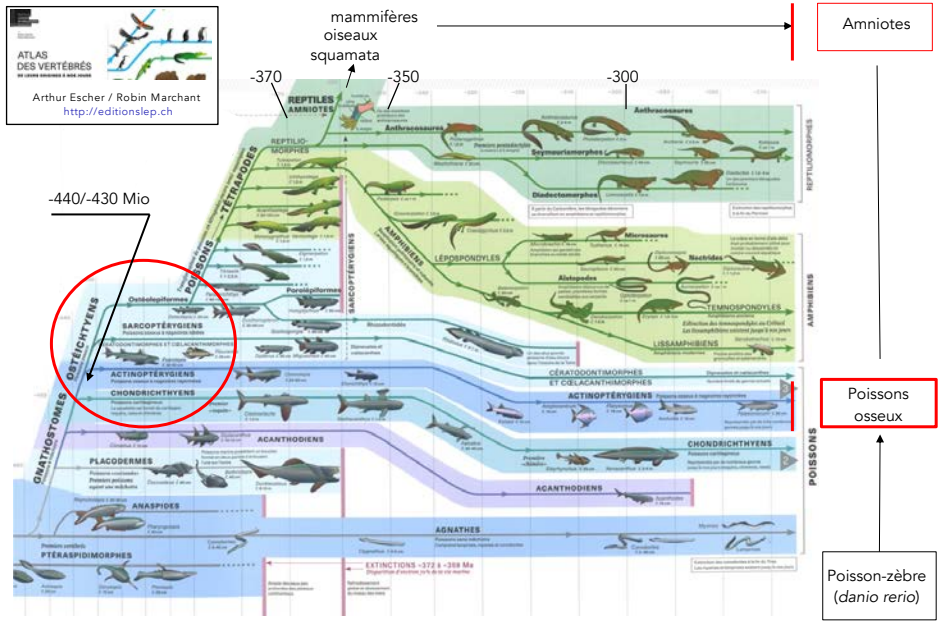
21

Il n'y a pas de fossile vivant...



22

Il n'y a pas de fossile vivant...



23

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*)



Images de Uwe Irion, Tübingen



- *Petit poisson tropical
- *Temps de génération de app 3 mois
- *Oeuf transparent (imagerie..)
- *Mutants, criblages génétiques
- *Génome bien séquencé
- *Transgène possible

*Modèle de développement vertébré
(le plus utilisé avec la souris)

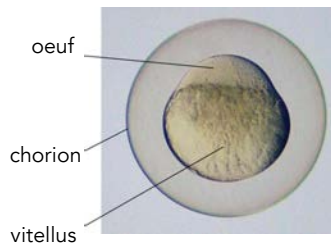
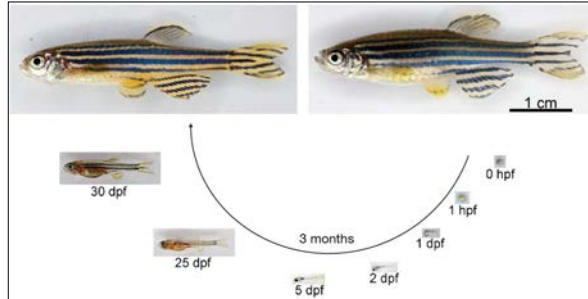
Mais!

- *Génome 'compliqué' par une duplication additionnelle (téléostéens)
- *Quelques problèmes techniques dues à la vitesse de développement (mosaïcisme..).
- *Animal anamniote...

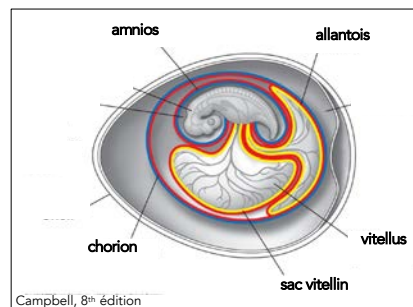
Questions et réponses @<http://www.uoneuro.uoregon.edu/k12/FAQs.html>

24

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*)



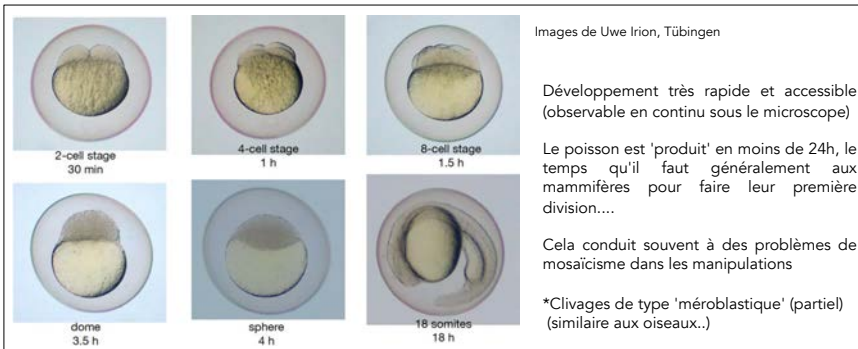
Images de Uwe Irion, Tübingen



Campbell, 8^e édition

25

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*)



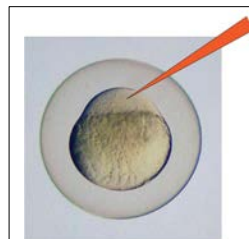
Images de Uwe Irion, Tübingen

Développement très rapide et accessible (observable en continu sous le microscope)

Le poisson est 'produit' en moins de 24h, le temps qu'il faut généralement aux mammifères pour faire leur première division....

Cela conduit souvent à des problèmes de mosaïcisme dans les manipulations

*Clivages de type 'méroblastique' (partiel) (similaire aux oiseaux..)



Micro-injections possibles:

- *poissons transgéniques (tol2, CRISPR)..
- *Ingénierie chromosomique (CRISPR)
- *Inactivations géniques (CRISPR; morpholinos)
- *Gain de fonction (expression d'ARNs)

26

Le poisson-zèbre; développement des nageoires paires



Mechanisms of Development 79 (2018) 99–120

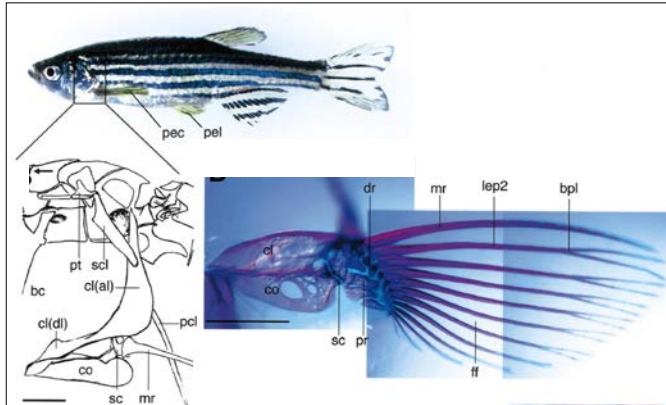


The development of the paired fins in the Zebrafish (*Danio rerio*)

Heiner Grandel, Stefan Schulte-Merker*

MPF für Entwicklungsbiologie, Spemannstrasse 31, 72076 Tübingen, Germany

Received 14 July 2018, revised version received 23 September 2018, accepted 23 September 2018



- sc: scapula (omoplate)
- pec: nageoire pectorale
- pel: nageoire pelvienne
- co: coracoïd
- cl: cleithrum
- pr: radiaux proximaux
- dr: radiaux distaux
- mr: mesocoracoïde
- lep: lépidotriches
- bpl: point de branchement #1
- ff: crête (repliement) de la nageoire

27

Le poisson-zèbre; développement des nageoires paires



Mechanisms of Development 79 (2018) 99–120

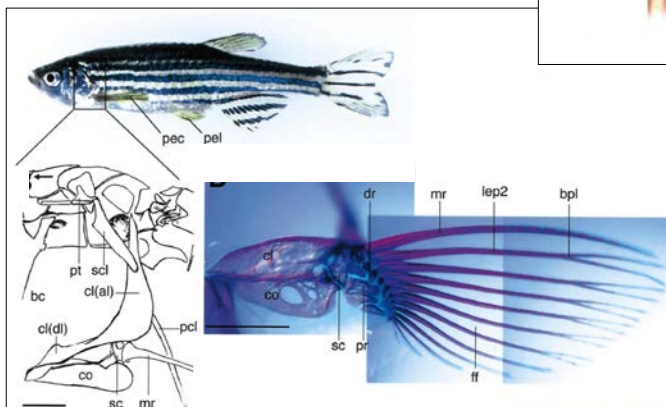


The development of the paired fins in the Zebrafish (*Danio rerio*)

Heiner Grandel, Stefan Schulte-Merker*

MPF für Entwicklungsbiologie, Spemannstrasse 31, 72076 Tübingen, Germany

Received 14 July 2018, revised version received 23 September 2018, accepted 23 September 2018



- sc: scapula (omoplate)
- pec: nageoire pectorale
- pel: nageoire pelvienne
- co: coracoïd
- cl: cleithrum
- pr: radiaux proximaux
- dr: radiaux distaux
- mr: mesocoracoïde
- lep: lépidotriches
- bpl: point de branchement #1
- ff: crête (repliement) de la nageoire

28

Le poisson-zèbre; développement des nageoires paires



Mechanism of Development 79 (1998) 99-120

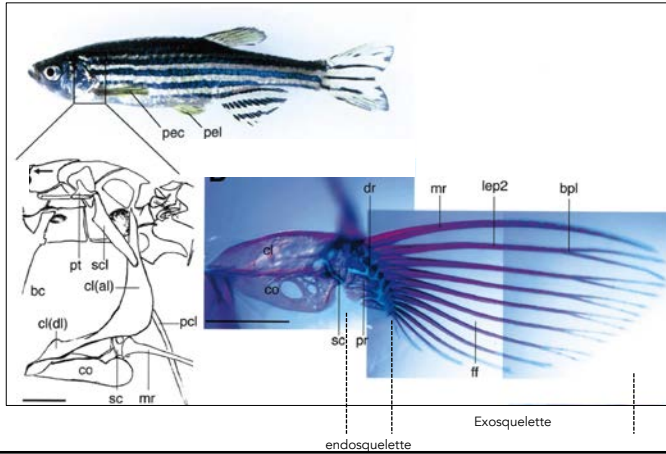


The development of the paired fins in the Zebrafish (*Danio rerio*)

Heiner Grandel, Stefan Schulte-Merker*

MPZ für Entwicklungsbiologie, Spemannstrasse 31, 72076 Tübingen, Germany

Received 14 July 1998; revised version received 23 September 1998; accepted 23 September 1998



- sc: scapula (omoplate)
- pec: nageoire pectorale
- pel: nageoire pelvienne
- co: coracoïd
- cl: cleithrum
- pr: radiaux proximaux
- dr: radiaux distaux
- mr: mesocoracoïde
- lep: lépidotriches
- bpl: point de branchement #1
- ff: crête (repliement) de la nageoire

29

Le poisson-zèbre; développement des nageoires paires



Mechanism of Development 79 (1998) 99-120

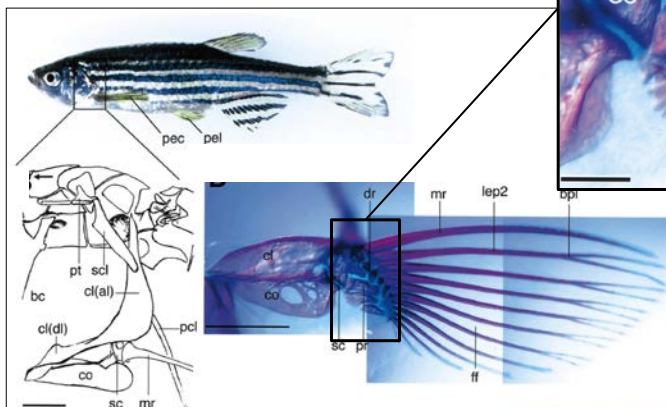


The development of the paired fins in the Zebrafish (*Danio rerio*)

Heiner Grandel, Stefan Schulte-Merker*

MPZ für Entwicklungsbiologie, Spemannstrasse 31, 72076 Tübingen, Germany

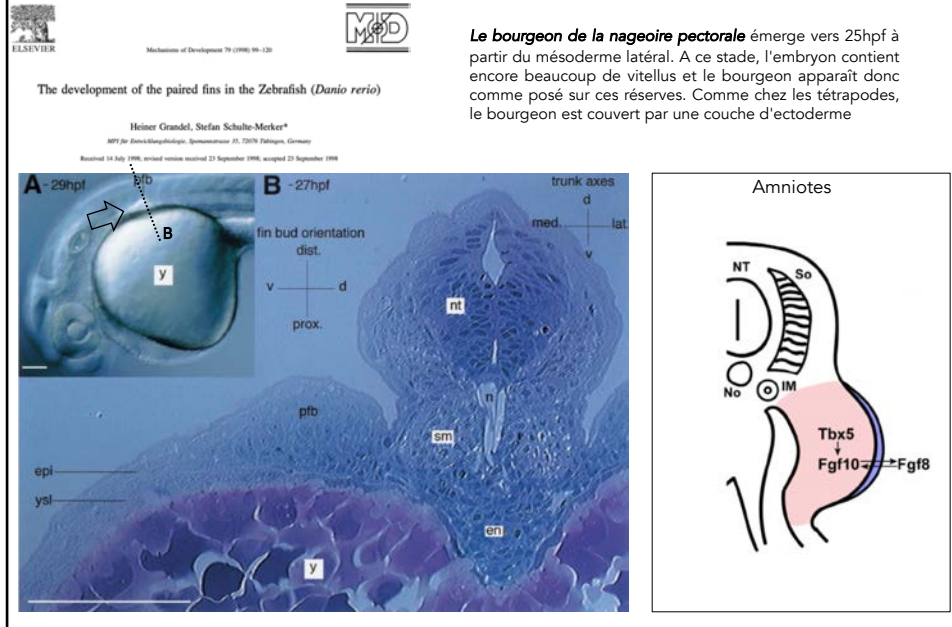
Received 14 July 1998; revised version received 23 September 1998; accepted 23 September 1998



- sc: omoplate
- pr1-4: radiaux proximaux #1-4
- dr 3: radial distal #3

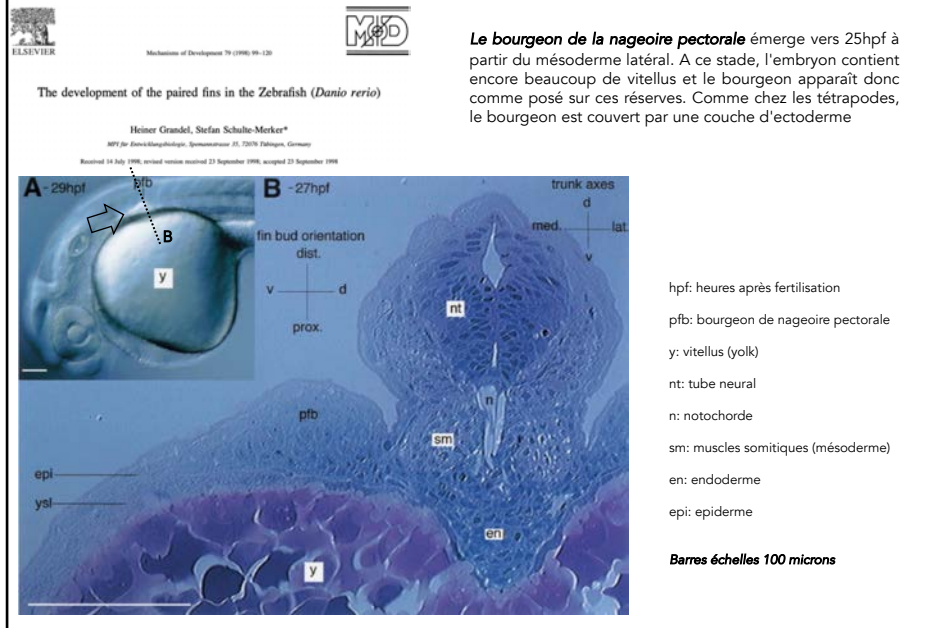
30

Nageoire pectorale du ZF: origine et bourgeonnement



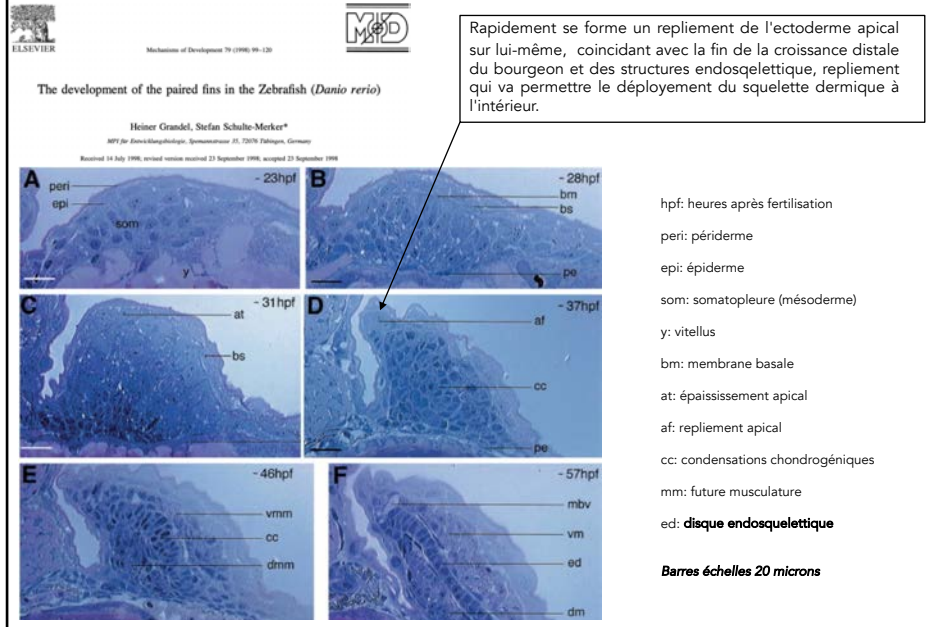
31

Nageoire pectorale du ZF: origine et bourgeonnement



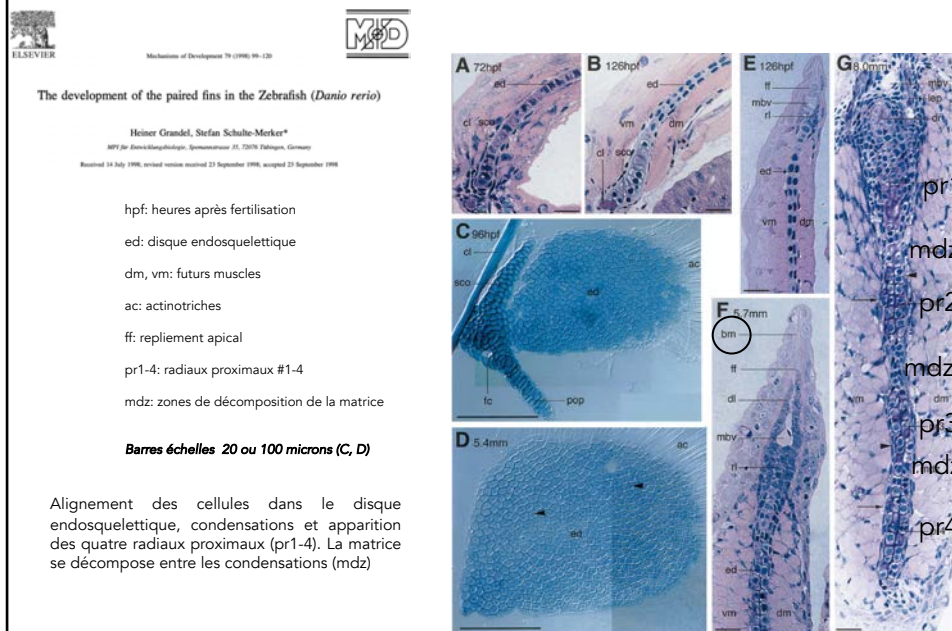
32

Nageoire pectorale du ZF: repliement apical



33

Nageoire pectorale du ZF: endosquelette



34

Nageoire pectorale du ZF: quatre radiaux proximaux



Mechanism of Development 79 (1998) 99–120



The development of the paired fins in the Zebrafish (*Danio rerio*)

Heiner Grandel, Stefan Schulte-Merker*

MPZ für Entwicklungsbiologie, Spemannstrasse 31, 72076 Tübingen, Germany
Received 14 July 1998; revised version accepted 23 September 1998; accepted 23 September 1998

hpf: heures après fertilisation

sco: scapulocoracoïde

pr1-4: radiaux proximaux #1-4

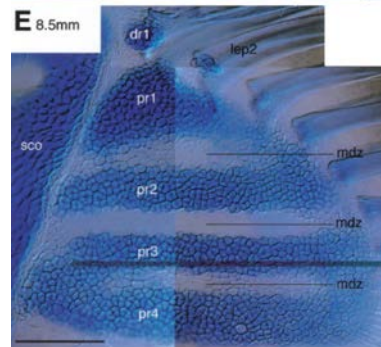
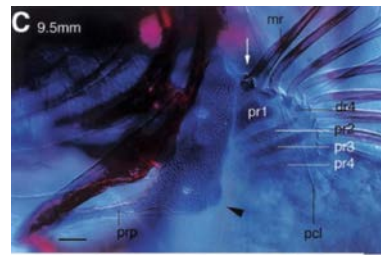
dr1-4: radiaux distaux #1-4

mdz: zones de décomposition de la matrice

lep2: lépidotriche #2

Barres échelles 100 microns

Individualisation des quatre radiaux proximaux (pr1-4) et apparition des radiaux distaux qui vont articuler avec les lépidotriches. La matrice se décompose entre les condensations (mdz)



35

Nageoire pectorale du ZF: résumé

LETTERS TO NATURE

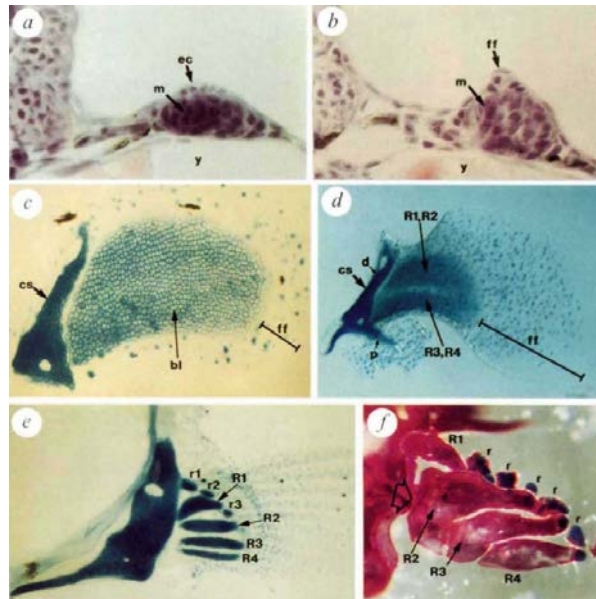
Hox gene expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits

Paolo Sordino, Frank van der Hoeven & Denis Duboule*

Department of Zoology and Animal Biology, University of Geneva, Sciences III, Quai Ernest Ansermet 30, 1213 Geneva 4, Switzerland

NATURE · VOL 375 · 22 JUNE 1995

Le repliement apical (ff) va rapidement interrompre la signalisation de croissance effectuée par des facteurs distaux et, par conséquent, le moment du repliement de l'ectoderme a été interprété comme un interrupteur possible réglant la transition entre endo- et exo-squelettes, ce dernier se formant à l'intérieur de ce replis (hypothèse de Peter Thorogood). Cette hypothèse peut s'appliquer à un schéma évolutif impliquant l'hétérochronie.

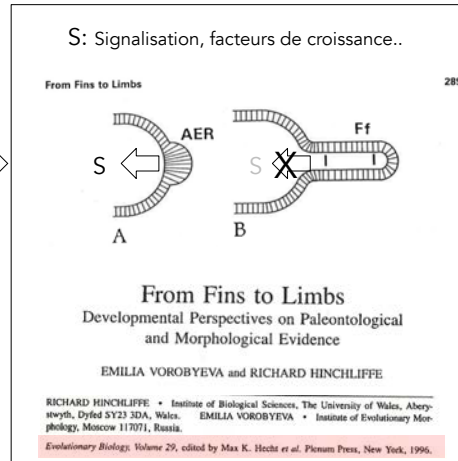


36

Modèle de l'horloge AER versus AEF (P. Thorogood, 1991)

Thorogood, P. (1991). The development of the teleost fin and implications for our understanding of tetrapod limb evolution. In *Developmental patterning of the vertebrate limb*. Springer, pp. 347-354.

En 1991, **Peter Thorogood** propose l'hypothèse d'un développement inégal des structures endosquelettiques le long de l'axe proximo-distal, en fonction de l'arrêt ou de la persistance de la signalisation distale contrôlant la croissance du bourgeon. Un arrêt tardif conduirait au développement de plusieurs 'segments', suite à l'extension distale de modèles cartilagineux (sarcoptérygiens, tétrapodes) alors que le repliement de l'ectoderme produirait un arrêt plus ou moins précoce de la croissance, conduisant à des formes réduites des éléments osseux (poissons téléostéens). Les formes intermédiaires pourraient représenter une variation hétérochronique de ce mécanisme.

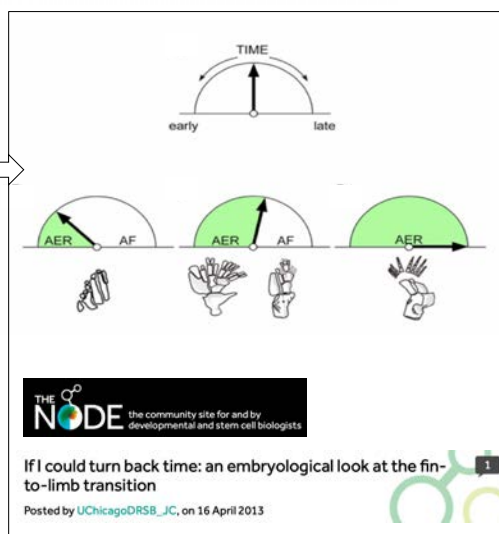


37

Modèle de l'horloge AER versus AEF (P. Thorogood, 1991)

Thorogood, P. (1991). The development of the teleost fin and implications for our understanding of tetrapod limb evolution. In *Developmental patterning of the vertebrate limb*. Springer, pp. 347-354.

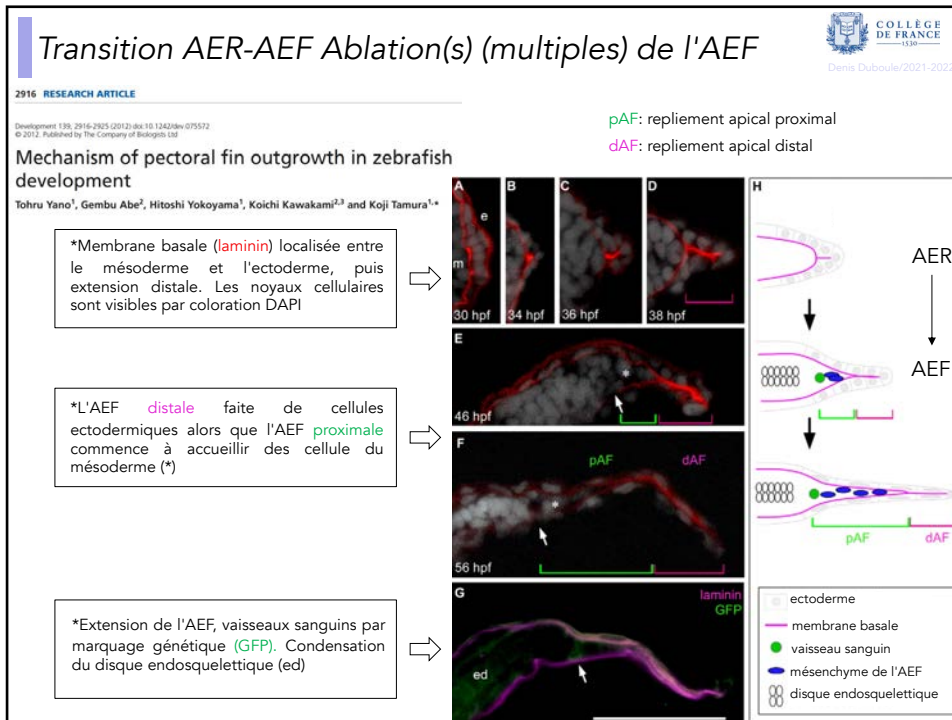
En 1991, **Peter Thorogood** propose l'hypothèse d'un développement inégal des structures endosquelettiques le long de l'axe proximo-distal, en fonction de l'arrêt ou de la persistance de la signalisation distale contrôlant la croissance du bourgeon. Un arrêt tardif conduirait au développement de plusieurs 'segments', suite à l'extension distale de modèles cartilagineux (tétrapodes) alors que le repliement de l'ectoderme produirait un arrêt plus ou moins précoce de la croissance, conduisant à des formes réduites des éléments osseux (poissons téléostéens). Les formes intermédiaires pourraient représenter des variations hétérochroniques de ce mécanisme.



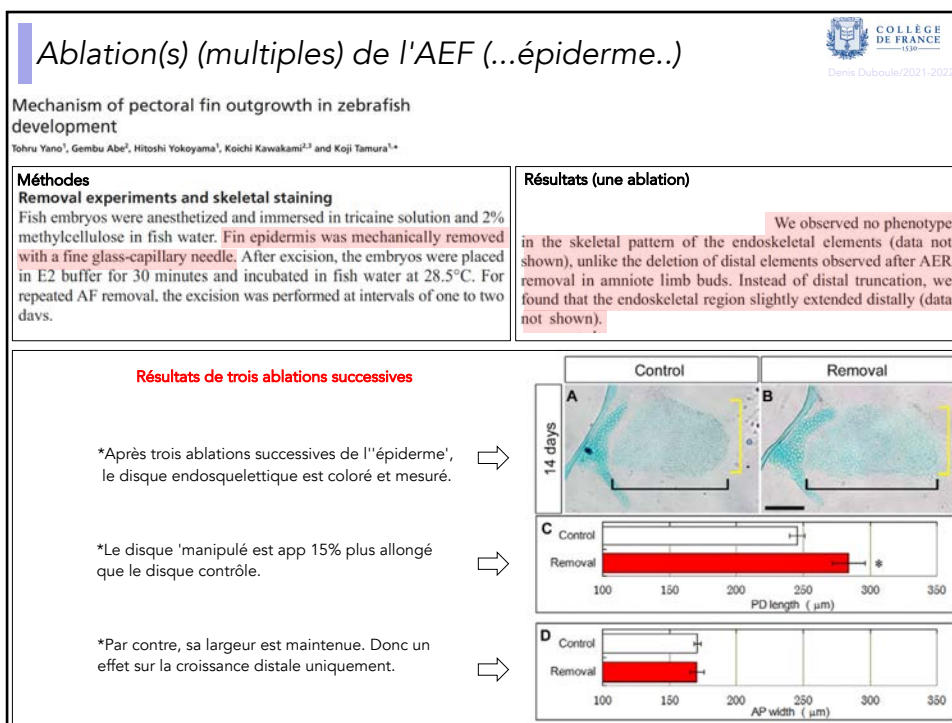
Ce modèle a été utilisé comme base explicative dans de nombreuses publications et des tentatives de vérification font penser qu'il pourrait ne pas être incorrect. Par exemple, que se passerait-il si l'on pouvait empêcher le repliement de l'ectoderme chez le poisson-zèbre et par là même surseoir à l'arrêt de la signalisation?

Exemple: Yano et al., *Development*, 2012

38



39



40

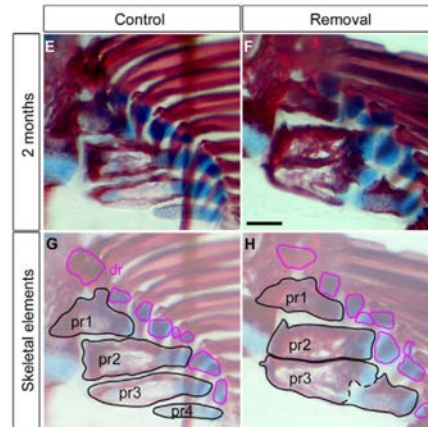
Ablation(s) (multiples) de l'AEF (...épiderme..)

Mechanism of pectoral fin outgrowth in zebrafish development

Tohru Yano¹, Gembu Abe², Hitoshi Yokoyama¹, Koichi Kawakami^{2,3} and Koji Tamura^{1,*}

After two weeks, as a result of repeatedly (three times) removing the AF, the endoskeletal disc was deformed and appeared more oblong along the PD axis than that of the control fin (Fig. 6A,B). PD length of the disc was increased (Fig. 6C; supplementary material Table S2), but the change in width along the anteroposterior axis was not significant (Fig. 6D; supplementary material Table S2). After two months, the morphology of the resultant endochondral bones, the proximal and distal radials, was affected in adult fins ($n=6/6$; Fig. 6E-H, see also supplementary material Fig. S5). In normal pectoral fins, an endoskeletal disc is subdivided into four parts and differentiates into four proximal radials, while six to eight distal radials are dotted distal to the proximal radials (Fig. 6E,G) (Grandel and Schulte-Merker, 1998). After removing the AF three times, a sample (Fig. 6F,H) had only three proximal radials, and the fourth radial was missing or fused with the third one. In this sample, the second and third radials had widened and adhered to each other, and the third radial appeared to be divided into two along the PD axis. An additional distal radial had formed between the proximal and distal radials (supplementary material Fig. S5A). Thus, removal of the AF three times caused excessive distal fin bud outgrowth and gave rise to changes in endoskeletal morphology, suggesting that the temporal range of exposure to AER signals controls the outgrowth and morphology of the endoskeletal region. The AER-to-AF transition might restrict the growth and shape of the endoskeletal region.

Résultats de trois ablations successives



*Cet allongement du disque se traduit plus tard par des anomalies dans le nombre et la morphologie des radiaux proximaux et distaux (plus 'compacts' et plus 'allongés')(observés sur ce spécimen seulement). La conclusion est que la transition AER-AEF 'pourrait restreindre' la croissance et la forme de la région endosquelettique, en accord avec le modèle de P. Thorogood (1991)

41

Deux phases distinctes, proximale et distale

2916 RESEARCH ARTICLE

Development 135, 2916-2925 (2012); doi:10.1242/dev.075572
© 2012. Published by The Company of Biologists Ltd

Mechanism of pectoral fin outgrowth in zebrafish development

Tohru Yano¹, Gembu Abe², Hitoshi Yokoyama¹, Koichi Kawakami^{2,3} and Koji Tamura^{1,*}

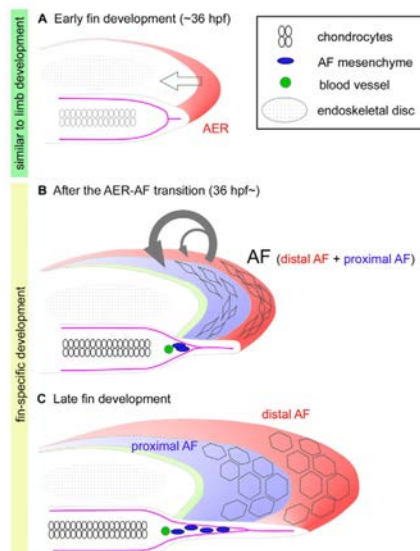
*Une première phase (36hpf) qui ressemble passablement au développement précoce des membres tétrapodes

mécanismes partagés avec le membre tétrapode

mécanismes spécifiques aux nageoires des poissons

*Transformation de l'AER en une AEF, arrêt de la croissance distale du mésoderme du disque et début de colonisation de mésenchyme du futur exosquelette

*Développement et formation du squelette dermique



42

COLLEGE DE FRANCE
1330
Denis Duboule/2021-2022

Deux squelettes (phases) chez Tiktaalik aussi...

nature | Vol 440, 6 April 2006 | doi:10.1038/nature04637

ARTICLES

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

Neil H. Shubin¹, Edward B. Daeschler² & Farish A. Jenkins Jr³

Lepidotrichia (antérieur)

Lepidotrichia (postérieur)

Ichthyostega

Acanthostega

Tiktaalik

Endosquelette (radiaux, os ou cartilage)

Exosquelette (rayons, actinotriches ou lépidotriches –téléostéens-)

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-45719-1_1

Les actinotriches sont composés essentiellement d'élastoïdine (comprenant les protéines Actinodine 1 et 2; Zhang et al., 2010, Nature)

43

COLLEGE DE FRANCE
1330
Denis Duboule/2021-2022

Deux phases distinctes, proximale et distale

2916 RESEARCH ARTICLE

Development 135, 2916–2925 (2012) | doi:10.1242/dev.075572
© 2012. Published by The Company of Biologists Ltd

Mechanism of pectoral fin outgrowth in zebrafish development

Tohru Yano¹, Gembu Abe², Hitoshi Yokoyama¹, Koichi Kawakami^{2,3} and Koji Tamura^{1,*}

mécanismes partagés avec le membre tétrapode

*Une première phase (36hpf) qui ressemble passablement au développement précoce des membres tétrapodes

⇒

A Early fin development (~36 hpf)

similar to limb development

- chondrocytes
- AF mesenchyme
- blood vessel
- endoskeletal disc

mécanismes spécifiques aux nageoires des poissons

*Transformation de l'AER en une AEF, arrêt de la croissance distale du mésoderme du disque et début de colonisation de mésenchyme du futur exosquelette

⇒

B After the AER-AF transition (36 hpf-)

fin-specific development

*Développement et formation du squelette dermique

⇒

C Late fin development

fin-specific development

44

Quelques mots sur le squelette dermique

nature

Vol 466 | 8 July 2020 | doi:10.1038/nature09537

LETTERS

Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition

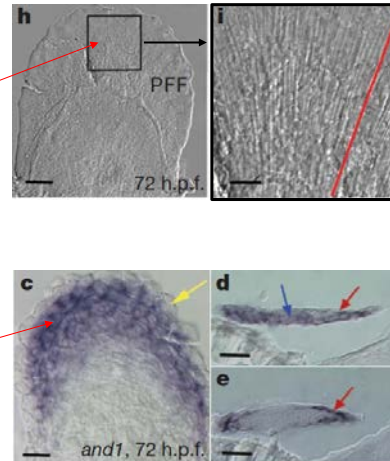
Jing Zhang¹, Purva Wagh¹, Danielle Guay¹, Luis Sanchez-Pulido², Bhaja K. Padhi¹, Vladimir Korzh³, Miguel A. Andrade-Navarro³ & Marie-Andrée Akimenko³

*La formation du repliement ectodermique (AEF) est suivie par l'apparition de deux séries de fibres rigides mais non-minéralisées (les **actinotriches** qui vont à la fois donner la flexibilité à la nageoire 'embryonnaire' mais également servir de matrice pour guider la migration de cellules du mésoderme qui, après ossification de type membranaire donneront les **lépidotriches** (squelette dermique minéralisé).

*Les actinotriches sont composé d'une substance appelée 'élastoïdine', un mélange contenant du collagène et des protéines de types Actinodine (And) 1-2. Les gènes *and1* et *and2* sont exprimés dans le repliement ectodermique.

*Les actinotriches sont-ils nécessaires pour le bon développement de la nageoire (actifs ou passifs?)

PFF: Repliement ectodermique de la nageoire pectorale



barres d'échelles: 40 (d, e); 20 (c, h) ou 5 (i) microns

45

Quelques mots sur le squelette dermique

nature

Vol 466 | 8 July 2020 | doi:10.1038/nature09537

LETTERS

Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition

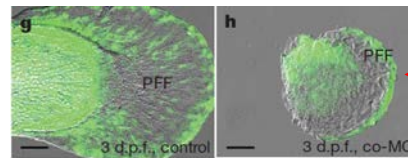
Jing Zhang¹, Purva Wagh¹, Danielle Guay¹, Luis Sanchez-Pulido², Bhaja K. Padhi¹, Vladimir Korzh³, Miguel A. Andrade-Navarro³ & Marie-Andrée Akimenko³

*Les actinotriches sont-ils nécessaires pour le bon développement de la nageoire (actifs ou passifs?).

*Expériences de perte de fonction en utilisant des **morpholinos**. Double perte de fonction car danger de redondance fonctionnelle...(protéines similaires).

*Les **morpholinos** sont des oligonucléotides synthétiques (généralement de app 25pb) 'antisenses' de molécules d'ARN et qui contiennent des modifications chimiques. L'appariement entre le morpholino et l'ARN cible va empêcher ces ARNs d'être utilisés correctement par la cellule et conduira donc à l'inactivation (partielle?) des gènes en question par défaut de protéines.

PFF: Repliement ectodermique de la nageoire pectorale



barres d'échelles: 20 microns

*La coloration verte reflète la présence de cellules mésenchymateuses dans le repliement ectodermique. Il s'agit d'une lignée enhancer-trap #ET37 (voir cours du 19 mai 2020).

*Il semble que la structure entière est affectée lorsque les deux gènes sont inactivés. Les cellules mésenchymateuses semblent absentes et il apparaît donc que ces cellules pourraient prendre part au développement de la PFF, et pas seulement la coloniser

46

Quelques mots sur le squelette dermique

nature

Vol 466, 8 July 2010 | doi:10.1038/nature09137

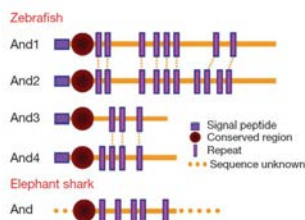
wikipedia

LETTERS

Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition

Jing Zhang¹, Purva Wagh¹, Danielle Guay¹, Luis Sanchez-Pulido², Bhaja K. Padhi¹, Vladimir Korzh³, Miguel A. Andrade-Navarro¹ & Marie-Andrée Akimenko³

*Les gènes *And1-4* n'ont pas de gènes orthologues chez les tétrapodes mais on trouve un gène similaire dans le génome de *Callorhynchus* (requin éléphant)



Liste des sous-ordres, familles et genres

Selon *World Register of Marine Species* (9 mars 2015)² :

- sous-ordre des **Chimaeroidel**
 - famille des **Callorhynchidae** Garman, 1901 -- 3 espèces
 - genre *Callorhynchus* Lacepede, 1798 -- 3 espèces
 - genre *Callorhynchus* Fleming, 1822 (*nomen dubium*)
 - famille des **Chimaeridae** Bonaparte, 1831
 - genre *Chimaera* Linnaeus, 1758 -- 16 espèces
 - genre *Hydrolagus* Gil, 1862 -- 25 espèces
 - famille des **Rhinochimaeridae** Garman, 1901
 - genre *Harriotta* Goode and Bean, 1895 -- 2 espèces
 - genre *Neoharriotta* Bigelow and Schroeder, 1950 -- 3 espèces
 - genre *Rhinochimaera* Garman, 1901 -- 3 espèces



Chimaera monstrosa (dessin de 1797).

Callorhynchus milii.

*Holocéphales, faisant parties de poissons cartilagineux, ils partagent des caractères avec les requins et les raies (*Chimaeridae*)..

47

Poissons cartilagineux, poissons osseux..

*Les gènes *And* furent perdus quelque part pendant la transition vers le membre tétrapode..

mammifères
oiseaux
squamata

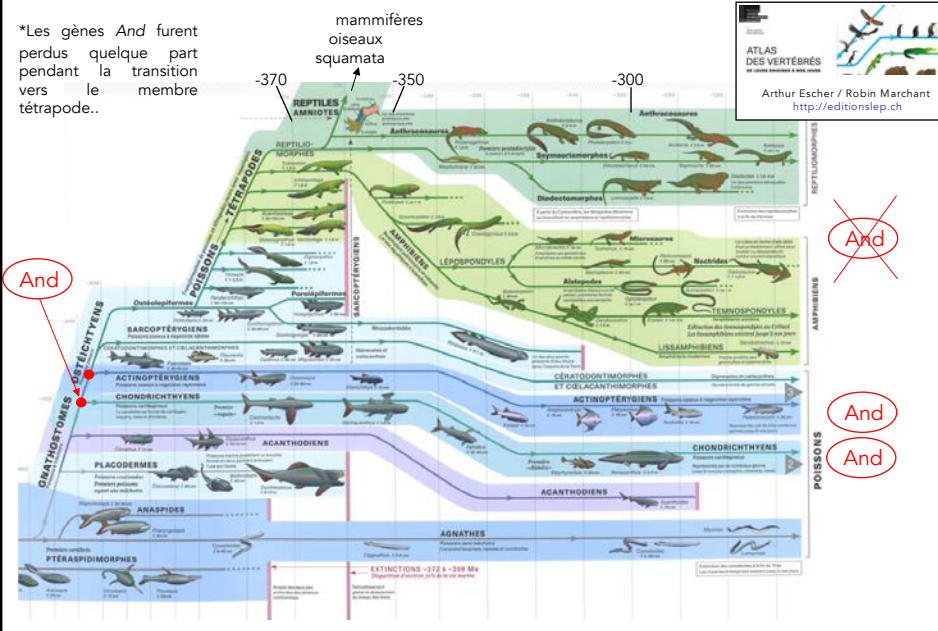
-370

-350

-300



Arthur Escher / Robin Marchant
<http://editionslep.ch>



48

Origine du squelette dermique

Current Biology

Volume 23, Issue 9, 6 May 2013, Pages R336-R337

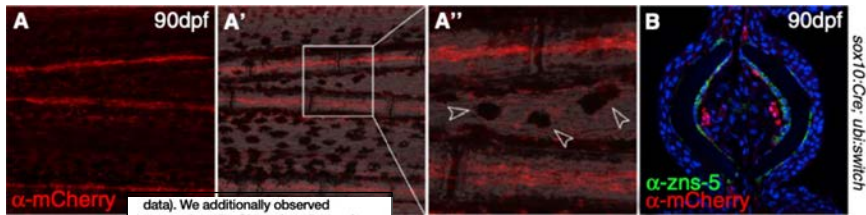


Correspondence

Dermal fin rays and scales derive from mesoderm, not neural crest

Raymond Teck Ho Lee¹, Jean Paul Thiery^{1,2,3}, Thomas J. Carney^{1,4,5}

*Marquage des cellules de la crête neurale avec une fluorescence mCherry (rouge) couplée à l'activité du gène Sox10 (indicatif d'une origine de la crête neurale)-



(data). We additionally observed expression of mCherry in cells running the length of the lepidotrichia (Figure 1A-A'). However co-immunostaining of cryosections and wholemounts for mCherry, with either the osteoblast marker zns-5, myelin basic protein or acetylated tubulin, identified these cells as labelling axon-associated Schwann cells in the ray interior, and never osteoblasts (Figure 1B; Supplemental data). Screening the fins of 5 individuals from three independent *sox10:cre; ubi:switch* transgenic lines failed to identify any discernible neural crest contribution to fin ray osteoblasts.

*Les cellules dérivées de la crête neurale (fluorescence mCherry, rouge) ne sont pas les ostéoblastes qui eux sont marqués en vert, par l'utilisation du gène zns-5. Les cellules rouges sont vraisemblablement des cellules de Schwann associées aux axones (co-coloration avec des protéines spécifiques).

Les ostéoblastes de la nageoire 'dermique' dérivent donc de la migration tardive de cellules du mésoderme paraxial.

49

Origine du squelette dermique

LETTER

doi:10.1016/j.nature.10953

A somitic contribution to the apical ectodermal ridge is essential for fin formation

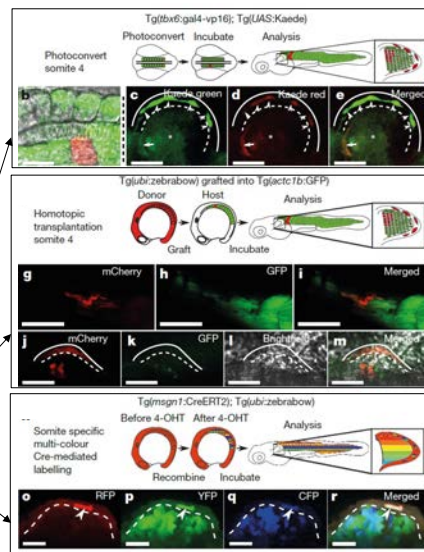
Walter Masuelink^{1,2}, Nicholas J. Cole³, Franziska Frenzel³, Silke Bergen³, Carmen Sonntag³, Alastair Wood³, Phong D. Nguyen³, Naomi Cohen³, Franziska Knopff³, Gilbert Weidinger³, Thomas E. Hall³ & Peter D. Currie^{2,3}

apical fold induction^{11,12}. Here we show that invasion by cells of a newly identified somite-derived lineage into the AER in zebrafish regulates apical fold induction. Ablation of these cells inhibits apical fold formation, prolongs AER activity and increases the amount of fin bud mesenchyme, suggesting that these cells could provide the timing mechanism proposed in Thorogood's clock model of the fin-to-limb transition¹¹. We further demonstrate that apical-fold-inducing cells are progressively lost during gnathostome evolution; the absence of such cells within the tetrapod limb suggests that their loss may have been a necessary prelude to the attainment of limblike structures in Devonian sarcopterygian fish.

Trois approches différentes:

- 1) Photoconversion du somite #4 (transgène convertible)
- 2) Transfert homotypique de somite marqués
- 3) Traçage de lignée par recombinaison ('zebrabow')

*Kaede: Protéine photoactivable (corail)
*Homotypique: transfert en position du même somite
*Zebrabow: système de marquage de clones par recombinaison



50

Origine du squelette dermique

LETTER

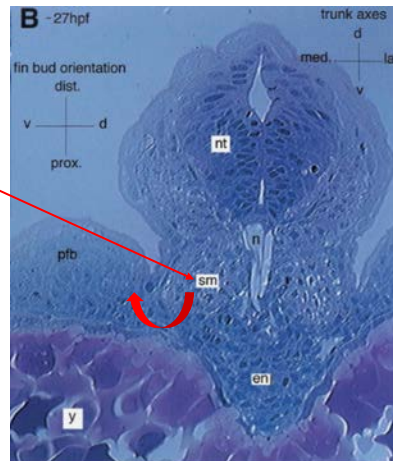
doi:10.1038/nature18953

A somitic contribution to the apical ectodermal ridge is essential for fin formation

Walter Masuel^{1*}, Nicholas J. Cole², Franziska Freyer³, Silke Berger³, Carmen Sonntag⁴, Alastair Wood⁵, Phong D. Nguyen⁶, Naomi Cohen⁷, Franziska Knopp⁸, Gilbert Weidinger⁹, Thomas E. Hall⁶ & Peter D. Currie^{1,2}

apical fold induction^{11,12}. Here we show that invasion by cells of a newly identified somite-derived lineage into the AER in zebrafish regulates apical fold induction. Ablation of these cells inhibits apical fold formation, prolongs AER activity and increases the amount of fin bud mesenchyme, suggesting that these cells could provide the timing mechanism proposed in Thorogood's clock model of the fin-to-limb transition¹¹. We further demonstrate that apical-fold-inducing cells are progressively lost during gnathostome evolution; the absence of such cells within the tetrapod limb suggests that their loss may have been a necessary prelude to the attainment of limb-like structures in Devonian sarcopterygian fish.

Migration dans le bourgeon de cellules d'origine somitique qui seront nécessaires à l'induction du repliement de la couche ectodermique et au développement du squelette dermique (exosquelette).



51

Origine du squelette dermique

LETTER

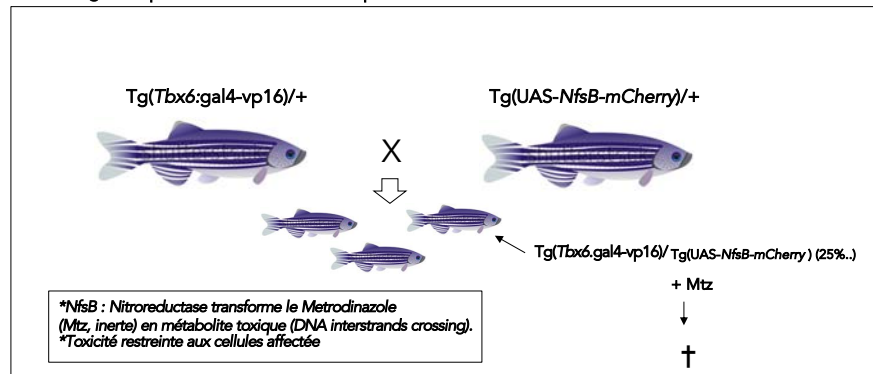
doi:10.1038/nature18953

A somitic contribution to the apical ectodermal ridge is essential for fin formation

Walter Masuel^{1*}, Nicholas J. Cole², Franziska Freyer³, Silke Berger³, Carmen Sonntag⁴, Alastair Wood⁵, Phong D. Nguyen⁶, Naomi Cohen⁷, Franziska Knopp⁸, Gilbert Weidinger⁹, Thomas E. Hall⁶ & Peter D. Currie^{1,2}

apical fold induction^{11,12}. Here we show that invasion by cells of a newly identified somite-derived lineage into the AER in zebrafish regulates apical fold induction. Ablation of these cells inhibits apical fold formation, prolongs AER activity and increases the amount of fin bud mesenchyme, suggesting that these cells could provide the timing mechanism proposed in Thorogood's clock model of the fin-to-limb transition¹¹. We further demonstrate that apical-fold-inducing cells are progressively lost during gnathostome evolution; the absence of such cells within the tetrapod limb suggests that their loss may have been a necessary prelude to the attainment of limb-like structures in Devonian sarcopterygian fish.

Ablation génétique de ces cellules somitiques



52

Origine du squelette dermique

LETTER

doi:10.1038/nature18953

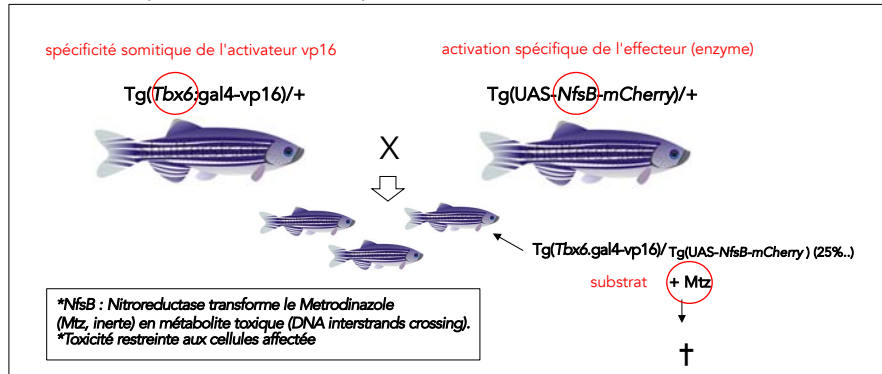
A somitic contribution to the apical ectodermal ridge is essential for fin formation

Walter Masuel^{1,4}, Nicholas J. Cole², Franziska Frenzel², Silke Berger³, Carmen Sonntag², Alastair Wood¹, Phong D. Nguyen², Naomi Cohen¹, Franziska Knopp¹, Gilbert Weidinger⁴, Thomas E. Hall¹ & Peter D. Currie^{1,2}

La séquence protéine gal4 reconnaît la séquence ADN UAS et la séquence protéine vp16 est un activateur de transcription (des ARNs du gène NfsB) ...donc enzyme produite etc...

apical fold induction^{11,12}. Here we show that invasion by cells of a newly identified somite-derived lineage into the AER in zebrafish regulates apical fold induction. Ablation of these cells inhibits apical fold formation, prolongs AER activity and increases the amount of fin bud mesenchyme, suggesting that these cells could provide the timing mechanism proposed in Thorogood's clock model of the fin-to-limb transition¹¹. We further demonstrate that apical-fold-inducing cells are progressively lost during gnathostome evolution; the absence of such cells within the tetrapod limb suggests that their loss may have been a necessary prelude to the attainment of limb-like structures in Devonian sarcopterygian fish.

Ablation génétique de ces cellules somitiques



53

Origine du squelette dermique

LETTER

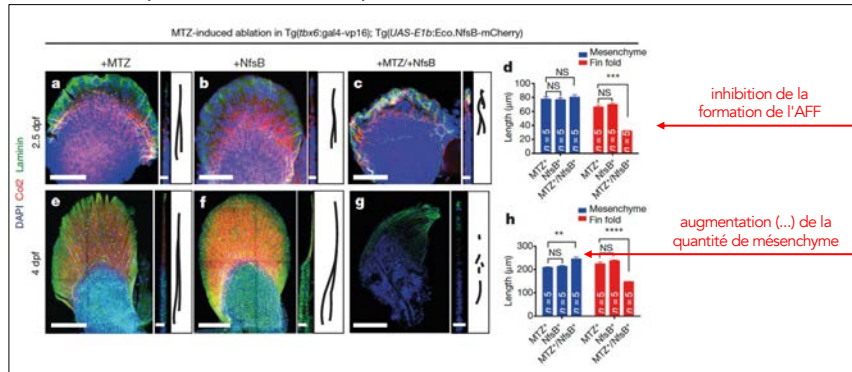
doi:10.1038/nature18953

A somitic contribution to the apical ectodermal ridge is essential for fin formation

Walter Masuel^{1,4}, Nicholas J. Cole², Franziska Frenzel², Silke Berger³, Carmen Sonntag², Alastair Wood¹, Phong D. Nguyen², Naomi Cohen¹, Franziska Knopp¹, Gilbert Weidinger⁴, Thomas E. Hall¹ & Peter D. Currie^{1,2}

apical fold induction^{11,12}. Here we show that invasion by cells of a newly identified somite-derived lineage into the AER in zebrafish regulates apical fold induction. Ablation of these cells inhibits apical fold formation, prolongs AER activity and increases the amount of fin bud mesenchyme, suggesting that these cells could provide the timing mechanism proposed in Thorogood's clock model of the fin-to-limb transition¹¹. We further demonstrate that apical-fold-inducing cells are progressively lost during gnathostome evolution; the absence of such cells within the tetrapod limb suggests that their loss may have been a necessary prelude to the attainment of limb-like structures in Devonian sarcopterygian fish.

Ablation génétique de ces cellules somitiques



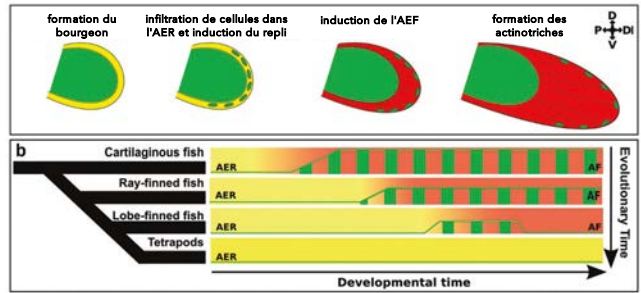
54

LETTER

doi:10.1038/nature18953

A somitic contribution to the apical ectodermal ridge is essential for fin formation

Wouter Masselink¹, Nicholas J. Cole², Franziska Freyer³, Silke Berger³, Carmen Sonntag⁴, Alastair Wood⁵, Phong D. Nguyen⁶, Naomi Cohen⁷, Franziska Knecht⁸, Gilbert Weidinger⁹, Thomas E. Hall¹ & Peter D. Curran¹



Une confirmation du modèle proposé par Peter Thorogood qui suggère que le moment auquel le repliement de l'ectoderme se produit va fixer la quantité de matériel de l'exo-squelette qui sera produite. L'absence totale de repliement conduira au membre des tétrapodes..