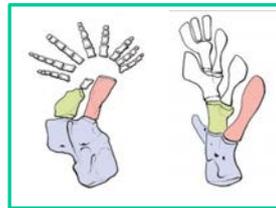


Denis Duboule

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 #4, 7 juin 2022, 17h

Rappel des notions du cours #3, les gènes Hox comme marqueurs de l'axe
proximo-distal chez les amniotes, structure, expression et fonctions des
gènes Hox pendant le développement de la nageoire pectorale
du poisson-zèbre



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 pairs, 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

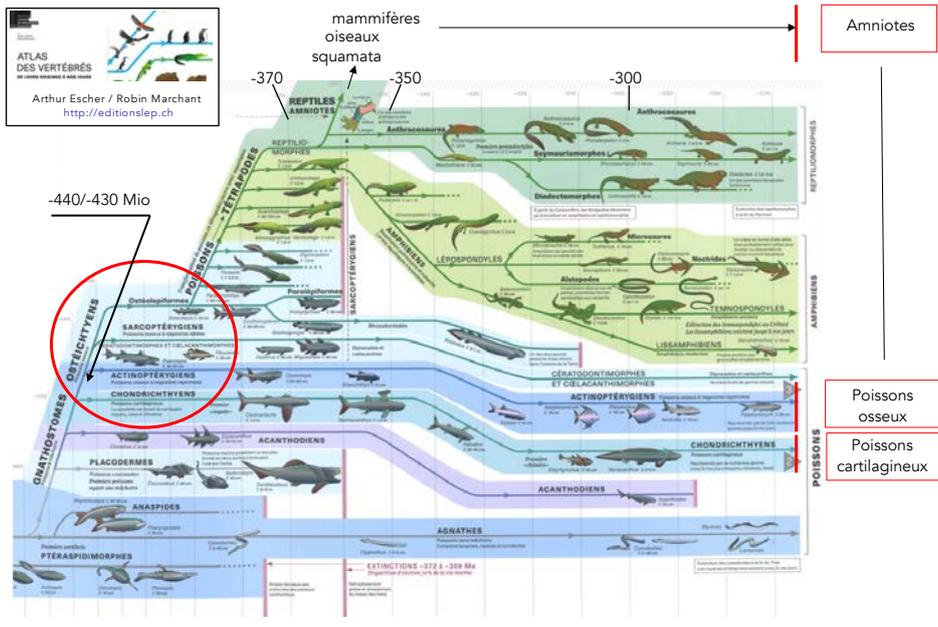
Cours 4: Utilisation de marqueurs génétiques, gènes Hox et marquages cellulaires, inactivations fonctionnelles et mutagenèse chez le poisson-zèbre

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

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

3

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



4

Rappel; 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
- *Transgénèse 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>

5

Rappel; développement des nageoires (téléostéens)



Mechanisms of Development 79 (2002) 99–120



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

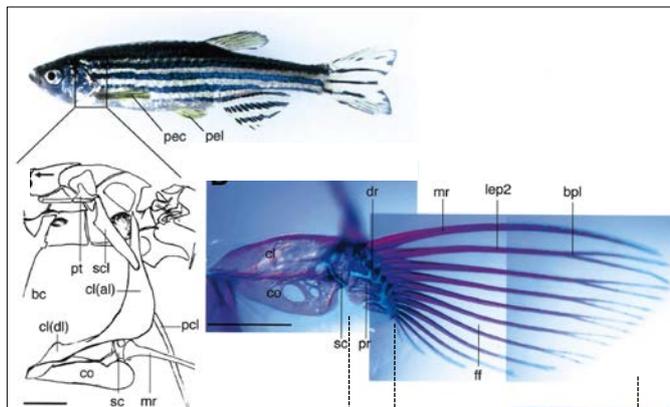
Heiner Grandel, Stefan Schulte-Merker*

MPZ für Entwicklungsbiologie, Spemannstrasse 31, 72076 Tübingen, Germany

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

Endosquelette: ossification de type endochondrale, similaire aux os longs des membres tétrapodes.

Exosquelette: ossification de type membranaire, ce type d'ossification n'existe pas dans le membre des tétrapodes



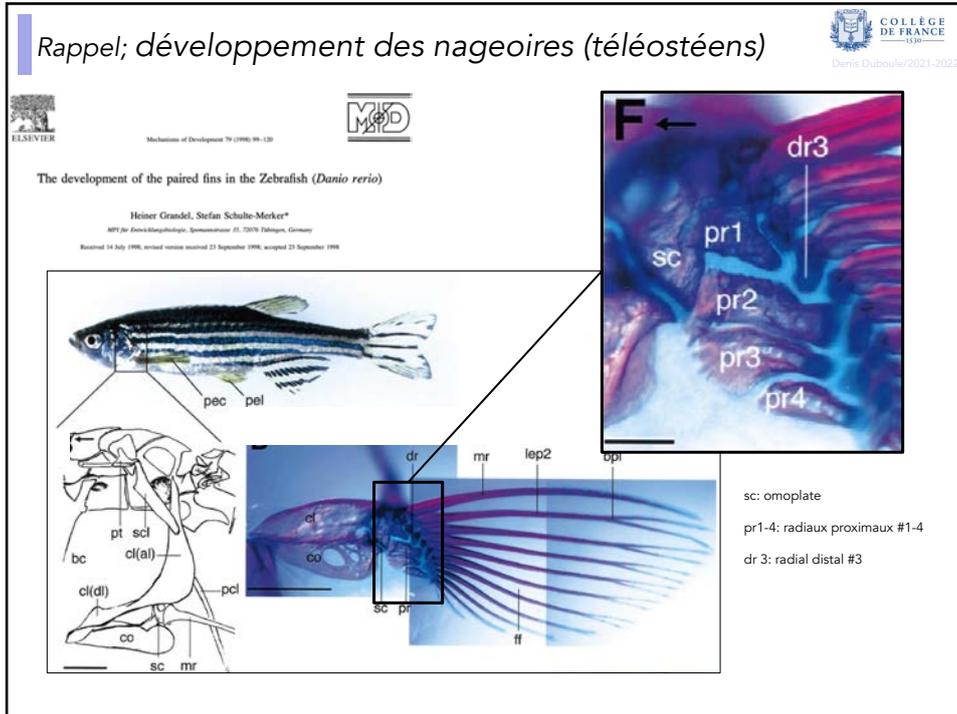
- sc: scapula (omoplate)
- pec: nageoire pectorale
- pel: nageoire pelvienne
- co: coracoïde
- cl: cleithrum
- pr: radiaux proximaux
- dr: radiaux distaux
- mr: mesocoracoïde
- lep: lépidotriches
- bpl: point de branchement #1
- ff: crête (repliement) de la nageoire

endosquelette

Exosquelette

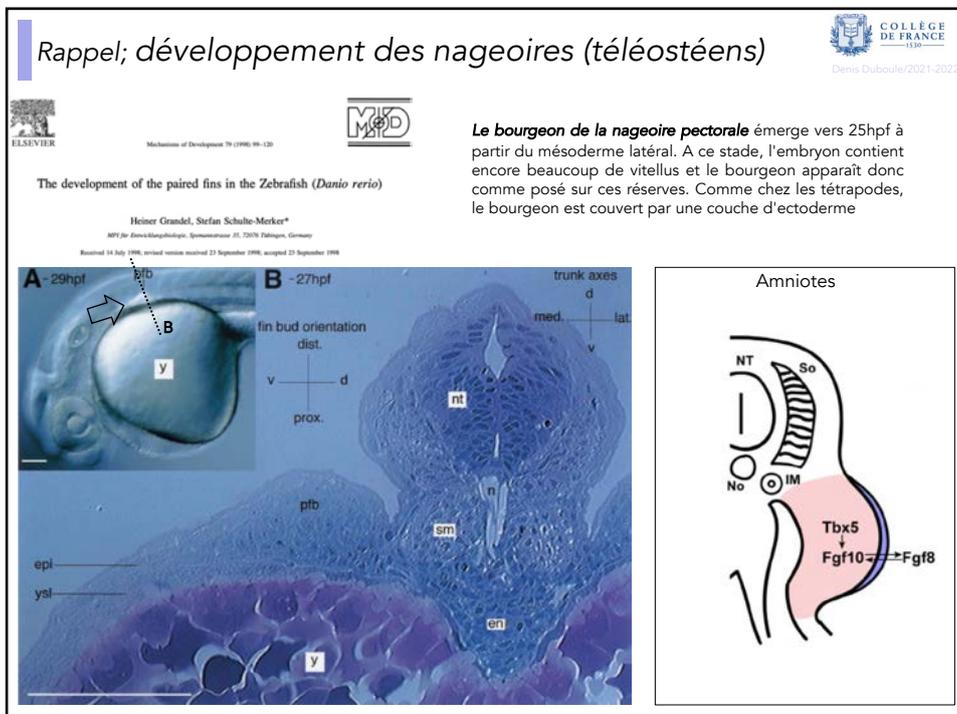
6

Rappel; développement des nageoires (téléostéens)



7

Rappel; développement des nageoires (téléostéens)



8

Rappel; développement des nageoires (téléostéens)

LETTERS TO NATURE

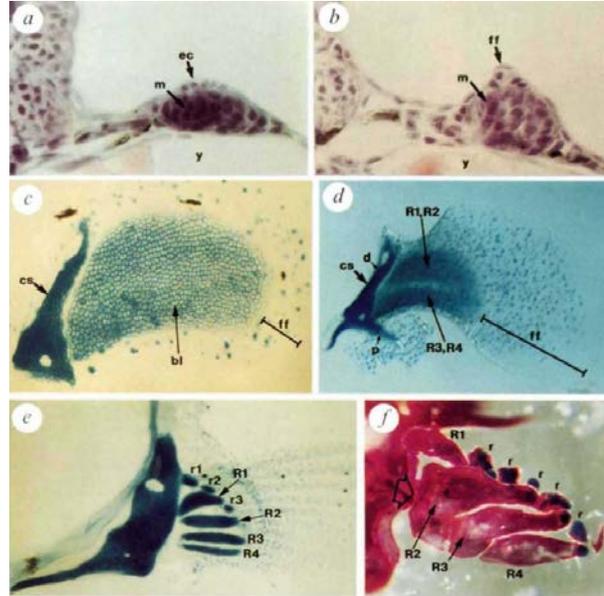
Hox gene expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits

Paolo Sordino, Frank van der Hoeven & Denis Duboule*

Department of Zoology and Animal Biology, University of Geneva, Sciences III, Quai Ernest Ansermet 30, 1211 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.



9

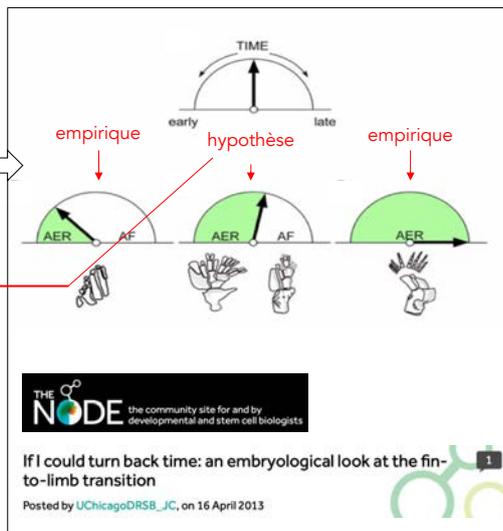
Rappel; Modèle de l'horloge AER versus AEF

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



10

Rappel; Deux phases distinctes, proximale et distale

2916 RESEARCH ARTICLE

Development 139, 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,*}

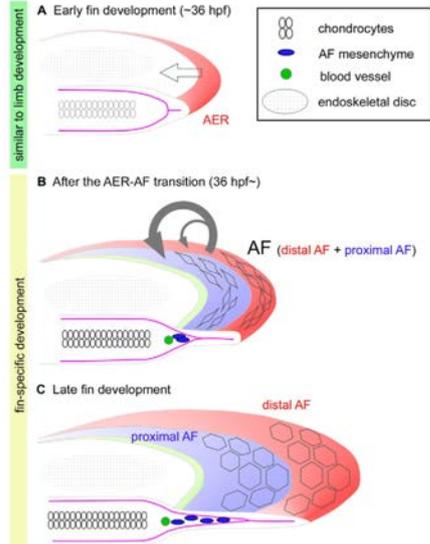
*Une première phase (36hpf) qui ressemble passablement au développement précoce des membres tétrapodes

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



11

Phase précoce et Shh chez les amniotes

2916 RESEARCH ARTICLE

Development 139, 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

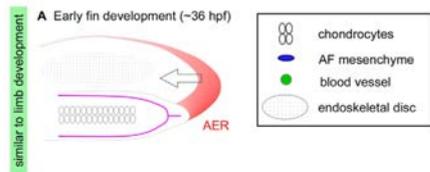
mécanismes partagés avec le membre tétrapode



*La phase précoce du membre chridien est caractérisée entre autre par l'activation du gène *sonic-hedgehog* à la face postérieure du bourgeon de membre (polarité AP..)

*Inactivation de *Shh* dans les membres

Genetics of Acheiropodia (the Handless and Footless Families of Brazil). VI. Formal Genetic Analysis
ADEMAR FREIRE-MAIA,¹ NEWTON FREIRE-MAIA,² NEWTON E. MORTON,³
ELIANE S. AZEVEDO,⁴ AND ANTONIO QUELCE-SALGADO⁵
Am J Hum Genet. 27:521-527, 1975



12

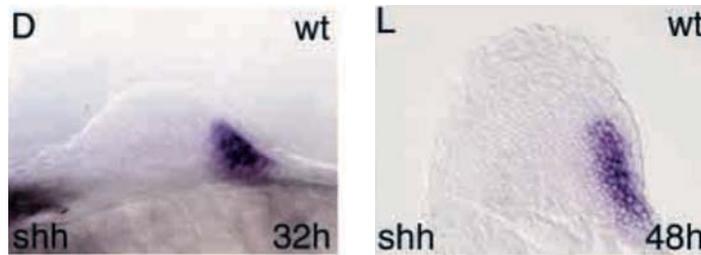
Phase précoce et Shh chez le poisson-zèbre

Cell, Vol. 75, 1431-1444, December 31, 1993, Copyright © 1993 by Cell Press

A Functionally Conserved Homolog of the *Drosophila* Segment Polarity Gene *hh* Is Expressed in Tissues with Polarizing Activity in Zebrafish Embryos

S. Krauss, J.-P. Concordet, and P. W. Ingham
Molecular Embryology Laboratory
Imperial Cancer Research Fund
Developmental Biology Unit
Department of Zoology
South Parks Road
Oxford OX1 3PS
England

*Clonage du gène Shh chez le poisson-zèbre en 1993. Caractérisation de son expression pendant le développement de la nageoire pectorale...



Neumann et al., 1999, *Development*

13

Phase précoce et Shh chez le poisson-zèbre

Development 126, 4817-4826 (1999)
Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 1999
DEV2443

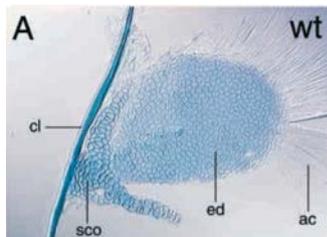
4817

Transient establishment of anteroposterior polarity in the zebrafish pectoral fin bud in the absence of *sonic hedgehog* activity

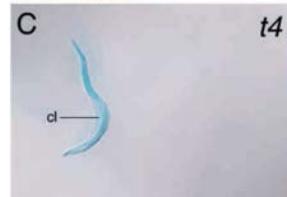
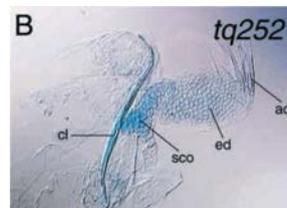
Carl J. Neumann^{1,*,5}, Heiner Grandel^{1,*}, William Gaffield², Stefan Schulte-Merker³
and Christiane Nüsslein-Volhard¹

*Criblage génétique pour des mutations chez le ZF et caractérisation plusieurs allèles mutants *sonic-you* (*syu*)

**syu* mutant hypomorphe
(fonction partielle)



**syu* mutant nul
(pas de fonction)



14

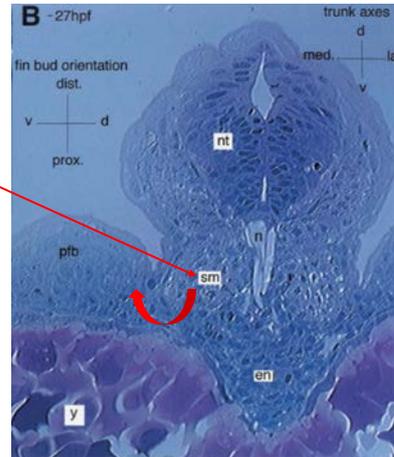
Rappel; Le squelette dermique (exosquelette)

LETTER

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

Walter Masoulek^{1*}, Nicholas J. Cole², Franziska Frenzel³, Silke Berger³, Carmen Sonntag³, Alastair Wood³, Phong D. Nguyen³, Naomi Cohen³, Franziska Kneip³, Gilbert Weidinger³, Thomas E. Hall³ & Peter D. Carnaud³

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).

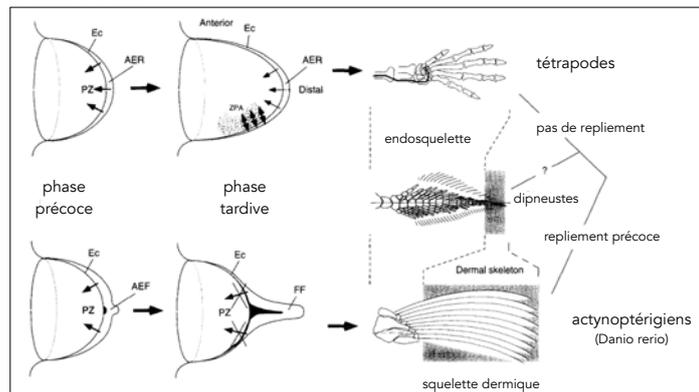
17

Rappel; Homo et Danio; aux extrêmes des formes

A molecular approach to the evolution of vertebrate paired appendages

Paolo Sordino and Denis Duboule

TREE vol. 11, no. 3 March 1996



Dans ce modèle (ou dans d'autres) la partie distale (autopode) est-elle une structure 'néomorphique' (nouvellement produite) ou est-elle une extension/complexification/'amélioration' d'une structure pré-existante? Les poissons (avaient-) ont-ils des doigts?

18

Nageoire pectorale du ZF: valeur heuristique?

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

Heiner Grandel, Stefan Schulz-Merker*
MPI für Entwicklungsbiologie, Spemannstrasse 35, 72076 Tübingen, Germany

esturgeon, poisson-castor, poisson-zèbre

polyptère

les chondrostéens sont considérés comme les actinoptérogens les plus primitifs, en partie car ils ont un squelette qui est incomplètement ossifié, principalement formé de cartilages.

chondrostéens, holostéens, téléostéens

actinoptérogens, sarcoptérogens

chondrichyens

phylogénie adaptée de P. Janvier (1996)

homologie simple
↓
homologie profonde

19

Homologies classique et profonde

ulna (cubitus), humerus, radius

Les os de la nageoire pectorale (avant) de *Furthestopteron*

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

Osteolepiformes, POISSONS, TETRAPODES, REPTILES MORPHES, REPTILES AMNIOTES, SARCOPTRYGIENS

20

COLLEGE DE FRANCE
Denis Duboule/2021-2022

Utilisation de marqueurs moléculaires

Gènes exprimés dans des structures précises du membres tétrapode:

- ↓ Distal
- ← Intermédiaire
- ← Proximal

Utilisation de l'expression de certains gènes dont les fonctions sont restreintes à des structures particulières afin de conclure sur l'existence de ces structures et sur leurs status d'homologie. Exemple: les gènes des actinodines (*And*) discutés précédemment, que l'on ne trouve que chez les vertébrés ayant un squelette dermique (**donc** pas de structures **a priori** homologues chez les amniotes...)

21

COLLEGE DE FRANCE
Denis Duboule/2021-2022

Utilisation de marqueurs moléculaires

Gènes exprimés dans des structures précises du membres tétrapode:

- ↓ Distal
- ← Intermédiaire
- ← Proximal

Dans ce cas particulier de recherche d'homologies, il s'agit d'utiliser des marqueurs distribués le long de l'axe **proximo-distal**, puisque l'hypothèse de l'apparition ou de l'extension d'une partie distale concerne avant tout cet axe précis. L'axe PD étant lié, pendant le développement, à l'axe antéro-postérieur (voir avant), des marqueurs de ce dernier peuvent aussi être utiles.

22

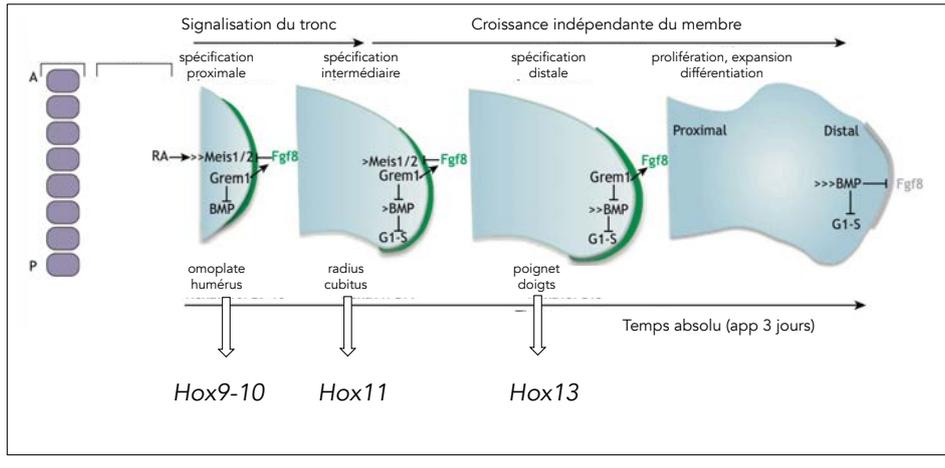
Gènes Hox comme marqueurs de l'axe PD

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

REVIEW

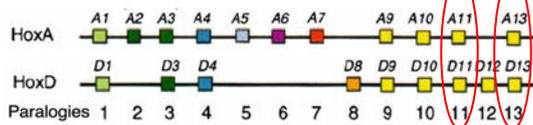
Establishing the pattern of the vertebrate limb
Caillin McQueen and Matthew Towers*

A chaque 'segment' correspond l'expression de gènes Hox particuliers, en fonction de leurs positions sur le cluster génomique (le #13 étant le dernier, donc dans les doigts).



23

Gènes Hox comme marqueurs de l'axe PD



*Deux clusters de gènes Hox (sur les quatre) furent 'recrutés' pour fonctionner dans les membres, A et D.

*Il s'agit en particulier des gènes des groupes 9 à 13, tous orthologues au gène *AbdB* de la mouche *Drosophila*.

*Ces gènes déterminent des segments différents le long de l'axe proximodistal, comme le montrent à la fois les effets de leurs inactivations et leurs domaines d'expression

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

24

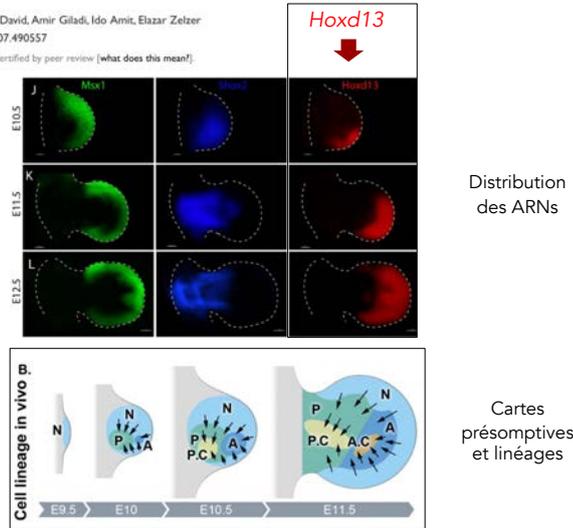
Hoxd13 et cellules progénitrices distales

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

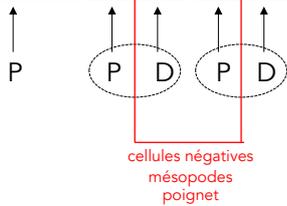
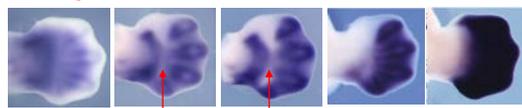
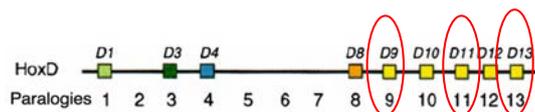
doi: <https://doi.org/10.1101/2022.05.07.490557>

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



25

Gènes Hox comme marqueurs de l'axe PD



*Deux clusters de gènes Hox (sur les quatre) furent 'recrutés' pour fonctionner dans les membres, A et D.

*Il s'agit en particulier des gènes des groupes 9 à 13, tous orthologues au gène *AbdB* de la mouche *Drosophila*.

*Ces gènes déterminent des segments différents le long de l'axe proximo-distal, comme le montrent à la fois les effets de leurs inactivations et leurs domaines d'expression.

*Les gènes exprimés à la fois dans les parties distales et proximales (#10 et 11) ont une zone de non-expression entre les deux domaines...

*Cette zone coïncide avec le **mésopode** et sera critique dans l'évaluation des homologies... (présence ou non d'une articulation...)

Pascal Dollé; Marie Kmita

26

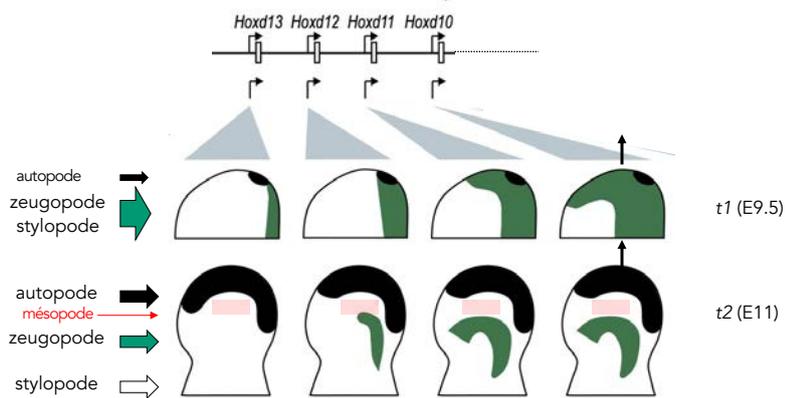
Les gènes *Hoxd*; phases précoce (*prox*) et tardive (*dist*)

Developmental Cell 10, 93-103, January, 2006 ©2006 Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.devcel.2005.11.014

Control of *Hoxd* Genes' Collinearity during Early Limb Development

Basile Turchini¹ and Denis Duboule^{1*}
¹Department of Zoology and Animal Biology and National Research Centre "Frontiers in Genetics" University of Geneva

↑: Croissance distale. Gènes d'abord exprimés dans les FUTURES cellules proximales (vert), mais qui sont distales à 9.5 (...) puis dans les cellules distales (noir)



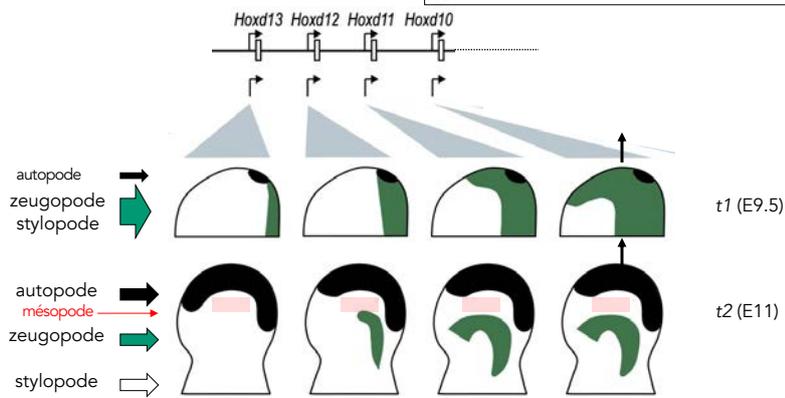
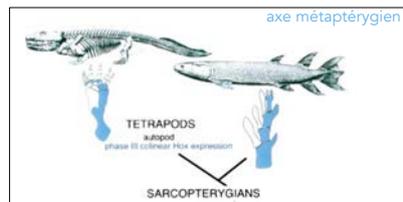
27

Les gènes *Hoxd*; phases précoce (*prox*) et tardive (*dist*)

Developmental Cell 10, 93-103, January, 2006 ©2006 Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.devcel.2005.11.014

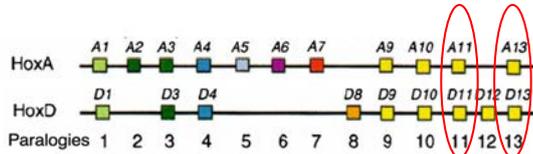
Control of *Hoxd* Genes' Collinearity during Early Limb Development

Basile Turchini¹ and Denis Duboule^{1*}
¹Department of Zoology and Animal Biology and National Research Centre "Frontiers in Genetics" University of Geneva



28

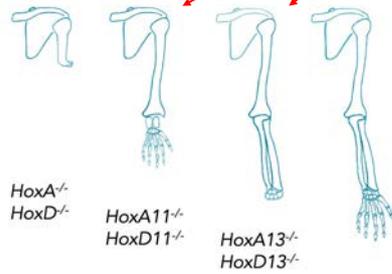
Gènes *HoxA* et *D* comme marqueurs de l'axe PD



*Deux clusters de gènes *Hox* (sur les quatre) furent 'recrutés' pour fonctionner dans les membres, A et D.

*Il s'agit en particulier des gènes des groupes 9 à 13, tous orthologues au gène *AbdB* de la mouche *Drosophila*.

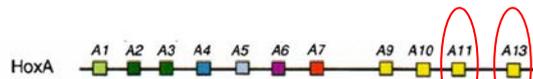
*Ces gènes déterminent des segments différents le long de l'axe proximo-distal, comme le montrent à la fois les effets de leurs inactivations et leurs domaines d'expression



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

29

Gènes *HoxA* comme marqueurs de l'axe PD

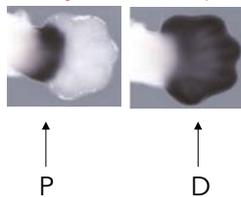


*Deux clusters de gènes *Hox* (sur les quatre) furent 'recrutés' pour fonctionner dans les membres, A et D.

*Il s'agit en particulier des gènes des groupes 9 à 13, tous orthologues au gène *AbdB* de la mouche *Drosophila*.

*Ces gènes déterminent des segments différents le long de l'axe proximo-distal, comme le montrent à la fois les effets de leurs inactivations et leurs domaines d'expression

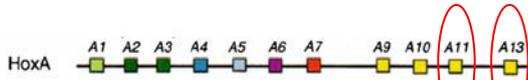
Woltering et al., (2014)
PLoS Biol.



*Dans le cas du cluster A, les gènes #11 et #13 ont des domaines complémentaires qui se séparent pendant la croissance du bourgeon.

30

Gènes *HoxA* comme marqueurs de l'axe PD

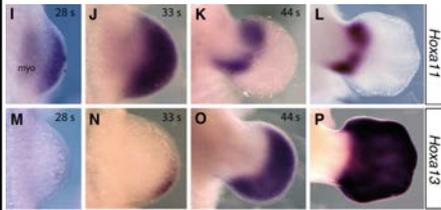


*Deux clusters de gènes *Hox* (sur les quatre) furent 'recrutés' pour fonctionner dans les membres, A et D.

*Il s'agit en particulier des gènes des groupes 9 à 13, tous orthologues au gène *AbdB* de la mouche *Drosophila*.

*Ces gènes déterminent des segments différents le long de l'axe proximo-distal, comme le montrent à la fois les effets de leurs inactivations et leurs domaines d'expression

*Dans le cas du cluster A, les gènes #11 et #13 ont des domaines complémentaires qui se séparent pendant la croissance du bourgeon.



Int. J. Dev. Biol. 33: 1483-1494 (2009)
doi: 10.1387/ijdb.072430em

DEVELOPMENTAL
BIOLOGY

Ectopic *Meis1* expression in the mouse limb bud alters P-D patterning in a *Pbx1*-independent manner

NADIA MERCADER¹, LICIA SELLER¹, LUIS MIGUEL CRIADO¹, PILAR PALLARES¹, CARLOS PARRAS¹, MICHAEL L. CLEARY² and MIGUEL TORRES^{1,3*}

31

Gènes *HoxA* comme marqueurs de l'axe PD



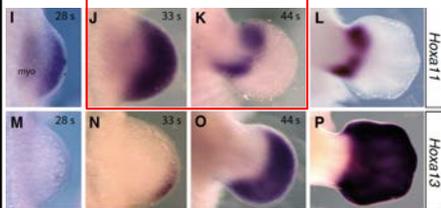
*Deux clusters de gènes *Hox* (sur les quatre) furent 'recrutés' pour fonctionner dans les membres, A et D.

*Il s'agit en particulier des gènes des groupes 9 à 13, tous orthologues au gène *AbdB* de la mouche *Drosophila*.

*Ces gènes déterminent des segments différents le long de l'axe proximo-distal, comme le montrent à la fois les effets de leurs inactivations et leurs domaines d'expression

*Dans le cas du cluster A, les gènes #11 et #13 ont des domaines complémentaires qui se séparent pendant la croissance du bourgeon.

DISTAL... PROXIMAL...



Int. J. Dev. Biol. 33: 1483-1494 (2009)
doi: 10.1387/ijdb.072430em

DEVELOPMENTAL
BIOLOGY

Ectopic *Meis1* expression in the mouse limb bud alters P-D patterning in a *Pbx1*-independent manner

NADIA MERCADER¹, LICIA SELLER¹, LUIS MIGUEL CRIADO¹, PILAR PALLARES¹, CARLOS PARRAS¹, MICHAEL L. CLEARY² and MIGUEL TORRES^{1,3*}

32

Gènes Hox chez le poissons zèbre

Vertebrate genomics: **More fishy tales about Hox genes**
Axel Meyer and Edward Málaga-Trillo
Current Biology 1999, 9:R210–R213
http://biomednet.com/elecref/09609822009R0210

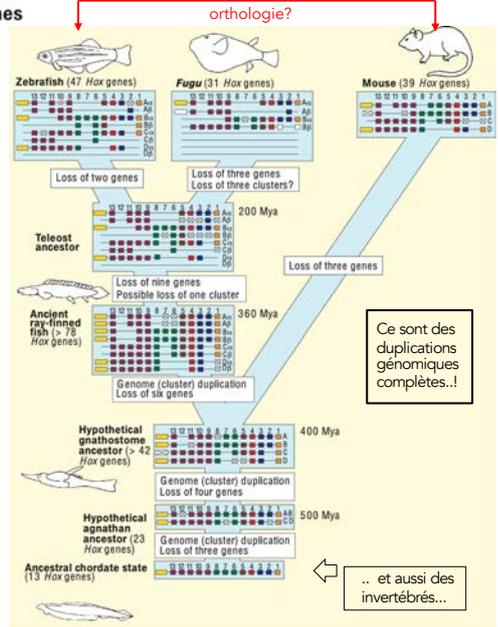
Poisson-zèbre; 7 clusters, 47 Hox
Souris; 4 clusters, 39 Hox

Perte de gènes et d'un cluster,
à l'origine des téléostéens (7C)

Une duplication supplémentaire, à
l'origine des poissons (8C)

Deux duplication génomiques
à l'origine des vertébrés (4C)

Un cluster ancestral (1C)



Ce sont des duplications génomiques complètes..!

.. et aussi des invertébrés...

33

Gènes Hox chez le poissons zèbre

REVIEW 2549

Development 134, 2549-2560 (2007) doi:10.1242/dev.001065

The rise and fall of Hox gene clusters

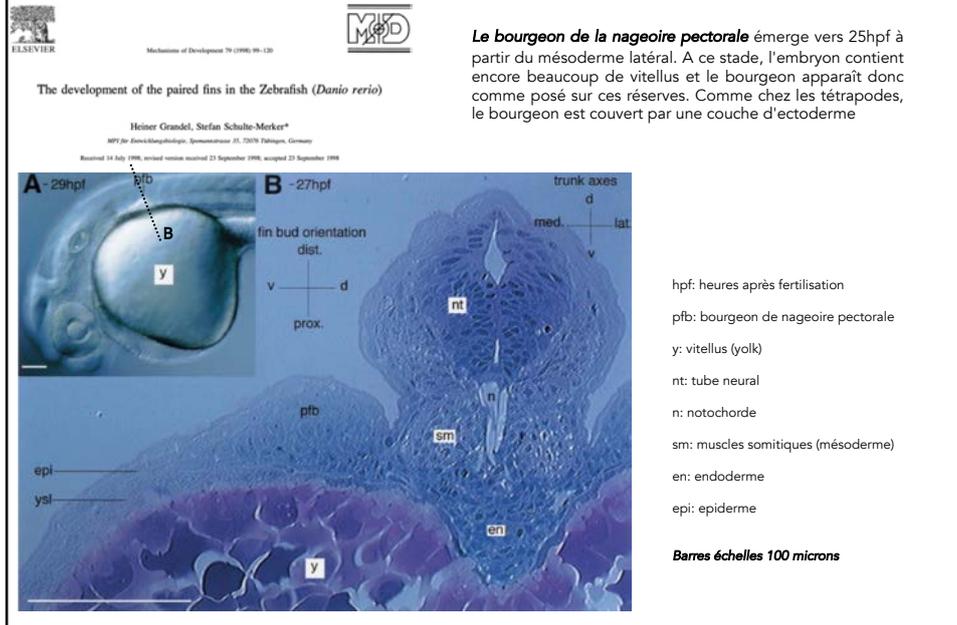
Denis Duboule

Relations d'orthologies entre les clusters Hox de la souris (M) et du poisson-zèbre (ZF)

Cluster	100 kb	No of genes	Size (kb)
M HoxA		11	105
ZFHoxAa		7	60
ZFHoxAb		5	35
M HoxB		10	100*
ZFHoxBa		11	110
ZFHoxBb		4	40
M HoxC		9	110
ZFHoxCa		10	110
ZFHoxCb		4	25
M HoxD		9	100
ZFHoxDa		7	50
ZFHoxDb		0	0†

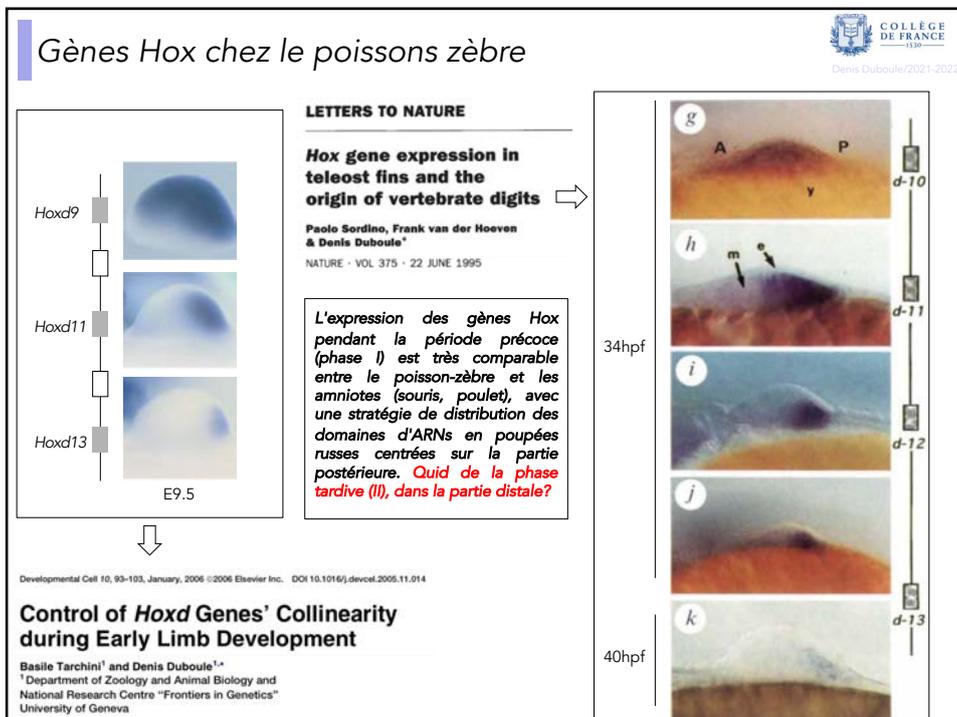
34

Nageoire pectorale du ZF: origine et bourgeonnement



35

Gènes Hox chez le poissons zèbre



36

Gènes Hox chez le poissons zèbre

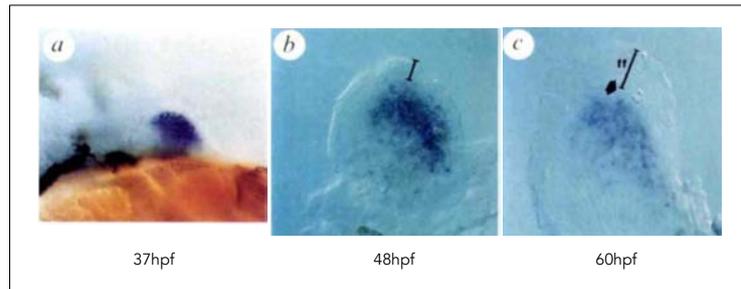
LETTERS TO NATURE

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

Paolo Sordino, Frank van der Hoeven & Denis Duboule*

NATURE · VOL 375 · 22 JUNE 1995

La première impression d'une différence apparaît avec l'expression du gène *Hoxa11* dont l'expression se restreint dans la partie proximale chez les amniotes, une dynamique qui n'est pas observée dans la nageoire pectorale du ZF



37

Gènes Hox chez le poissons zèbre

Evolution of Developmental Control Mechanisms

Tri-phasic expression of posterior *Hox* genes during development of pectoral fins in zebrafish: Implications for the evolution of vertebrate paired appendages

Dagmar Ahn, R. B. Robert E. Ho

Developmental Biology

Volume 322, Issue 1, 1 October 2008, Pages 220-233

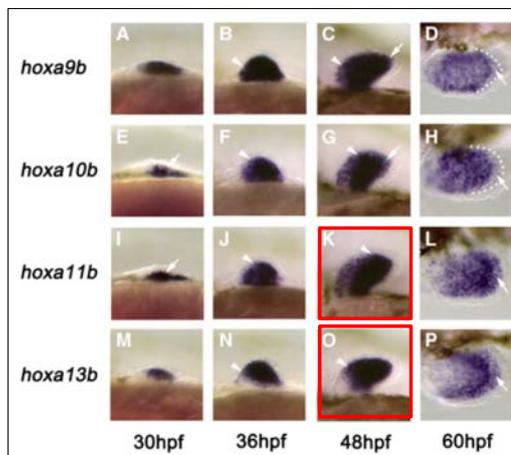
Cette observation est vérifiée en 2008 par l'analyse générale des domaines d'expressions des gènes *Hox* des clusters *HoxA* et *HoxD* (Ahn and Ho).

Cette analyse révèle que *Hoxa11* n'est pas 'exclu de la partie la plus distale du mésoderme et que *Hoxa13* n'est pas restreint à cette partie la plus distale, comme c'est le cas chez les amniotes.

Une expression dans le mésenchyme distal du disque endochondral semble spécifique à *Hoxa13* et *Hoxa11* (flèches blanches). Cette expression distale représenterait une 'phase distale' comparable à celle des amniotes (selon ces auteurs). Chez les amniotes, seule cette phase existe pour *Hoxa13*...

amniotes

Woltering et al., (2014)
PLoS Biol.



38

Gènes Hox chez le poissons zèbre

Evolution of Developmental Control Mechanisms

Tri-phasic expression of posterior Hox genes during development of pectoral fins in zebrafish: Implications for the evolution of vertebrate paired appendages

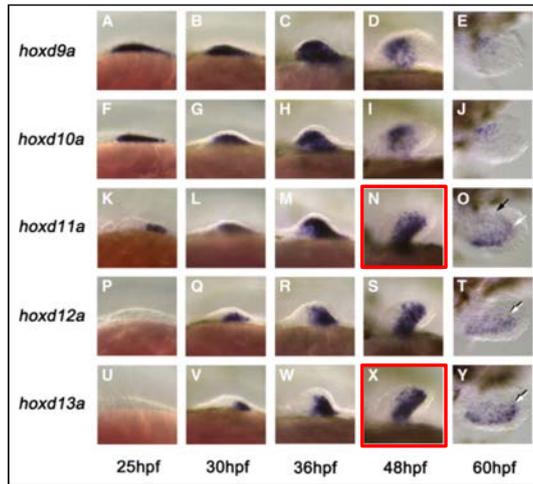
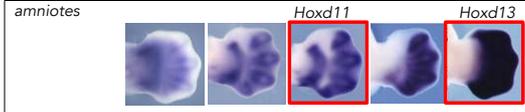
Dargyan Abu-R. R., Robert K. Ho

Developmental Biology

Volume 322, Issue 1, 1 October 2008, Pages 220-233

Quant aux gènes *Hoxd*, les domaines d'expression tardifs (48, 60hpf) indiquent des différences notables d'avec les amniotes. *Hoxd13* n'est pas plus distal que *Hoxd11* avec lequel il semble partager son domaine d'expression.

Ce domaine conserve la préférence postérieure observée dans le bourgeon (30hpf) et est continu, contrairement aux deux domaines observés pour *Hoxd11* (proximal et distal) chez les amniotes.



39

Gènes Hox chez le poissons zèbre

LETTER

Digits and fin rays share common developmental histories

Tetsuya Nakamura*, Andrew R. Gellera*, Nathan Lemberg†, Julie Scymaoui† & Neil H. Shubin†

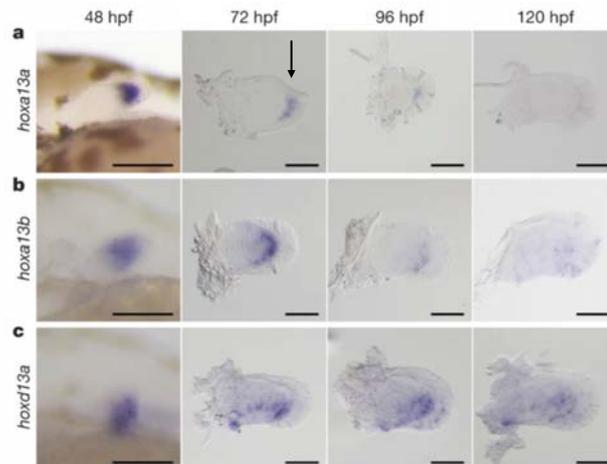
8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

En 2016, Shubin et collègues ré-évaluent l'expression des gènes *Hoxa13a* et *b* et *Hoxd13a*.

Hoxa13a exprimé dans le mésenchyme distal à 48 hpf puis dans le repliement ectodermique proximal à 72 hpf.

Hoxa13b exprimé dans le mésenchyme distal à 48 hpf puis reste exprimé dans le disque endochondral.

Hoxd13a exprimé dans le mésenchyme distal et postérieur à 48 hpf puis reste exprimé dans le disque endochondral.



barres d'échelle: 100 microns

40

Séquences 'enhancers'

Ces séquences enhancers ont une grande modularité, de telle sorte que l'expression de ces gènes peut être modifiée de façon locale, **intra-**(pleiotropie) ou **inter-**spécifique (évolution).

Importance des enhancers pour modifier les régulations dans des tissus différents de la même espèce ('paysage de régulation', 2003)

REVIEW INSIGHT

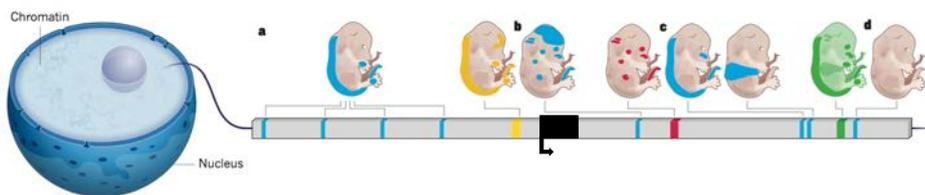


Figure 2 | The mammalian regulatory jungle.

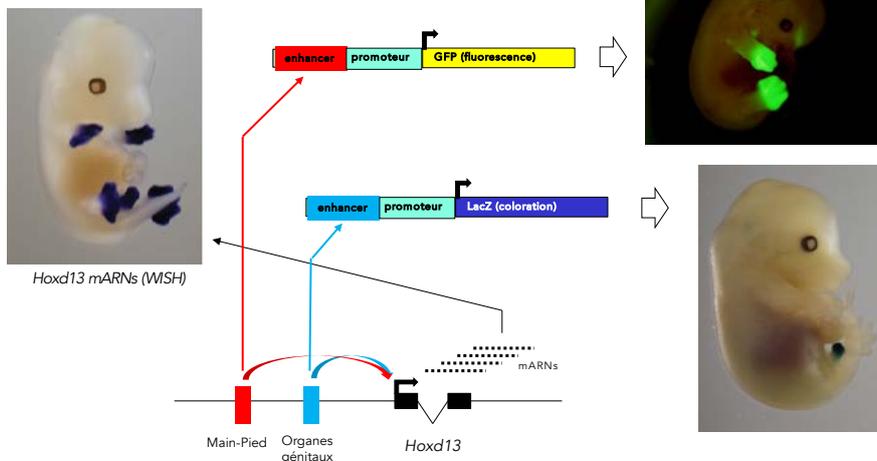
Modifié de: de Laat and Duboule, 2013 Nature

41

Séquences 'enhancers'; interrupteurs fonctionnels

Les gènes 'de développement' sont régulés par des enhancers multiples qui ont une grande modularité, de telle sorte que l'expression de ces gènes peut être modifiée selon les contextes cellulaires.

Transgénèse



Lonfat et al., Science, 2014; Bolt et al., Nature Com. 2022

42

Enhancers et marquages cellulaires

LETTER

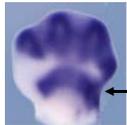
Digits and fin rays share common developmental histories

Tetsuya Nakamura^{1*}, Andrew K. Gebicki^{2*}, Justin Lemberg³, Julie Seymour⁴ & Neil H. Shubin¹

8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

Quelles sont les cellules, dans la nageoire adulte, qui exprimaient les gènes *Hox11* et *13* pendant le développement? Quelles sont les destinées des cellules qui transcrivent les gènes *Hox11* et *13* dans le bourgeon de nageoire?

Expériences de marquages des destins cellulaires avec utilisation de **séquences enhancers** comme agents de spécificités géniques...



CNS65 proximal précoce
contrôle les gènes *Hoxd*

> *Science*. 2013 Jun 7;340(6137):1234167. doi: 10.1126/science.1234167.

A switch between topological domains underlies *HoxD* genes collinearity in mouse limbs

Guillaume Andrey¹, Thomas Montavon, Bénédicte Mascrez, Federico Gonzalez, Daan Noordermeer, Marion Lelou, Didier Trono, François Spitz, Denis Duboule



e16 distal tardif, contrôle
Hoxa13

> *PLoS Genet*. 2013;9(12):e1004018. doi: 10.1371/journal.pgen.1004018. Epub 2013 Dec 26.

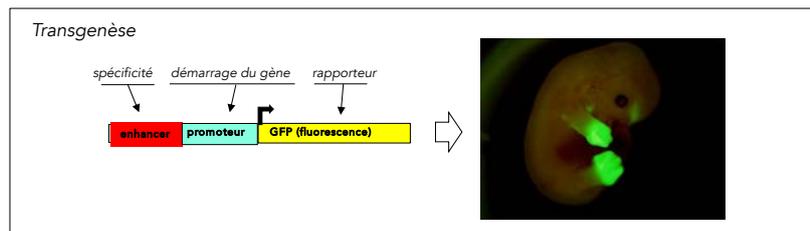
Clustering of tissue-specific sub-TADs accompanies the regulation of *HoxA* genes in developing limbs

Soizik Berlivet¹, Denis Paquette², Annie Dumouchel³, David Langlais⁴, Josée Dostie², Marie Kmita⁵

43

Enhancers et marquages cellulaires

L'utilisation d'une séquence enhancer avec un promoteur et un gène rapporteur montre où et quand cet enhancer est actif, en regardant où et quand le gène rapporteur est exprimé...



⚠ Mais, ce système ne nous montre pas ce que ces cellules vont devenir, ce qu'elles vont donner plus tard lorsque la séquence enhancer ne fonctionnera plus... (car alors la fluorescence (le gène rapporteur) ne sera plus visible....)

Il faut donc un système qui non seulement est visible lorsque la séquence enhancer fonctionne mais également dans les cellules descendantes dans lesquelles une séquence enhancer particulière s'est arrêtée de fonctionner 😊

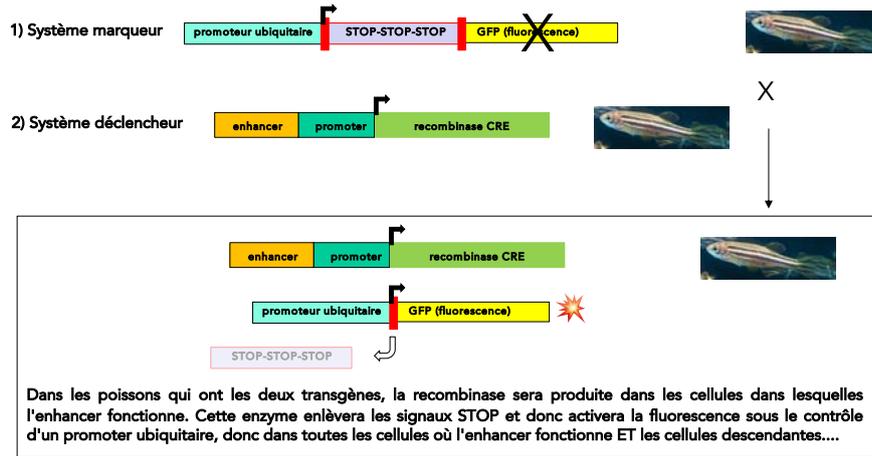
Système en deux composants qui active une recombinaison qui elle déclenche l'activation d'un gène rapporteur qui ne s'arrêtera pas.....

44

Enhancers et marquages des destins cellulaires

Site LoxP (petite séquence d'ADN reconnue par la recombinaise CRE. Le recombinaise délète (par recombinaison...) l'ADN localisé entre deux sites LoxP

*Promoteur ubiquitaire: promoteur qui fonctionne partout, dans toutes les cellules.. (par exemple les gènes qui codent pour des enzymes cellulaires etc....)



45

Enhancers et marquages cellulaires (destins)

LETTER

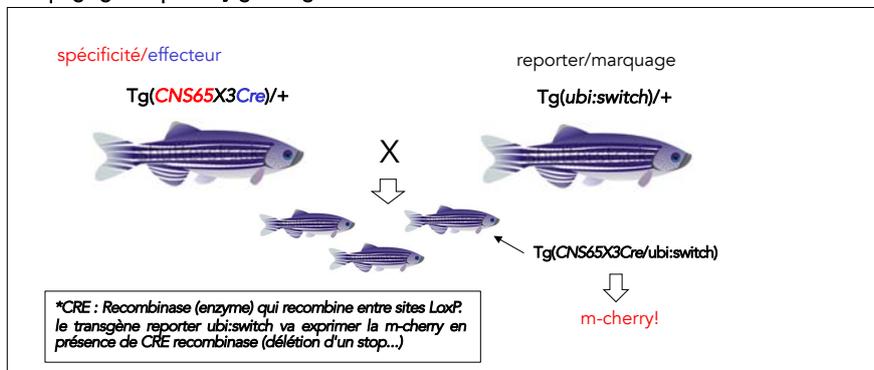
Digits and fin rays share common developmental histories

Tetsuya Nakamura^{1*}, Andrew R. Getchko^{2*}, Nathan Lemberg³, Julie Szymanski⁴ & Neil H. Shubin¹

8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

Chaque cellule dans laquelle l'enhancer **CNS65** (ou **e16**) est actif va produire de la recombinaise CRE. Cette recombinaise va rendre actif un transgène reporter qui va fabriquer de façon stable de la m-cherry fluorescente. Par conséquent, toutes les cellules descendantes de ces cellules initiales seront marquées.

Marquage génétique/ traçage de lignée cellulaire

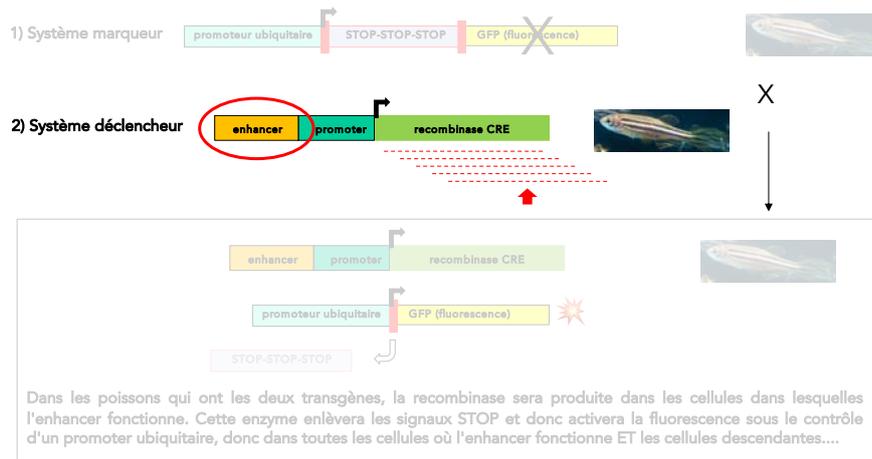


46

Enhancers et marquages des destins cellulaires

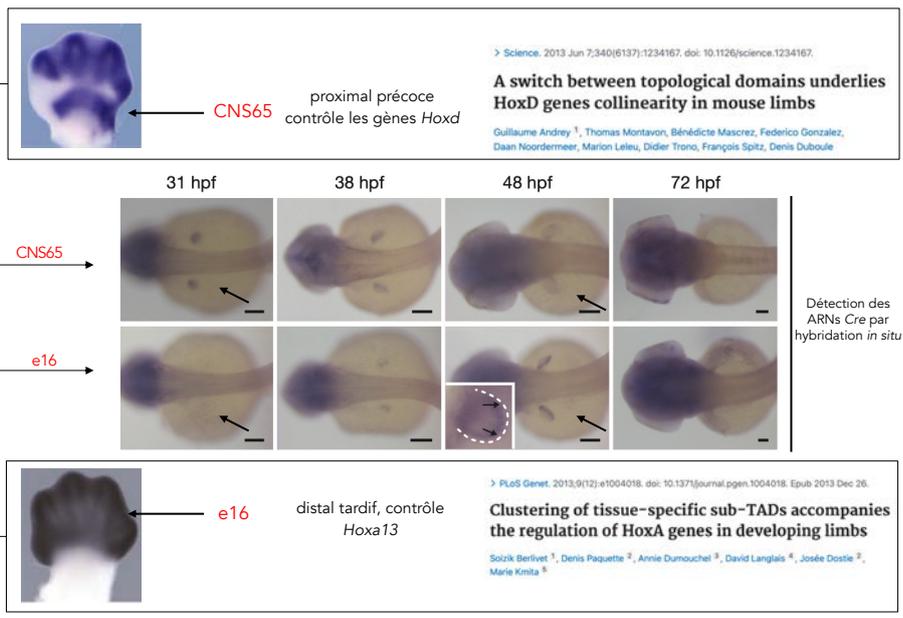
Site LoxP (petite séquence d'ADN reconnue par la recombinaise CRE. Le recombinaise délète (par recombinaison...) l'ADN localisé entre deux sites LoxP

*Promoteur ubiquitaire: promoteur qui fonctionne partout, dans toutes les cellules.. (par exemple les gènes qui codent pour des enzymes cellulaires etc....)



47

Enhancers et marquages cellulaires (destins)



48

Enhancers et marquages cellulaires (destins)

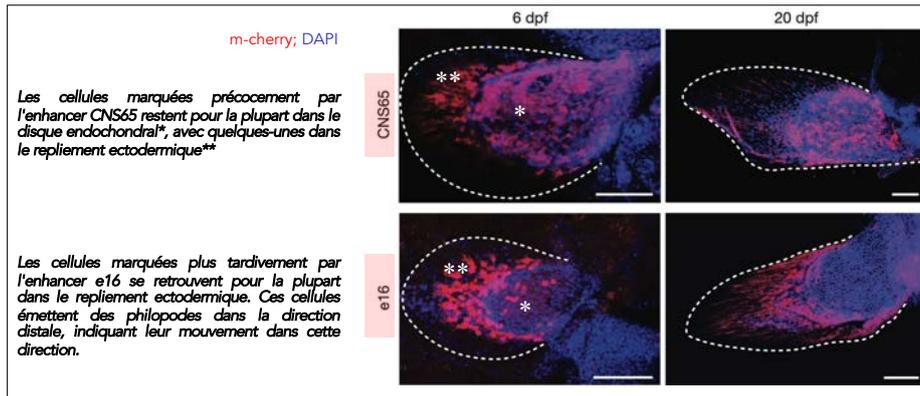
LETTER

Digits and fin rays share common developmental histories

Tetsuya Nakamura^{1*}, Andrew R. Gebauer^{1*}, Justin Lemberg¹, Julie Szymanski¹ & Neil H. Shubin¹

8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

Chaque cellule dans laquelle l'enhancer CNS65 (ou e16) est actif va produire de la recombinase CRE. Cette recombinase va rendre actif un transgène reporter qui va fabriquer de façon stable de la m-cherry fluorescente. Par conséquent, toutes les cellules descendantes de ces cellules initiales seront marquées.



49

Enhancers et marquages cellulaires (destins)

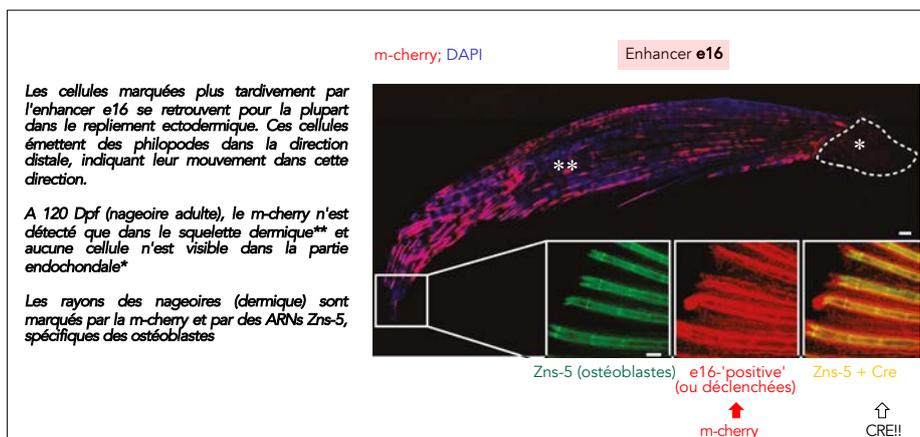
LETTER

Digits and fin rays share common developmental histories

Tetsuya Nakamura^{1*}, Andrew R. Gebauer^{1*}, Justin Lemberg¹, Julie Szymanski¹ & Neil H. Shubin¹

8 SEPTEMBER 2016 | VOL 537 | NATURE | 225

Chaque cellule dans laquelle l'enhancer CNS65 (ou e16) est actif va produire de la recombinase CRE. Cette recombinase va rendre actif un transgène reporter qui va fabriquer de façon stable de la m-cherry fluorescente. Par conséquent, toutes les cellules descendantes de ces cellules initiales seront marquées.



50