



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Collège de France; Chaire:
Evolution du Développement et des Génomes
Denis.Duboule@college-de-france.fr

Cours 2023: Les Temps du Développement Embryonnaire



@Duboule

@CdF1530

1



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Denis Duboule

Cours 2023: Les Temps du Développement Embryonnaire

Déroulé du cours

Cours #1: Introduction au cours et présentation des différents sujets abordés. Les différents temps du développement. Le temps des différenciations cellulaires; les cellules souches neurales –neuroblastes- de l'embryon de *Drosophila* et du système visuel des mouches. 'Identités temporelles'.

Cours #2: Le temps des différenciations cellulaires: Exemples des cellules souches neurales chez l'embryon et la larve de *Drosophila* et dans le système visuel (médulla). Progressions temporelles vers des types cellulaires différents, notion d'identité temporelle et comparaison avec les mammifères (suite et fin).

Cours #3: Horloge de segmentation, mécanisme moléculaire et évolution, systèmes *in vitro*.

Cours #4: Identification moléculaire et destin des somites, les gènes *Hox*, l'homéose, pseudo-embryons *in vitro* comme sujets d'études.

Cours #5: Le temps génomique; exemple du timer *Hox*, importance et mécanisme potentiel.

2



Cours 2023: Les Temps du Développement Embryonnaire

Cours #2, 23 mai 2023, 17h

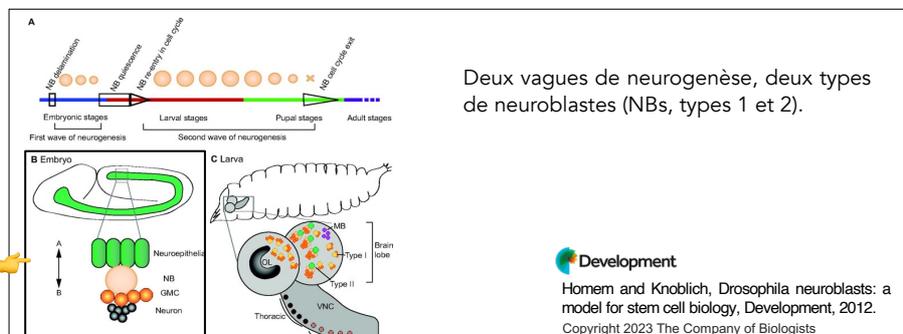
Cours #2: Le temps des différenciations cellulaires: Exemples de cellules souches neurales chez l'embryon et la larve de *Drosophila* et dans le système visuel (médulla). Progressions temporelles vers des types cellulaires différents, notion d'identité temporelle et comparaison avec les mammifères (suite et fin).

3



Résumé de l'épisode précédent

- *2 vagues de neurogenèse (embryon et larve)
- *Les neuroblastes dérivent du neuroépithélium (en vert)
- *Les neuroblastes se divisent de façon asymétrique pour donner:
 - *Un nouveau neuroblaste et une cellule GMC
 - *La cellule GMC se différencie en neurones ou en glie



4

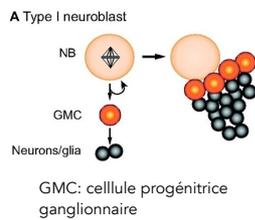


Résumé de l'épisode précédent

- *Publication fondatrice
- *Des facteurs de transcription sont activés dans chaque nouveau neuroblaste
- *En suivant toujours la même série...
- *Ces facteurs sont maintenus dans les cellules GMC et descendantes

Cell. Vol. 106, 511-521, August 24, 2001, Copyright ©2001 by Cell Press 2001
Drosophila Neuroblasts Sequentially Express Transcription Factors which Specify the Temporal Identity of Their Neuronal Progeny
 Takako Isshiki, Bret Pearson, Scott Holbrook, and Chris Q. Doe¹

Question: quels sont les facteurs (gènes) qui déterminent les identités des GMC à leurs naissances et des neurones qu'elles produisent ensuite?



Les auteurs analysent une série de gènes codant pour des facteurs de transcription et qui semblent être exprimés dans des neurones de types différents (Hunchback, Hb, pdm, castor, cas et Krüpel, Kr).

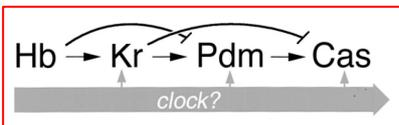
Hb → Kr → Pdm → Cas

5

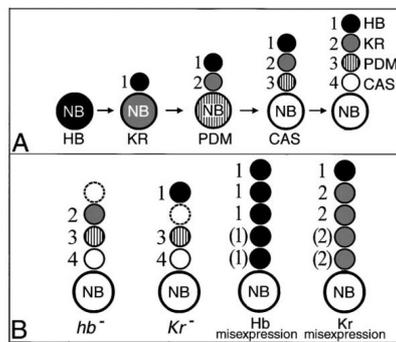


Résumé de l'épisode précédent

- *Un schéma d'épistasie est proposé pour cette série de FTs
- *Vérification par l'approche génétique (gain et perte de fonction)
- *Schéma partiellement vérifié mais effets assez faibles
- *Conc: Une autre horloge (mitotique) doit se superposer



On voit que les résultats ne matchent pas complètement le modèle proposé (mentionné par les auteurs eux-mêmes.), car même les mutations nulles n'empêchent pas le déroulement de l'activation séquentielle (contrairement aux gains de fonctions)



6



Résumé de l'épisode précédent

*Conclusions des auteurs

*Conclusion: l'observation originale reste l'élément fondateur de ce type de référentiel temporel. Les conclusions sur les mécanismes génétiques et sur la nécessité d'une horloge complémentaire sont peut-être moins claires aujourd'hui.

Conclusions de l'étude

Ce modèle propose que chaque gène active le gène suivant et réprime le suivant. 'Néanmoins, ces interactions ne sont pas nécessaires pour dérouler une activation temporelle car des mutations dans ces gènes ne supprime pas cette activation séquentielle (elles l'altèrent légèrement). Ainsi, un mécanisme relié et indépendant doit exister en coordination avec le cycle cellulaire.' (car chaque division cellulaire 'fixe' l'expression dans un neuroblaste précis).

We conclude that a cell cycle-dependent "clock" is required to drive the transitions in Hb → Kr → Pdm → Cas gene expression (gray arrows in Figure 6L).

We favor a model in which the timing of Hb → Pdm → Cas expression is regulated primarily by a cell cycle-dependent clock but also by regulation within the Hb → Kr → Pdm → Cas pathway.

! ...mais, voir plus loin...



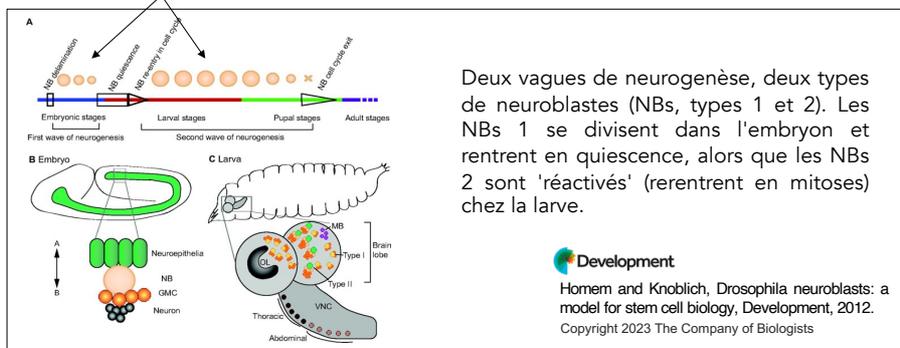
Régulation temporelle de la diversité des neurones pendant le développement du système nerveux chez *Drosophila*

Neuroblastes de *Drosophila*

Les Neuroblastes sont les cellules souches précurseurs (progénitrices) des neurones du système nerveux de la mouche *Drosophila*.

Deux vagues de neurogenèse, embryonnaire et larvaire

tailles des neuroblastes!



Deux vagues de neurogenèse, deux types de neuroblastes (NBs, types 1 et 2). Les NBs 1 se divisent dans l'embryon et rentrent en quiescence, alors que les NBs 2 sont 'réactivés' (reentrent en mitoses) chez la larve.



Homem and Knoblich, *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology, Development, 2012. Copyright 2023 The Company of Biologists

Denis Duboule/2023 Les Temps du Développement Embryonnaire

A la fin du stade embryonnaire, les NBs expriment **Cas** et rentrent en quiescence. Chez la larve, lors de la réactivation de la division, les NBs de la VNC réexpriment **Svp** puis d'autres facteurs non-encore identifiés (X)

*Dans le mutant **Svp**, **Cas** n'est pas éteint et les divisions continuent

A

B

Embryonic stages Larval stages Pupal stages

Key Hb (red) Svp (yellow) Kr (green) Pdm (cyan) Cas (blue)

Svp est un facteur de transcription de type récepteur nucléaire (hormones stéroïdes etc...ligand ?)

Development
 Homem and Knoblich, *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology, *Development*, 2012.
 Copyright 2023 The Company of Biologists

9

Denis Duboule/2023 Les Temps du Développement Embryonnaire

Une 'stratégie' similaire à l'œuvre pendant le développement du système visuel

ARTICLE 2013 doi:10.1038/nature12319

Temporal patterning of *Drosophila* medulla neuroblasts controls neural fates

Xin Li^{1*}, Ted Erdik^{2*}, Claire Bertel¹, Zhenqing Chen¹, Roumen Voutev², Srinidhi Venkatesh¹, Javier Morante¹, Arzu Celik¹ & Claude Desplan¹

Dans le lobe optique, la medulla processe l'information visuelle provenant des photorécepteurs...[...] **La medulla contient app 40'000 neurones appartenant à app 70 types différents....'**

In the *Drosophila* optic lobes, the medulla processes visual information coming from inner photoreceptors R7 and R8 and from lamina neurons. It contains approximately 40,000 neurons belonging to more than 70 different types. Here we describe how precise temporal patterning of neural progenitors generates these different neural types. Five transcription factors—Homothorax, Eyeless, Sloppy paired, Dichaete and Tailless—are sequentially expressed in a temporal cascade in each of the medulla neuroblasts as they age. Loss of Eyeless, Sloppy paired or Dichaete blocks further progression of the temporal sequence. We provide evidence that this temporal sequence in neuroblasts, together with Notch-dependent binary fate choice, controls the diversification of the neuronal progeny. Although a temporal sequence of transcription factors had been identified in *Drosophila* embryonic neuroblasts, our work illustrates the generality of this strategy, with different sequences of transcription factors being used in different contexts.

"Bien qu'une séquence temporelle de facteurs de transcription ait été identifiée dans les neuroblastes embryonnaires de *Drosophila*, notre travail illustre la généralité de cette stratégie, avec différentes séquences de FTs utilisées dans des contextes différents..."

10



Une 'stratégie' similaire à l'œuvre pendant le développement du système visuel

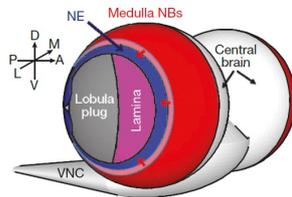
ARTICLE

2013 doi:10.1038/nature12319

Temporal patterning of *Drosophila* medulla neuroblasts controls neural fates

Xin Li^{1*}, Ted Eickbush^{2*}, Claire Bertet¹, Zhenqing Chen¹, Roumen Vouret³, Srinidhi Venkatesh¹, Javier Morante¹, Arzu Celik^{1†} & Claude Desplan¹

In the *Drosophila* optic lobes, the medulla processes visual information coming from inner photoreceptors R7 and R8 and from lamina neurons. It contains approximately 40,000 neurons belonging to more than 70 different types. Here we describe how precise temporal patterning of neural progenitors generates these different neural types. Five transcription factors—Homothorax, Eyeless, Sloppy paired, Dichaete and Tailless—are sequentially expressed in a temporal cascade in each of the medulla neuroblasts as they age. Loss of Eyeless, Sloppy paired or Dichaete blocks further progression of the temporal sequence. We provide evidence that this temporal sequence in neuroblasts, together with Notch-dependent binary fate choice, controls the diversification of the neuronal progeny. Although a temporal sequence of transcription factors had been identified in *Drosophila* embryonic neuroblasts, our work illustrates the generality of this strategy, with different sequences of transcription factors being used in different contexts.



Medulla (une partie du lobe optique): app 40'000 neurones; 70 types différents...à partir de 800 NBs

Figure 1 | The developing medulla. a, Model of a larval brain showing that the neuroepithelium (blue) gives rise to the lamina on the lateral (L) side and to the medulla on the medial (M) side. A wave of neurogenesis (light red) converts neuroepithelium (NE) cells (blue) into neuroblasts (NBs) (red). A, anterior; D, dorsal; P, posterior; V, ventral; VNC, ventral nerve cord

NE: neuroépithélium; NBs: Neuroblasts



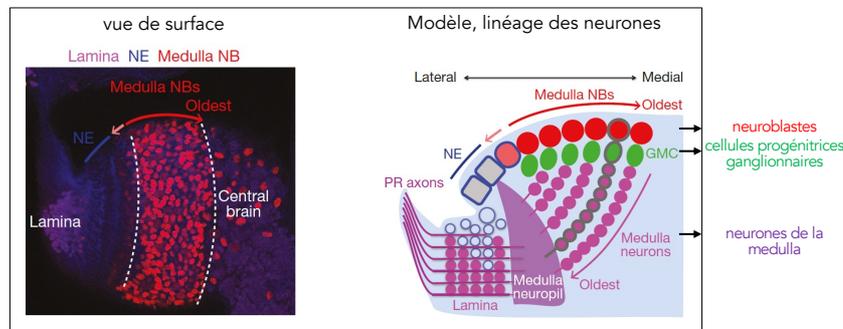
Une 'stratégie' similaire à l'œuvre pendant le développement du système visuel

ARTICLE

2013 doi:10.1038/nature12319

Temporal patterning of *Drosophila* medulla neuroblasts controls neural fates

Xin Li^{1*}, Ted Eickbush^{2*}, Claire Bertet¹, Zhenqing Chen¹, Roumen Vouret³, Srinidhi Venkatesh¹, Javier Morante¹, Arzu Celik^{1†} & Claude Desplan¹



○ : exemple du développement d'un clone



Une 'stratégie' similaire à l'œuvre pendant le développement du système visuel

ARTICLE

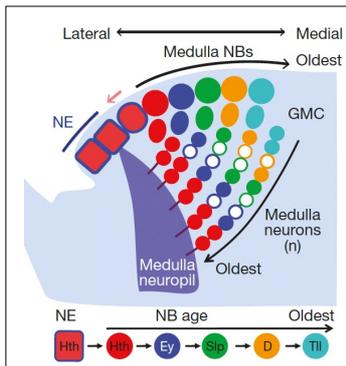
2013

doi:10.1038/nature12219

Temporal patterning of *Drosophila* medulla neuroblasts controls neural fates

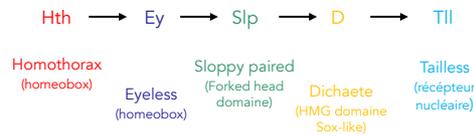
Xin Li^{1*}, Ted Eickbush^{1*}, Claire Berret¹, Zhenqiang Chen¹, Roumen Vostatev², Srinidhi Venkatesh¹, Javier Morante^{1*}, Arzu Gökbiç^{1*} & Claude Desplan^{1*}

Larve 3 (L3)



We found that five transcription factors, Homothorax (Hth), Eyeless (Ey), Sloppy paired 1 and 2 (Slp), Dichaete (D) and Tailless (Tll), are sequentially expressed in medulla neuroblasts as they age.

Le même déroulement successif dans l'activation temporelle de facteurs de transcription, mais les identités de ces facteurs sont différentes de celles des facteurs impliqués dans le CNS de l'embryon.



13



Séquençage d'ARNs de cellules uniques (scRNA-seq):
Une 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.

- *Equivalence génomique (les cellules ont le même génome)
- *Non-équivalence des transcriptomes (ensemble des ARNs d'un échantillon biologique)
- *Séquençage en 'batch' (tissue, culture de cellules, organisme): Mélange des ARNs
- *Identité cellulaire par le transcriptome de la cellule unique

Q: Comment séquencer de l'ARN?

Q: Comment séquencer les ARNs d'une cellule unique?

14



La fabrication d'un ADN (double brin) à partir d'un ARN (simple brin)

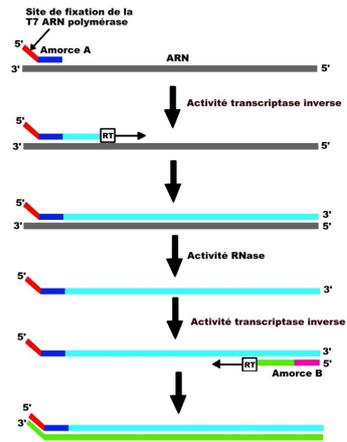
La clé: une enzyme, la transcriptase inverse:

La transcriptase inverse ou rétrotranscriptase (en anglais reverse transcriptase ou encore RT) est une enzyme utilisée par les rétrovirus et les rétrotransposons qui transcrivent l'information génétique des virus ou rétrotransposons de l'ARN en ADN, qui peut s'intégrer dans le génome de l'hôte.

Wikipedia
https://fr.wikipedia.org/wiki/Transcriptase_inverse

- ARN simple brin, avec une amorce (multiples séquences..)
- Transcription inverse, ADN simple brin
- Élimination de l'ARN par digestion enzymatique
- Fabrication du brin d'ADN complémentaire

microbiologiemedicale.fr



Séquençage!

Amplification par PCR, 10^x copies d'ADN

15



La fabrication d'un ADN (double brin) à partir d'un ARN (simple brin)

La clé: une enzyme, la transcriptase inverse:

La transcriptase inverse ou rétrotranscriptase (en anglais reverse transcriptase ou encore RT) est une enzyme utilisée par les rétrovirus et les rétrotransposons qui transcrivent l'information génétique des virus ou rétrotransposons de l'ARN en ADN, qui peut s'intégrer dans le génome de l'hôte.

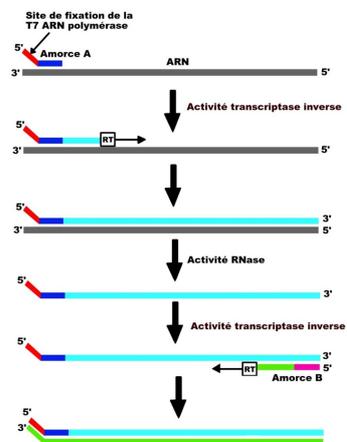
Wikipedia
https://fr.wikipedia.org/wiki/Transcriptase_inverse



*Il faut une certaine quantité d'ARNs/cellule pour pouvoir passer au travers de cette procédure. Donc seul un certain % des ARNs (les plus abondants) seront séquencés *in fine*...

*Le nombre de séquences (reads) obtenues pour un ARN sera fonction de sa concentration dans les cellules de départ (donc un aspect quantitatif...)

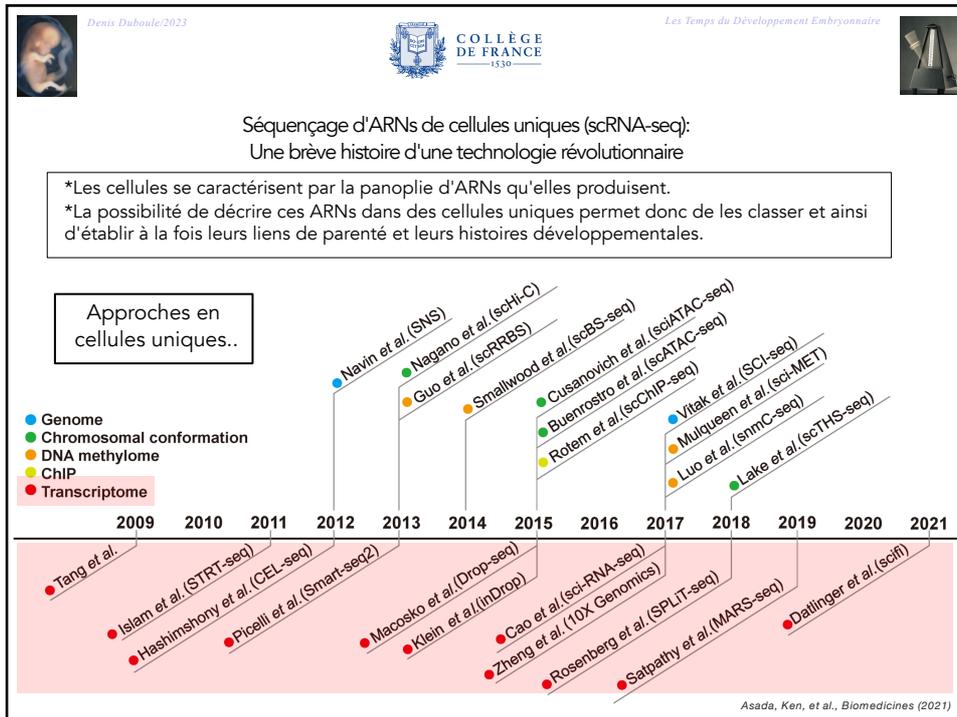
microbiologiemedicale.fr



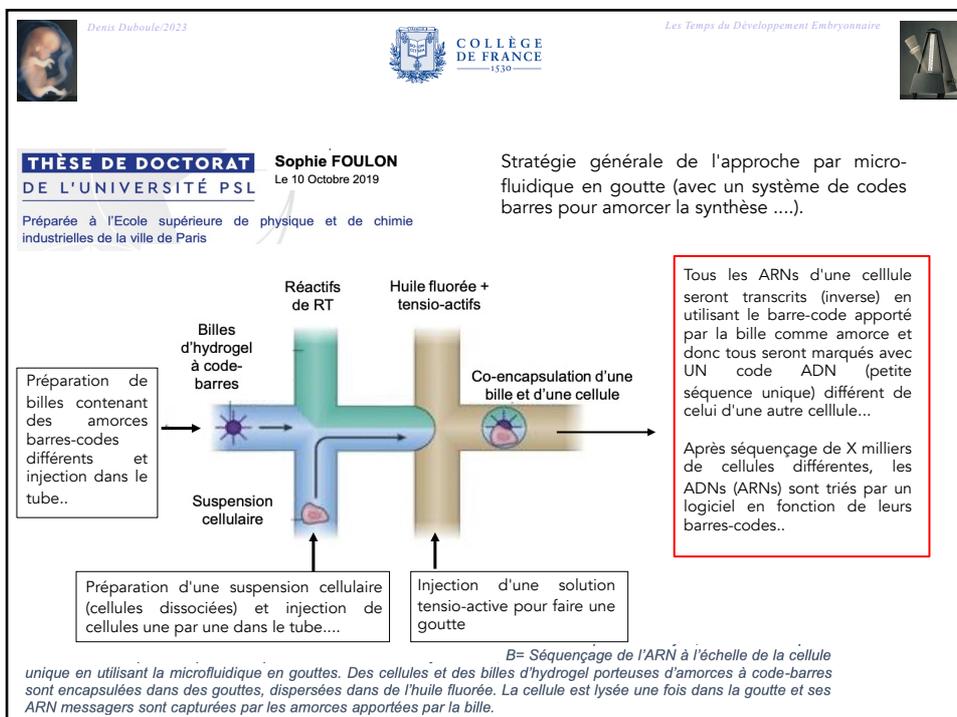
Séquençage!

Amplification par PCR, 10^x copies d'ADN

16



17



18

Denis Duboule/2023

COLLÈGE DE FRANCE

Les Temps du Développement Embryonnaire

Developmental Cell

Available online 14 March 2023

In Press, Corrected Proof

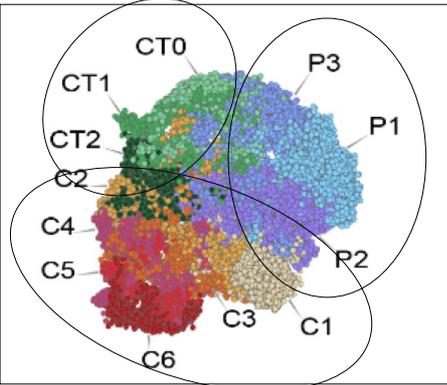
Article
 A single-cell census of mouse limb development identifies complex spatiotemporal dynamics of skeleton formation

Svetlana Markman^{1,2}, Mor Zada^{2,3}, Eyal David², Amir Giladi², Ido Amit^{2,4}, et al.
 Elazar Zehor^{1,4,5}, et al.

Un exemple simple: Une fenêtre dans le développement des membres mammifère

*scRNAseq de bourgeons de membres de souris se développant, entre les jours 10.5 et 14.5

*Chaque point représente une cellule. Les points de même couleur représentent des cellules qui globalement partagent leurs ARNs et sont donc comparables. Ces cellules se regroupent en 'clusters'.



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

19

Denis Duboule/2023

COLLÈGE DE FRANCE

Les Temps du Développement Embryonnaire

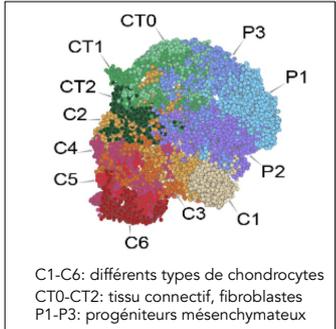
Developmental Cell

Available online 14 March 2023

In Press, Corrected Proof

Article
 A single-cell census of mouse limb development identifies complex spatiotemporal dynamics of skeleton formation

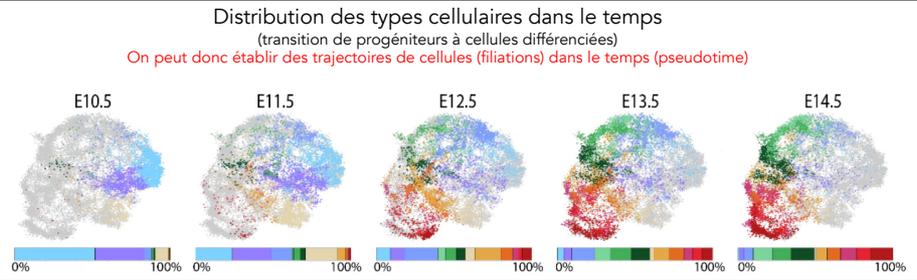
Svetlana Markman^{1,2}, Mor Zada^{2,3}, Eyal David², Amir Giladi², Ido Amit^{2,4}, et al.
 Elazar Zehor^{1,4,5}, et al.



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)

On peut donc établir des trajectoires de cellules (filialions) dans le temps (pseudotime)



E10.5 E11.5 E12.5 E13.5 E14.5

0% 100% 0% 100% 0% 100% 0% 100% 0% 100%

20



Inférence de trajectoires et 'pseudotimes'

De très nombreux logiciels existent qui reconstituent les trajectoires cellulaires à partir de datasets obtenus par séquençage d'ARN de cellules uniques. Ces logiciels permettent également de déterminer un 'pseudotime' pour les apparitions des types cellulaire.



Une définition

Inférence de trajectoires et 'pseudotimes'

Advanced Single-Cell Analysis with Bioconductor

Authors: Robert Amezquita [aut], Aaron Lun [aut, cre], Stephanie Hicks [aut], Raphael Gottardo [aut]

Version: 1.2.1

Modified: 2021-11-08

Compiled: 2021-11-12

Environment: R version 4.1.2 (2021-11-01), Bioconductor 3.14

License: CC BY 4.0

Copyright: Bioconductor, 2021

Source: <https://github.com/OSCA-source/OSCA.advanced>

Many biological processes manifest as a continuum of dynamic changes in the cellular state. The most obvious example is that of differentiation into increasingly specialized cell subtypes, but we might also consider phenomena like the cell cycle or immune cell activation that are accompanied by gradual changes in the cell's transcriptome. We characterize these processes from single-cell expression data by identifying a "trajectory", i.e., a path through the high-dimensional expression space that traverses the various cellular states associated with a continuous process like differentiation. In the simplest case, a trajectory will be a simple path from one point to another, but we can also observe more complex trajectories that branch to multiple endpoints.

The "pseudotime" is defined as the positioning of cells along the trajectory that quantifies the relative activity or progression of the underlying biological process. For example, the pseudotime for a differentiation trajectory might represent the degree of differentiation from a pluripotent cell to a terminal state where cells with larger pseudotime values are more differentiated. This metric allows us to tackle questions related to the global population structure in a more quantitative manner. The most common application is to fit models to gene expression against the pseudotime to identify the genes responsible for generating the trajectory in the first place, especially around interesting branch events.

 Denis Duboule/2023  COLLÈGE DE FRANCE 1530 Les Temps du Développement Embryonnaire 

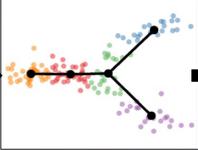
Inférence de trajectoires et 'pseudotimes'

De très nombreux logiciels existent qui reconstituent les trajectoires cellulaires à partir de datasets obtenus par séquençage d'ARN de cellules uniques. Ces logiciels permettent également de déterminer un 'pseudotime' pour les apparitions des types cellulaire.

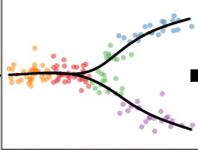
Exemple du logiciel *Slingshot* et d'une expérience de scRNAseq à partir d'épithélium olfactif à des temps différents



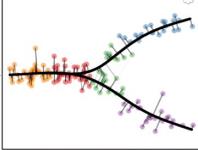
Clustering des cellules par comparaison de leurs ARNs principaux.



Construction d'un arbre minimum qui donne le nombre de branchements et de lignées.



Les trajectoires pour chaque lignée sont affinées (smoothing).



Les valeurs relatives de pseudotime sont données par projections orthogonales des cellules sur la trajectoire.

 Kelly Street, Davide Rizzo, Russel B. Fletcher, Diya Das, John Ngai, Nir Yosef, Elizabeth Purdom, Sandrine Dudoit - <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-4772-0>

23

 Denis Duboule/2023  COLLÈGE DE FRANCE 1530 Les Temps du Développement Embryonnaire 

Inférence de trajectoires et 'pseudotimes'

De très nombreux logiciels existent qui reconstituent les trajectoires cellulaires à partir de datasets obtenus par séquençage d'ARN de cellules uniques. Ces logiciels permettent également de déterminer un 'pseudotime' pour les apparitions des types cellulaire.

Trajectoires des cellules souches de l'épithélium olfactif (en 3D)

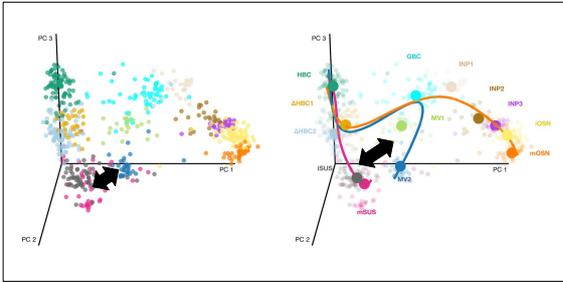
Cell Stem Cell

Volume 20, Issue 6, 1 June 2017, Pages 817-830.e8

Article

Deconstructing Olfactory Stem Cell Trajectories at Single-Cell Resolution

Russell B. Fletcher^{1,2}, Diya Das^{1,2}, Levi Gadye², Kelly N. Street^{1,2}, Ariane Bauzhan¹, Allison Wagner^{1,2}, Michael B. Cook^{1,2}, Quentin Flores¹, Soon-Gi Choi^{1,2}, Nir Yosef^{1,2}, Elizabeth Purdom^{1,2}, Sandrine Dudoit^{1,2}, Davide Rizzo^{1,2}, John Ngai^{1,2,3,4} 



24

Denis Duboule/2023

COLLÈGE DE FRANCE

Les Temps du Développement Embryonnaire

Article

A complete temporal transcription factor series in the fly visual system

https://doi.org/10.1038/s41586-022-04564-w
 Received: 24 February 2021
 Accepted: 18 February 2022
 Published online: 6 April 2022

Nikolaos Konstantinides^{1,2,3,4,5}, Isabel Holguera^{1,2}, Anthony M. Rossi^{1,2,3}, Aristides Escobar¹, Liébaud Doubragne¹, Yoo-Chang Chen¹, Thinh N. Tran¹, Azalia M. Martinez Jimenez¹, Mehmet Nasser Ouzf¹, Felix Simon¹, Zhiping Shao¹, Nadejda M. Tsankova¹, John F. Fullard¹, Uwe Walldorf¹, Panos Roussos^{1,2} & Claude Desplan^{1,2,3,4,5}

316 | Nature | Vol 604 | 14 April 2022

Résumé

The brain consists of thousands of neuronal types that are generated by stem cells producing different neuronal types as they age. In *Drosophila*, this temporal patterning is driven by the successive expression of temporal transcription factors (tTFs)¹⁻⁶. Here we used single-cell mRNA sequencing to identify the complete series of tTFs that specify most *Drosophila* optic lobe neurons. We verify that tTFs regulate the progression of the series by activating the next tTF(s) and repressing the previous one(s), and also identify more complex mechanisms of regulation. Moreover, we establish the temporal window of origin and birth order of each neuronal type in the medulla and provide evidence that these tTFs are sufficient to explain the generation of all of the neuronal diversity in this brain region. Finally, we describe the first steps of neuronal differentiation and show that these steps are conserved in humans. We find that terminal differentiation genes, such as neurotransmitter-related genes, are present as transcripts, but not as proteins, in immature larval neurons. This comprehensive analysis of a temporal series of tTFs in the optic lobe offers mechanistic insights into how tTF series are regulated, and how they can lead to the generation of a complete set of neurons.

Utilisation de scRNAseq pour identifier toute la série de facteurs de transcription (TFs) qui spécifient la plupart des neurones du lobe optique de *Drosophila*.

Vérification par des approches génétiques que ces TFs régulent la progression de la série en activant le prochain facteur et en réprimant celui d'avant (en plus d'autres mécanismes de régulations complexes).

Nous établissons les fenêtres temporelles de l'origine et de l'ordre de naissance de chaque sous-type neuronal dans la medulla et montrons que ces TFs suffisent à expliquer la génération de la diversité neuronale dans cette région du cerveau.

25

Denis Duboule/2023

COLLÈGE DE FRANCE

Les Temps du Développement Embryonnaire

Article

A complete temporal transcription factor series in the fly visual system

https://doi.org/10.1038/s41586-022-04564-w
 Received: 24 February 2021
 Accepted: 18 February 2022
 Published online: 6 April 2022

Nikolaos Konstantinides^{1,2,3,4,5}, Isabel Holguera^{1,2}, Anthony M. Rossi^{1,2,3}, Aristides Escobar¹, Liébaud Doubragne¹, Yoo-Chang Chen¹, Thinh N. Tran¹, Azalia M. Martinez Jimenez¹, Mehmet Nasser Ouzf¹, Felix Simon¹, Zhiping Shao¹, Nadejda M. Tsankova¹, John F. Fullard¹, Uwe Walldorf¹, Panos Roussos^{1,2} & Claude Desplan^{1,2,3,4,5}

316 | Nature | Vol 604 | 14 April 2022

Cycle de *Drosophila melanogaster*

Larve 3 (L3)

Lamina differentiation, Neuroepithelium, Lamina LPCs, Medulla differentiation, Medulla neuropil, Neuroblasts, Neurons

Larve 3; lobe optique

NE, Medulla NBs, Central vrain, Lobula plug, Lamina, VNC

D, V, M, L, P, A

26

Denis Duboule/2023

COLLÈGE DE FRANCE

Les Temps du Développement Embryonnaire

Article

A complete temporal transcription factor series in the fly visual system

https://doi.org/10.1038/s41586-022-04564-w
 Received: 24 February 2021
 Accepted: 18 February 2022
 Published online: 6 April 2022

Nikolaos Konstantinides^{1,2,3,4,5}, Isabel Holguera^{6,7}, Anthony M. Rossi^{8,9}, Aristides Escobar¹, Liabaud Doubragne¹⁰, Yoo-Chang Chee¹¹, Thinh N. Tran¹², Azalia M. Martinez Jimenez¹³, Mehmet Nasser Ozturk¹⁴, Felix Simon¹⁵, Zhipeng Shao¹⁶, Nadejda M. Tsankova¹⁷, John F. Fullard¹⁸, Uwe Walldorf¹⁹, Panos Roussos²⁰ & Claude Desplan²¹

316 | Nature | Vol 604 | 14 April 2022

***Mi-larve 3 et pupaison précoce combinés**
 * 70'000 cellules

***Différenciation vers la medulla (flèche noire)**

***Le passage de NB vers les cellules progénitrices ganglionnaires (GMC) forme un sablier (réduction de la diversité des ARNs).**

***Egalement observé à la transition entre NE et NB (flèches rouges)**

UMAP: 'Uniform Manifold Approximation and Projection' (une façon condensée de représenter des similarités)
<https://github.com/mcinnis/umap>

27

Denis Duboule/2023

COLLÈGE DE FRANCE

Les Temps du Développement Embryonnaire

Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell and Developmental Biology

ELSEVIER journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcdev

Review

Temporal regulation of neural diversity in *Drosophila* and vertebrates

Rana N. El-Danaf^{1,2,3}, Raghuvanshi Rajesh^{4,5}, Claude Desplan^{1,2,3,4,5}

2023

Génération des types cellulaires neuronaux (et glie) dans le système visuel de la mouche (rappel), analyse par scRNAseq. Séquence temporelle de FTs.

28



Article

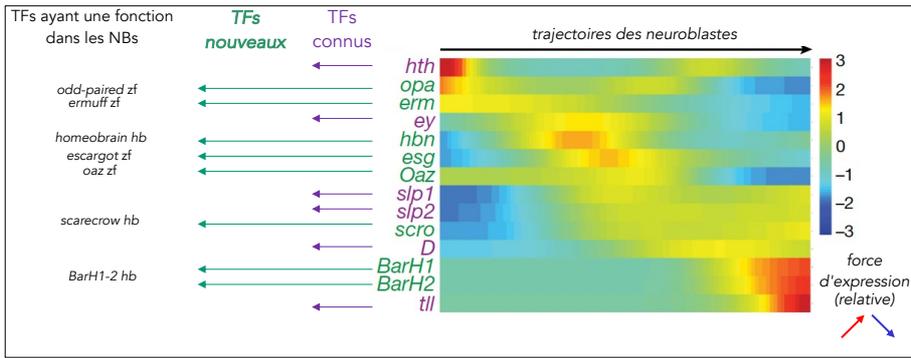
A complete temporal transcription factor series in the fly visual system

https://doi.org/10.1038/s41586-022-04564-w
Received: 24 February 2021
Accepted: 18 February 2022
Published online: 6 April 2022

316 | Nature | Vol 604 | 14 April 2022

On peut donc placer les cellules sur ces trajectoires en inférant le temps d'apparition (pseudotime) des NB exprimant des signatures de TFs différentes...

Ce qui permet la découverte d'une série de nouveaux TFs pour compléter ceux déjà connus et ainsi en avoir une liste exhaustive



29

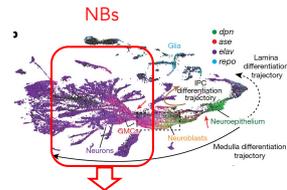


Article

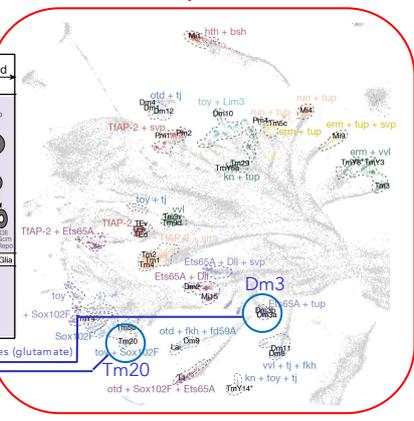
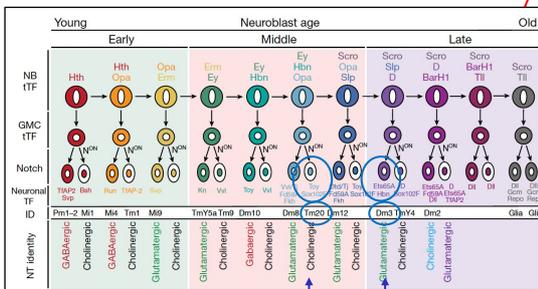
A complete temporal transcription factor series in the fly visual system

https://doi.org/10.1038/s41586-022-04564-w
Received: 24 February 2021
Accepted: 18 February 2022
Published online: 6 April 2022

316 | Nature | Vol 604 | 14 April 2022



11 'fenêtres temporelles' !



30

Denis Duboule/2023 Les Temps du Développement Embryonnaire

COLLÈGE DE FRANCE
— 1530 —

Article

A complete temporal transcription factor series in the fly visual system

https://doi.org/10.1038/s41586-022-04564-w
 Received: 24 February 2021
 Accepted: 18 February 2022
 Published online: 6 April 2022

Nikolaos Konstantinides^{1,2,3*}, Isabel Holguera^{3*}, Anthony M. Rossi^{3,4*}, Aristides Escobar¹, Liabaud Doubragne⁵, Yoo-Chang Chen⁶, Thinh N. Tran⁷, Azalia M. Martinez Jimenez⁸, Mehmet Nasser Oazi⁹, Felix Simons⁹, Zhiping Shao⁹, Nadejda M. Tsankova⁹, John F. Fullard⁴, Uwe Walldorf¹, Panos Roussos^{1,2*} & Claude Desplan^{3,10}

316 | Nature | Vol 604 | 14 April 2022

âge des neuroblastes

interaction positive
interaction négative

TFs nouveaux TFs connus

*Ces auteurs proposent que cette chaîne d'évènements et de boucles de régulation (épistasie) est suffisante pour expliquer le temps de génération des neuroblastes (et des neurones)

We have therefore identified most, if not all, tTFs in a developing neuronal system and show that these tTFs participate in the progression of the temporal series. We also confirmed many of these interactions by analysing the effect of tTF mis-expression on the temporal cascade

causalité?

31

Denis Duboule/2023 Les Temps du Développement Embryonnaire

COLLÈGE DE FRANCE
— 1530 —

Available online at www.nature.com/scientificopinion

ScienceDirect Current Opinion in Neurobiology

Principles of progenitor temporal patterning in the developing invertebrate and vertebrate nervous system
 Polina Oberst^{1,4}, Gulistan Agirman^{1,2,4} and Denis Jabaudon^{1,3}

Current Opinion in Neurobiology 2019, 56:185–193

2019

Temporal patterning in the mammalian cerebral cortex

As is the case in *Drosophila*, at least some neural progenitors in vertebrates also generate distinct neuronal subtypes over time.

Control of temporal transitions in APs

In contrast to the well-characterized temporal sequence of tTFs in *Drosophila*, the temporal transcriptional dynamics in mammalian cortical progenitors are still relatively poorly described with only few genes identified so far. Cortical progenitors express the transcription factor well studied in the mouse neocortex. The neocortex is organized in six layers, each enriched in specific subtypes of neurons with distinct molecular identities, morphologies, and connectivity [19,20]. In the developing neocor-

Dans le cortex (le pallium dorsal), les neurones glutamatergiques sont générés par vagues successives, qui vont former 6 couches de neurones dans le néocortex adulte.

Embryo Adult

Neurogenesis Gliogenesis

II/III I/II Superficial layers

IV IV

V V Deep layers

VI VI

SVZ IP

VZ AP

Developmental time

AP: Progéniteurs apicaux
 IP: Progéniteurs intermédiaires
 VZ: Zone ventriculaire
 SVZ: Zone sub-ventriculaire
 LV: Ventricules latéraux

32

Denis Duboule/2023

COLLÈGE DE FRANCE

Les Temps du Développement Embryonnaire

Seminars in Cell and Developmental Biology

Temporal regulation of neural diversity in *Drosophila* and vertebrates

Rana N. El-Danaf^{1,2,3}, Raghuvanshi Rajesh^{1,2}, Claude Desplan^{1,2,3,4}

2023

Cascades temporelles de facteurs de transcription: similarités entre la mouche et la rétine des mammifères.

Plusieurs paires de gènes 'orthologues' existent entre la VNC de la mouche et la rétine de la souris.

33

Denis Duboule/2023

COLLÈGE DE FRANCE

Les Temps du Développement Embryonnaire

Seminars in Cell and Developmental Biology

Temporal regulation of neural diversity in *Drosophila* and vertebrates

Rana N. El-Danaf^{1,2,3}, Raghuvanshi Rajesh^{1,2}, Claude Desplan^{1,2,3,4}

2023

Un mécanisme similaire de patterning temporel par TFs est observé pendant le développement de la rétine de la souris, avec des trajectoire comparables de spécifications des neurones (analyse par scATAC-seq).

Organisation (repliements multiples) de l'ADN (chromatine) dans le noyau

Job Dekker, Nancy Kleckner et collègues... source: Susan Mango

34

Denis Duboule/2023

COLLÈGE DE FRANCE

Les Temps du Développement Embryonnaire

Seminars in Cell and Developmental Biology

Review
Temporal regulation of neural diversity in *Drosophila* and vertebrates
Rana N. El-Danaf^{1,2}, Raghuvanshi Rajesh^{1,3}, Claude Desplan^{1,3,4,5*}
2023

Un mécanisme similaire de patterning temporel par TFs est observé pendant le développement de la rétine de la souris, avec des trajectoire comparables de spécifications des neurones (analyse par scATAC-seq).

L'approche ATAC globale (X milliers-ions de cellules)

CURRENT PROTOCOLS in Molecular Biology 2015
UNIT
ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide
Jason D. Buenrostro, Beijing Wu, Howard Y. Chang, William J. Greenleaf
First published: 05 January 2015 | https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2129s109 | Citations: 1,512

L'approche ATACseq mesure l'accessibilité à la chromatine, donc les endroits 'actifs' (là où des facteurs sont déposés, ou où la chromatine est modifiée etc..)

The diagram illustrates the ATAC-seq process. It starts with 'Closed chromatin' (tightly packed DNA) and 'Open chromatin' (loosely packed DNA). 'Tn5 transposase' (represented by blue arrows) is added, which inserts into the open chromatin regions. This is followed by 'Amplify and sequence'.

35

Denis Duboule/2023

COLLÈGE DE FRANCE

Les Temps du Développement Embryonnaire

Seminars in Cell and Developmental Biology

Review
Temporal regulation of neural diversity in *Drosophila* and vertebrates
Rana N. El-Danaf^{1,2}, Raghuvanshi Rajesh^{1,3}, Claude Desplan^{1,3,4,5*}
2023

Un mécanisme similaire de patterning temporel par TFs est observé pendant le développement de la rétine de la souris, avec des trajectoire comparables de spécifications des neurones (analyse par scATAC-seq).

L'approche ATAC globale (X milliers-ions de cellules)

CURRENT PROTOCOLS in Molecular Biology 2015
UNIT
ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide
Jason D. Buenrostro, Beijing Wu, Howard Y. Chang, William J. Greenleaf
First published: 05 January 2015 | https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2129s109 | Citations: 1,512

L'approche ATACseq mesure l'accessibilité à la chromatine, donc les endroits 'actifs' (là où des facteurs sont déposés, ou où la chromatine est modifiée etc..)

The GoldBio diagram shows the 'Tagmentation-based Library Prep' process. It starts with 'DNA and transposases' (represented by yellow and red structures). 'Transposases cut and ligate adapters to DNA fragments' (represented by blue structures). This is followed by 'PCR' and 'Sequencing'.

36

Denis Duboule/2023

COLLÈGE DE FRANCE

Les Temps du Développement Embryonnaire

Seminars in Cell and Developmental Biology

Review

Temporal regulation of neural diversity in *Drosophila* and vertebrates

Rana N. El-Danaf^{1,2,3}, Raghuvanshi Rajesh^{1,2}, Claude Desplan^{1,3,4,5}

¹Center for Genes and Systems Biology (CGSB), New York University Abu Dhabi, Abu Dhabi, United Arab Emirates
²Department of Biology, New York University, New York, NY 10003, USA

Un mécanisme similaire de patterning temporel par TFs est observé pendant le développement de la rétine de la souris, avec des trajectoire comparables de spécifications des neurones (analyse par scATAC-seq).

L'approche ATAC en cellules uniques

Amplification Purification, séquençage

10x Barcoded Gel Beads → Collect → Linear Amplification → Pool Remove Oil → 10x Barcoded Accessible DNA Fragments

Transposition of Nuclei in Bulk → Single Nucleus GEMs → 10x Barcoded Accessible DNA Fragments

Gel Beads in Emulsion (GEMs) → Fragments ADN barcodés

L'approche ATACseq en cellules uniques requiert l'association de noyaux uniques avec des billes barcodées (micro-fluidique)

institut Curie

37

Denis Duboule/2023

COLLÈGE DE FRANCE

Les Temps du Développement Embryonnaire

Cell Reports

Resource

Gene regulatory networks controlling temporal patterning, neurogenesis, and cell-fate specification in mammalian retina

2021

Pin Liu,^{1,2} Thanh Hoang,^{3,4,5} Clayton P. Santiago,^{4,5} Eric D. Thomas,² Andrew E. Timms,² Haley Appel,¹ Megan Gimmen,² Nguyen Lu,² Lizhi Jiang,² Dong Won Kim,² Siqi Chen,² David F. Espinoza,² Ariel E. Telger,² Kurt Weir,² Brian S. Clark,^{1,2} Timothy J. Cherny,^{1,2,3} Jiang Qian,^{1,2} and Seth Blackshaw^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,615,616,617,618,619,620,621,622,623,624,625,626,627,628,629,630,631,632,633,634,635,636,637,638,639,640,641,642,643,644,645,646,647,648,649,650,651,652,653,654,655,656,657,658,659,660,661,662,663,664,665,666,667,668,669,670,671,672,673,674,675,676,677,678,679,680,681,682,683,684,685,686,687,688,689,690,691,692,693,694,695,696,697,698,699,700,701,702,703,704,705,706,707,708,709,710,711,712,713,714,715,716,717,718,719,720,721,722,723,724,725,726,727,728,729,730,731,732,733,734,735,736,737,738,739,740,741,742,743,744,745,746,747,748,749,750,751,752,753,754,755,756,757,758,759,760,761,762,763,764,765,766,767,768,769,770,771,772,773,774,775,776,777,778,779,780,781,782,783,784,785,786,787,788,789,790,791,792,793,794,795,796,797,798,799,800,801,802,803,804,805,806,807,808,809,810,811,812,813,814,815,816,817,818,819,820,821,822,823,824,825,826,827,828,829,830,831,832,833,834,835,836,837,838,839,840,841,842,843,844,845,846,847,848,849,850,851,852,853,854,855,856,857,858,859,860,861,862,863,864,865,866,867,868,869,870,871,872,873,874,875,876,877,878,879,880,881,882,883,884,885,886,887,888,889,890,891,892,893,894,895,896,897,898,899,900,901,902,903,904,905,906,907,908,909,910,911,912,913,914,915,916,917,918,919,920,921,922,923,924,925,926,927,928,929,930,931,932,933,934,935,936,937,938,939,940,941,942,943,944,945,946,947,948,949,950,951,952,953,954,955,956,957,958,959,960,961,962,963,964,965,966,967,968,969,970,971,972,973,974,975,976,977,978,979,980,981,982,983,984,985,986,987,988,989,990,991,992,993,994,995,996,997,998,999,1000}

Un mécanisme similaire de patterning temporel par TFs est observé pendant le développement de la rétine de la souris, avec des trajectoire comparables de spécifications des neurones (analyse par scATAC-seq).

Trajectoires déterminées par scATAC-seq

Précoce Tardif

BC, Rod, Rod precursor, Cone, Cone precursor, AC/HC, RGC, Late NG, Early NG, MG, RPC S3, RPC S2, RPC S1

cellules neuroépithéliales

TF

Rod: Bâtonnets; AC/HC: cellules amacrines, horizontales; NG, progéniteurs neuronaux; RGC, cellules ganglionnaires rétinales; MG, cellules gliales; RPC, cellules progénitrices de la rétine; BC, cellules bipolaires.

38