



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



Cours 2023: Les Temps du Développement Embryonnaire

Cours #4, 6 juin 2023, 17h

Cours #4: L'horloge de segmentation, oscillateur cellulaire, front de détermination et différences de périodes (suite et fin). Introduction au 'timer Hox'.

2



Denis Duboule/2023

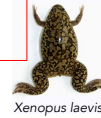


COLLÈGE
DE FRANCE
—1539—

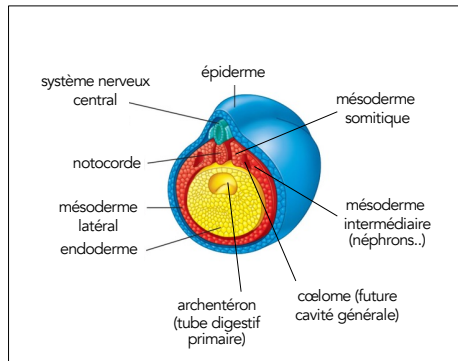
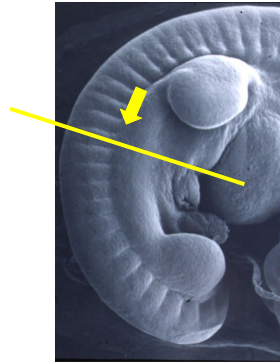
Les Temps du Développement Embryonnaire



Résumé de l'épisode précédent 1) Les somites se condensent à partir du mésoderme paraxial



Xenopus laevis



Biologie, Campbell, 8ème édition; Copyright 2008 Pearson education

3



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1539—

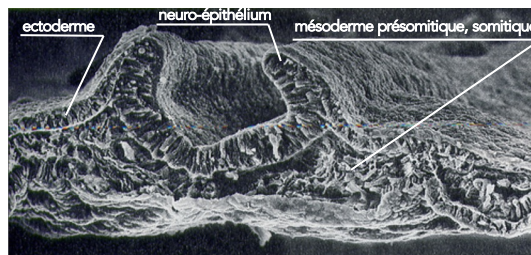
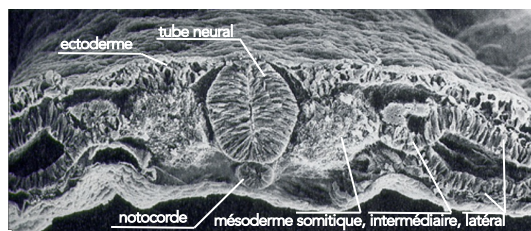
Les Temps du Développement Embryonnaire



Résumé de l'épisode précédent 2) Les somites se condensent à partir du mésoderme paraxial et donnent le sclérotome, le dermatome et le myotome



Gallus gallus



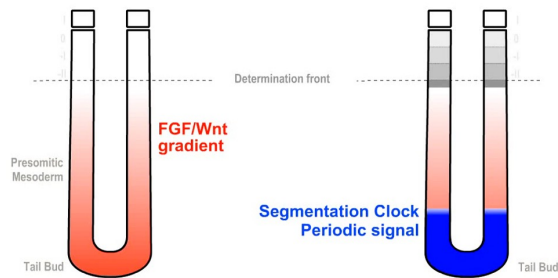
Pictures from: Developmental Biology, Scott Gilbert

4

L'Horloge de Segmentation

Cell, Vol. 91, 639-648, November 28, 1997, Copyright ©1997 by Cell Press

Avian *hairy* Gene Expression Identifies a Molecular Clock Linked to Vertebrate Segmentation and Somitogenesis



Source: O. Pourquié

Isabel Palmeirim,¹ Domingos Henrique,^{1,§}
David Ish-Horowicz,¹ and Olivier Pourquié^{1,§}
¹Institut d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire
du Centre National de la Recherche Scientifique
et du Collège de France
49 bis avenue de la Belle Gabrielle
94736 Nogent sur Marne Cedex
France
[†]Imperial Cancer Research Fund
PO Box 123, 44 Lincolns Inn Fields
London WC2A 3PX
United Kingdom
[‡]Developmental Biology Institute of Marseille (IBDM)
LGPD-UMR CNRS 6545 Campus
de Luminy - case 907
13288 Marseille cedex 9
France

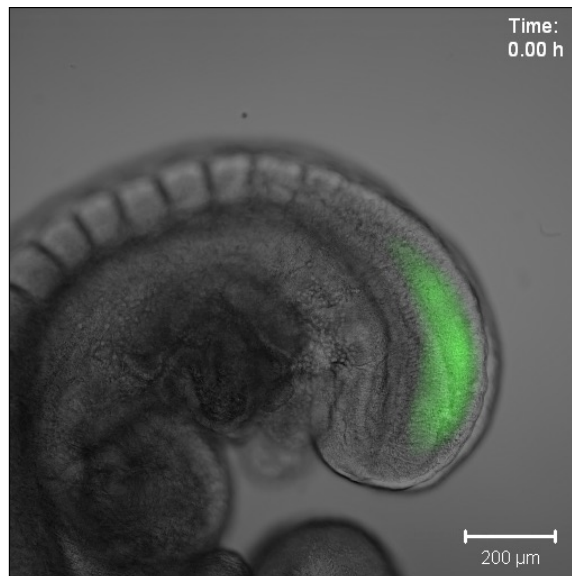
Gradient avec une
source postérieure,
fixant un 'front de
détermination'

Oscillateur moléculaire
intrinsèque aux
cellules

7

A beta-catenin gradient links the clock and wavefront systems in mouse embryo segmentation.

Aulehla A, Wiegand W, Baubet V, Wahl MB, Deng C, Taketo M, Lewandoski M, Pourquié O.
Nat Cell Biol. 2008 Feb;10(2):186-93. doi: 10.1038/ncb1679. Epub 2007 Dec 23.



8



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1539—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Résumé de l'épisode précédent 6) L'oscillateur résulte des interactions entre trois voies de signalisation

Signalling dynamics in vertebrate segmentation

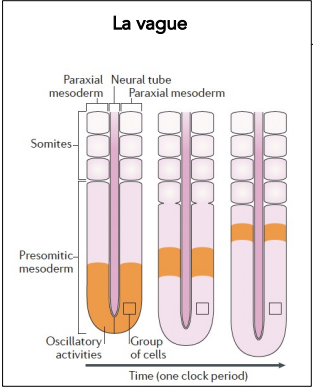
Alexis Hubaud^{1,2} and Olivier Pourquié^{1,2}

NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY

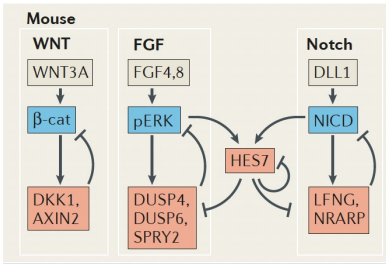
VOLUME 15 | NOVEMBER 2014 | 709

*La synchronisation des oscillateurs cellulaires et leur ralentissement le long du PSM donne l'impression visuelle d'une vague qui se condense antérieurement. Cette vague ne dépend pas de mouvements cellulaires

La vague



L'oscillateur



9



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1539—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Le 'wavefront' correspond à un gradient de ligands pour les voies *Fgf* (et *Wnt*)

Cell, Vol. 106, 219-232, July 27, 2001, Copyright ©2001 by Cell Press

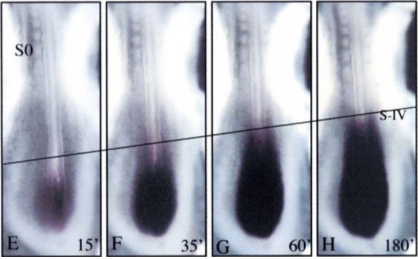
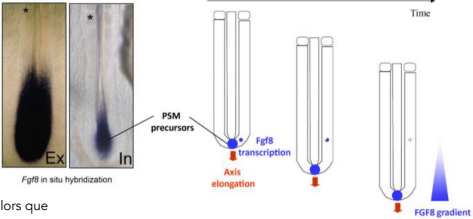
FGF Signaling Controls Somite Boundary Position and Regulates Segmentation Clock Control of Spatiotemporal *Hox* Gene Activation

Julien Dubrulle, Michael J. McGrew, and Olivier Pourquié¹ 2001

*Hybridation *in situ* de *Fgf8* mRNAs avec des temps de révélation différents, montrant la concentration différente de ces ARNs dans le PSM.

*Transcription intronique (In) révélant où les ARNs *Fgf8* sont fabriqués (dans les cellules progénitrices (en bleu)). Les ARNs sont alors transportés avec les cellules et disparaissent progressivement ('decay'). Plus une cellule sera 'antérieure', moins elle aura d'ARN *Fgf8*.

Transcription intronique: l'épissage des ARNs se fait dans le noyau alors que les mARNs 'matures' sont dans le cytoplasme...

10



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

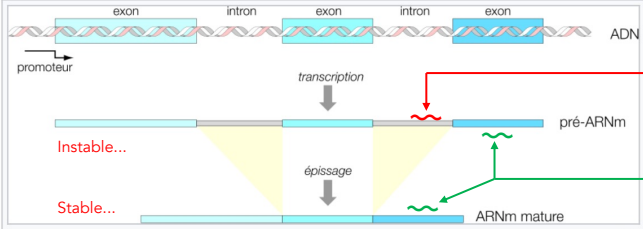
Les Temps du Développement Embryonnaire



Les gènes eucaryotes sont généralement 'épissés'

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Épissage>

Chez les **eucaryotes** (organismes à noyau), l'**épissage** est un processus par lequel les **ARN transcrits** à partir de l'**ADN** génomique peuvent subir des étapes de coupure et ligature qui conduisent à l'élimination de certaines régions dans l'ARN final. Les segments conservés s'appellent des **exons** et ceux qui sont éliminés s'appellent des **introns**.



Détection par hybridation *in situ*

Sonde intronique,
détection des pré-ARNm
(instables..., seulement dans
les cellules en produisant...)

Sonde exonique,
détection des ARNm
(stables...cytoplasmiques)

11



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Le 'wavefront' correspond à un gradient de ligands pour les voies *Fgf* (et *Wnt*)

Cell, Vol. 106, 219-232, July 27, 2001, Copyright ©2001 by Cell Press

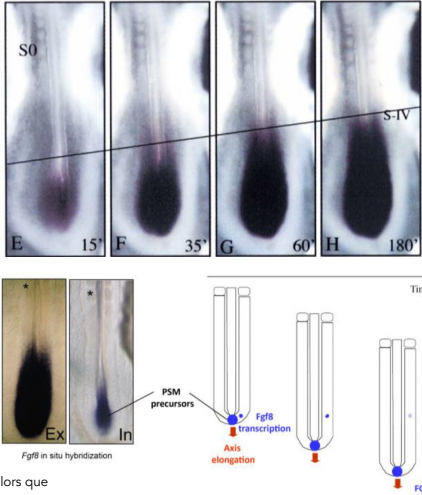
FGF Signaling Controls Somite Boundary Position and Regulates Segmentation Clock Control of Spatiotemporal *Hox* Gene Activation

Julien Dubrulle, Michael J. McGrew, and Olivier Pourquie¹

*Hybridation *in situ* de *Fgf8* mRNAs avec des temps de révélation différents, montrant la concentration différente de ces ARNs dans le PSM.

*Transcription intronique (In) révélant où les ARNs *Fgf8* sont fabriqués (dans les **cellules progénitrices** (en bleu)). Les ARNs sont alors transportés avec les cellules et disparaissent progressivement ('decay'). Plus une cellule sera 'antérieure', moins elle aura d'ARN *Fgf8*.

Transcription intronique: l'épissage des ARNs se fait dans le noyau alors que les mARNs 'matures' sont dans le cytoplasme...



12



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Comment former ces gradients?

Signalling dynamics in vertebrate segmentation

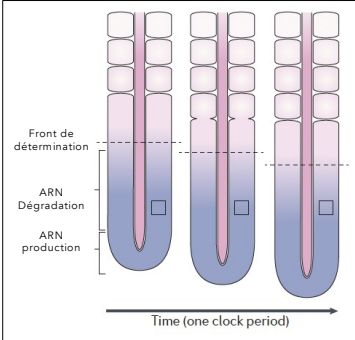
Alexis Hubaud^{1,2} and Olivier Pourquié^{1,2}

NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY

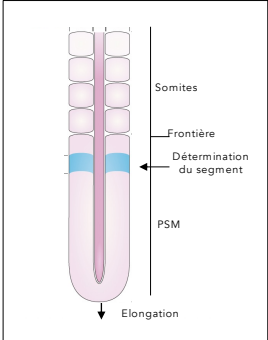
VOLUME 15 | NOVEMBER 2014 | 709

*Formation du gradient de Fgf8(Fgf4, Wnt3a?) par un mécanisme de dégradation de l'ARN après sa production dans des cellules postérieures.

*Le front de détermination, défini par des seuils de ces gradients, se déplace donc avec le temps vers le postérieur



Comment déterminer le segment ?



13



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Comment former le nouveau segment?

Signalling dynamics in vertebrate segmentation

Alexis Hubaud^{1,2} and Olivier Pourquié^{1,2}

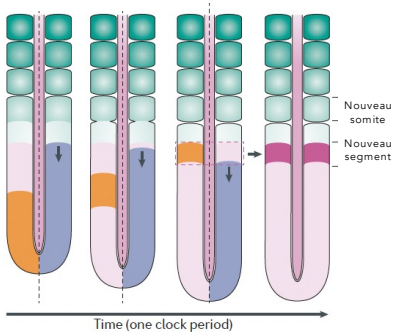
NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY

VOLUME 15 | NOVEMBER 2014 | 709

*Formation du gradient de Fgf8(Fgf4, Wnt3a?) par un mécanisme de dégradation de l'ARN après sa production dans des cellules postérieures.

*Le front de détermination, défini par des seuils de ces gradients, se déplace donc avec le temps vers le postérieur et va 'rencontrer' les cellules oscillantes, créant ainsi une fenêtre particulière ou l'évènement cellulaire va se passer.

*Le nouveau segment (magenta) est déterminé par la combinaison de deux inputs; d'une part le front de détermination (bleu) qui descend vers le postérieur en même temps que l'élongation de l'embryon et, d'autre part, la rencontre avec l'horloge de segmentation dont la vague d'oscillations 'remonte' le PSM du postérieur vers l'antérieur.



14



Denis Duboule/2023
Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Les Temps du Développement Embryonnaire
Les Temps du Développement Embryonnaire

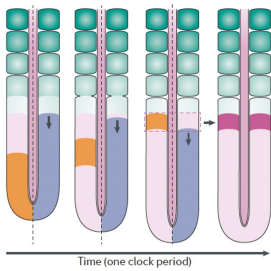


Couplage du 'patterning' antéro-postérieur à la production rythmique des somites

La voie Notch a deux fonctions:

- 1) Purement oscillatoire dans le PSM 'postérieur'.
- 2) 'Instructive' par l'activation de *mesp2* dans le (pré)somite -2

- 1-Détermination du segment par l'horloge et le 'wavefront'
- 2-Activation par Notch du gène *Mesp2* dans les cellules du segment de façon stochastique (? , poivre et sel)
- 3-Triage des cellules *Mesp2* positives et négatives dans des compartiments antérieurs et postérieurs du somite




Somite cycle n Somite cycle n+1 Somite cycle n+2

nature

Article | Published: 21 November 2022
Reconstruction and deconstruction of human somitogenesis in vitro
 Yuchuan Miao, Yannis Dierf, Alessandro De Simone, Kimchi Zhu, Jinyi Chen, Lili, Zhi Li, Andrew Silberfeld, José Luis, Daniel A. Takasawa, Alessandra Morozova, Pedro Raposo, Margaret Dai, Cuadras, Laura M. Soto, Doris, Stefano Di Talia & Olivier Pourquié
 Nature 604, 690–698 (2022) | Cite this article | Miao et al., 2022

15



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Les Temps du Développement Embryonnaire



Contrôle du nombre de segments

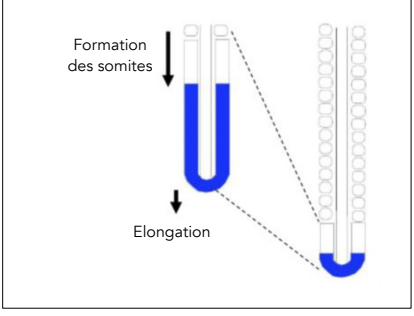
> J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2009 Sep 15;312(6):533–44. doi: 10.1002/jez.b.21305.

Developmental control of segment numbers in vertebrates

Céline Gomez [†], Olivier Pourquié

Le contrôle du nombre de segments dépend du rapport entre le taux de formation des somites et l'élongation de l'axe. Le taux de formation des somites dépend lui de la période de l'horloge ou/et de la vitesse de régression du wavefront

Un ralentissement de l'élongation ou une accélération de la formation des somites conduit à la réduction du PSM (appauvrissement en cellules) et donc à la terminaison de l'axe



16



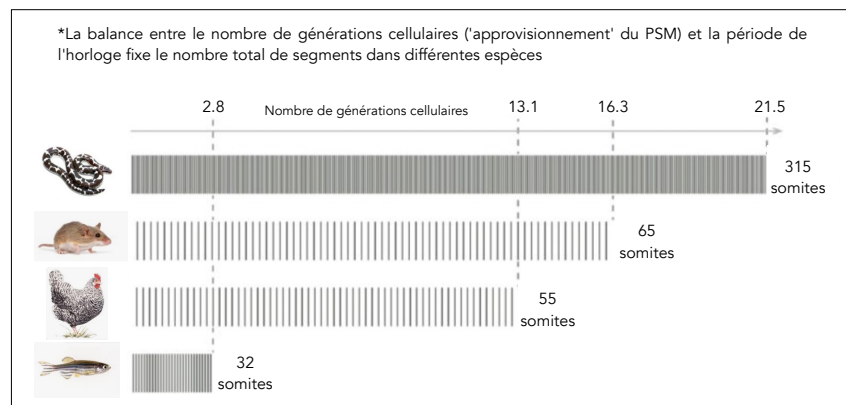
Contrôle du nombre de segments

> J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2009 Sep 15;312(6):533-44. doi: 10.1002/jex.b.21305.

Developmental control of segment numbers in vertebrates

Céline Gomez ¹, Olivier Pourquié

Le contrôle du nombre de segments dépend du rapport entre le taux de formation des somites et l'élongation de l'axe. Le taux de formation des somites dépend lui de la période de l'horloge ou/et de la vitesse de régression du wavefront.



17



Les variations relatives entre référentiels temporels ont été étudiées depuis de nombreuses comme source potentielle de différences interspécifiques et comme moteur évolutif (une littérature historique très riche qui ne peut faire l'objet de ce cours).



Stephen J Gould
(1941-2002)

Lecture recommandée:



Gavin de Beer
(1899-1972)

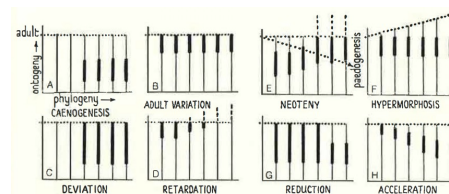
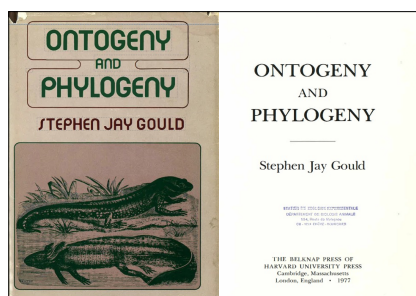


Fig. 29. De Beer's eight categories of "heterochrony." See text for explication and critique. Only four are actually modes of heterochrony and these reduce to the two processes of acceleration (paedogenesis = progenesis, acceleration) and retardation (neoteny, retardation, hypermorphosis). (From de Beer, 1940.)

18



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Différentes périodes de l'oscillateur entre les espèces

RESEARCH ARTICLE

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds

Mitsuhiro Matsuda^{1,2}, Hanako Hayashi^{1,2}, Jordi Garcia-Ojalvo³, Kumiko Yoshioka-Kobayashi⁴, Ryoichiro Kageyama^{1,5}, Yoshihiro Yamanaka^{6,7}, Makoto Ikeya⁸, Junya Toguchida^{4,6}, Cantas Aleu^{4,7}, Miki Ebisawa^{2,2}

Matsuda *et al.*, *Science* **369**, 1450–1455 (2020)

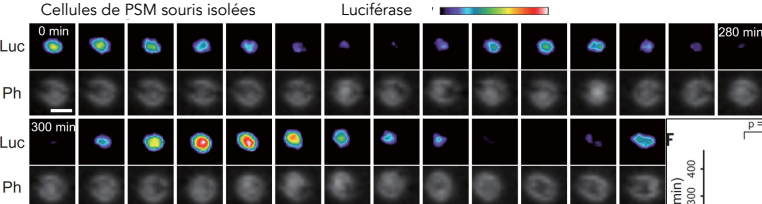
Mise en culture de cellules ES (souris) ou iPS (humain) et protocole de différenciation en cellules du PSM. Introduction d'un transgène reporter Prom-*Hes7*/Luciférase de façon à pouvoir détecter les oscillations 'live'.

Ces oscillations sont-elles dues au couplage des cellules (par la voie *Notch*)?

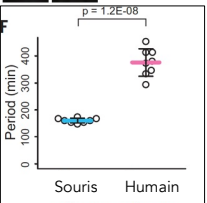
1) Inhibiteur de la voie *Notch*: ➡ pas d'effet drastique

2) Examen de cellules uniques isolées:

Cellules de PSM souris isolées Luciférase



Les cellules de PSM de souris isolées continuent à osciller avec la bonne période, bien que le 'bruit' soit supérieur, en particulier avec les cellules humaines ➡



Period (min)

Souris Humain

$p = 1.2E-08$

21



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Différentes périodes de l'oscillateur entre les espèces

RESEARCH ARTICLE

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds

Mitsuhiro Matsuda^{1,2}, Hanako Hayashi^{1,2}, Jordi Garcia-Ojalvo³, Kumiko Yoshioka-Kobayashi⁴, Ryoichiro Kageyama^{1,5}, Yoshihiro Yamanaka^{6,7}, Makoto Ikeya⁸, Junya Toguchida^{4,6}, Cantas Aleu^{4,7}, Miki Ebisawa^{2,2}

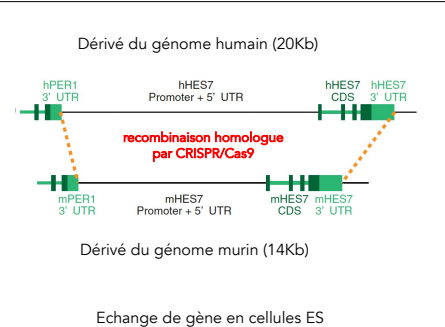
Matsuda *et al.*, *Science* **369**, 1450–1455 (2020)

Interspecies period difference is not due to *HES7* sequence differences

HES7 oscillations arise from a delayed auto-regulatory negative feedback loop: *HES7* is a transcription repressor that directly inhibits its own promoter with time delays (fig. S2A) (16, 23). We first hypothesized that differences in the sequences of *HES7* loci between murine and human genomes might lead to the observed oscillation-period difference. To test this hypothesis, we swapped murine and human *HES7* loci (Fig. 2A). The sequence of the human *HES7* locus, including the promoter, exons, introns, and untranslated regions (UTRs), was swapped into the mouse *Hes7* locus in mouse ESCs (fig. S4), and the resulting cells were induced into the PSM fate. The homozygous

Différence peut-être due des séquences spécifiques dans le promoteur du gène *Hes7* qui ralentiraient/accéléraient la période (car feedback loop...)?

Expérience d'échange de gènes complets (incluant le promoteur et des régions amonts et avals etc...)



Dérivé du génome humain (20Kb)

recombinaison homologue par CRISPR/Cas9

Dérivé du génome murin (14Kb)

Echange de gène en cellules ES

22



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1539—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Différentes périodes de l'oscillateur entre les espèces

RESEARCH ARTICLE

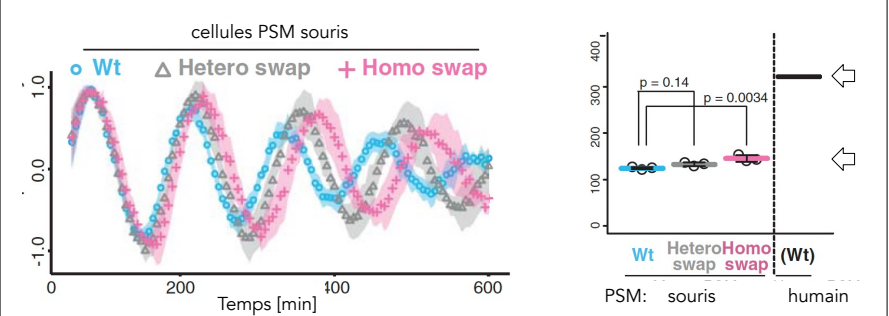
DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds

Mitsuhiro Matsuda^{1,2}, Hanako Hayashi^{1,2}, Jordi Garcia-Ojalvo³, Kumiko Yoshioka-Kobayashi⁴, Ryoichiro Kageyama^{1,5}, Yoshihiro Yamanaka^{6,7}, Makoto Ikeya⁸, Junya Toguchida^{4,6}, Cantas Aleu^{4,7}, Miki Ebisuya^{1,2,3}

Différence peut-être due des séquences spécifiques dans le promoteur du gène *Hes7* qui ralentiraient/accéléraient la période (car feedback loop...)?

Expérience d'échange de gènes complets (incluant le promoteur et des régions amonts et aval etc...



cellules PSM souris

○ Wt △ Hetero swap + Homo swap

Temps [min]

La période d'oscillation de *Hes7* humain s'adapte à celle de la souris, dans des cellules PSM **et chez la souris live!**

PSM: souris humain

23



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1539—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Différentes périodes de l'oscillateur entre les espèces

RESEARCH ARTICLE

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

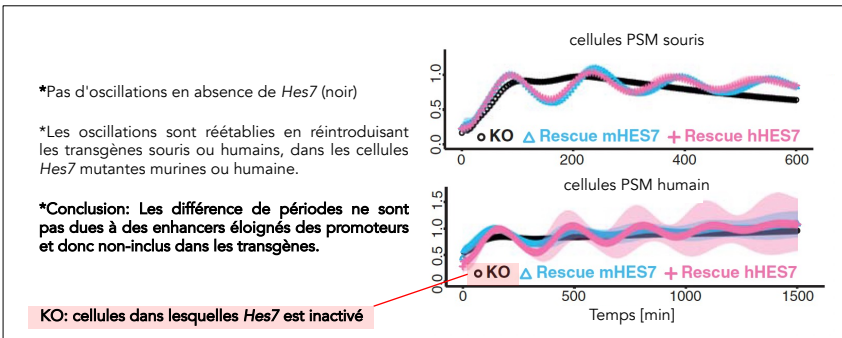
Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds

Mitsuhiro Matsuda^{1,2}, Hanako Hayashi^{1,2}, Jordi Garcia-Ojalvo³, Kumiko Yoshioka-Kobayashi⁴, Ryoichiro Kageyama^{1,5}, Yoshihiro Yamanaka^{6,7}, Makoto Ikeya⁸, Junya Toguchida^{4,6}, Cantas Aleu^{4,7}, Miki Ebisuya^{1,2,3}

Matsuda *et al.*, *Science* **369**, 1450–1455 (2020)

MAIS!! peut-être y a-t-il une séquence de régulation du gène *Hes7* éloignée du promoteur et donc NON INCLUSE dans les transgènes....

DONC: Expérience de 'sauvetage', avec des cellules qui n'ont plus de *Hes7* (inactivé) et dans lesquelles les auteurs réintroduisent les transgènes souris ou humains sans les cibler quelque part.



cellules PSM souris

○ KO △ Rescued mHES7 + Rescued hHES7

cellules PSM humain

○ KO △ Rescued mHES7 + Rescued hHES7

Temps [min]

*Pas d'oscillations en absence de *Hes7* (noir)

*Les oscillations sont réétablies en réintroduisant les transgènes souris ou humains, dans les cellules *Hes7* mutantes murines ou humaine.

*Conclusion: Les différence de périodes ne sont pas dues à des enhanceurs éloignés des promoteurs et donc non-inclus dans les transgènes.

KO: cellules dans lesquelles *Hes7* est inactivé

24



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Différentes périodes de l'oscillateur entre les espèces

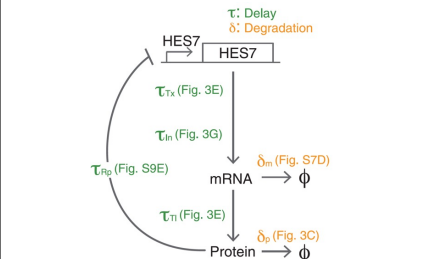
RESEARCH ARTICLE

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds

Mitsuhiro Matsuda^{1,2}, Hanako Hayashi^{1,2}, Jordi Garcia-Ojalvo³, Kumiko Yoshioka-Kobayashi⁴, Ryoichiro Kageyama^{1,5}, Yoshihiro Yamanaka^{6,7}, Makoto Ikeya⁸, Junya Toguchida^{4,6}, Cantas Aleev^{9,7}, Miki Ebisuya^{1,2,7}

**De nombreux paramètres biochimiques sont susceptibles de varier entre la souris et les humains, comme par exemples la dégradation des ARNs, leurs vitesses d'épissage (maturation), la durée des délais introduits par le feedback loop impliquant Hes7...
Donc, les auteurs mesurent les vitesses de dégradation des ARNs et des protéines ainsi qu'en plusieurs délais dans le feedback loop...



Restent des différences possibles dans les vitesses de réactions biochimiques entre les deux espèces, qui pourraient alors expliquer les périodes distinctes.

↓

We then hypothesized that differences in the biochemical reaction speeds of *HES7* between murine and human cells might lead to the observed oscillation-period difference. Biochemical parameters that strongly affect the *HES7* oscillation period are the degradation rates and delays in the regulatory feedback loop of *HES7* (Fig. 3A) (16, 24–27). In fact, genetic manipulations that modulate the degradation or delay of *Hes7* affect the oscillation period in mice (24, 26). Delays resulting from splicing and export of mRNAs are also reported to be different among mice, chickens, and zebrafish (27). Thus, we measured the degradation rates of *HES7* mRNA and protein (i.e., δ_m and δ_p ,

25



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Différentes périodes de l'oscillateur entre les espèces

RESEARCH ARTICLE

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds

Mitsuhiro Matsuda^{1,2}, Hanako Hayashi^{1,2}, Jordi Garcia-Ojalvo³, Kumiko Yoshioka-Kobayashi⁴, Ryoichiro Kageyama^{1,5}, Yoshihiro Yamanaka^{6,7}, Makoto Ikeya⁸, Junya Toguchida^{4,6}, Cantas Aleev^{9,7}, Miki Ebisuya^{1,2,7}

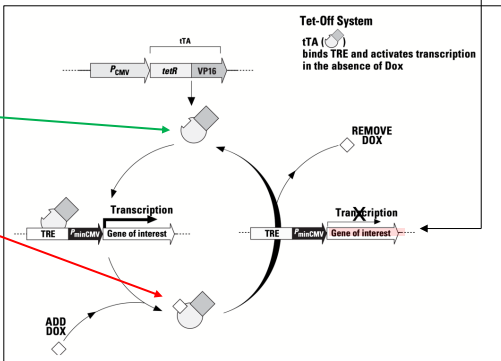
Matsuda et al., *Science* 369, 1450–1455 (2020)

**Sans doxycycline, le transactivateur se lie et active le gène souhaité.
Avec doxycycline, le transactivateur ne se lie plus et le gène cesse d'être transcrit.

Mesure de la dégradation des ARNs

Le système TeT-off (Dox) permet de stopper la production des ARNs au temps T et la luciférase permet de regarder la stabilité (donc la dégradation).

Dox $\rightarrow$ rTetOne $\rightarrow$ HES7-NLuc $\xrightarrow{\delta_m, \delta_p}$ ϕ



26



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE

—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Différentes périodes de l'oscillateur entre les espèces

RESEARCH ARTICLE

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds

Mitsuhiro Matsuda^{1,2}, Hanako Hayashi^{1,2}, Jordi Garcia-Ojalvo³, Kumiko Yoshioka-Kobayashi⁴, Ryoichiro Kageyama^{1,5}, Yoshihiro Yamanaka^{6,7}, Makoto Ikeya⁸, Junya Toguchida^{4,6}, Cantas Alev^{4,9}, Miki Eblusay^{1,2,†}

Mesure de la dégradation des ARNs

Le système Tet-off (Dox) permet de stopper la production des ARNs au temps T et la luciférase permet de regarder la stabilité (donc la dégradation).

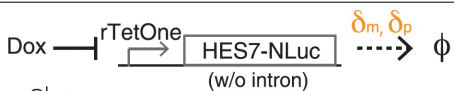
*Stimulation de l'expression de *Hes7* puis arrêt soudain en ajoutant de la Dox.

*les auteurs mesurent alors la quantité de luciférase (fluorescence quantitative) pour estimer la vitesse de dégradation de l'ARN *Hes7*

*Fait avec *Hes7* murin ou humain dans des cellules PSM murines ou humaines.

*Demi-vies = 20' (PSM souris) et 40' (PSM humain).

Conclusion. La vitesse de dégradation dépend uniquement du milieu cellulaire et non de l'origine du gène.



HES7-NLuc activity

Time (min)

δ_m, δ_p
 ϕ

• Mouse HES7 in mouse PSM
 Δ Human HES7 in mouse PSM
 • Mouse HES7 in human PSM
 Δ Human HES7 in human PSM

27



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE

—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Différentes périodes de l'oscillateur entre les espèces

RESEARCH ARTICLE

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds

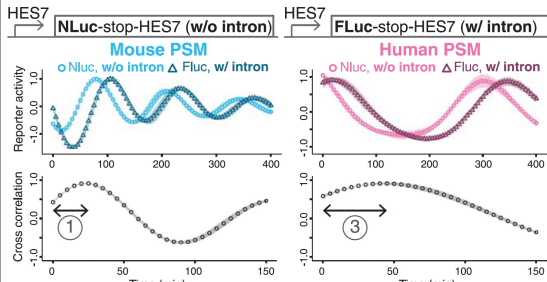
Mitsuhiro Matsuda^{1,2}, Hanako Hayashi^{1,2}, Jordi Garcia-Ojalvo³, Kumiko Yoshioka-Kobayashi⁴, Ryoichiro Kageyama^{1,5}, Yoshihiro Yamanaka^{6,7}, Makoto Ikeya⁸, Junya Toguchida^{4,6}, Cantas Alev^{4,9}, Miki Eblusay^{1,2,†}

Un délai différentiel peut également être introduit par la durée de l'épissage (splicing) des ARNs précurseurs en ARN messagers.

Construction avec promoteur HES7, la Luciférase/ stop / *Hes7* avec (w/) ou sans (w/o) introns...

L'un des ARNs doit être épissé (w/), l'autre (w/o) pas....

Des constructions avec ou sans introns sont introduites et les délais dans les oscillations calculés (différences de phases en luciférase entre les deux conditions). Le délai est de **37 minutes dans les cellules humaines et 13 minutes dans les cellules de souris**.



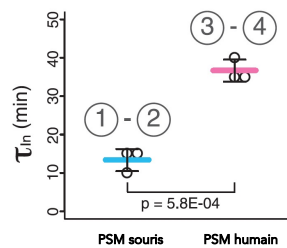
Reporter activity

Cross correlation

Time (min)

Mouse PSM
 • NLuc, w/o intron Δ Fluc, w/ intron

Human PSM
 • NLuc, w/o intron Δ Fluc, w/ intron



T_n (min)

PSM souris PSM humain

$p = 5.8E-04$

28


Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Les Temps du Développement Embryonnaire



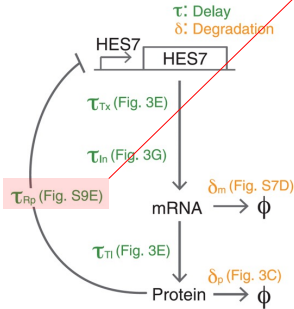
Différentes périodes de l'oscillateur entre les espèces

RESEARCH ARTICLE

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds

Mitsuhiro Matsuda^{1,2}, Hanako Hayashi^{1,2}, Jordi Garcia-Ojalvo³, Kumiko Yoshioka-Kobayashi⁴, Ryoichiro Kageyama^{1,5}, Yoshihiro Yamanaka^{6,7}, Makoto Ikeya⁸, Junya Toguchida^{4,6}, Cantas Aleev⁹, Miki Ebisuya^{2,2}



Finally, mesure d'une différence possible dans les délais de la répression directe du promoteur *Hes7* par la protéine *HES7*. Utilisation d'un reporter promoteur *Hes7*/Luc et activation/termination de la transcription de *Hes7* (transgène).

Finally, to measure the delay for *HES7* to start repressing its own promoter, we induced the expression of *HES7* and estimated the onset of decline in the *HES7* promoter activity (fig. S9). Fitting the results to an open-loop repression model where the induced *HES7* protein represses the expression of *HES7* promoter-luciferase reporter suggested that the *HES7* repression delay (τ_{RP}) is negligible in both murine and human PSM.

Conclusion: Les délais de répression sont négligeables et donc à ne pas considérer dans la différence de périodes

29


Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Les Temps du Développement Embryonnaire



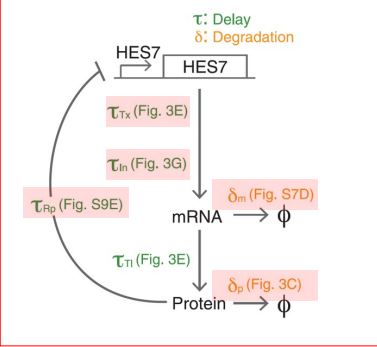
Différentes périodes de l'oscillateur entre les espèces

RESEARCH ARTICLE

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds

Mitsuhiro Matsuda^{1,2}, Hanako Hayashi^{1,2}, Jordi Garcia-Ojalvo³, Kumiko Yoshioka-Kobayashi⁴, Ryoichiro Kageyama^{1,5}, Yoshihiro Yamanaka^{6,7}, Makoto Ikeya⁸, Junya Toguchida^{4,6}, Cantas Aleev⁹, Miki Ebisuya^{2,2}



Construction d'un modèle mathématique basé sur les paramètres suivants:

we built a simple mathematical model of *HES7* oscillation (16) based directly on the following parameters: δ_p , δ_m , τ_{TXI} , τ_{IN} , and τ_{RP} (Fig. 4A). Mathematical analyses of the model showed that the oscillation period depends on these measured parameters (i.e., degradation rates and total delays) and that other parameters, such as the transcription and translation rates and the repression threshold, essentially do not affect the period

Conclusion: le modèle fonctionne sans considérer les niveaux de transcription et de translation, ainsi que l'auto-répression, qui n'affectent pas la période.

30



Denis Duboule/2023



COLLÈGE DE FRANCE

1530

Les Temps du Développement Embryonnaire



Différentes périodes de l'oscillateur entre les espèces

RESEARCH ARTICLE

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

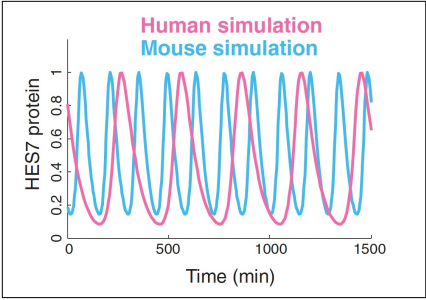
Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds

Mitsuhiro Matsuda^{1,2}, Hanako Hayashi^{1,3}, Jordi Garcia-Ojalvo², Kumiko Yoshioka-Kobayashi⁴, Ryoichiro Kageyama^{4,5}, Yoshihiro Yamanaka^{6,7}, Makoto Ikeya⁸, Junya Toguchida^{4,5}, Cantas Aleu^{4,7}, Miki Ebisawa^{2,3}

Matsuda *et al.*, *Science* **369**, 1450–1455 (2020)

Our simulation of oscillations with the murine parameters showed periods of ~150 min, whereas that with human parameters showed ~300-min periods (Fig. 4B), reproducing the two- to threefold period difference between actual murine and human PSM (Fig. 1D).

Construction d'un modèle mathématique et simulation des oscillations *Hes7* dans des cellules PSM de souris et d'humains



CONCLUSION: Des réactions biochimiques plus lentes chez les humains (dégradations, délais..) sont suffisantes pour expliquer quantitativement des périodes d'oscillations plus longues de l'horloge de segmentation.

Plus généralement, d'autres gènes humains montrent les mêmes 'ralentissements', mais pas tous....

These results mean that the slower biochemical reactions of *HES7* (i.e., slower degradations and longer delays) in human PSM compared with mouse PSM are sufficient to quantitatively account for the longer oscillation period of the human segmentation clock.

31



Denis Duboule/2023



COLLÈGE DE FRANCE

1530

Les Temps du Développement Embryonnaire



Différences d'activités métaboliques entre espèces et pendant le développement

Article

Metabolic regulation of species-specific developmental rates

550 | Nature | Vol 613 | 19 January 2023

<https://doi.org/10.1038/s41586-022-05674-4>

Margarete Diaz-Cuadros^{1,2,3,4}, Teemu P. Miettinen⁵, Owen S. Skinner^{6,7}, Dylan Sheehy^{2,3}, Carlos Martin Diaz-Garcia^{1,2}, Stefania Gagnon^{1,2}, Aleksa Hukovic^{1,2}, Gary Yelland¹, Scott R. Manalis^{1,2,3}, William M. Oldham^{1,2,3} & Olivier Pourquie^{1,2,3,4}

Received: 21 August 2022
Accepted: 18 November 2022
Published online: 4 January 2023

Animals display substantial inter-species variation in the rate of embryonic development despite a broad conservation of the overall sequence of developmental events. Differences in biochemical reaction rates, including the rates of protein production and degradation, are thought to be responsible for species-specific rates of development^{1–3}. However, the cause of differential biochemical reaction rates between species remains unknown. Here, using pluripotent stem cells, we have established an in vitro system that recapitulates the twofold difference in developmental rate between mouse and human embryos. This system provides a quantitative measure of developmental speed as revealed by the period of the segmentation clock, a molecular oscillator associated with the rhythmic production of vertebral precursors. Using this system, we show that mass-specific metabolic rates scale with the developmental rate and are therefore higher in mouse cells than in human cells. Reducing these metabolic rates by inhibiting the electron transport chain slowed down the segmentation clock by impairing the cellular NAD⁺/NADH redox balance and, further downstream, lowering the global rate of protein synthesis. Conversely, increasing the NAD⁺/NADH ratio in human cells by overexpression of the *Lactobacillus brevis* NADH oxidase *LbNOX* increased the translation rate and accelerated the segmentation clock. These findings represent a starting point for the manipulation of developmental rate, with multiple translational applications including accelerating the differentiation of human pluripotent stem cells for disease modelling and cell-based therapies.

*Loi de Kleiber
*Balance redox NAD⁺/NADH



En utilisant un système *in vitro* comparable (cellules PSM qui oscillent..), les auteurs montrent que les niveaux métaboliques (qui sont associés à la masse globale -loi de Kleiber-) varient de concert avec les vitesses de développement et sont donc plus élevés chez la souris que chez l'homme.

En modifiant la balance redox cellulaire NAD⁺/NADH, l'horloge de segmentation peut être soit ralentie, soit accélérée

32



Différences d'activités métaboliques entre espèces et pendant le développement

*Loi de Kleiber



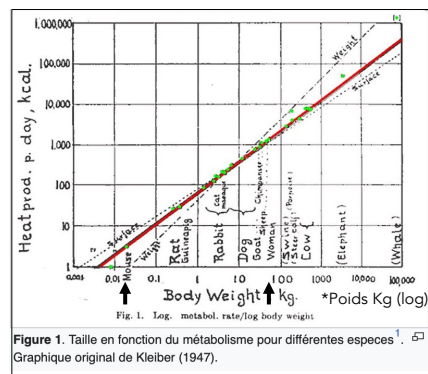
*Métabolisme: Kcal/jour (log)

La loi de Max Kleiber (1930) dit que dans la majorité des cas, chez les vertébrés dits 'supérieurs' (amniotes?), le métabolisme est ajusté (proportionnel) à la masse corporelle à la puissance $\frac{3}{4}$.

Par conséquent, un mammifère 100 fois plus lourd qu'un autre aura un métabolisme consommant 32 fois plus d'énergie que l'autre.

(les temps de gestation également...)

*Poids d'une souris *Mus musculus*: 20 grammes
*Poids d'un être humain *Homo Sapiens*: 80 Kilos (4000 X)



Denis Duboule/2023

COLLÈGE
DE FRANCE

— 1530 —

Les Temps du Développement Embryonnaire

Différences d'activités métaboliques entre espèces et pendant le développement

Article
Metabolic regulation of species-specific developmental rates
550 | Nature | Vol 613 | 19 January 2023

<https://doi.org/10.1038/s41586-022-05324-4>
 Received: 31 August 2021
 Accepted: 18 November 2022
 Published online: 4 January 2023

Margarita Diaz-Cuadros^{1,2,3,4,5}, Teemu P. Mäkitien⁶, Owen S. Skinner^{1,4,5}, Dylan Shaddy^{2,4}, Carlos Martín Díaz-García^{1,2}, Svetlana Gaspar^{1,2}, Alexis Hubaud^{1,2}, Gary Yellen¹, Scott R. Manalis^{1,2,3}, William M. Oldham^{1,2,3} & Olivier Pourquie^{1,2,3,4,5}

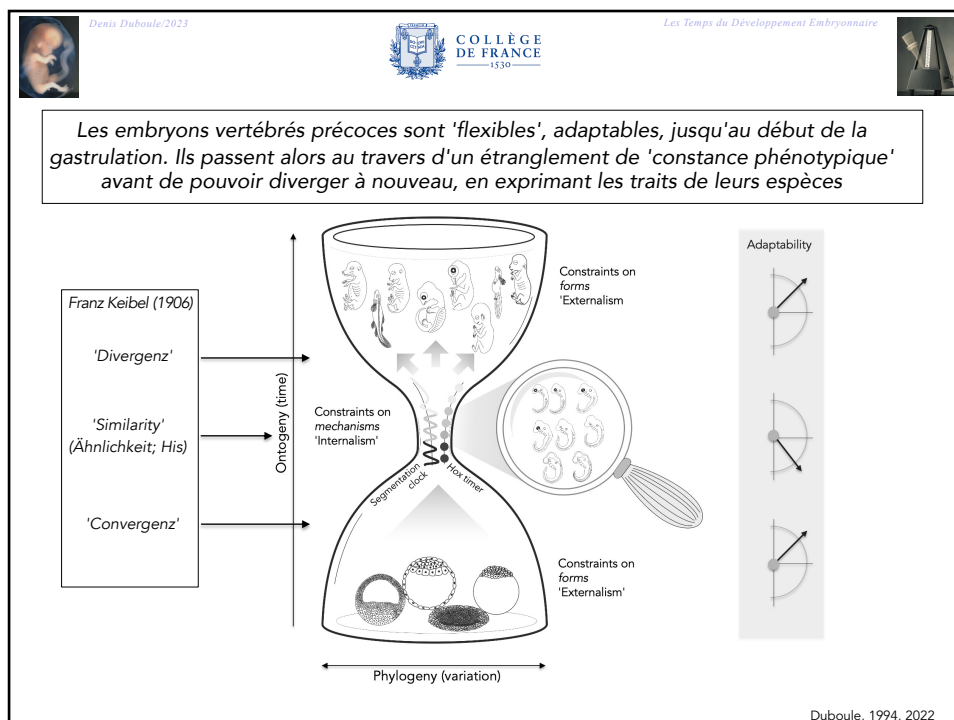
Animals display substantial inter-species variation in the rate of embryonic development despite a broad conservation of the overall sequence of developmental events. Differences in biochemical reaction rates, including the rates of protein production and degradation, are thought to be responsible for species-specific rates of development^{1–3}. However, the cause of differential biochemical reaction rates between species remains unknown. Here, using pluripotent stem cells, we have established an in vitro system that recapitulates the twofold difference in developmental rate between mouse and human embryos. This system provides a quantitative measure of developmental speed as revealed by the period of the segmentation clock, a molecular oscillator associated with the rhythmic production of vertebral precursors. Using this system, we show that mass-specific metabolic rates scale with the developmental rate and are therefore higher in mouse cells than in human cells. Reducing these metabolic rates by inhibiting the electron transport chain slowed down the segmentation clock by impairing the cellular NAD⁺/NADH redox balance and, further downstream, lowering the global rate of protein synthesis. Conversely, increasing the NAD⁺/NADH ratio in human cells by overexpression of the *Lactobacillus brevis* NADH oxidase *LbNOX* increased the translation rate and accelerated the segmentation clock. These findings represent a starting point for the manipulation of developmental rate, with multiple translational applications including accelerating the differentiation of human pluripotent stem cells for disease modelling and cell-based therapies.

*Balance redox NAD⁺/NADH

*En diminuant le ratio NAD⁺/NADH (inhibition du transfert d'électron), l'horloge de segmentation est ralentie due à une diminution globale de la synthèse des protéines

*En augmentant le ratio NAD⁺/NADH, l'horloge de segmentation est accélérée due à une accélération de la traduction et donc une augmentation globale de la synthèse des protéines

35



36



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



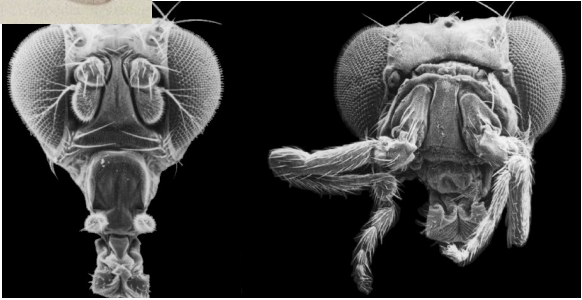


Ultrabithorax (Ubx)

Les gènes architectes
(homéotiques; Hox) (bref historique)

Des mutations aux phénotypes
spectaculaires (homéotiques)

Antennapedia (Antp)



37



Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Huit gènes Hox chez Drosophila

(Laboratoires de E. Lewis, G. Morata, D. Hogness, T. Kaufman, W. Gehring, M. Levine...)

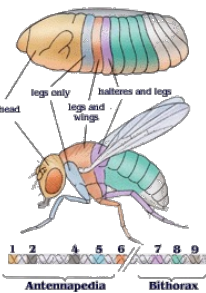
Antérieur Postérieur

3' lab pb Dfd Scr Antp Ubx abd-A Abd-B 5'

Complexe Antennapedia Complexe Bithorax

lab labial
pb proboscidea
Dfd deformed
Scr Sex combs reduced
Antp Antennapedia

Ubx Ultrabithorax
abd-A abdominal-A
Abd-B Abdominal-B



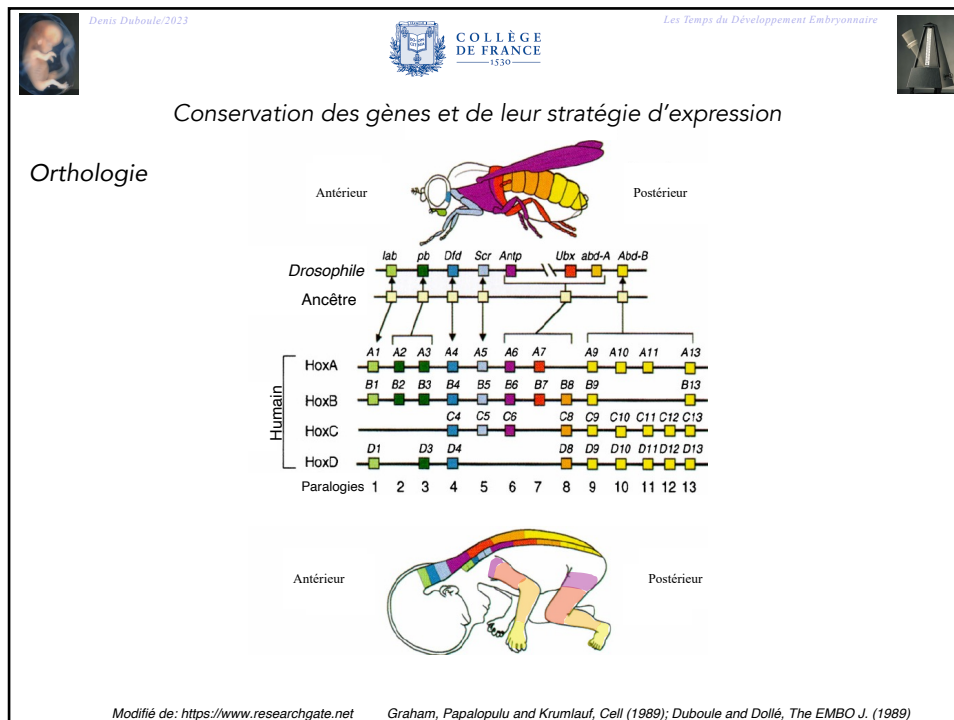
1 2 4 5 6 7 8 9
Antennapedia Bithorax

*Les gènes Hox sont en groupes ('clusters')

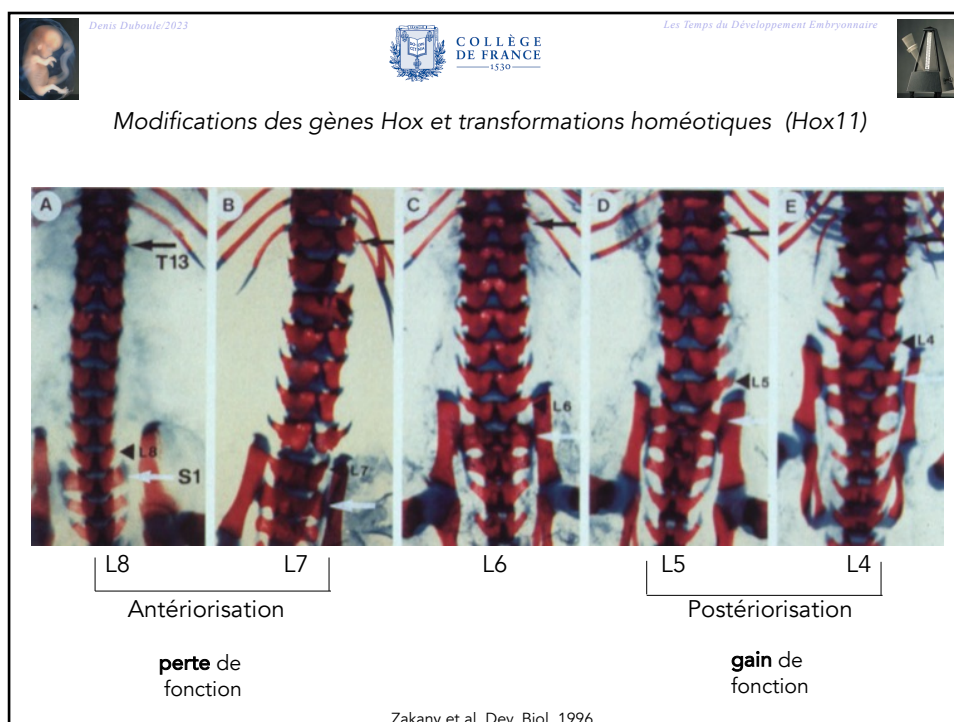
*L'expression reflète la distribution des gènes ('colinéarité')

http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1995/illpres/more-l-segmspec.html

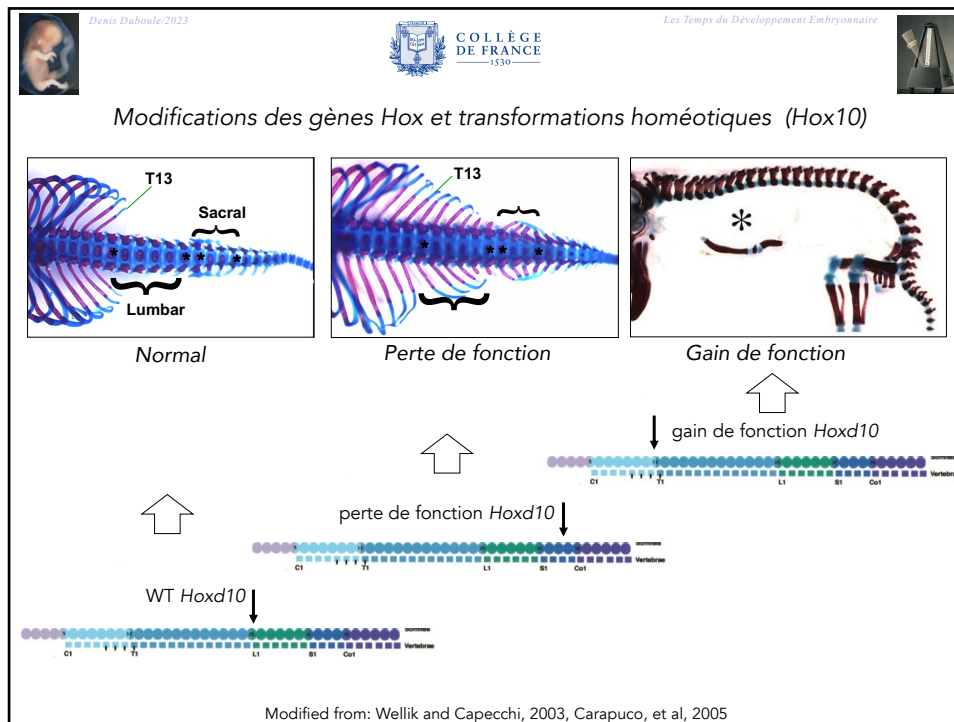
38



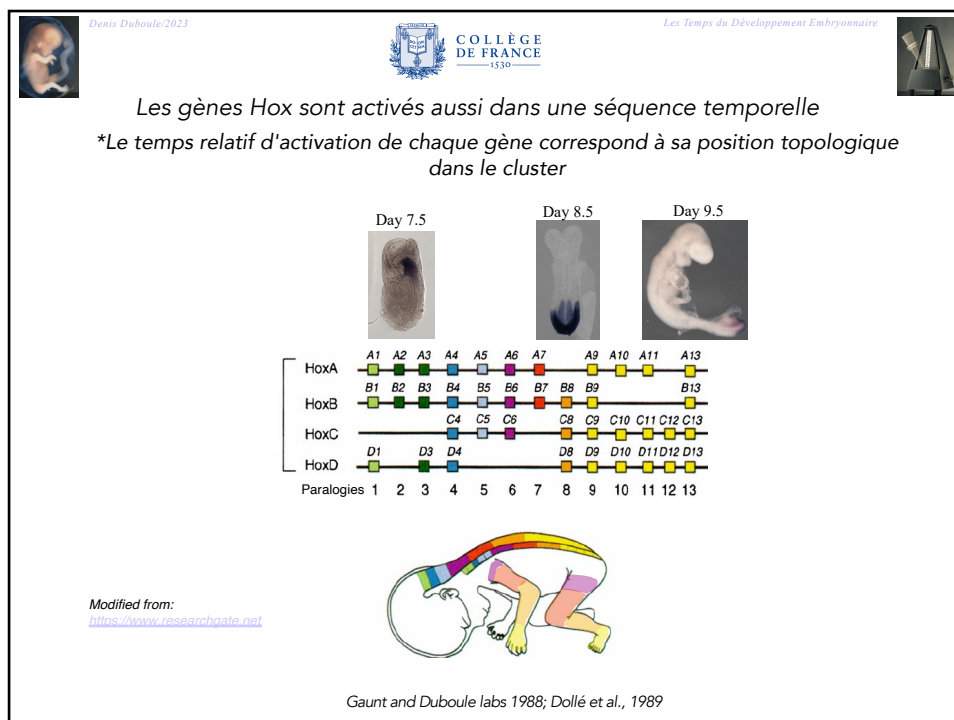
39



40



41



42


Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
1530

Les Temps du Développement Embryonnaire

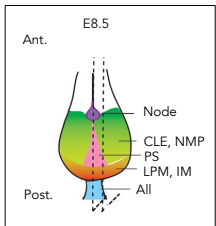

© 2019. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2019) 146, doi:10.1093/dev.180190

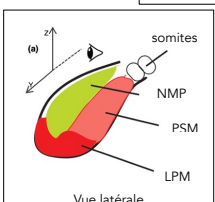
STEM CELLS AND REGENERATION
RESEARCH ARTICLE

Neuro-mesodermal progenitors (NMPs): a comparative study between pluripotent stem cells and embryo-derived populations
Shlomit Edri^{1,2}, Penelope Hayward^{3,4}, Wajid Jawad^{3,4} and Alfonso Martinez Arias^{1,2}

Les gènes *Hox* sont activés pendant la seconde partie de la gastrulation, lors de la segmentation de la partie sous-occipitale de l'axe antéro-postérieur.

Leurs transcription est activée dans la partie la plus caudale de l'embryon, dans une population de cellules progénitrices du mésoderme et du neuro-ectoderme, les cellules NMPs



Vue latérale

NMP: Neuro-mesodermal precursors
PSM: Presomitic mesoderm
LPM: Lateral plate mesoderm
CLE: Caudal lateral epiblast
IM: Intermediate mesoderm
PS: Primitive streak (ligne)
All: Allantois

43


Denis Duboule/2023



COLLÈGE
DE FRANCE
1530

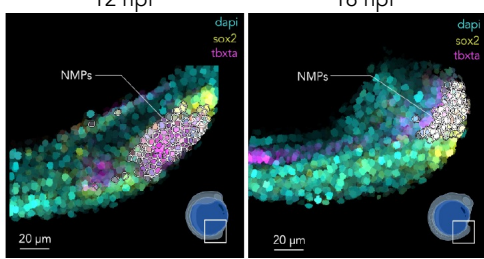
Les Temps du Développement Embryonnaire


bioRxiv THE PREPRINT SERVER FOR BIOLOGY

Zebrafish – Multimodal Zebrafish Developmental Atlas Reveals the State Transition Dynamics of Late Vertebrate Pluripotent Axial Progenitors

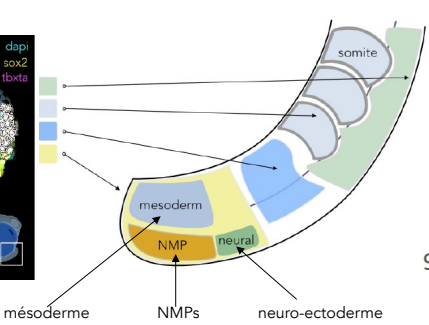
Merlin Lange,^{1,2} Alejandro Granados,^{1,2} Shrutli Vijaykumar,^{1,2} Jordao Bragantini,^{1,2} Sarah Ancheta,^{1,2} Sreejith Santhosh,¹ Michael Borja,¹ Hirofumi Kobayashi,¹ Erin McGeever,¹ Ahmet Can Solak,¹ Bin Yang,¹ Xiang Zhao,¹ Yang Liu,¹ Angela Dettweiler,¹ Sheryl Paul,¹ Honey Mäkinen,¹ Tiger Luo,¹ Rachel Banks,¹ Adrian Jecio,¹ Kait Balla,¹ Kyle Aveyan,¹ Samuel D'Souza,¹ Robert Haase,¹ Alexandre Dabauz,¹ Olivier Pourquie,¹ Rafael Gómez-Sjöberg,¹ Greg Huber,¹ Mattia Serra,² Norma Nefti,² Angela Oliveira Pisco,¹ & Loïc A. Royer^{1,2}





12 hpf 16 hpf

20 μm



9

mésoderme NMPs neuro-ectoderme

44



Denis Duboule/2023



COLLÈGE DE FRANCE
—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Zebrahub – Multimodal Zebrafish Developmental Atlas Reveals the State Transition Dynamics of Late Vertebrate Pluripotent Axial Progenitors

Merlin Lange,^{1,*} Alejandro Granados,^{1,*} Shrutli VijayKumar,^{1,*} Jordao Bragantini,^{1,*} Sarah Archetti,^{1,*} Sreejith Santhosh,¹ Michael Borja,¹ Hirofumi Kobayashi,¹ Erin McGeever,¹ Ahmet Can Solak,¹ Bin Yang,¹ Xiang Zhao,¹ Yang Liu,¹ Angela Delveiler,¹ Sheryl Paul,¹ Honey Makonen,¹ Tiger Luo,¹ Rachel Banks,¹ Adrian Jacobo,¹ Kair Balla,¹ Kyle Awaysan,¹ Samuel D'Souza,¹ Robert Haase,² Alexandre Dizeux,¹ Olivier Pourquie,¹ Rafael Gómez-Sjöberg,¹ Greg Huber,¹ Mattia Serra,² Norma Neft,¹ Angela Oliveira Pisco,¹ & Loïc A. Royer^{1,*}

bioRxiv THE PREPRINT SERVER FOR BIOLOGY

CSH Cold Spring Harbor Laboratory

RESULTS

Time-resolved single-embryo deep scRNAseq dataset of zebrafish development. Zebrahub's sequencing resource consists of a dataset containing 120,444 cells from 40 individual zebrafish embryos and larvae spanning 10 developmental stages from end-of-gastrulation embryos to 10-day larvae (10-, 12-, 14-, 16-, 19-, 24-hours post-fertilization, as well as 2-, 3-, 5- and 10-days post-fertilization). To capture single-cell RNA sequencing variability across individuals, the cell dissociation protocol was optimized to avoid embryo pooling thus achieving non-pooled single-embryo single-cell RNA sequencing (Fig. 1a, Supp. Fig. 1 & Methods). Four fish were sequenced for each of the ten developmental stages thus obtaining 40 individually sequenced embryos. Using strict quality control criteria (Supp. Fig. 2 and Methods) we obtained a minimum of one thousand high-quality single-cell transcriptomic profiles for the early developmental time points and more than 20 thousand cells at later stages (Fig. 1a – left). Importantly, we were able to obtain a minimum of 3,000 genes per cell (25,000 UMIs per cell) for developmental stages before 24 hpf – highlighting the depth of our dataset.

Schéma général de distribution des types cellulaires (UMAP, clustering) après séquençage d'ARNs de cellules uniques d'embryons de différents âges. Production d'un atlas.

120'444 cellules séquencées à partir de 40 spécimen couvrant 10 stades de développement différents (10, 12, 14, 16, 19, 24 hpf et 2, 3, 5 et 10 jp.

4 duplicats et un minimum de 1000 transcriptomes de haute qualité pour les stades de développement précoces ainsi que plus de 20'000 cellules pour les stades ultérieurs.

Minimum de 3'000 gènes 'lus' par cellule pour les stades avant 24hpf (séquençage très 'profond').

45



Denis Duboule/2023



COLLÈGE DE FRANCE
—1530—

Les Temps du Développement Embryonnaire



Zebrahub – Multimodal Zebrafish Developmental Atlas Reveals the State Transition Dynamics of Late Vertebrate Pluripotent Axial Progenitors

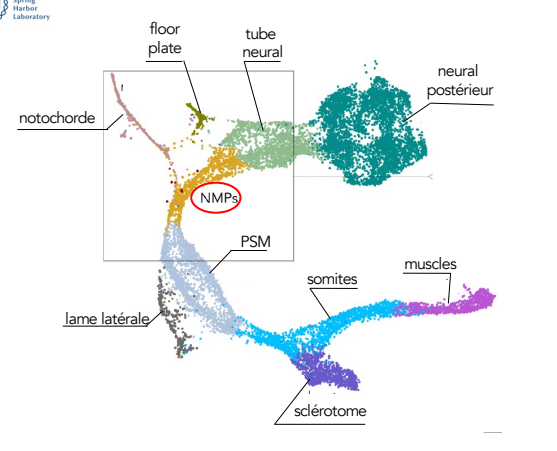
Merlin Lange,^{1,*} Alejandro Granados,^{1,*} Shrutli VijayKumar,^{1,*} Jordao Bragantini,^{1,*} Sarah Archetti,^{1,*} Sreejith Santhosh,¹ Michael Borja,¹ Hirofumi Kobayashi,¹ Erin McGeever,¹ Ahmet Can Solak,¹ Bin Yang,¹ Xiang Zhao,¹ Yang Liu,¹ Angela Delveiler,¹ Sheryl Paul,¹ Honey Makonen,¹ Tiger Luo,¹ Rachel Banks,¹ Adrian Jacobo,¹ Kair Balla,¹ Kyle Awaysan,¹ Samuel D'Souza,¹ Robert Haase,² Alexandre Dizeux,¹ Olivier Pourquie,¹ Rafael Gómez-Sjöberg,¹ Greg Huber,¹ Mattia Serra,² Norma Neft,¹ Angela Oliveira Pisco,¹ & Loïc A. Royer^{1,*}

bioRxiv THE PREPRINT SERVER FOR BIOLOGY

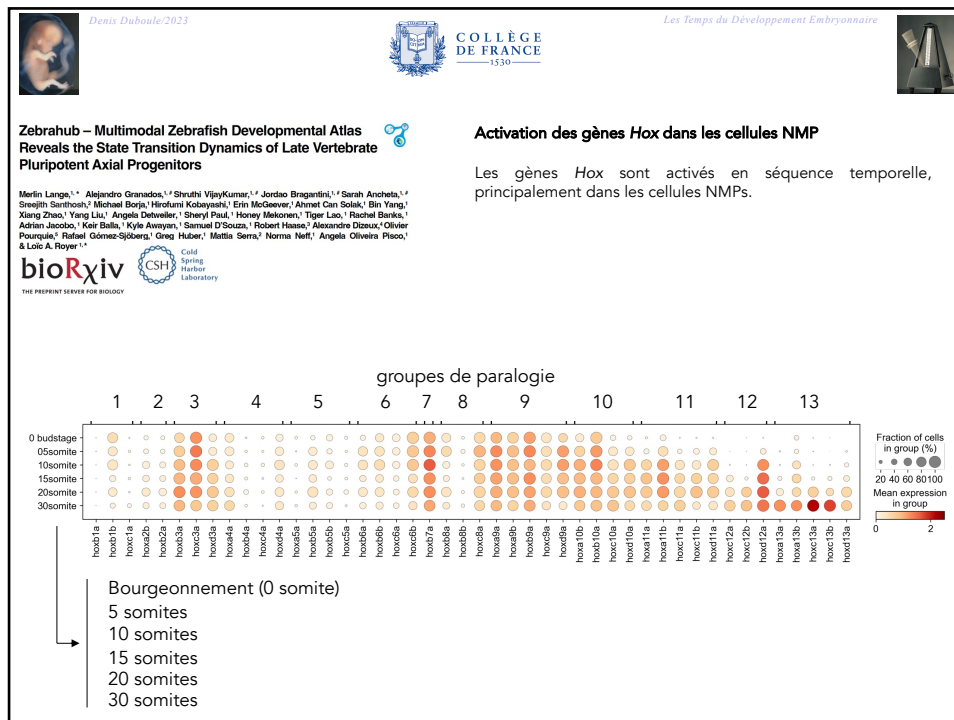
CSH Cold Spring Harbor Laboratory

Dynamique de transcription des cellules NMP

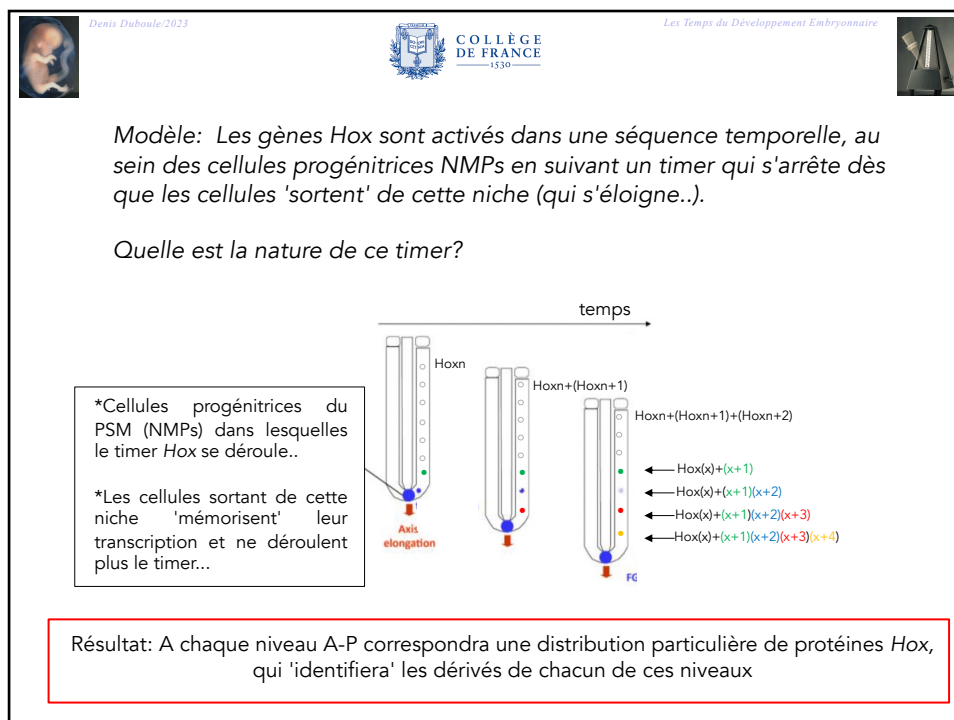
Schéma général de distribution des types cellulaires (UMAP, clustering) après séquençage d'ARNs de cellules uniques d'embryons. Clusters cellulaires concernant le 'tail bud' et ses dérivés



46



47



48