



Université de Montréal

**Fonction et évolution de la régulation du gène *Hoxa11* au cours du développement des membres chez les vertébrés**

par Yacine Kherdjemil

Programmes de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée

en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en Biologie Moléculaire

Août, 2017

© Yacine Kherdjemil, 2017

## Résumé

Le développement des membres nécessite la fonction des gènes des complexes HoxA et HoxD, qui sont exprimés de façon différentielle le long de l'axe proximo-distal, colinéaire avec leur position sur le chromosome. Cette stratégie régulatrice est essentielle afin de spécifier l'identité de chaque segment au cours du développement des membres. Précédemment, nous avons montré que l'expression des gènes *HoxA* dans la partie distale du membre dépend de plusieurs régions cis-régulatrices localisées à longue distance mais qui en 3D sont en contact avec les gènes *Hoxa9* à *Hoxa13*. Cependant, *Hoxa11* n'est pas exprimé dans la partie distale du membre et une série d'évidence indique qu'un mécanisme restreint son expression à la partie proximale du membre.

Au cours de l'évolution, la transition de la nageoire au membre fût l'une des adaptations morphologiques cruciales lors du passage d'un mode de vie aquatique à un mode de vie terrestre. Alors que la grande majorité des tétrapodes actuels possèdent des membres pentadactyles, les données fossiles nous indiquent que les premiers tétrapodes étaient polydactyles.

Dans le chapitre 2, nous avons montré qu'un changement dans la régulation du gène *Hoxa11* au cours de l'évolution des vertébrés a vraisemblablement joué un rôle dans l'acquisition/stabilisation du stade pentadactyle chez les tétrapodes. Chez le poisson zèbre, les gènes *hoxa11* et *hoxa13* sont exprimés dans des domaines chevauchants dans la nageoire. En revanche, chez la souris, les domaines d'expression de *Hoxa11* et *Hoxa13* sont mutuellement exclusifs dans le bourgeon de membre. *Hoxa11* est exprimé dans la partie proximale du bourgeon de membre (futur zeugopode) alors que *Hoxa13* est exprimé dans la partie la plus distale (futur autopode). Nous avons montré que l'absence d'expression distale de *Hoxa11* dans le bourgeon de membre est due à la présence d'une région régulatrice localisée dans l'intron de *Hoxa11*. Sous le contrôle des protéines HOXA13 et HOXD13, cette région régulatrice induit une transcription antisense, empêchant ainsi la transcription de *Hoxa11* dans

l'autopode. De plus nous avons montré que cette région régulatrice est absente chez le poisson zèbre, indiquant que son émergence a eu lieu lors de la transition de la nageoire au membre. Nous avons procédé à la délétion de cette région régulatrice chez la souris et observé une expansion distale du domaine d'expression de *Hoxa11* dans le bourgeon de membre. Nous avons aussi montré que l'expression de *Hoxa11* dans le domaine d'expression de *Hoxa13* engendre la formation d'un membre polydactyle chez la souris (lignée de souris *Prx1Cre* ; *Rosa<sup>Hoxa11/Hoxa11</sup>* ou *AI1KI*). Ainsi, nos résultats indiquent que l'émergence d'une région régulatrice dans l'intron de *Hoxa11*, au cours de l'évolution, a permis la restriction du domaine d'expression de *Hoxa11* à la région proximale du membre via un mécanisme de répression impliquant les protéines HOX13 et la transcription antisense. De plus, basé sur le phénotype de polydactylie observé après expression de *Hoxa11* dans la région distale du bourgeon de membre, nos résultats suggèrent que l'évolution de la régulation de *Hoxa11* (ayant entraîné la séparation des domaines d'expression de *Hoxa11* et *Hoxa13*) a contribué à la transition des membres polydactyles des premiers tétrapodes aux membres pentadactyles des tétrapodes actuels.

Dans le chapitre 3, nous avons étudié les causes moléculaires du développement de la polydactylie résultant de l'expression distale de *Hoxa11* chez les souris *AI1KI*. La polydactylie est souvent engendrée par l'expression ectopique de *Shh* dans la partie antérieure du bourgeon de membre. En revanche, nos résultats suggèrent que l'activation ectopique de *Shh* dans le bourgeon de membre des souris *AI1KI* est une conséquence du développement de la polydactylie et non la cause. L'analyse du transcriptome des membres *AI1KI* indique que l'expression distale de *Hoxa11* a pour conséquence une diminution de l'expression des gènes donnant l'identité antérieure au bourgeon de membre ainsi qu'une antériorisation de l'expression de gènes « postérieurs ». Par ailleurs, nous avons montré que HOXA11 se lie à la région régulatrice de *Grem1*, gène dont l'expression est essentielle à la croissance du membre et la formation des doigts. Nos résultats indiquent que l'expression distale de *Hoxa11* a pour conséquence un renforcement de la boucle SHH-GREM1-FGF qui est probablement la cause de la polydactylie des souris *AI1KI*. De plus, notre étude du double mutant *Xt/Xt* ; *AI1KI*, nous a permis de montrer que la polydactylie, résultant de l'expression distale de *Hoxa11*, est dépendante de *Gli3*. En effet les doubles mutants *Xt/Xt* ; *AI1KI* développent des membres

oligodactyles (nombre de doigts inférieur à 5). L'analyse moléculaire de ce double mutant nous a aussi permis d'établir que l'expression de *Grem1* est affectée dans les bourgeons de membres, suggérant fortement que l'oligodactylie observée est le résultat d'une altération de la boucle SHH-GREM1-FGF, ayant pour conséquence un défaut d'expansion des cellules progénitrices des doigts. Ainsi pour conclure, nos résultats indiquent que l'expression distale de *Hoxa11* contribue à la régulation de la boucle SHH-GREM1-FGF. En présence de *Gli3*, l'expression distale de *Hoxa11* a une action positive sur l'expression de *Grem1*, entraînant le développement d'un membre polydactyle. En l'absence de *Gli3*, *Hoxa11* distal réprime l'expression de *Grem1* causant la formation d'un membre oligodactyle.

Ce travail a permis une meilleure compréhension de l'importance des changements de régulation des gènes *Hox* survenus au cours de l'évolution et dans le développement des membres, notamment sur le contrôle du nombre de doigts et la mise en place de la pentadactylie chez les tétrapodes.

**Mots-clés** : gènes *Hox*, Région cis-régulatrice, Régulation, Évolution, Membre, Nageoire, Pentadactylie, Polydactylie, Oligodactylie

## Abstract

Limb development requires the proper function of genes belonging to the *HoxA* and *HoxD* gene clusters, which are differentially expressed along the proximal-distal in a collinear fashion corresponding to their position along the chromosome. This regulatory strategy is essential to specify the identity of each limb segment during limb development. We have previously shown that the expression of *HoxA* genes in the distal limb relies on several remote transcriptional enhancers which come into 3D contact with the *Hoxa9* to *Hoxa13* genes. However, *Hoxa11* is not expressed in the distal limb and multiple lines of evidence suggest that a mechanism exists to specifically prevent *Hoxa11* expression in distal limb

In the course of evolution, the fin to limb transition represents one of the most crucial morphological adaptations associated with the switch from an aquatic to terrestrial lifestyle. While most modern tetrapods are pentadactyl, fossil records indicate that the first tetrapods were polydactylous.

In chapter 2, we have shown that a change in *Hoxa11* gene regulation over the course of vertebrate evolution has likely played a role in the acquisition/stabilization of the pentadactyl state in tetrapods. In zebrafish, *hoxa11* and *hoxa13* genes are expressed in overlapping domains in the fin bud. On the other hand, in the mouse, *Hoxa11* and *Hoxa13* have mutually exclusive expression domains in the limb bud. *Hoxa11* is expressed in the proximal region of the limb bud (future zeugopod) whereas *Hoxa13* is expressed in the most distal region (future autopod). We have shown that the absence of *Hoxa11* expression in the distal limb bud is due to the presence of an enhancer located in the intron of *Hoxa11*. Under the control of HOXA13 and HOXD13 proteins, this enhancer induces antisense transcription which consequently prevents the transcription of *Hoxa11* in the autopod. Moreover, we have shown that this enhancer is absent in zebrafish, suggesting that its emergence occurred during the fin to limb transition. We proceeded to delete this enhancer in the mouse and observed a distal expansion of the *Hoxa11* expression domain in the limb bud. We have also shown in the mouse that the

expression of *Hoxa11* in the *Hoxa13* expressing domain of the limb bud results in the formation of a polydactylous limb (*Prx1Cre* ; *Rosa<sup>Hoxa11/Hoxa11</sup>* or *A11KI* mouse line). As such, our results indicate that the emergence of this enhancer in the intron of *Hoxa11*, throughout evolution, has permitted the restriction of the *Hoxa11* expression domain to the proximal region of the limb by a mechanism of repression implicating HOX13 proteins and the antisense transcription. In addition, based on the polydactyly phenotype resulting from the expression of *Hoxa11* in the distal region of the limb, our results suggest that the evolution of *Hoxa11* regulation (which separated the expression domains of *Hoxa11* and *Hoxa13*) has contributed to the transition from polydactyly in early tetrapods to pentadactyly in extant tetrapods.

In chapter 3, we have studied the molecular causes for the development of the polydactylous limb which results from the distal expression of *Hoxa11* in the *A11KI* mouse line. Polydactyly is often caused by the ectopic expression of *Shh* in the anterior limb bud. To the contrary, our results suggest that ectopic *Shh* expression in limb buds of the *A11KI* mouse line is a consequence and not a cause of the polydactyly. Transcriptome analysis of *A11KI* limb buds has shown that the distal expression of *Hoxa11* results in both the downregulation of genes involved in establishing the anterior identity of the limb bud as well as the anteriorization of genes posteriorly expressed. Moreover, we have shown that HOXA11 binds the regulatory region of *Grem1*, a gene whose expression is essential for limb bud growth and digit formation. Our results indicate that the distal expression of *Hoxa11* reinforces the SHH-GREM1-FGF feedback loop which is probably the cause of polydactyly in the *A11KI* mouse line. Furthermore, studying the double mutant *Xt/Xt* ; *A11KI* allowed us to show that the polydactyly phenotype, resulting from distal *Hoxa11* expression, is dependent on *Gli3*. Indeed, the double mutant *Xt/Xt* ; *A11KI* mice develop oligodactylous limbs (digit number less than 5). Molecular analysis of this double mutant allowed us to establish that expression of *Grem1* is affected in limb buds and this strongly suggests that the observed oligodactyly is due to alteration of the SHH-GREM1-FGF feedback loop, which in turn causes a defect in expansion of the digit progenitor cells. Therefore, to conclude, our results demonstrate that the distal expression of *Hoxa11* contributes to the regulation of the SHH-GREM1-FGF feedback loop. In the presence of *Gli3*, distal *Hoxa11* expression positively regulates *Grem1* expression,

resulting in the development of a polydactylous limb. In the absence of *Gli3*, distal *Hoxa11* represses *Grem1* expression and causes the formation of an oligodactylous limb.

This work has provided a better understanding of the importance of changes in *Hox* genes regulation acquired over the course of evolution and for limb development, notably for the control of digit number and to establish the pentadactyl state in modern tetrapods.

**Keywords** : *Hox* genes, Enhancer, Regulation, Evolution, Limb, Fin, Pentadactyly, Polydactyly, Oligodactyly



# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux .....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations .....	xvi
Remerciements.....	xix
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION .....	1
1.1. Le développement des membres .....	2
1.1.1. Généralités .....	2
1.1.2. Initiation de la formation du bourgeon de member .....	4
1.1.2.1. La boucle de rétrocontrôle positive de la signalisation <i>Fgf</i> .....	4
1.1.2.2. Les gènes de la famille <i>Tbx</i> .....	4
1.1.2.3. L'acide rétinoïque.....	5
1.1.2.4. Les gènes de la famille <i>Hox</i> .....	6
1.1.2.5. La signalisation <i>Wnt</i> .....	7
1.1.3. Développement du membre selon l'axe P-D .....	9
1.1.3.1. Le modèle de la « zone de progression ».....	9
1.1.3.2. Le modèle de la « spécification précoce » .....	12
1.1.3.3. Le modèle du « front de différenciation ».....	13
1.1.3.4. Le modèle des « deux signaux » .....	14

<b>1.1.4. Spécification selon l'axe A-P du bourgeon de membre .....</b>	<b>17</b>
1.1.4.1. La ZPA et le modèle du « drapeau français ».....	17
1.1.4.2. Caractérisation moléculaire de la ZPA.....	17
1.1.4.3. Le modèle « à deux phase ».....	19
1.1.4.4. Spécification tardive de l'identité des doigts.....	19
1.1.4.5. Spécification A-P dépendante de <i>Gli3</i> .....	20
1.1.4.6. Contrôle de la régulation transcriptionnelle en cis de <i>Shh</i> et les facteurs impliqués .....	22
<b>1.1.5. La boucle de rétrocontrôle SHH-GREM1-FGF et la croissance du bourgeon de membre .....</b>	<b>23</b>
1.1.5.1. Mise en place de la boucle de rétrocontrôle SHH-GREM1-FGF .....	24
1.1.5.2. Rôle des gènes <i>Hox</i> dans l'expansion proliférative du bourgeon de membre.....	25
1.1.5.3. Terminaison de la boucle de rétrocontrôle SHH-GREM1-FGF .....	25
<b>1.2. La famille des gènes <i>Hox</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2.1. Caractéristiques principales .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2.2. Régulation des gènes <i>Hox</i> dans le développement des membres.....</b>	<b>29</b>
1.2.2.1. La colinéarité des gènes <i>Hox</i> dans le développement des membres.....	29
1.2.2.2. La régulation en cis des gènes <i>Hox</i> .....	30
1.2.2.3. Évolution de la régulation en cis des gènes <i>Hox</i> et la transition de la nageoire au membre. ....	34
<b>1.2.3. Rôle des gènes <i>Hox</i> dans la formation des différents segments du membre .</b>	<b>36</b>
<b>1.3. Rôle des gènes <i>Hox</i> dans l'émergence de la pentadactylie .....</b>	<b>40</b>
<b>Insights on the role of <i>Hox</i> genes in the emergence of the pentadactyl ground state .....</b>	<b>41</b>

Abstract .....	42
Introduction .....	43
<i>Hox</i> genes and digit development.....	44
Over-expression of 5' <i>HoxA/D</i> genes and the expansion of the digit progenitor pool .....	45
<i>Hox</i> genes and the modulation of the digit wavelength .....	46
Evolution of <i>Hox13</i> regulation.....	47
The mutually exclusive expression of <i>Hoxa11</i> and <i>Hoxa13</i> in modern tetrapods.....	49
Conclusion .....	51
Acknowledgements.....	55
<b>1.4. Les objectifs de recherche .....</b>	<b>56</b>
<b>1.4.1. Objectif 1 (Chapitre 2) .....</b>	<b>56</b>
<b>1.4.2. Objectif 2 (Chapitre 2) .....</b>	<b>57</b>
<b>1.4.3. Objectifs 3 (Chapitre 3) .....</b>	<b>57</b>
<b>CHAPITRE 2.....</b>	<b>58</b>
<b>L'ÉVOLUTION DE LA RÉGULATION DE <i>HOXA11</i> CHEZ LES VERTÉBRÉS EST LIÉE AU STADE PENTADACTYLE .....</b>	<b>58</b>
Authors contributions.....	59
<b>Evolution of <i>Hoxa11</i> regulation in vertebrates is linked to the pentadactyl state ..</b>	<b>60</b>
Abstract .....	61
Main text .....	62
Materials and Methods .....	83
Acknowledgements.....	89
<b>CHAPITRE 3.....</b>	<b>90</b>

<b>HOXA11 ET GLI3 INTÉRAGISSENT POUR CONTRÔLER L'EXPRESSION DE <i>GREM1</i> ET LE NOMBRE DE DOIGTS DANS LES SOURIS <i>A11KI</i></b> .....	<b>90</b>
<b>3.1. Contributions des auteurs</b> .....	<b>91</b>
<b>3.2. Résumé</b> .....	<b>92</b>
<b>3.3. Introduction</b> .....	<b>93</b>
<b>3.4. Résultats</b> .....	<b>95</b>
3.4.1. L'activation ectopique de la signalisation <i>Shh</i> n'est pas responsable de la polydactylie des souris <i>A11KI</i> .....	<b>95</b>
3.4.2. L'expression distale de <i>Hoxa11</i> dans le bourgeon de membre des souris <i>A11KI</i> est associée à une perte de l'identité antérieure et renforce l'expansion proliférative du bourgeon en contrôlant la boucle SHH-GREM1-FGF .....	<b>97</b>
3.4.3. L'expansion antérieure du domaine d'expression des gènes <i>5'HoxD</i> n'est pas responsable de la polydactylie chez les souris <i>A11KI</i> .....	<b>99</b>
3.4.4. La polydactylie des souris <i>A11KI</i> dépend de la fonction de <i>Gli3</i> .....	<b>100</b>
<b>3.5. Matériels et méthodes</b> .....	<b>103</b>
<b>3.6. Discussion</b> .....	<b>104</b>
<b>3.7. Remerciements</b> .....	<b>106</b>
<b>CHAPITRE 4</b> .....	<b>120</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>120</b>
<b>4.1. L'évolution de la régulation de <i>Hoxa11</i> chez les vertébrés et la pentadactylie</b> .....	<b>121</b>
<b>4.2. Interaction entre HOXA11 et GLI3 : de la polydactylie à l'oligodactylie</b> .....	<b>122</b>
<b>4.3. Homologie de structures nageoire/membre</b> .....	<b>124</b>
<b>4.4. HOXA11 : de l'activation à la répression</b> .....	<b>125</b>
<b>4.5. Réduction du nombre de doigts chez les mammifères</b> .....	<b>127</b>

<b>4.6. Le contrôle du nombre de doigts et le mécanisme de Turing.....</b>	<b>128</b>
<b>4.7. Divergence fonctionnelle entre HOXA11 et HOXA13 .....</b>	<b>129</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>i</b>
<b>Annexe 1 : HOXA11 et HOXA13 se lient aux régions cis-régulatives actives dans le bourgeon de membre .....</b>	<b>i</b>
<b>Annexe 2 : Spécificité de HOXA11 vs HOXA13.....</b>	<b>ii</b>
<b>Annexe 3 : Article publié dans le journal Genesis (Scotti et al. 2015) .....</b>	<b>iii</b>

## Liste des tableaux

Table 2.S1. Summary of transient transgenic embryos analysed.....	82
---	----

## Liste des figures

Figure 1.1. La structure du membre .....	3
Figure 1.2. L'initiation de la formation du bourgeon de membre.....	9
Figure 1.3. Le modèle de la « zone de progression ».....	11
Figure 1.4. Le modèle du « front de différenciation » .....	14
Figure 1.5. Le modèle des « deux signaux ».....	16
Figure 1.6. Le modèle du « gradient spatio-temporel ».....	18
Figure 1.7. Réseaux de gènes contrôlant le développement du bourgeon de membre .....	26
Figure 1.8. Conservation de l'organisation génomique des gènes <i>Hox</i> et de leur patron d'expression .....	28
Figure 1.9. La régulation des gènes <i>HoxD</i> pendant le développement des membres .....	33
Figure 1.10. Les gènes <i>Hox</i> sont requis pour la formation des différents segments du membre .....	38
Figure 1.11. Evolution of <i>Hoxa11</i> regulation in vertebrates is linked to the pentadactyl state.....	53
Figure 2.1. The proximal restriction of <i>Hoxa11</i> is linked to antisense transcription at the <i>Hoxa11</i> locus.....	68
Figure 2.2. Deletion of the distal enhancer in <i>Hoxa11</i> intron results in impaired antisense transcription and gain of sense transcription in distal cells.....	70
Figure 2.3. <i>Hox13</i> inactivation disrupts <i>Hoxa11</i> antisense transcription in distal cells and distal <i>Hoxa11</i> expression results in the formation of supernumerary digits.....	71
Figure 2.4. The mouse <i>Hoxa11</i> antisense enhancer is functional in distal fins .....	72
Figure 2.S1. Absence of antisense transcription 3' to the <i>Hoxa11</i> promoter in the <i>Hoxa11</i> <sup>eGFP/eGFP</sup> limb and evidence that <i>Hoxa11as-b</i> transcripts produced in <i>trans</i> have no effect on <i>Hoxa11</i> expression.....	73
Figure 2.S2. Deletion of the distal enhancer in <i>Hoxa11</i> intron using CRISPR-Cas9 .....	74
Figure 2.S3. The distal enhancer located in the <i>Hoxa11</i> intron is bound by HOXA13 and HOXD13 in distal limb cells and its activity is increased by HOXA13 in 293T cells .....	75

Figure 2.S4. Individual inactivation of <i>Hoxa13</i> or <i>Hoxd13</i> is not sufficient to fully abrogate antisense transcription in distal limbs .....	76
Figure 2.S5. Inactivation of both <i>Hoxa13</i> and <i>Hoxd13</i> disrupts antisense transcription overlapping with the <i>Hoxa11</i> exon 1 .....	77
Figure 2.S6. Generation of the <i>Rosa<sup>Hoxa11</sup></i> knock-in mouse line.....	78
Figure 2.S7. The conditional gain of <i>Hoxa11</i> using the <i>Hoxa13Cre</i> allele results in the formation of supernumerary digits .....	79
Figure 2.S8. <i>hoxa11</i> and <i>hoxa13</i> are expressed in overlapping domains in zebrafish fins .....	80
Figure 2.S9. Absence of antisense transcription at the <i>hoxa11a</i> and <i>hoxa11b</i> loci in zebrafish fins.....	81
Figure 3.1. L'activation ectopique de la signalisation <i>Shh</i> n'est pas responsable de la polydactylie des souris <i>A11KI</i> .....	107
Figure 3.2. L'expression distale de <i>Hoxa11</i> dans le bourgeon de membre des souris <i>A11KI</i> est associée à une perte de l'identité antérieure .....	108
Figure 3.3. L'expression distale de <i>Hoxa11</i> dans le bourgeon de membre des souris <i>A11KI</i> renforce l'expansion proliférative du bourgeon en contrôlant la boucle SHH-GREM1-FGF .....	110
Figure 3.4. L'expansion antérieure du domaine d'expression des gènes 5' <i>HoxD</i> n'est pas responsable de la polydactylie chez les souris <i>A11KI</i> .....	111
Figure 3.5. La polydactylie des souris <i>A11KI</i> dépend de la fonction de <i>Gli3</i> .....	113
Figure 3.S1. La signalisation <i>Shh</i> dans les bourgeons de membres des souris <i>A11KI</i> ....	114
Figure 3.S2. Validation de la spécificité de l'anticorps anti-HOXA11 pour le Chip-Seq .....	115
Figure 3.S3. L'expression distale de <i>Hoxa11</i> dans le bourgeon de membre des souris <i>A11KI</i> est associée à une perte de l'identité antérieure .....	116
Figure 3.S4. L'expression distale de <i>Hoxa11</i> dans le bourgeon de membre des souris <i>A11KI</i> est associée à expansion antérieure du domaine d'expression des gènes 5' <i>HoxD</i> .....	117
Figure 3.S5. La polydactylie des souris <i>A11KI</i> dépend de la fonction de <i>Gli3</i> .....	118
Figure 3.S6. La liaison de HOXA11 et GLI3 colocalisent dans la région régulatrice de <i>Ptch1</i> .....	119



**Figure 4.1. Modèle d'action hypothétique de HOXA11 distal dans le contrôle du nombre de doigts. .... 123**

## Liste des abréviations

AER : « apical ectodermal ridge », crête apicale ectodermique

A-P : antéro-postérieur

AR : acide rétinoïque

A11KI : lignée de souris Prx1Cre ; Rosa<sup>Hoxa11/Hoxa11</sup>

BAC : bacterial artificial chromosome

Bmp : Bone morphogenetic protein

Cyp26b1 : Cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1

D-V : dorso-ventral

Enhancer : région cis-régulatrice

EMT : « epithelial-mesenchymal transition », transition épithelio-mésenchymateuse

Fgf : Fibroblast growth factor

Fmn : Formin

Gli1/2/3 : Glioma-associated oncogene family zinc finger 1/2/3

Grem1 : Gremlin 1

Hox : Homeobox

Irx3/5 : Iroquois homeobox 3/5

LEF : Lymphoid enhancer binding factor

Lhx : LIM homeobox

LPM : « lateral plate mesoderm », plaque latérale mésodermique

Meis1/2 : Meis homeobox 1/2, Myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog 1/2

Msx2 : Msh homeobox homolog 2

Pax9 : paired box 9

P-D : proximo-distal

PFR : « phalanx forming region », région formant les phalanges

Raldh2 : Retinaldehyde specific deshydrogenase type 2

Shh : Sonic hedgehog

Smo : Smothered

Sox9 : SRY box 9

TAD : « topological associated domain », domaine d'association topologique

Tbx4/5 : T-box 4/5

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

Wnt : Wingless type MMTV integration site family

Xt : Gli3<sup>XtJ</sup>, inactivation génétique de Gli3 chez la souris

ZPA : « zone of polarizing activity », zone d'activité polarisante

ZRS : ZPA regulatory sequence

*À mon père et ma mère*

## Remerciements

*Je remercie tout d'abord ma directrice de thèse, Dre Marie Kmita, pour son soutien sans faille tout au long de mon doctorat. Marie, merci pour tes conseils, ton écoute et ton excellente supervision. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir pris à cœur de développer en moi les qualités d'un jeune chercheur (notamment en m'envoyant régulièrement dans des congrès scientifiques internationaux). Merci de m'avoir poussé à aller toujours plus loin, tu as éveillé en moi une curiosité scientifique pour laquelle je te serai toujours reconnaissant. Je suis admiratif de ta rigueur scientifique et intellectuelle que tu t'efforces de nous transmettre au laboratoire. Pour finir, merci aussi pour ton soutien au niveau personnel.*

*Je remercie tous les membres ayant participé à mes comités de thèse : Dr Jacques Drouin, Dr Maxime Bouchard, Dr Éric Lecuyer et Dr Jean-François Côté. Merci pour votre suivi et vos conseils tout au long de mon doctorat. Je remercie également Dr Éric Lecuyer, Dr Jean-François Côté, Dr Richard Bertrand et Dr Oliver Pourquoié d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.*

*Je remercie tout particulièrement Dre Marie-Andrée Akimenko et son étudiant au doctorat Robert Lalonde pour leur excellent travail lors de notre collaboration qui fut très agréable.*

*Je remercie également les membres des différents plateaux technologiques de l'IRCM, à savoir Dr Qinzhang Zhu et Lian Li en « Microinjection et transgénèse », Dr Odile Neyret, Agnès Dumont et Myriam Rondeau en « Biologie moléculaire et génomique fonctionnelle », Dr Dominique Fillion en « Microscopie et imagerie » et Jessica Barthe pour la gestion parfaite de nos souris. Merci à tous pour votre expertise et votre assistance.*

*Évidemment je remercie tous les membres passés et présents du laboratoire. Ce fut extrêmement agréable de travailler à vos côtés. Je tiens à remercier Annie Dumouchel pour son aide dans les expériences et son excellente gestion du laboratoire. Merci à tous pour les discussions scientifiques et tous les moments chaleureux passés avec vous en dehors du laboratoire. Je tiens tout particulièrement à remercier Dr Rushikesh Sheth. Rushi, thanks a lot*

*for all your support during my thesis, you've been the best mentor I could imagine to have. Thanks a lot for taking care and teaching me your skills and knowledge. All our scientific interactions (but not only) were absolutely essential and guide me during my thesis (remembering our time spent at Else's). Thank you Rushi to be my friend!*

*Merci à Claudia, Marine, Laura, Maëva, Rushi, Konstantin, Marika et Alexandre pour votre soutien et votre amitié. Nos fins de semaine en chalet, nos sorties et tous les moments passés ensembles ont été parfaits et essentiels. Toutes ces années ont été plus qu'agréables grâce à votre présence. Il y a des gens que l'on n'oublie pas et vous en faites partie. Alexandre, merci également pour ton expertise, j'ai vraiment apprécié travailler avec toi (au plaisir pour de futures collaborations!). Pour mon quotidien à l'IRCM, merci également à Marine L, Carine, Noumeira, Afnan, Aurèle, Ludivine, Deepak et Steve pour votre support et amitié.*

*Pour finir, je remercie mes parents. Merci pour votre soutien sans faille. Merci de croire en moi et de toujours me pousser à aller plus loin. Merci pour les valeurs que vous m'avez transmises qui m'ont servi tout au long de mon doctorat et qui me servent dans la vie de tous les jours. Merci pour tous les sacrifices que vous avez pu faire pour que je puisse toujours être dans les meilleures conditions. Merci d'être vous, je vous aime! Je remercie également mon frère et ma sœur.*

*Yacine*

**CHAPITRE 1**  
**INTRODUCTION**

# 1.1. Le développement des membres

## 1.1.1. Généralités

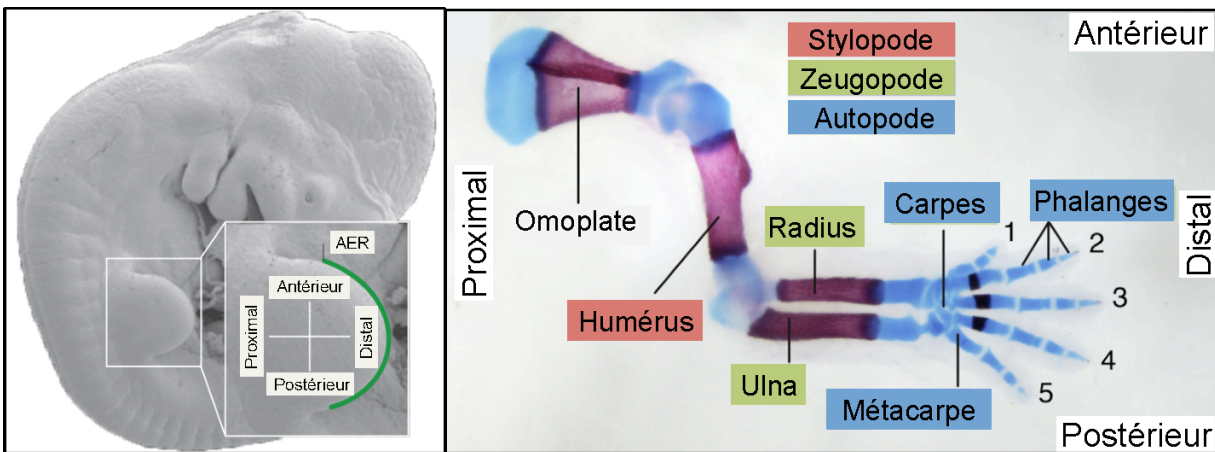
Le membre est un modèle de choix pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires communs contrôlant la morphogenèse des organes. Structure complexe et organisée, le membre, de part son accessibilité, permet la pratique de manipulations expérimentales et une observation facilitée des conséquences phénotypiques de celles-ci. La combinaison de manipulations expérimentales sur les membres, principalement chez le poulet, la génétique de la souris (perte et gain de fonction de gènes) ainsi que les techniques actuelles de génomique ont permis, au fil des années, l'identification des mécanismes développementaux à l'origine de la formation des membres ainsi que des mécanismes de régulation des gènes sous-jacents.

Chez les tétrapodes, super-classe d'animaux vertébrés comportant deux paires de membres, le bourgeon de membre émerge de la plaque latérale mésodermique (LPM) au niveau du flanc de l'embryon. Ce bourgeon de membre, constitué de cellules du mésenchyme non différenciées recouvertes d'une couche de cellule épithéliale, se développe de façon spatio-temporelle selon trois axes d'orientations : l'axe proximo-distal (P-D), l'axe antéro-postérieur (A-P) et l'axe dorso-ventral (D-V), chacun contrôlé par un centre de signalisation. À terme, le membre adopte une structure composée de trois segments qui peuvent être définis selon l'axe P-D. En proximal, le stylo-pode forme l'humérus (fémur pour les membres postérieur), dans la région intermédiaire le zeugopode est constitué du radius et de l'ulna (tibia et fibula pour les membres postérieurs) et dans la partie la plus distale l'autopode, correspondant à la main, est composé des os des carpes, des métacarpes et des phalanges (tarses, métatarses et phalanges des pieds pour les membres postérieurs) (Figure 1.1).

Dans "*On the Origin of Species*" (Darwin, 1859), Darwin a écrit "What can be more curious than that the hand of a man, formed for grasping, that of a mole for digging, the leg of the horse, the paddle of the porpoise, and the wing of the bat, should all be constructed on the same pattern, and should include similar bones, in the same relative positions?". Il veut ainsi illustrer l'homologie du schéma d'organisation des éléments osseux composant les membres des différentes espèces. En effet, le nombre d'éléments osseux constituant le stylo-pode et le



zeugopode est relativement conservés entre les espèces. En revanche, le nombre d'éléments osseux (doigts) composant l'autopode est sujette à variation reflétant le besoin d'adaptation au mode de vie adoptée par les différentes espèces (Cooper *et al.*, 2014; de Bakker *et al.*, 2013; Lopez-Rios *et al.*, 2014). Cette forte homologie de structure, malgré quelques variations, laisse présager de mécanismes généraux sous-jacents à la formation des membres entre les différentes espèces. En effet, la formation du membre est contrôlée par des mécanismes conservés entre espèces impliquant des facteurs clés parmi lesquels sont : les gènes de la famille *Hox* et *Tbx*, l'acide rétinoïque (AR) et les signalisations *Fgf*, *Shh*, *Wnt* et *Bmp*.



**Figure 1.1. La structure du membre**

Image d'un embryon au stade embryonnaire 10.5 (E10.5). L'agrandissement montre le bourgeon de membre antérieur avec les deux axes principaux P-D et A-P indiqués. La crête apicale ectodermique (AER) est indiquée en vert (**à gauche**). Le squelette du membre est formé de trois segments le long de l'axe P-D : le stylo-pode (humérus), le zeugopode (radius et ulna) et l'autopode (carpes, métacarpes et phalanges). Les doigts sont numérotés de 1 à 5 le long de l'axe A-P (**à droite**). Adapté de (Lopez-Rios, 2016; Zeller *et al.*, 2009).

## 1.1.2. Initiation de la formation du bourgeon de membre

### 1.1.2.1. La boucle de rétrocontrôle positive de la signalisation *Fgf*

Les premières expériences identifiant des facteurs clés nécessaires à l'initiation du bourgeon de membre proviennent d'expérimentations réalisées chez le poulet. Une source de FGFs appliquée au niveau de la LPM, entre les domaines formant les membres antérieurs et postérieurs, permet la formation ectopique d'un membre complet (Cohn *et al.*, 1995). De plus, les embryons de souris perte de fonction pour le gène *Fgf10* ne forment pas de bourgeon de membre avec pour conséquence phénotypique une absence d'éléments squelettiques à l'exception d'une omoplate rudimentaire (Min *et al.*, 1998; Sekine *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1998), ce qui montre son importance pour l'initiation du bourgeon de membre. *Fgf10* est exprimé dans les cellules du mésenchyme du bourgeon de membre précoce et agit par signalisation via des récepteurs localisés dans les cellules de la crête apicale ectodermique (AER), ligne de cellules spécialisées de l'ectoderme au niveau de l'extrémité distale du bourgeon. *Fgf10* induit et maintient ainsi l'expression de *Fgf8* dans les cellules de l'AER. À son tour, le ligand FGF8 agit par signalisation via des récepteurs, localisés dans le mésoderme sous-jacent, en régulant positivement l'expression de *Fgf10*. Ainsi, l'initiation du bourgeon de membre se fait par l'établissement d'une boucle de rétrocontrôle positive de la signalisation *Fgf*, nécessaire à l'émergence du bourgeon de membre et à sa croissance (Xu *et al.*, 1998) (Figure 1.2).

### 1.1.2.2. Les gènes de la famille *Tbx*

D'autres facteurs clés, tels que les gènes de la famille *Tbx* sont importants pour l'initiation du bourgeon de membre. Les gènes *Tbx5* et *Tbx4* sont responsables de la mise en place de la boucle de rétrocontrôle entre *Fgf10* et *Fgf8* dans le bourgeon de membre. L'expression de *Tbx5* est restreinte à la LPM et au mésenchyme du membre antérieur, alors que *Tbx4* s'exprime dans la LPM et dans le mésenchyme du membre postérieur. Les pertes de fonction de ces gènes chez la souris ont montré leur rôle critique dans l'initiation. En effet, les

embryons de souris ayant une délétion du gène *Tbx5* ne forment pas de bourgeon de membres antérieurs. En absence de *Tbx5*, l'expression de *Fgf10* n'est pas initié et en conséquence la boucle de rétrocontrôle de la signalisation *Fgf* entre le mésenchyme et l'ectoderme n'est pas établie. *Fgf10* semble être une cible directe de *Tbx5* (Agarwal *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2002; Rallis *et al.*, 2003). De plus, le phénotype squelettique du mutant conditionnel *Tbx5*, avec absence totale de membre, est plus sévère que celui du mutant *Fgf10*, ce qui suggère que *Tbx5* aurait une action additionnelle à l'activation de *Fgf10* dans l'initiation du bourgeon de membre. Une délétion de *Tbx4* engendre la formation d'un bourgeon de membre postérieur de taille réduite qui ne parvient pas à croître. L'absence de *Tbx4* entraîne une activation et une maintenance incomplète de l'expression de *Fgf10*. Ainsi, *Tbx4* nécessaire au bon établissement de la boucle de rétrocontrôle de la signalisation *Fgf*, ne semble pas être le seul facteur impliqué au niveau du bourgeon de membre postérieur pour l'initiation (Naiche and Papaioannou, 2003).

L'initiation du bourgeon de membre est accompagnée d'une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) au niveau de la plaque somatopleurale latérale. La présence de cette EMT a été montrée chez le poulet grâce a des expériences de suivi de lignage des cellules de la somatopleurale latérale (Gros and Tabin, 2014). L'analyse de souris mutantes pour *Tbx5* et *Fgf10* montre une diminution de la proportion de cellules du mésenchyme comparée à la proportion des cellules épithéliales dans le bourgeon de membre (Gros and Tabin, 2014). Ces résultats démontrent ainsi que les gènes *Tbx5* et *Fgf10*, nécessaire à l'initiation, sont en partie responsables de la EMT de l'épithélium de la somatopleure donnant naissance au mésenchyme du bourgeon de membre.

### 1.1.2.3. L'acide rétinoïque

Le futur territoire duquel le bourgeon du membre émerge est spécifié moléculairement avant même son apparition au jour E9.5. L'acide rétinoïque (AR) joue un rôle dans le développement du membre à de nombreuses reprises dans le temps. Avant même l'initiation du bourgeon de membre, l'AR est requis. Les souris avec une délétion de *retinaldehyde*

*dehydrogenase 2 (Raldh2)*, enzyme essentiel à la synthèse de l'AR, ne forment pas de bourgeon de membre (Niederreither *et al.*, 1999). De même, le traitement d'embryons de poulet avec des inhibiteurs de *Raldh2* empêche la formation d'un bourgeon de membre (Stratford *et al.*, 1996). Des expériences réalisées chez le poulet ont montrés que l'initiation du bourgeon est dépendante de signaux adjacents à l'axe embryonnaire. En effet, le placement d'une barrière d'alluminium entre les somites et la LPM bloque la formation du bourgeon de membre (Murillo-Ferrol, 1965; Stephens and McNulty, 1981; Sweeney and Watterson, 1969). Ainsi l'AR, facteur axial de l'initiation du bourgeon de membre, donnerait la compétence à la LPM de former un bourgeon de membre.

#### 1.1.2.4. Les gènes de la famille *Hox*

Les gènes de la famille *Hox*, en particulier les gènes du groupe *HoxC*, ont été montré comme ayant un rôle non à proprement parler dans l'initiation du bourgeon de membre mais dans le positionnement du bourgeon de membre le long de l'axe rostro-caudal de l'embryon. En effet, les gènes du groupe *HoxC* présentent un patron d'expression restreint au niveau de la plaque latérale mésodermique du flanc de l'embryon qui spécifie la région où les membres émergent (Cohn *et al.*, 1997; Cohn and Tickle, 1999). *Hoxc4* et *Hoxc5* sont exprimés dans le mésenchyme du territoire donnant le futur membre antérieur (Burke *et al.*, 1995; Savard *et al.*, 1988; Tabin, 1989) alors que *Hoxc9*, *Hoxc10* et *Hoxc11* sont principalement exprimés de façons restreintes dans le mésenchyme donnant le futur membre postérieur. *Hoxc6* et *Hoxc8* quant à eux se retrouvent exprimés dans la région du flanc entre les membres antérieurs et postérieurs. L'analyse d'un élément cis-régulateur dans l'intron 2 du gène *Tbx5* a été identifié comme la région permettant aux gènes *Hox* des groupes paralogues 4 et 5 d'activer sa transcription au niveau du membre antérieur et aux gènes *Hoxc9*, *Hoxc10* et *Hoxc11* de réprimer son expression au niveau du membre postérieur. Ainsi, les facteurs de transcription HOX, via l'établissement d'un « code HOX » d'expression collinéaire, ont été suggérés comme responsable de la formation d'une frontière entre les domaines d'expression positif et négatif de *Tbx5* au niveau de la plaque latérale mésodermique le long de l'axe rostro-caudal, correspondant aux futurs membres antérieurs et postérieurs respectivement (Minguillon *et al.*,

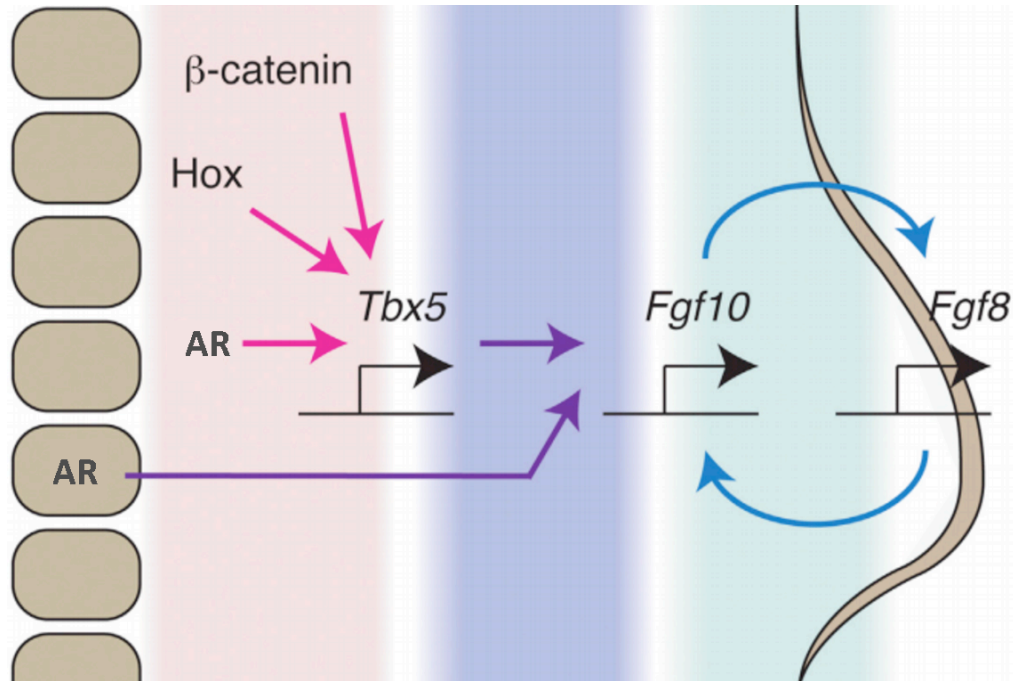
2012; Nishimoto *et al.*, 2015). Les éléments cis-régulateurs contrôlant l'expression de *Tbx4* ont été identifiés (Menke *et al.*, 2008), cependant les facteurs de transcription clés permettant la restriction de son expression aux membres postérieurs n'ont pas été reportés. En revanche, les souris ayant une délétion de tous les gènes du groupe *HoxC* ne présentent pas de défaut de positionnement de leurs membres le long de l'axe rostro-caudal de l'embryon (Suemori and Noguchi, 2000). Il est ainsi vraisemblable que d'autres gènes *Hox* participent de façon redondante à ce processus. De plus, d'un point de vue évolutif, la perte des membres chez le serpent a été corrélée avec une altération de l'expression des gènes *Hox* (Cohn and Tickle, 1999) ainsi une interprétation différente du « code HOX » pourrait jouer un rôle dans la perte des membres dans ce lignage (Woltering *et al.*, 2009).

#### 1.1.2.5. La signalisation *Wnt*

L'expression de *Tbx5* est aussi régulée par  $\beta$ -catenin/TCF/LEF, un des complexes médiant l'activité de la signalisation *Wnt*. Chez le poisson zèbre, comme chez le poulet, la voie Wnt/ $\beta$ -catenin est requise pour l'initiation du bourgeon de membre et notamment pour l'expression de *Tbx5* (Ng *et al.*, 2002). Chez le poisson zèbre, *Wnt2b* est exprimé dans le tissu médian à la LPM aux stades précédant l'émergence du bourgeon de la nageoire pectorale. Chez le poulet, *Wnt2b* est exprimé dans la partie médiale du coelom et dans les somites (Kawakami *et al.*, 2001). Dans ces espèces, le blocage de la voie de signalisation *Wnt*, à l'aide de morpholino contre *Wnt2b* chez le zebrafish et d'adénovirus exprimant *Axin* chez le poulet, entraîne une diminution de l'expression de *Tbx5* (Ng *et al.*, 2002). Le rôle de la signalisation *Wnt* dans l'initiation du bourgeon de membre chez la souris est cependant moins clair. En effet, les ligands clés de la voie *Wnt* nécessaires à l'initiation n'ont pas été identifiés. *Wnt2* est exprimé au niveau de la LPM (Monkley *et al.*, 1996; Nishimoto *et al.*, 2015), cependant la délétion de *Wnt2* n'engendre pas de défaut de la formation du membre (Monkley *et al.*, 1996). Ceci suggère que d'autres ligands de la famille *Wnt* pourraient agir de façons redondantes pour le processus d'initiation chez la souris. En revanche, l'activation de la voie Wnt- $\beta$ -catenin est plus forte dans la LPM au niveau des territoires formant les futurs membres que entre les membres eux-mêmes, suggérant l'importance de cette voie dans l'initiation. De plus, les

embryons mutants conditionnels pour *β-catenin* présentent un défaut de l'émergence du bourgeon de membre postérieur (Kawakami *et al.*, 2011) et la présence de site de liaison pour les facteurs de transcription TCF/LEF au niveau de l'élément cis-régulateur de *Tbx5* suggère leur importance pour le contrôle de son expression. Cependant, en l'absence de LEF1 et TCF1, l'initiation du bourgeon de membre a lieu correctement (Galceran *et al.*, 1999). Ainsi, d'autres facteurs de cette famille ayant une expression plus faible, tels que TCF3 et TCF4 pourraient être suffisants pour compenser et induire le programme de l'initiation du bourgeon de membre.

En résumé, au moment de l'initiation du bourgeon de membre, l'AR produite par *Raldh2* au niveau de la LPM, induit directement l'expression des gènes *Tbx* en coopération avec *β-catenin*/TCF/LEF et les gènes *Hox*. Puis l'AR produit au niveau des somites agit de façon coordonnée avec *Tbx4* et *Tbx5* pour induire l'expression de *Fgf10*. Celui-ci dans le mésenchyme du bourgeon de membre induit l'expression de *Fgf8* dans l'ectoderme sus-jacent de l'AER pour mettre en place la boucle de rétro-contrôle positive *Fgf10-Fgf8* nécessaire à la croissance du membre (Figure 1.2).



**Figure 1.2. L'initiation de la formation du bourgeon de membre**

Au niveau de la plaque latérale mésodermique (LPM), l'acide rétinoïque (AR), les gènes *Hox* et *β-catenin* agissent de façon coopérative pour induire l'expression de *Tbx5*. L'AR produite au niveau des somites et *Tbx5* induisent l'expression de *Fgf10*. Dans le bourgeon de membre, *Fgf10* induit l'expression de *Fgf8* dans l'AER sus-jacéent mettant en place la boucle de rétrocontrôle positive *Fgf10-Fgf8* nécessaire à la croissance du bourgeon de membre. Adapté de (Nishimoto *et al.*, 2015).

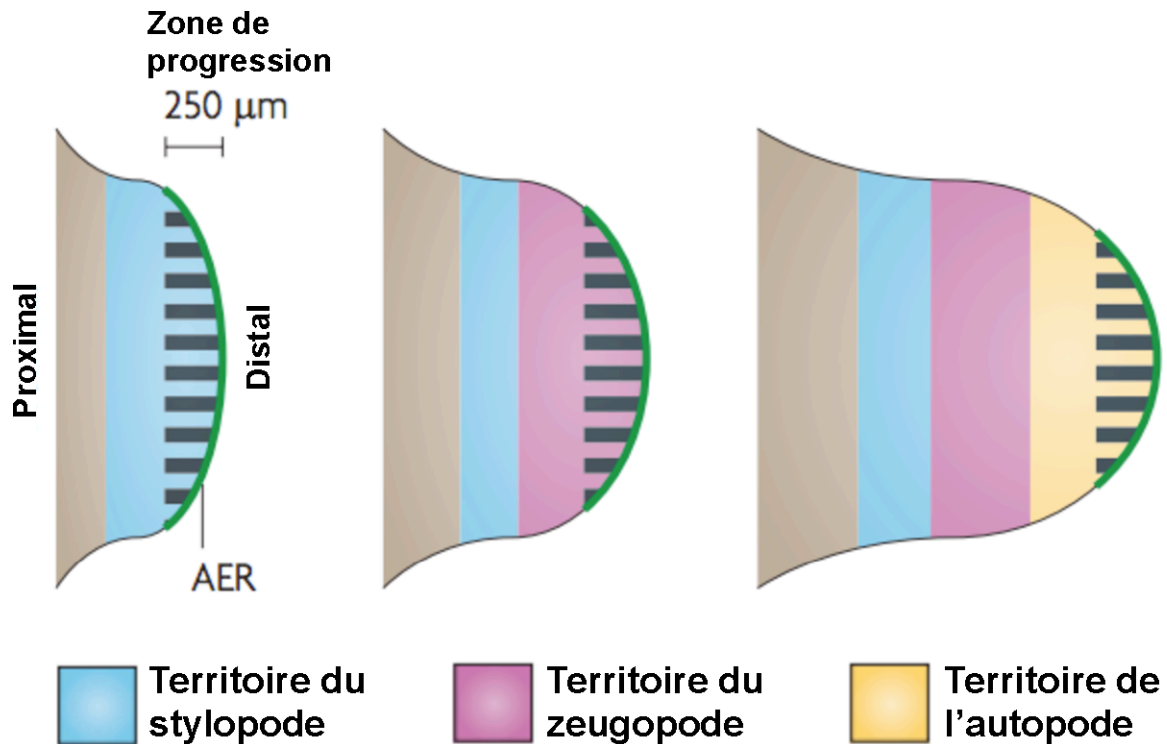
### 1.1.3. Développement du membre selon l'axe P-D

#### 1.1.3.1. Le modèle de la « zone de progression »

Le premier centre organisateur découvert comme étant impliqué dans la formation du membre est la crête apicale ectodermique (AER), correspondant à un renflement de l'épithélium formant une ligne au niveau de la partie la plus distale du bourgeon de membre (Saunders, 1948). Des expériences de retrait de l'AER du bourgeon de membre chez le poulet ont montré qu'elle était importante pour le développement du membre et notamment pour la croissance du

bourgeon dans l'axe P-D. En effet, un retrait de l'AER entraîne une troncation du membre (Saunders, 1948; Summerbell *et al.*, 1973). De plus, des expériences de greffes d'une AER tardive sur un bourgeon de membre précoce ou d'une AER précoce sur un bourgeon de membre tardif ont permis de déterminer que l'AER a un rôle permissif et non instructif dans la croissance du bourgeon de membre (Rubin and Saunders, 1972; Saunders, 1948; Summerbell *et al.*, 1973). Ainsi, le modèle de la « zone de progression » permettant d'expliquer le rôle de l'AER dans la croissance du bourgeon de membre dans l'axe P-D a été formulé (Summerbell *et al.*, 1973). Selon ce modèle, le bourgeon de membre croît sous influence de signaux provenant de l'AER. Celle-ci garde les cellules dans un état de prolifération et non-différenciées, correspondant à la « zone de progression ». Ainsi l'identité des cellules formant les différents segments de l'axe P-D sont spécifiées en fonction du temps passé dans cette zone. Les cellules passant un temps court dans la « zone de progrès » sont spécifiées pour former les structures proximales alors que les cellules subissant l'influence des signaux de l'AER de manière plus longue forment les structures plus distales (Figure 1.3).





**Figure 1.3. Le modèle de la « zone de progression »**

Le mésenchyme sous-jacent à l'AER contient des progéniteurs non spécifiés (la zone de progression est indiquée par les traits noirs), dont le destin cellulaire est contrôlé par les signaux de l'AER. Au cours de la croissance distale du bourgeon de membre, les cellules proximales ne sont plus sous l'influence des signaux de l'AER. Le moment de leur sortie de la zone de progression détermine leur identité P-D. Les cellules du mésenchyme quittant la zone de progression de façon précoce forment les structures proximales. Celles restant dans la zone de progression plus longtemps forment les structures plus distales. Adapté de (Zeller *et al.*, 2009).

### 1.1.3.2. Le modèle de la « spécification précoce »

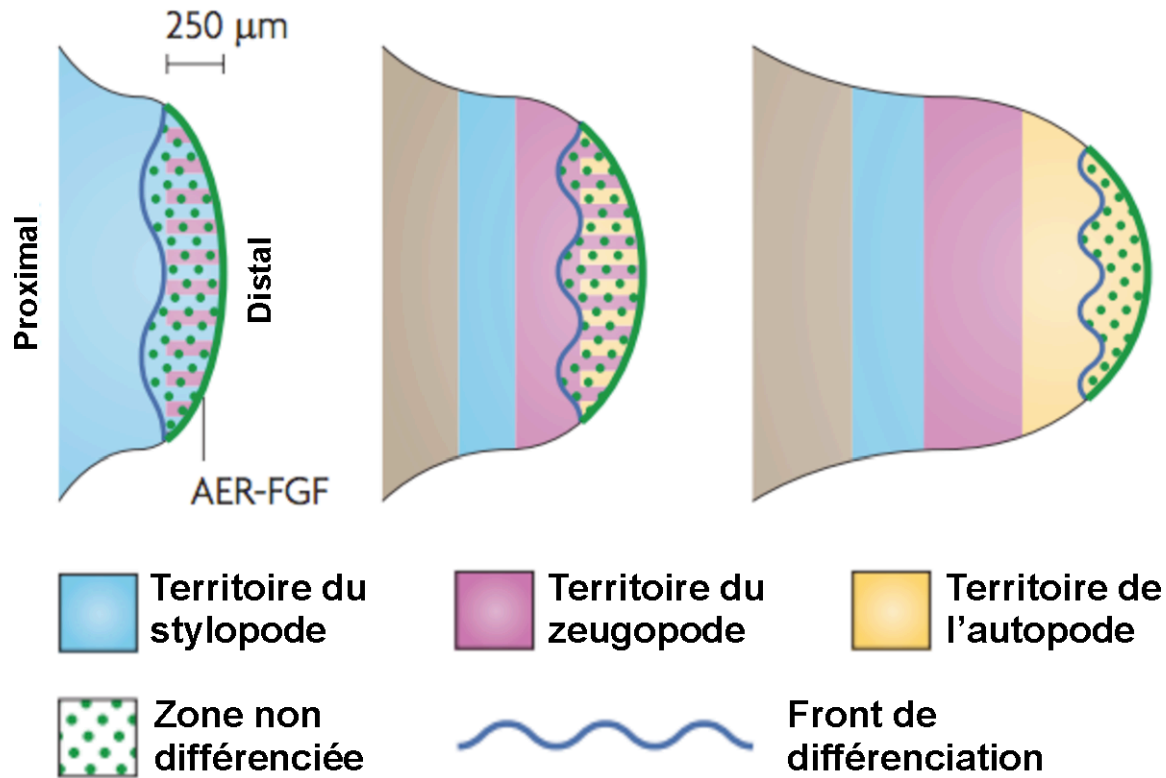
Au niveau de l'AER, les signaux primordiaux à son activité sont codés par les membres de la famille des *Fibroblast growth factors* (*Fgf*), *Fgf8* étant le premier à être exprimé dès la formation de l'AER. *Fgf4*, *Fgf9* et *Fgf17* sont activés séquentiellement dans la partie postérieure de l'AER et leur expression s'étend vers la partie plus antérieure de l'AER au cours du développement (Fernandez-Teran and Ros, 2008; Lewandoski *et al.*, 2000; Mariani *et al.*, 2008). Des expériences réalisées chez le poulet ont permis de montrer l'importance de la signalisation Fgf provenant de l'AER. En effet la croissance et l'établissement du schéma d'organisation du membre peuvent être rétablis lors de l'application de billes imprégnées de FGFs sur des bourgeons de membres de poulet ayant subi une ablation de l'AER (Fallon *et al.*, 1994; Niswander *et al.*, 1993). Des analyses génétiques chez la souris ont permis d'en apprendre davantage sur le rôle de ces ligands FGFs. L'inactivation simple des gènes codant pour *Fgf4*, *Fgf9* et *Fgf17* n'engendre pas de phénotype du membre relié à un défaut de l'AER (Mariani *et al.*, 2008). En revanche, les embryons mutants pour *Fgf8* présentent une AER réduite et la croissance du bourgeon de membre est retardée, ayant pour conséquence phénotypique une hypoplasie des trois segments du membre avec absence de certains éléments osseux (Lewandoski *et al.*, 2000; Moon and Capecchi, 2000). Alors que le simple mutant *Fgf4* ne présente pas de défaut du développement des membres et que sa fonction dans l'AER n'est donc pas indispensable, une augmentation de son expression est observée dans les embryons mutants pour *Fgf8*. Ce gain d'expression est suffisant pour compenser la perte de fonction de *Fgf8* et permettre tout de même la croissance du bourgeon de membre. Ainsi, la double inactivation génétique de *Fgf4* et *Fgf8* conduit à la formation d'un bourgeon de membre de taille nettement réduite et engendre un phénotype plus drastique avec une agénésie complète de la formation des éléments squelettiques du membre (Boulet *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2002).

En revanche, une expression transitoire de *Fgf4* et *Fgf8* dans le bourgeon de membre précoce est suffisante pour spécifier l'identité des trois segments du membre de l'axe P-D (Sun *et al.*, 2002). De plus, des expériences de suivi de lignage cellulaire du bourgeon de membre chez le poulet ont permis de formuler un nouveau modèle, appelé « spécification précoce ». Ainsi, selon ce modèle, l'identité P-D est spécifiée à un stade précoce et les réservoirs de progéniteurs sont ensuite soumis à prolifération de telle manière que les différentes structures

de l'axe P-D sont différenciées au cours du développement sous influence de la signalisation Fgf provenant de l'AER (Dudley *et al.*, 2002).

### 1.1.3.3. Le modèle du « front de différenciation »

Cependant, il n'existe pas de marqueurs moléculaires précoces connus pouvant supporter le modèle de la « spécification précoce ». Ainsi, un nouveau modèle a été proposé sous le nom de « front de différenciation » (Figure 1.4) (Tabin and Wolpert, 2007). Dans ce modèle, ayant pour but l'intégration des analyses génétiques, des manipulations chez le poulet ainsi que des marqueurs moléculaires, il est établi qu'au cours du développement, les cellules du mésenchyme dans la partie la plus distale du bourgeon (250 µm) sont maintenues dans un état non-différenciées due à leur exposition à la signalisation Fgf de l'AER. Les cellules du mésenchyme se différencient seulement après avoir quittés cette zone d'influence. Ainsi une fois le front de différenciation passé, les cellules expriment seulement les gènes qui marquent l'identité des différents segments. Par exemple, *Meis1* est exprimé dans le territoire du stylopode, *Hoxa11* dans le zeugopode et *Hoxa13* marque les cellules de l'autopode. Il a notamment été montré que des signaux ectodermiques *Wnt* en interaction avec les *Fgfs* de l'AER garde les cellules du mésenchyme les plus distales dans un état non-différencié et en prolifération. Les cellules du mésenchyme, se trouvant en dehors de cette zone d'influence, prolifèrent moins et expriment *SRY box containing 9 (Sox9)* et forment le cartilage des futurs éléments squelettiques du membre (ten Berge *et al.*, 2008).



**Figure 1.4. Le modèle du « front de différenciation »**

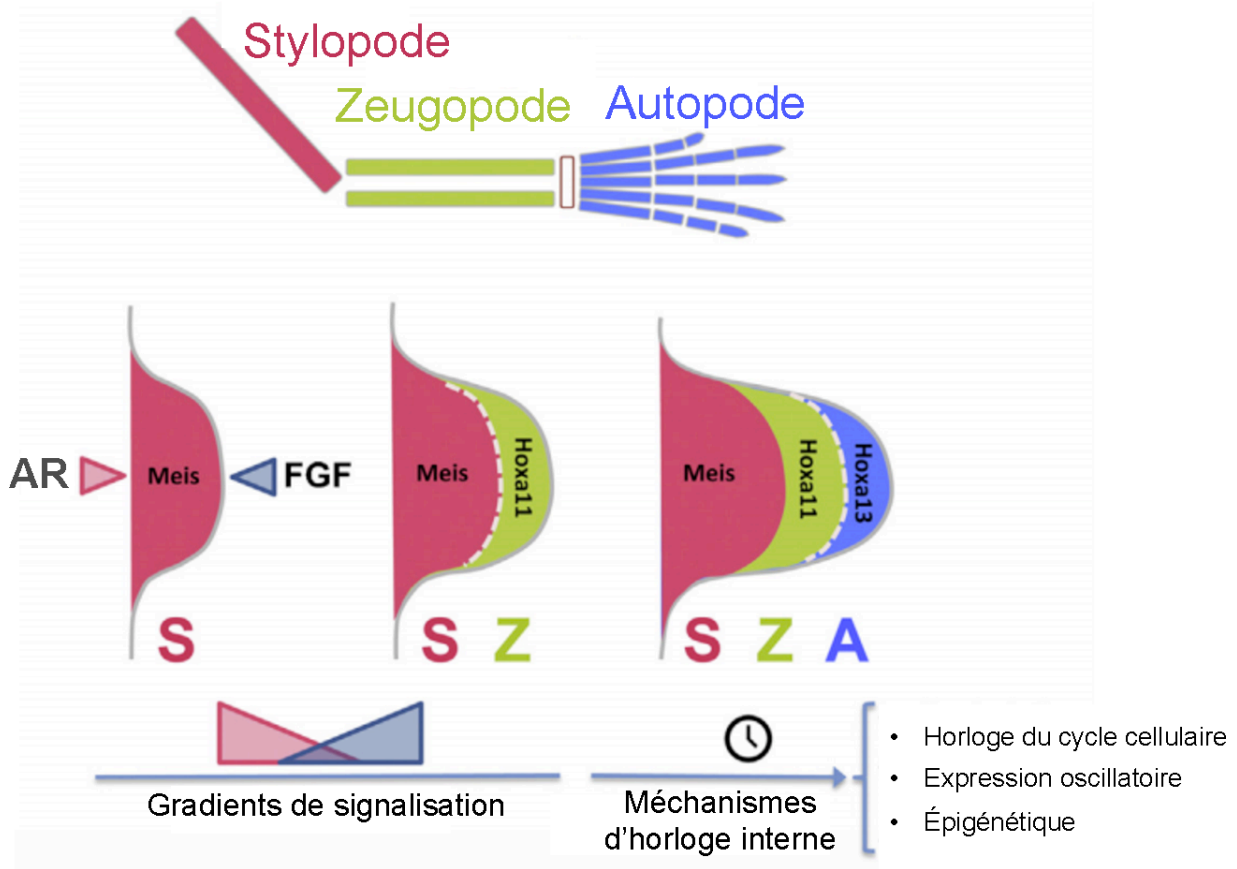
L'identité P-D est déterminée lorsque le mésenchyme en prolifération quitte la zone non différenciée, lorsque le mésenchyme n'est plus sous influence de la signalisation Fgf de l'AER. Une fois le front de différenciation passé, les cellules n'expriment plus que les gènes qui marquent l'identité d'un segment particulier. Adapté de (Zeller *et al.*, 2009).

#### 1.1.3.4. Le modèle des « deux signaux »

L'analyse de la relation entre les Fgfs et l'AR, dans les bourgeons de membres chez le poulet (Mercader *et al.*, 2000), a permis d'identifier l'AR, comme facteur donnant une identité proximale aux cellules du mésenchyme, notamment en induisant l'expression de *Meis1* et *Meis2*, connus pour leur rôle dans la spécification de l'identité du stylopode. L'expression ectopique de *Meis* dans la partie distale du bourgeon de membre entraîne une troncation des

structures distales et induit l'expression de gènes proximaux dans la partie distale (Mercader *et al.*, 1999; Mercader *et al.*, 2000). En revanche, les *Fgfs* de l'AER antagonisent la signalisation RA et entraînent les cellules dans un destin cellulaire distal. Il a été suggéré que *Fgfs* sont nécessaires pour l'activation des gènes *Hoxa11* et *Hoxa13*, marqueurs d'un destin cellulaire plus distal, formant le zeugopode et l'autopode respectivement (Capdevila *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 2011). L'utilisation d'un transgène ayant un gène rapporteur LacZ sous le contrôle de l'AR a permis de démontrer la présence d'un gradient P-D d'AR dans le bourgeon de membre. Ce gradient est produit par l'expression complémentaire de *Raldh2* et de *Cyp26b1* dans la zone proximale et distale respectivement (Yashiro *et al.*, 2004). De plus, les inactivations génétiques de *Raldh2* et de *Cyp26b1*, chez la souris, corroborent le rôle de l'AR comme facteur donnant un destin cellulaire proximal. En effet, chez les embryons mutants *Raldh2*, l'initiation du bourgeon est perturbée mais peut être restaurée par l'apport d'AR exogène, alors qu'une inactivation du gène *Cyp26b1* engendre une troncation de la partie distale du membre (Yashiro *et al.*, 2004). L'inactivation génétique de *Fgf8* en combinaison avec les autres *Fgfs* de l'AER, tels que *Fgf17*, *Fgf9* et *Fgf4* cause un phénotype de défaut du membre de plus en plus drastique, montrant ainsi que chaque *Fgf* contribue en partie à la signalisation Fgf de l'AER. Cette analyse a suggéré que les *Fgfs* de l'AER sont nécessaires pour la survie cellulaire et pour l'induction d'un destin cellulaire distal. Alors que le triple mutant *Fgf4*, *Fgf8* et *Fgf9* montre une absence des trois segments du membre, le mutant *Fgf4*, *Fgf8* et hétérozygote pour *Fgf9* possède un stylo-pode réduit, une structure distale apparentée à des doigts mais l'absence du zeugopode. Ce phénotype a été interprété comme une perte de l'information donnant lieu à une spécification intermédiaire correspondant au zeugopode, entre la partie proximale spécifiée par l'AR et la partie distale par les *Fgfs* (Mariani *et al.*, 2008). Ainsi le modèle des « deux signaux » a été formulé, où les activités opposées des signaux d'AR et *Fgfs*, dans la zone proximale et distale respectivement, entraînent la spécification selon l'axe P-D au stade précoce de la formation du bourgeon (Mariani *et al.*, 2008; Mercader *et al.*, 1999; Mercader *et al.*, 2000). Il a été montré que la transition entre la spécification du stylo-pode et du zeugopode est dépendante de la signalisation environnante, supportant la notion d'un mécanisme non autonome (Cooper *et al.*, 2011; Rosello-Diez *et al.*, 2011). En revanche, lors de la transition entre la spécification du zeugopode et de l'autopode, la

signalisation environnante n'est pas suffisante et un mécanisme autonome d'horloge interne est requis (Rosello-Diez *et al.*, 2014; Saiz-Lopez *et al.*, 2015) (Figure 1.5.).



**Figure 1.5. Le modèle des « deux signaux »**

Dans le bourgeon de membre, deux signaux opposés, l'AR en proximal et les Fgfs en distal, déterminent la compartimentalisation P-D. Le stylopode est spécifié, lorsque les deux signaux coexistent dans le bourgeon de membre précoce. La croissance du bourgeon de membre avançant, les deux signaux se séparent et la frontière entre le stylopode et le zeugopode est établie. Pour la transition entre le zeugopode et l'autopode, la signalisation environnante ainsi qu'un mécanisme d'horloge interne sont importants. Adapté de (Delgado and Torres, 2016).

## 1.1.4. Spécification selon l'axe A-P du bourgeon de membre

### 1.1.4.1. La ZPA et le modèle du « drapeau français »

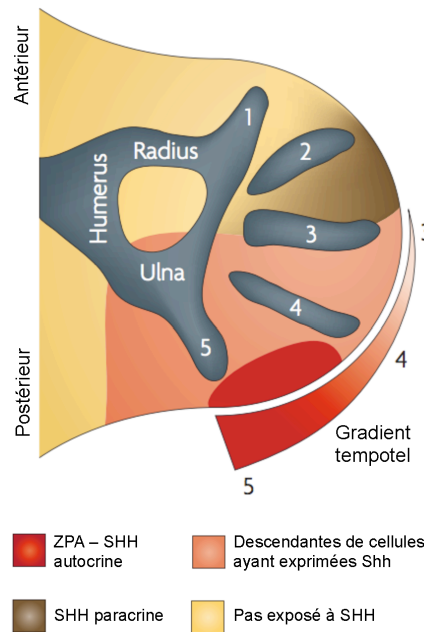
Les premières expériences qui ont permis l'identification d'un centre organisateur et le facteur clé régissant la mise en place de l'axe A-P du bourgeon de membre proviennent de manipulations réalisées chez le poulet. La transplantation d'une petite zone de la partie postérieure du mésenchyme d'un bourgeon de membre donneur dans la partie antérieure d'un bourgeon de membre receveur entraîne la formation d'une duplication en miroir des doigts (Saunders, 1948; Tickle, 1981). Cette région du mésenchyme, centre organisateur, dans la partie postérieure du mésenchyme est appelé ZPA pour « zone d'activité polarisante » car elle permet la polarisation du bourgeon de membre en intruisant les cellules du mésenchyme vers leur destin cellulaire dans l'axe A-P. L'identification de la ZPA a mené Wolpert a formulé le modèle du « drapeau français » où les cellules de la ZPA sécrètent un morphogène qui forme un gradient dans le bourgeon de membre et spécifie l'identité des cellules du mésenchyme dans l'axe A-P (Wolpert, 1969).

### 1.1.4.2. Caractérisation moléculaire de la ZPA

L'AR a été le premier facteur identifié comme ayant la capacité de recréer la duplication en miroir observée lors de greffe de ZPA chez le poulet (Tickle *et al.*, 1982; Wanek *et al.*, 1991). Ensuite, *Sonic hedgehog* (*Shh*) a été identifié comme le morphogène exprimé dans la ZPA, lui conférant sa fonction polarisante (Riddle *et al.*, 1993). L'AR ectopique induit l'expression de *Shh* qui reproduit ainsi le phénotype observé lors de greffe de ZPA (Lopez-Martinez *et al.*, 1995; Riddle *et al.*, 1993; Tickle, 1981; Yang *et al.*, 1997). La fonction de *Shh* est essentielle au bon développement du membre et son inactivation génétique entraîne la perte des éléments squelettiques à identité postérieure (l'ulna et les doigts 2 à 5) (Chiang *et al.*, 2001).

Le suivi du lignage des cellules de la ZPA exprimant *Shh* a permis de déterminer que les cellules formant le doigt 2 et la partie antérieure du doigt 3 sont soumis à une signalisation *Shh* longue distance alors que les cellules à l'origine de la partie postérieure du doigt 3 jusqu'au doigt 5 dérivent de cellules ayant précédemment exprimées *Shh* dans la ZPA (Ahn and Joyner,

2004; Harfe *et al.*, 2004), la formation du doigt 1 étant quant à elle indépendante de *Shh*. De plus, un niveau faible d'exposition à la signalisation *Shh* est suffisant pour spécifier les doigts antérieurs mais pas les doigts postérieurs qui nécessitent un temps d'exposition plus long à l'activité *Shh*. En revanche, une exposition à une faible activité *Shh* dans la durée entraîne la perte du doigt 2 et une restauration des doigts à identité postérieure (doigts 3 à 5) (Scherz *et al.*, 2007). Ainsi, le modèle du « gradient spatio-temporel » a été formulé, où la quantité totale de signalisation *Shh* reçue par les cellules détermine l'identité des doigts mais où la durée d'exposition à cette signalisation *Shh* est aussi un facteur clé de la spécification, plus particulièrement pour les doigts postérieurs (Harfe *et al.*, 2004; Scherz *et al.*, 2007) (Figure 1.6).



**Figure 1.6. Le modèle du « gradient spatio-temporel »**

Lorsque les cellules cessent d'exprimer *Shh*, elles quittent la zone d'activité polarizante (ZPA). L'expansion de la population de cellules dérivant du lignage *Shh* déplace les cellules non issues de la ZPA vers la région antérieure du bourgeon de membre. Les cellules issues du lignage de *Shh* forme l'ulna, les doigts 4, 5 et contribue à la formation du doigt 3. Les cellules formant le doigt 2 et une partie du doigt 3 sont spécifiées par une signalisation *Shh* longue distance (SHH paracrine). L'humérus et le doigt 1 sont spécifiés de manière indépendante de la signalisation *Shh*. Adapté de (Zeller *et al.*, 2009).



#### 1.1.4.3. Le modèle « à deux phase »

L'exposition de bourgeon de membre de poulet à la cyclopamine, qui inhibe la transduction de la signalisation *Shh*, entraîne un arrêt du cycle cellulaire et empêche l'expansion proliférative conduisant à la perte des doigts postérieurs. De façon opposée, l'inhibition de la prolifération cellulaire après traitement à la deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) engendre la formation d'un bourgeon de membre de taille réduite avec seulement la présence des doigts à identité postérieure (Towers *et al.*, 2008). De plus, l'inactivation génétique de *Shh* de façon temporellement contrôlée dans le bourgeon de membre de souris indique que la spécification A-P a lieu dans le bourgeon de membre précoce. Ainsi, un modèle liant l'activité de *Shh* à la spécification A-P de l'identité des doigts et au contrôle de la prolifération cellulaire a été proposé. Dans ce modèle « à deux phase », *Shh*, dans une première phase, est nécessaire de façon précoce à la spécification A-P de l'identité des doigts. Puis dans une deuxième phase, *Shh* est requis pour l'expansion proliférative des progéniteurs spécifiés (Zhu *et al.*, 2008).

#### 1.1.4.4. Spécification tardive de l'identité des doigts

D'autres expériences chez le poulet suggèrent que l'identité des doigts est déterminée à un stade tardif et dépend de la signalisation *Bmp*. Des changements du niveau d'expression des *Bmps* dans les régions interdigitales peuvent causer des transformations d'identité des doigts (Dahn and Fallon, 2000). La signalisation *Bmp* dans le mésenchyme interdigital a été proposée comme pouvant agir sur une zone appelée PFR (phalanx forming region ou région formant les doigts) localisée au bout des structures cartilagineuses des doigts en formation, sous l'AER (Suzuki, 2013; Suzuki *et al.*, 2008). Les PFRs, aussi présentes chez la souris (Witte *et al.*, 2010), se caractérisent par une signature unique de la transduction de la signalisation *Bmp* provenant des zones interdigitales. Les expériences chez le poulet ont mené à la conclusion qu'une exposition à une signalisation interdigitale postérieure programme une identité postérieure (nombre de phalanges plus élevé) et qu'une exposition à une zone interdigitale antérieure entraîne la mise en place d'une identité antérieure (nombre de phalanges moins élevé) (Suzuki *et al.*, 2008). Il a notamment été proposé que la signalisation *Shh* longue distance et l'induction de *Bmp2* par *Shh* entraîne la mise en place d'un gradient d'activité *Bmp* dans le

bourgeon de membre et ainsi agit de concert avec la fonction précoce de *Shh* pour spécifier l'identité A-P (Drossopoulou *et al.*, 2000). De plus, une analyse génétique récente utilisant des souris mutantes pour les gènes 5'*HoxD* (délétion de *Hoxd11*, *Hoxd12* et *Hoxd13*) et *Gli3* (*Gli3<sup>XtJ</sup>* ou *Xt*) a permis de montrer qu'une balance entre les 5'*Hoxd* et *Gli3* agit sur la signalisation *Bmp* dans les régions interdigitales. Ainsi une distribution graduelle de l'expression des 5'*Hoxd* le long de l'axe A-P distal apporte un mécanisme potentiel pour la création d'une activité *Bmp* différentielle en zone interdigitale agissant sur les PFRs et influençant la formation des phallanges des articulations inter-phallange et ainsi l'identité A-P des doigts (Huang *et al.*, 2016).

#### 1.1.4.5. Spécification A-P dépendante de *Gli3*

*Shh* joue un rôle essentiel dans la mise en place de la polarité A-P du bourgeon de membre, l'absence de *Shh* entraînant le développement d'un membre sévèrement affecté avec la perte de l'ulna (zeugopode) et des doigts 2 à 5 (autopode), chez la souris (Chiang *et al.*, 2001). Cependant, *Shh* n'est pas activé durant les douze premières heures du développement du membre. Il n'est pas le premier gène polarisé à être exprimé de façon restreinte dans la partie postérieure du bourgeon (Ros *et al.*, 1996; Zhulyn *et al.*, 2014). Lorsque le bourgeon de membre émerge du flanc de l'embryon, les gènes 5'*Hox* sont exprimés de façon restreinte dans la partie postérieure du mésenchyme (Tarchini *et al.*, 2006). *Hand2* est exprimé dans la LPM puis se trouve restreint à la partie postérieure du bourgeon (Charite *et al.*, 2000; Fernandez-Teran *et al.*, 2000; Panman and Zeller, 2003; te Welscher *et al.*, 2002a). *Gli3* quant à lui, est exprimé spécifiquement dans la partie antérieure du bourgeon et est nécessaire à la restriction postérieure des gènes *Hand2* et 5'*Hox* (Kuijper *et al.*, 2005; te Welscher *et al.*, 2002b). L'antagonisme mutuel entre l'expression de *Gli3* et *Hand2* est requis pour la mise en place d'un pré-plan d'organisation de l'axe A-P du bourgeon de membre émergent. Ainsi *Shh* se retrouve activé et restreint dans la partie postérieure du bourgeon de membre (Osterwalder *et al.*, 2014; te Welscher *et al.*, 2002a) (Figure 1.7). Une activation précoce de la signalisation *Shh* interfère avec la spécification dépendante de *Gli3* des progéniteurs antérieurs provoquant la perturbation du développement normal du membre. Un contrôle du niveau et temporel

d'activation de la signalisation est requis, permettant ainsi l'expansion du réservoir des progéniteurs postérieurs du bourgeon sans interférer avec la fonction précoce de *Gli3* et la spécification précoce des progéniteurs antérieurs (Zhulyan *et al.*, 2014). De plus, les gènes *Iroquois homeobox 3* et *Iroquois homeobox 5* (*Irx3/5*) sont essentiels à la spécification des progéniteurs antérieurs, les souris avec une inactivation de ces gènes montrant une perte des éléments osseux antérieurs. Ces éléments squelettiques perdus lors de l'inactivation génétique de *Irx3/5* peuvent être restaurés grâce à une diminution de la signalisation *Shh*, indiquant que *Shh* régule négativement leur formation (Li *et al.*, 2014).

Une fois activé, *Shh* induit l'expression de gènes cibles tels que l'activateur transcriptionnel *Gli1* ou d'un de ses récepteurs, *Patched1* (*Ptch1*). Récemment, il a notamment été montré qu'un élément cis-régulateur de *Ptch1* a subi une altération au cours de l'évolution, entraînant une absence de réponse à la signalisation *Shh* graduelle, lors du développement de l'autopode des bovins et des porcins. Ce changement de régulation serait à l'origine de la perte d'asymétrie dans la formation des doigts chez ces espèces et vraisemblablement plus largement impliqué dans la diversification des membres artiodactyles au cours de l'évolution (Cooper *et al.*, 2014; Lopez-Rios *et al.*, 2014). En l'absence de *Shh*, *Ptch1* inhibe l'action de la protéine transmembranaire Smoothed (Smo) et par conséquent empêche la transduction du signal et l'activation transcriptionnelle des gènes cibles. À l'opposé la liaison du ligand SHH à son récepteur empêche l'inhibition de Smo par *Ptch1* et ainsi permet la transduction du signal (Yang *et al.*, 1997). De plus, SHH bloque le clivage protéolytique constitutif de la forme complète de GLI3 (GLI3A, forme activatrice) en sa forme tronquée (GLI3R, forme répressive). Ainsi, la signalisation *Shh* dans le bourgeon de membre crée un gradient A-P de la protéine GLI3R avec de fort niveau de GLI3R dans la partie antérieure et de faible niveau dans la partie postérieure (Wang *et al.*, 2000). L'inactivation génétique de *Gli3* chez la souris entraîne l'apparition d'un membre avec une polydactylie préaxial (Hui and Joyner, 1993; Schimmang *et al.*, 1992). GLI3 agit comme régulateur négatif de l'expansion proliférative du réservoir des cellules progénitrices formant les doigts (Lopez-Rios *et al.*, 2012). Cependant, la double inactivation génétique de *Gli3* et *Shh* cause le même phénotype de polydactylie, ainsi la polydactylie observée dans le mutant *Gli3* est indépendante de *Shh*. Il a été suggéré qu'une

fonction de *Shh* est de prévenir la répression dépendante de GLI3R et ainsi permettre la progression du développement du membre (Litingtung *et al.*, 2002; te Welscher *et al.*, 2002b).

#### 1.1.4.6. Contrôle de la régulation transcriptionnelle en cis de *Shh* et les facteurs impliqués

*Shh* est sous le contrôle d'un élément cis-régulateur situé à un megabase de distance du gène, dans une région conservée appelée ZRS (ZPA regulatory sequence) (Lettice *et al.*, 2003; Lettice *et al.*, 2002; Sagai *et al.*, 2005; Sagai *et al.*, 2004). De façon intéressante, il a été montré qu'une mutation dans cet élément cis-régulateur peut causer un phénotype de polydactylie due à une activation ectopique de *Shh* dans la partie antérieure du bourgeon de membre alors qu'une délétion de la région abolie complètement l'expression de *Shh* et phénotypiquement la perte de fonction de *Shh*. Ces résultats suggèrent l'existence de plusieurs motifs de liaison de facteurs de transcription trans-régulateurs impliqués dans sa répression dans la partie antérieure du bourgeon de membre et requis pour son activation dans le mésenchyme postérieur (Maas and Fallon, 2005; Masuya *et al.*, 2007; Sagai *et al.*, 2005). Parmi ces facteurs, HAND2, ETS1, les facteurs de transcription de la famille PBX et HOX ont été montrés comme régulant l'expression de *Shh* en se liant à sa région régulatrice ZRS (Capellini *et al.*, 2006; Galli *et al.*, 2010; Kvon *et al.*, 2016; Leal and Cohn, 2016; Osterwalder *et al.*, 2014). Il a récemment été montré que la perte des membres chez le serpent est notamment associée à un changement de régulation de l'expression de *Shh* au cours de l'évolution. La vaste majorité des serpents n'ont pas de membre, cependant les serpents de type basaux, comme le python, ont conservés des membres postérieurs sévèrement tronqués. La réduction de la croissance des membres postérieurs chez le python est attribuée à un arrêt précoce de l'expression de *Shh* dans le bourgeon émergent, entraînant une régression de l'AER (Cohn and Tickle, 1999; Leal and Cohn, 2016). En effet, la ZRS contrôlant l'expression de *Shh* chez le serpent, montre une hypo-activité lors de test *in vivo*, due à un fort taux de changements de sa séquence, avec notamment des délétions au niveau de sites de liaisons pour les facteurs de transcriptions clés ETS1 et HOX (Kvon *et al.*, 2016; Leal and Cohn, 2016). De façon remarquable, la réintroduction d'un site de liaison ETS1 dans la séquence ZRS de python est

capable de restaurer l'activité de cette région régulatrice et permet même la formation d'un membre phénotypiquement normal chez la souris (Kvon *et al.*, 2016). Aussi, les cétacés modernes (baleines, dauphins, marsouins) ont perdu leurs membres postérieurs. Chez le dauphin, comme chez le python, le bourgeon de membre postérieur est initié mais ne croît pas (Thewissen *et al.*, 2006). Cependant, malgré l'absence d'expression de *Shh* dans le bourgeon de membre postérieur de dauphin, sa ZRS est capable d'induire l'expression d'un gène rapporteur lors d'essais transcriptionnels *in vivo* chez la souris (Kvon *et al.*, 2016). Dans ce cas, la perte des membres postérieurs a été attribuée à l'absence d'expression de *Hand2*, un régulateur en amont de *Shh* (Thewissen *et al.*, 2006). En revanche, chez le dauphin, *Hand2* et *Shh* sont exprimés dans les membres antérieurs qui se développent (Thewissen *et al.*, 2006). Ainsi une hypothèse nécessitant de plus amples investigations serait l'émergence d'un changement de régulation de *Hand2* spécifique aux membres postérieurs, entraînant l'absence d'expression de *Shh* et donc la perte des membres postérieurs au cours de l'évolution.

### **1.1.5. La boucle de rétrocontrôle SHH-GREM1-FGF et la croissance du bourgeon de membre**

Chez le poulet, il a été montré que l'AER et la ZPA sont mutuellement requises à leur maintien. Par conséquent, la mise en place de la polarité A-P et le développement P-D du bourgeon de membre sont liés. En effet, la mise en place du plan d'architecture et la croissance du bourgeon de membre nécessitent la présence d'une boucle de rétrocontrôle positive entre l'épithélium formé par l'AER et le mésenchyme du bourgeon. D'un point de vue moléculaire, ce lien entre l'AER et la ZPA a été caractérisé par la capacité de maintien de l'expression de *Shh* et de la croissance de bourgeon de membre dépourvu d'AER, après incorporation de billes imprégnées de FGFs. De plus, l'incorporation ectopique de billes imprégnées de SHH dans un bourgeon de membre est capable d'induire l'expression de *Fgfs* dans l'AER sus-jacent (Tickle, 2006; Zeller *et al.*, 2009). Cependant, dans le bourgeon de membre, l'expression de *Fgf8* apparaît avant celle de *Shh*. La signalisation SHH n'est pas requise pour l'initiation de l'expression de *Fgf8* mais pour la maintenance des *Fgfs* de l'AER. Quant à *Fgf8*, il est par contre nécessaire à l'induction de *Shh* (Zeller *et al.*, 2009).

### 1.1.5.1. Mise en place de la boucle de rétrocontrôle SHH-GREM1-FGF

Le contrôle de la signalisation *Bmp* dans le bourgeon de membre est crucial pour établir la communication entre la ZPA et l'AER. L'analyse de l'allèle mutant *limb-deformity (ld)* a permis de montrer que le maintien des *Fgfs* de l'AER par SHH nécessite un autre signal pour antagoniser l'activité BMP (Haramis *et al.*, 1995). En fait, *ld* correspond à un allèle mutant un élément cis-régulateur nécessaire à la transcription d'un antagoniste des *Bmps*, appelé *Gremlin 1 (Grem1)* (Khokha *et al.*, 2003; Michos *et al.*, 2004; Zuniga *et al.*, 2004). L'inactivation génétique de *Grem1* dans le bourgeon de membre entraîne une diminution de l'expression de *Shh* et l'expression de *Fgf4*, *Fgf9*, *Fgf17* est totalement abolie conduisant à une AER désorganisé exprimant *Fgf8* de façon transitoire (Michos *et al.*, 2004). Cette inactivation génétique entraîne un défaut de croissance du bourgeon et de la spécification de l'identité A-P. Ces résultats indiquent que l'action antagoniste de la signalisation *Bmp* médiée par GREM1 est nécessaire à la progression du développement du bourgeon de membre (Benazet *et al.*, 2009; Michos *et al.*, 2004). Ainsi pour conclure, GREM1, via son action antagoniste des *Bmps*, est crucial au relai de la signalisation *Shh* vers l'AER. Celle-ci permet l'augmentation de l'expression des *Fgfs* de l'AER qui à son tour maintient l'expression de *Shh* dans la ZPA du mésenchyme. Ensemble, ces signaux mettent en place une boucle de rétrocontrôle positive SHH-GREM1-FGF requise à l'expansion distale du bourgeon de membre (Figure 1.7).

Parmi les différents *Bmps*, *Bmp2*, *Bmp4* et *Bmp7* sont exprimés et ont des fonctions partiellement redondantes dans le bourgeon de membre en développement (Robert, 2007). *Bmp4* est requis pour la mise en place d'une AER fonctionnelle. Cependant, une signalisation *Bmp* trop élevée empêche l'extension antérieure de l'expression des *Fgfs* de l'AER et entraîne de la mort cellulaire dans le mésenchyme (Benazet *et al.*, 2009; Pizette *et al.*, 2001; Pizette and Niswander, 1999). Dans le bourgeon de membre précoce, la signalisation *Bmp* induit l'expression de *Grem1* et réprime l'expression de *Shh* (régulateur positif de l'expression de *Grem1*), contrôlant ainsi de façon direct (positivement) et indirect (négativement) l'expression de son antagoniste *Grem1* (Bastida *et al.*, 2009; Benazet *et al.*, 2009). Ainsi la boucle de rétrocontrôle positive se met en place permettant l'expansion distale du bourgeon de membre d'une manière auto-régulée. Diminuer le dosage des *Bmps* dans un contexte d'inactivation

génétiq ue de *Grem1* rétablie l'expansion distale du bourgeon de membre. Pour conclure, un contrôle accru du niveau de la signalisation *Bmp* est déterminant pour le bon développement du membre. Ce contrôle se caractérise par l'établissement d'une balance entre l'expression des ligands *Bmps* et de leurs antagonistes tels que *Grem1* et *Noggin* (Bastida *et al.*, 2009; Benazet *et al.*, 2009; Pizette and Niswander, 1999).

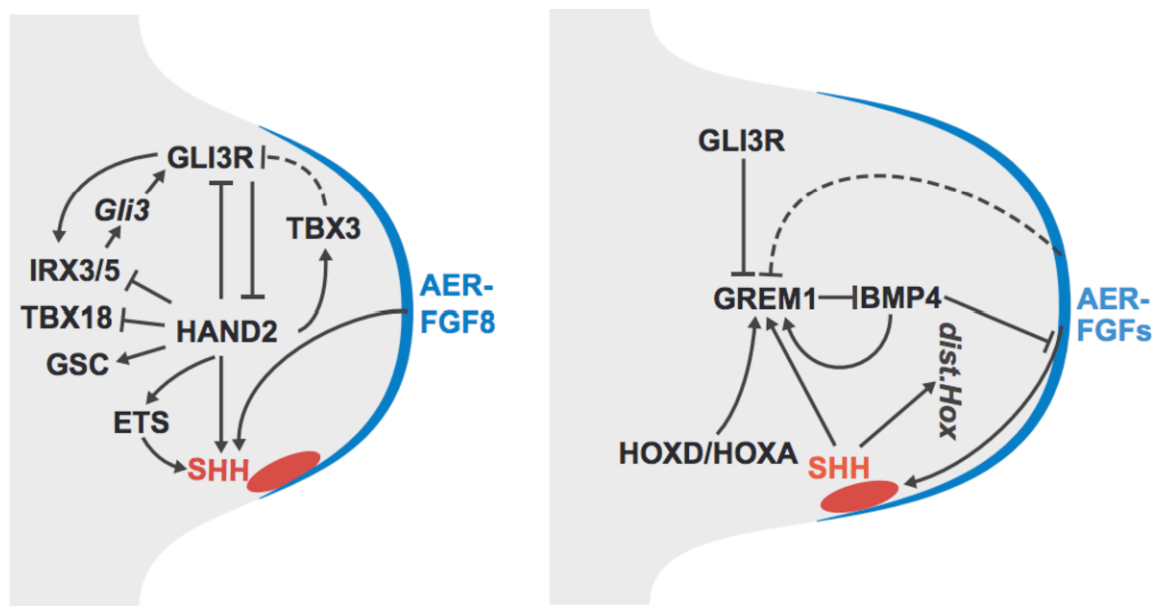
#### 1.1.5.2. Rôle des gènes *Hox* dans l'expansion proliférative du bourgeon de membre

Les gènes de la famille *Hox* aussi jouent un rôle crucial dans la mise en place de la boucle de rétrocontrôle positive SHH-GREM1-FGF et dans la croissance du bourgeon de membre. En effet, dans le bourgeon de membre précoce, la fonction des gènes des complexes *HoxA* et *HoxD* est nécessaire à l'activation initiale de l'expression de *Grem1* et de *Shh* (Kmita *et al.*, 2005; Sheth *et al.*, 2013b). De plus, les gènes *HoxA* et *HoxD* sont requis pour l'expansion de l'expression de *Grem1* dans la région antérieure du bourgeon, et ce de façon indépendante de leur contrôle de *Shh* (Sheth *et al.*, 2013b). Aussi, l'expression de *Fgf10* dans le bourgeon de membre précoce est partiellement dépendante de la fonction des gènes *HoxA* et *HoxD* (Sheth *et al.*, 2013b). Ensemble, ces résultats démontrent le rôle des gènes *Hox* dans la mise en place et le contrôle de la croissance du bourgeon de membre. Pour résumer, dans le bourgeon précoce, les gènes *HoxA* et *HoxD* permettent l'activation de *Shh*, de *Grem1* (avec la signalisation *Bmp*), et contribuent au contrôle de l'expression de *Fgf10*. Celui-ci induit l'expression de *Fgf8* dans l'AER. Dans le bourgeon de membre tardif, les gènes *HoxA* et *HoxD* contribuent à l'expansion antérieure de l'expression de *Grem1* qui permet l'expression correcte des *Fgfs* dans l'AER et aussi l'expansion A-P du bourgeon de membre (Figure 1.7).

#### 1.1.5.3. Terminaison de la boucle de rétrocontrôle SHH-GREM1-FGF

Un maintien prolongé de l'expression des gènes de la boucle de rétrocontrôle positive entraînerait une sur-croissance du bourgeon de membre. Ainsi une étape de terminaison de la boucle SHH-GREM1-FGF est nécessaire au bon développement du bourgeon (Scherz *et al.*,

2007; Verheyden and Sun, 2008). *Shh* est nécessaire au maintien de l'expression de *Grem1*, cependant les cellules issues du lignage de *Shh* sont réfractaires à l'expression de *Grem1*. Celui-ci voit ainsi son domaine d'expression se déplacé vers la région antérieure du bourgeon, le privant ainsi de l'influence de la signalisation *Shh*. Ainsi, il a été proposé que l'expansion des cellules issues du lignage de *Shh* provoque la mise en place d'une zone tampon réfractaire à l'expression de *Grem1*, provoquant ainsi la terminaison de la boucle SHH-GREM1-FGF et la régression de l'AER. De plus, l'expression de *Grem1* est aussi progressivement diminuée par GLI3R dans le mésenchyme antérieur et par les *Fgfs* de l'AER (Lopez-Rios *et al.*, 2012; Scherz *et al.*, 2007; Verheyden and Sun, 2008).



**Figure 1.7. Réseaux de gènes contrôlant le développement du bourgeon de membre**

Lors de la mise en place du pré-plan d'organisation dans le bourgeon de membre précoce, HAND2 régule directement de façon positive l'expression des gènes postérieurs/distaux et réprime l'expression de gènes proximaux/antérieurs. HAND2 (et les facteurs de transcription HOX, non montrés) participe à l'activation de *Shh* (à gauche). La croissance distale du bourgeon de membre requière la présence de la boucle de rétrocontrôle positive SHH-GREM1-FGF, entre l'épithélium (AER) et le mésenchyme. Les facteurs de trancription HOXA/D régulent de façon positive l'expression de *Grem1*. SHH propage l'expression de *Grem1* et des



gènes 5'*Hox* distaux. Comme les BMPs répriment l'expression des *Fgfs* de l'AER, *Grem1* est essentiel à la propagation de cette boucle de signalisation. La terminaison de la boucle de rétrocontrôle SHH-GREM1-FGF est en partie permise par la répression de *Grem1* par GLI3R dans le mésenchyme antérieur et par la signalisation *Fgf* de l'AER. Adapté de (Zuniga, 2015).

## 1.2. La famille des gènes *Hox*

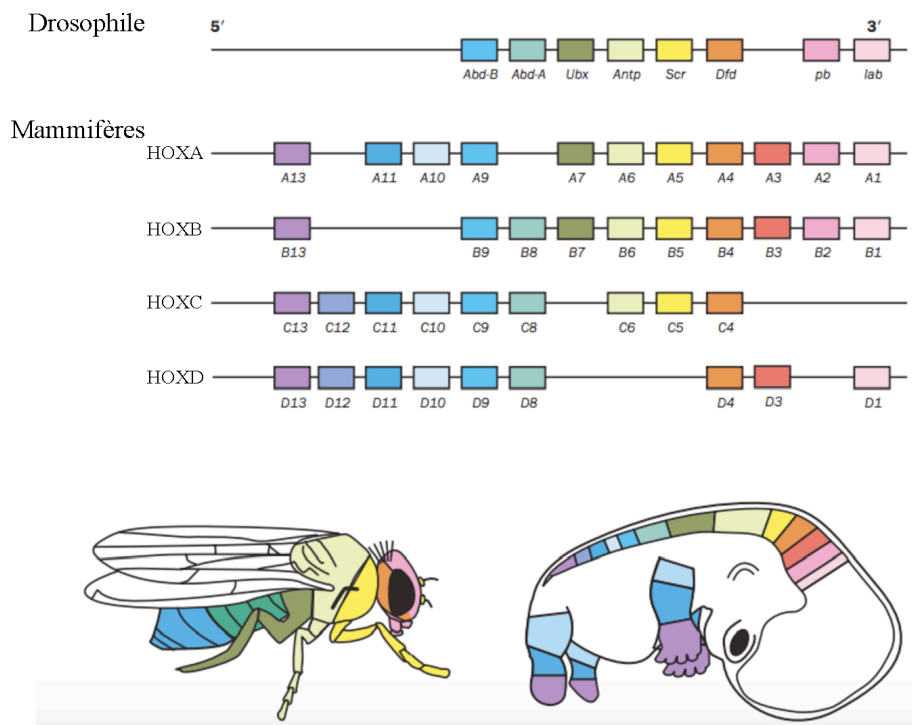
### 1.2.1. Caractéristiques principales

Les gènes *Hox* sont des facteurs de transcription à homéodomaine, ils font parti d'une famille de gène très conservée au cours de l'évolution (Carroll, 1995; Duboule, 1992, 2007; Krumlauf, 1994). Les gènes *Hox* jouent un rôle crucial au cours du développement embryonnaire. Ils ont d'abord été découverts chez la *Drosophile*, où ils donnent l'identité des différents segments du corps de l'embryon le long de l'axe principal A-P (Lewis, 1978). En effet, chez la *Drosophile*, la mutation des gènes *Hox*, résultant en leur perte de fonction, engendre des phénotypes de transformation homéotique. Ces phénotypes se caractérisent par des changements d'identités des segments du corps de l'embryon et l'acquisition de l'identité d'un autre segment.

La plupart des vertébrés possèdent trente neuf gènes *Hox*. Ces gènes sont séparés en quatre complexes, *HoxA*, *B*, *C* et *D*, situés sur quatre chromosomes différents. Ces différents groupes *Hox* possèdent entre neuf et treize gènes étalés sur une distance de 100 à 150 kilobases. Ils sont transcrits dans la même orientation, à partir d'un brin d'ADN, donnant l'orientation 5' - 3' aux complexes *Hox*. Basé sur leur similarité de séquence, les gènes sont classés en groupes paralogues de 1 à 13, le groupe paralogue 1 se situant à l'extrémité 3' du complexe et le groupe 13 à l'extrémité 5' (Duboule, 2007; Krumlauf, 1992) (Figure 1.8).

Un des phénomènes les plus fascinant de régulation des gènes en biologie du développement est celui de la colinéarité spatio-temporelle des gènes *Hox*, notamment le long de l'axe embryonnaire A-P (Deschamps and van Nes, 2005; Kmita and Duboule, 2003; Krumlauf, 1994). Les gènes localisés à l'extrémité 3' du complexe sont activés en premier dans les structures les plus antérieures. Puis par un processus graduel, les gènes du milieu du complexe

sont activés jusqu'à activation des gènes du groupe paralogue 13, localisés à l'extrémité 5' du complexe, dans les structures les plus postérieures. La relation colinéaire entre la position d'un gène *Hox* sur le chromosome et son domaine d'expression spatial a tout d'abord été décrite chez la *Drosophile* (Lewis, 1978). Le phénomène de colinéarité spatiale est répandu dans le règne animal, cependant le phénomène de colinéarité temporelle est restreint aux bilatériens, qui ont maintenus une organisation de leurs complexes *Hox* relativement intacte (Duboule, 2007; Duboule and Dolle, 1989; Gaunt, 1988; Graham *et al.*, 1989; Noordermeer and Duboule, 2013). L'activation séquentielle dans le temps des gènes *Hox*, au cours du développement apporte une information de positionnement spécifique le long de l'axe A-P du tronc de l'embryon et le long des axes appendiculaires tels que les membres (Dolle *et al.*, 1991; Duboule and Dolle, 1989; Haack and Gruss, 1993; Nelson *et al.*, 1996) (Figure 1.8).



**Figure 1.8. Conservation de l'organisation génomique des gènes *Hox* et de leur patron d'expression**

La *drosophile* possède huit gènes *Hox*, formant un seul groupe, alors que les mammifères possèdent trente-neuf gènes *Hox*, répartis en quatre groupes, chacun localisé sur un

chromosome différent. Chez les invertébrés, comme chez les vertébrés, les gènes *Hox* sont exprimés de façon colinéaire le long de l'axe embryonnaire A-P. Chez les vertébrés, les gènes *HoxA* et *HoxD* sont aussi exprimés de façon colinéaire lors de la formation des membres. Adapté de (Goodman, 2003).

## **1.2.2. Régulation des gènes *Hox* dans le développement des membres**

### 1.2.2.1. La colinéarité des gènes *Hox* dans le développement des membres

Le développement des membres nécessite la fonction des gènes des complexes *HoxA* et *HoxD* (Kmita *et al.*, 2005) alors que la délétion des complexes *HoxB* et *HoxC* n'engendre pas de phénotype anormal en ce qui concerne la mise en place de l'architecture des membres (Medina-Martinez *et al.*, 2000; Suemori and Noguchi, 2000). Comme dans l'axe A-P du tronc, les gènes *HoxA* et *HoxD* sont exprimés dans les membres, d'une manière spatio-temporelle. Cette similarité a conduit à l'hypothèse que le mécanisme permettant ce phénomène spatio-temporel d'activation des gènes *Hox* a été coopté du tronc dans les membres lors de leur émergence au cours de l'évolution (Shubin *et al.*, 1997; Tarchini *et al.*, 2006). Pendant le développement du bourgeon de membre, l'expression dynamique des gènes *Hox* se caractérise par une expression en deux phases. Lors de la première phase, dans le bourgeon de membre précoce, les gènes *Hox* sont séquentiellement activés et montrent un patron d'expression imbriqué le long de l'axe A-P, avec une restriction progressive des gènes activés plus tardivement vers la partie postérieure du bourgeon. Lors de la seconde phase d'expression, les gènes *Hox* des groupes paralogues 9 à 13 deviennent exprimés de façon différentielle le long de l'axe P-D, avec une transition progressive d'expression proximale (groupe paralogue 9) à une expression strictement distale (groupe paralogue 13). Les gènes appartenant aux mêmes groupes paralogues ont des domaines d'expression similaires mais non identiques, avec notamment la conservation d'un biais d'expression A-P lors de la seconde phase, pour les gènes du complexe *HoxD* (Zakany and Duboule, 2007).

### 1.2.2.2. La régulation en cis des gènes *Hox*

Durant ces dernières années, la combinaison de l'utilisation de la génétique chez la souris, de l'étude des profils transcriptionnels et épigénétiques, de la caractérisation de l'architecture chromosomale ainsi que des essais transcriptionnels *in vivo* par transgénèse a permis de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes de régulation des gènes *Hox* et plus particulièrement des gènes du complexe *HoxD*. Ces derniers sont régulés par de multiples régions enhancers localisées dans les deux déserts de gènes de part et d'autre du complexe *HoxD* (Noordermeer and Duboule, 2013).

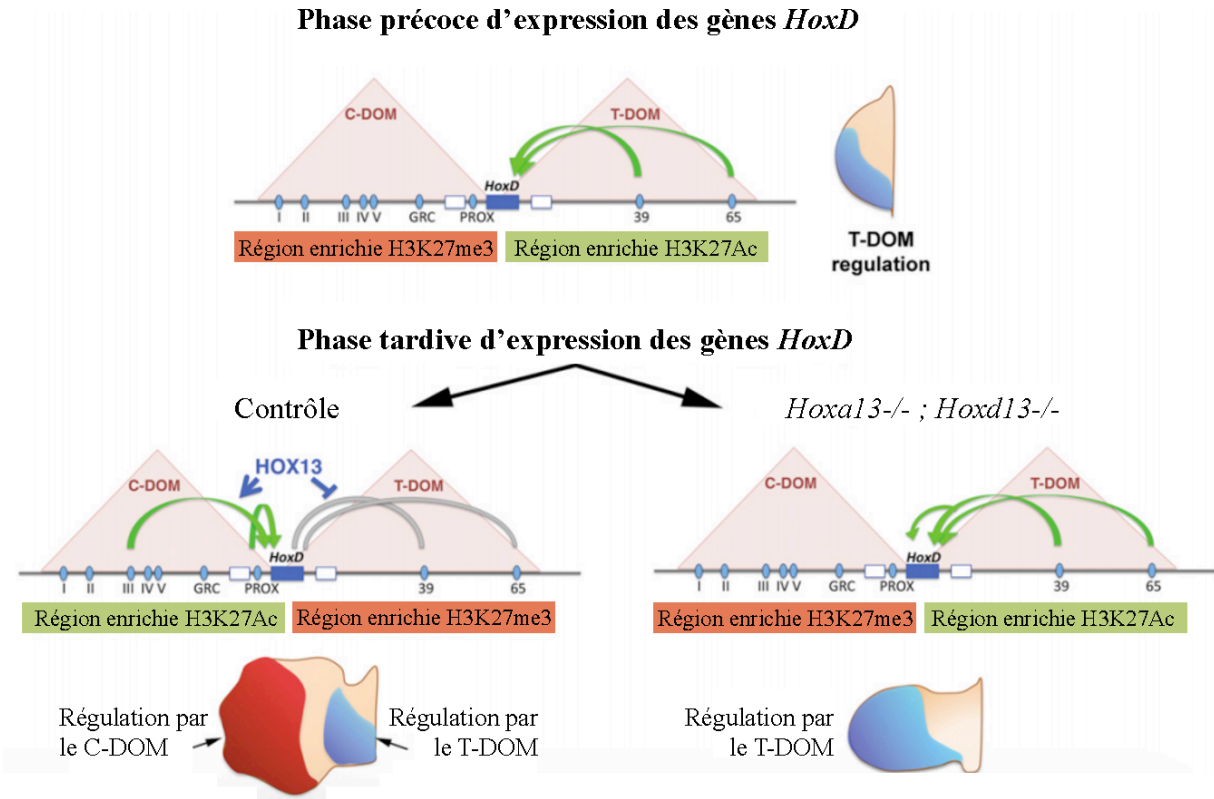
Pendant le développement des membres, l'expression spatio-temporelle des gènes *HoxD* en deux phases successives (Tarchini *et al.*, 2006; Zakany and Duboule, 2007) est régulée par ces enhancers agissant à distance (Andrey *et al.*, 2013; Montavon *et al.*, 2011). Durant la première phase d'expression des gènes *Hox* dans le bourgeon de membre précoce, les gènes *Hoxd8* à *Hoxd11* sont sous le contrôle transcriptionnel des enhancers télomériques localisés du côté 3' du complexe (CS39, CS65) (Andrey *et al.*, 2013). Le développement du bourgeon de membre avançant, la transcription des gènes *Hoxd11* à *Hoxd13* devient contrôlée par une série de sept enhancers centromériques localisés en 5' du complexe (seconde phase d'expression, Islands I, II, III, IV, IV, CsB, CsC) (Montavon *et al.*, 2011; Spitz *et al.*, 2003). L'utilisation de la technique de capture de la conformation chromosomale circularisée (4C) couplée au séquençage à haut débit (4C-seq) a permis de révéler que ces régions régulatrices localisées en cis de part et d'autre du complexe sont en contact physique avec les promoteurs proximaux des gènes *HoxD* qu'ils régulent via la formation de boucles de chromatine (Andrey *et al.*, 2013; Montavon *et al.*, 2011). De façon intéressante, l'utilisation de variantes de la technique 4C, telles que le 5C ou le Hi-C a permis d'identifier que les boucles, établies entre les enhancers et les promoteurs des gènes qu'ils régulent, appartiennent à une structure chromatienne supérieure, appelée « domaine d'association topologique » ou « TAD ». Ces TADs forment une architecture tridimensionnelle où les contacts internes sont favorisés (Andrey *et al.*, 2013; Dixon *et al.*, 2012; Montavon *et al.*, 2011). Ainsi, l'expression des gènes 5'*HoxD* dans le mésenchyme des régions proximale et distale du bourgeon de membre est régulée par deux domaines topologiques distincts, appelés T-DOM ET C-DOM contenant les enhancers télomériques (enhancers proximaux) et les enhancers centromériques (enhancers

distaux) respectivement (Andrey and Duboule, 2014; Andrey *et al.*, 2013; Montavon *et al.*, 2011). La phase précoce spécifie la morphologie du bras et de l'avant bras, alors que la phase tardive spécifie la morphologie des doigts. Les enhancers du T-DOM, n'étant plus actif lors de la formation des doigts, le développement normal du membre implique un transfert des contacts du T-DOM au C-DOM. Il a été proposé que ce transfert de contacts entraîne la formation d'une zone de faible expression des gènes *Hox*, correspondant au futur poignet. Ainsi séparation entre les deux phases d'expression serait le reflet de l'architecture modulaire P-D du squelette des membres (Andrey *et al.*, 2013) (Figure 1.9).

La régulation des gènes *Hox* par des régions régulatrices agissant à longue distance et l'organisation en domaines d'associations topologiques des complexes *Hox* semblent avoir été mises en place avant la duplication des complexes *HoxA/D* au cours de l'évolution car les enhancers régulant l'expression des gènes *HoxA* sont organisés de manière similaire en TADs (Berlivet *et al.*, 2013; Lonfat *et al.*, 2014; Woltering *et al.*, 2014). Une série de dix neuf enhancers (e1 à e19) en 5' du complexe *HoxA* ont été identifiés. Ceux là sont en contact avec les promoteurs des gènes 5'*HoxA*, formant ainsi une structure tridimensionnelle et permettent le contrôle de leur transcription dans la partie distale du bourgeon de membre (Berlivet *et al.*, 2013). La notion qu'une architecture tridimensionnelle de la chromatine est nécessaire au contrôle de l'expression des gènes *Hox*, se voit renforcée par l'observation que l'activité des enhancers testés de manière isolée *in vivo* ne permet pas de récapituler les patrons d'expression des gènes 5'*HoxD* et 5'*HoxA* dans le bourgeon de membre (Berlivet *et al.*, 2013; Montavon *et al.*, 2011). Ainsi, l'organisation bimodale des domaines topologiques de la chromatine des complexes *Hox* permet une régulation spécifique des patrons d'expression proximo-distaux et de l'identité au cours du développement du membre. Ces enhancers agissent de concert afin de contrôler l'expression spatio-temporelle des gènes 5'*Hox*.

Chez la souris, l'inactivation génétique des gènes *Hoxa13* et *Hoxd13* (*Hox13*) conduit à l'absence de séparation entre les phases précoce et tardive d'expression des gènes *HoxD* ainsi qu'à une activation ectopique des gènes de la phase précoce dans le domaine distal du bourgeon de membre formant les doigts (Beccari *et al.*, 2016; Sheth *et al.*, 2016; Sheth *et al.*, 2013a; Woltering *et al.*, 2014). Ces observations suggèrent un rôle pour les protéines paralogues HOX13 dans le contrôle de la régulation bimodale des gènes *Hox*. Récemment,

deux groupes ont procédé à une analyse plus poussée des changements, de l'expression des gènes par séquençage à haut débit des ARNs (RNA-seq), des profils épigénétiques ainsi que de la conformation de la chromatine dans les bourgeons de membres de mutants distincts, soit le mutant *Hox13* (Sheth *et al.*, 2016), soit les mutants *C-DOM* où les régions régulatrices localisés dans le C-DOM (région régulatrice contrôlant la seconde phase d'expression des gènes *HoxD*) sont absentes ou non fonctionnelles causant l'abrogation de la seconde phase d'expression des gènes *HoxD* (Andrey *et al.*, 2013; Beccari *et al.*, 2016). Les résultats ont montré que dans les cellules du domaine distal de ces mutants, le T-DOM (région régulatrice contrôlant la première phase d'expression des gènes *HoxD*) reste fonctionnellement actif alors que le C-DOM ne l'est pas, reflétant la persistance d'une régulation de type proximal (Beccari *et al.*, 2016; Sheth *et al.*, 2016). L'inactivation du C-DOM est notamment confirmé par la persistance des interactions de *Hoxd11* et *Hoxd13* avec le T-DOM dans les cellules des bourgeons de membres mutants (Beccari *et al.*, 2016). De plus, des immunoprécipitations de la chromatine suivie de séquençage à haut débit (CHIP-seq) pour les protéines HOX13 dans des bourgeons de membres sauvages ont montré plusieurs sites de liaison pour ces protéines dans le T-DOM et le C-DOM. Ces résultats couplés à une analyse des changements des profils épigénétiques dans les mutants ont permis de révéler la nécessité de liaison des protéines HOX13 sur ces éléments régulateurs pour la triméthylation (H3K27me3, marqueur de chromatine inactive) du T-DOM et l'acétylation (H3K27ac, marqueur de chromatine active) du C-DOM (Beccari *et al.*, 2016; Sheth *et al.*, 2016). Ainsi, aux vues de ces résultats un modèle sous-jacent au dynamisme de la régulation bimodale des gènes *HoxD* a été proposé. Dans ce dernier, les protéines HOXA13 et HOXD13 agissent de concert, d'une manière dose-dépendante, pour permettre le changement de régulation en réprimant le T-DOM et en activant le C-DOM (Beccari *et al.*, 2016; Sheth *et al.*, 2016). Ces résultats ouvrent la porte à de nouvelles questions, à savoir comment les protéines HOX13 peuvent réguler de façon différentielle les deux TADs : avoir une fonction répressive sur le T-DOM et une fonction activatrice sur le C-DOM. Il est possible que ces activités opposées soient dépendantes de co-facteurs spécifiques, dont l'identité reste à déterminer (Figure 1.9).



**Figure 1.9. La régulation des gènes *HoxD* pendant le développement des membres**

Pendant la phase précoce (première phase), les éléments cis-régulateurs du T-DOM régulent la transcription des gènes *Hoxd8* à *Hoxd11* dans les cellules progénitrices formant le bras et l'avant bras (**en haut**). Dans le bourgeon de membre tardif, lors de la phase tardive (seconde phase), les éléments cis-régulateurs du C-DOM contrôlent l'expression des gènes *Hoxd11* à *Hoxd13* dans les cellules formant l'autopode. L'action des protéine HOX13 permet à la fois la terminaison de l'action du T-DOM et l'activation du C-DOM, permettant la ségrégation des domaines proximale et distale (**en bas à gauche**). Dans le mutant *Hoxa13<sup>-/-</sup> ; Hoxd13<sup>-/-</sup>*, la régulation par le T-DOM persiste et affecte de façon anormale l'expression tardive des gènes *HoxD* (**en bas à droite**). Les ovales bleus représentent les éléments cis-régulateurs principaux du C-DOM et du T-DOM. Adapté de (Ros, 2016).

### 1.2.2.3. Évolution de la régulation en cis des gènes *Hox* et la transition de la nageoire au membre.

La transition de la nageoire au membre chez les vertébrés est l'une des plus importantes adaptations morphologiques survenues lors du passage d'un environnement aquatique à un environnement terrestre au cours de l'évolution. Les processus moléculaires impliqués ont été l'objet d'un grand nombre d'études et ont mis en évidence le rôle essentiel des gènes *HoxA* et *HoxD* dans cette transition (Freitas *et al.*, 2012; Sordino *et al.*, 1995; van der Hoeven *et al.*, 1996; Wagner and Chiu, 2001; Woltering and Duboule, 2010; Woltering *et al.*, 2014).

Les premières analyses comparatives du patron d'expression des gènes *Hox* entre la souris et le poisson zèbre ont mené à la conclusion qu'une seule phase d'expression est nécessaire au développement de la nageoire et que la seconde phase d'expression des gènes *Hox* est une caractéristique spécifique du développement des membres chez les tétrapodes (Sordino *et al.*, 1995). Ainsi une première vision de la transition de la nageoire au membre considère la présence des doigts chez les tétrapodes, dont la formation est initiée lors de la seconde phase d'expression des gènes *Hox*, comme une innovation morphologique acquise au cours de l'évolution des vertébrés (Sordino *et al.*, 1996; Sordino *et al.*, 1995; Woltering and Duboule, 2010). Une réévaluation des patrons d'expression dynamiques des gènes *Hox* chez le poisson zèbre a cependant indiqué l'existence d'une seconde phase d'expressio des gènes *Hox* avec une expansion partielle dans la partie antérieure des nageoires à un stade plus tardif (Ahn and Ho, 2008). Une seconde phase d'expression des gènes *Hox*, notamment des gènes 5'*HoxD*, est aussi observée dans d'autres espèces de poissons, telles que *Polyodon* (actinopterygians basal), *Scyliorhinus* (chondrichthyan) et *Neoceratodus* (sarcopterygian basal) (Davis *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2007). Ces observations ont donc mené à une seconde hypothèse concernant la transition de la nageoire au membre. Dans celle ci, la partie distale de la nageoire, caractérisée par la formation de longs rayons, est considérée comme étant une structure homologue à l'autopode des tétrapodes (Freitas *et al.*, 2007; Shubin *et al.*, 2009). Cependant, le débat reste toujours ouvert. Une autre interprétation de ces données considère que l'expression tardive des gènes *Hox* dans la nageoire des poissons correspond à une continuation de la première phase et non à une réelle seconde phase d'expression (Woltering and Duboule, 2010). Cette hypothèse a récemment été rediscutée à la lumière des résultats



obtenus par Beccari et al, montrant qu'en l'absence des protéines HOX13, le T-DOM, contrôlant la première phase d'expression des gènes *5'HoxD*, est capable d'activer l'expression de gènes de la seconde phase dans la partie distale du membre de souris, observant ainsi une continuation de la première phase d'expression des gènes *5'HoxD* dans le bourgeon de membre tardif (Beccari *et al.*, 2016).

Il est néanmoins clair que l'expression des gènes *Hox* a subi des changements considérables au cours de l'évolution. Ceci implique une modulation du contrôle de leur régulation transcriptionnelle, vraisemblablement source des variations morphologiques survenues pendant la transition de la nageoire au membre (Woltering and Duboule, 2010). L'alignement des séquences génomiques entre les tétrapodes et les espèces poissons suggère une conservation de certaines des régions cis-régulatrices en 5' des gènes *HoxD* (Islands III, V et CsB) et en 5' des gènes *HoxA* (e10, e13, e16) alors que d'autres semblent spécifiques aux tétrapodes (Berlivet *et al.*, 2013; Gehrke *et al.*, 2015; Gehrke and Shubin, 2016; Montavon *et al.*, 2011; Spitz *et al.*, 2003). De plus, les données issues du coelacanth, espèce poisson la plus proche des tétrapodes, montrent une conservation de certains enhancers avec même la capacité pour « Island I » d'induire l'expression d'un gène rapporteur dans l'autopode de souris lors d'essai transcriptionnel *in vivo* par transgénèse (Amemiya *et al.*, 2013). De plus, il a été montré que les complexes *HoxA* et *HoxD* du poisson zèbre présentent deux TADs, suggérant l'existence d'une régulation en cis en deux phases d'expression comme chez la souris (Woltering *et al.*, 2014). Cependant, l'utilisation d'essais transcriptionnels *in vivo* par transgénèse avec les enhancers putatifs du poisson zèbre ou ceux du pufferfish montrent souvent l'incapacité de ces régions génomiques à induire de l'expression d'un gène rapporteur dans la région distale du membre de souris (Gehrke *et al.*, 2015; Woltering and Duboule, 2010). En revanche l'utilisation des régions génomiques provenant du poisson gar, n'ayant pas subi une duplication additionnelle complète de son génome contrairement au poisson zèbre, a permis l'induction de l'expression d'un gène rapporteur dans la partie distale du membre de souris et dans la partie distale de la nageoire (Gehrke *et al.*, 2015).

Pour conclure, il semble que la transition de la nageoire au membre ait été accompagnée de changements dans l'expression des gènes *Hox*. Les complexes *HoxA* et *HoxD* des poissons sont composés de deux TADs comme chez les tétrapodes. De plus, un certain nombre de

régions cis-régulatrices des gènes *HoxA* et *HoxD* sont conservées entre les espèces poissons et les tétrapodes. Cependant, il est probable que l'acquisition, au cours de l'évolution, de nouveaux éléments cis-régulateurs spécifiques aux tétrapodes ait joué un rôle clé dans l'augmentation du niveau transcriptionnel des gènes *5'Hox* lors de la seconde phase d'expression. Ainsi la modulation de la régulation des gènes *Hox* au cours de l'évolution a très probablement été un élément essentiel dans la transition de la nageoire au membre.

### **1.2.3. Rôle des gènes *Hox* dans la formation des différents segments du membre**

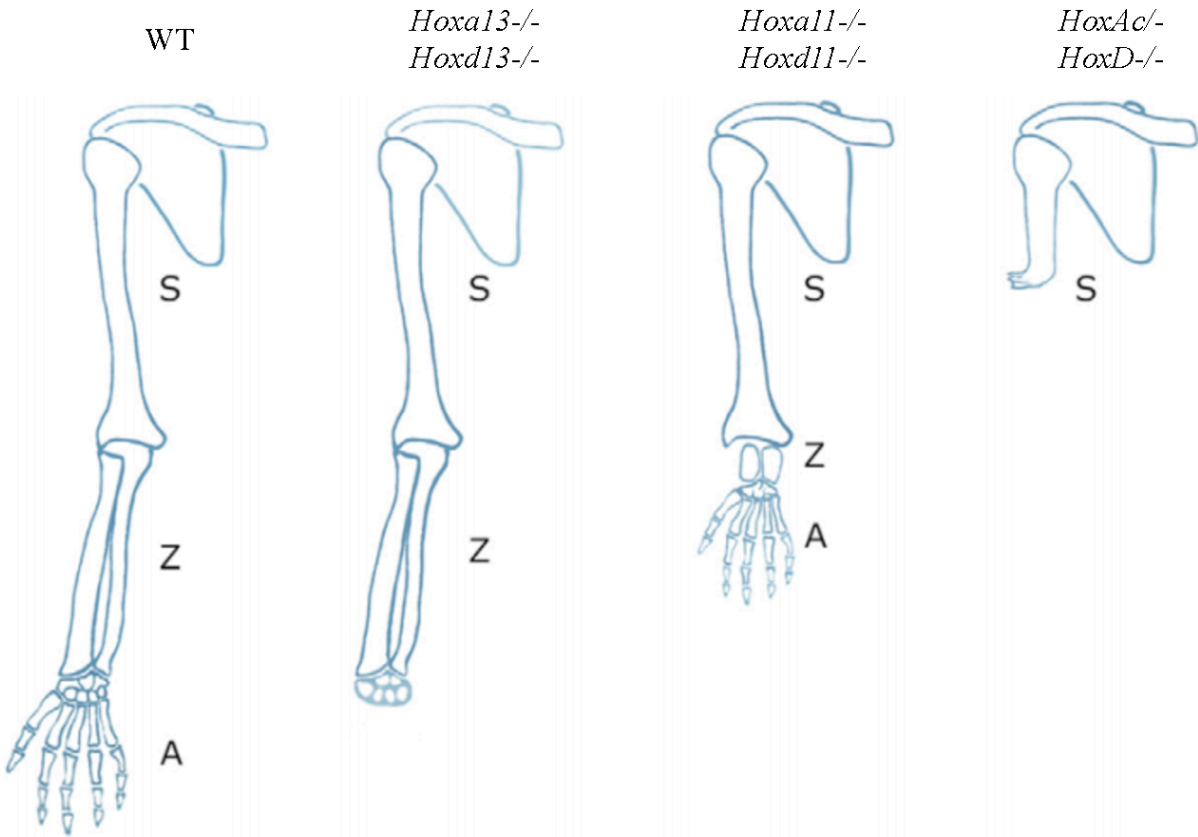
En accord avec l'expression colinéaire des gènes *Hox* dans le membre, leur perte de fonction affecte la formation des éléments squelettiques du membre reflétant la position du gène inactivé dans le complexe : les gènes les plus en 5' des complexes affectant progressivement les structures les plus distales.

L'inactivation génétique du gène *Hoxd9* altère la formation de l'humérus avec une taille réduite et une malformation de la crête deltoïde, alors que le mutant *Hoxa9* ne cause pas de défaut du membre. Cependant le double mutant *Hoxa9* et *Hoxd9* présente une altération accentuée de la formation du stylopede, montrant à la fois les fonctions spécifiques et redondantes des protéines HOXA9 et HOXD9 dans la formation du stylopede dans le membre antérieur (Fromental-Ramain *et al.*, 1996a). Les inactivations génétiques des gènes *Hox* du groupe paralogue 10 de façon isolée ou combinée présentent aussi des défauts de la formation du stylopede (Carpenter *et al.*, 1997; Favier *et al.*, 1996; Wahba *et al.*, 2001; Wellik and Capecchi, 2003). Ainsi, ces résultats indiquent que les gènes *Hox9* et *Hox10* agissent vraisemblablement ensemble pour former le stylopede.

Le zeugopode quant à lui nécessite la fonction des gènes *Hox* du groupe paralogue 11. Les souris mutantes *Hoxa11* présentent des malformations squelettiques dans les membres antérieurs et postérieurs. L'ulna et le radius sont incurvés, les os du poignet sont fusionnés et l'os sésamoïde se développe anormalement. Dans les membres postérieurs, les os du zeugopode sont malformés dans leur partie la plus distale (Small and Potter, 1993).

L'inactivation génétique du gène *Hoxd11* engendre une taille réduite des os du zeugopode et présente aussi des défauts au niveau de la partie distale du zeugopde et du poignet (Davis and Capecchi, 1994; Favier *et al.*, 1995). La double inactivation génétique de *Hoxa11* et *Hoxd11* affecte sévèrement la formation du zeugopode dans le membre antérieur, où il est drastiquement réduit en taille et malformé. Le membre postérieur quant à lui est drastiquement affecté chez le triple mutant *Hoxa11*, *Hoxd11* et *Hoxc11*. Ces résultats montrent une fois de plus la fonction redondante des gènes paralogues *Hox* et notamment la fonction redondante des gènes *Hox11* dans la formation du zeugopode (Boulet and Capecchi, 2004; Davis *et al.*, 1995; Wellik and Capecchi, 2003) (Figure 1.10).

Enfin, l'inactivation des gènes situés le plus en 5' des complexes *HoxA* et *HoxD*, soit *Hoxa13* et *Hoxd13*, cause des défauts de formation de la structure la plus distale du membre, à savoir l'autopode. En effet l'absence de *Hoxa13* engendre la perte du doigt 1, des fusions des os du poignet et la réduction de la taille des doigts (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b; Perez *et al.*, 2010). Le mutant *Hoxd13* présente une réduction de la taille des doigts avec l'apparition d'un doigt surnuméraire rudimentaire dans la partie postérieure du membre (polydactylie postaxiale) (Davis and Capecchi, 1996; Dolle *et al.*, 1993; Kmita *et al.*, 2000). La double inactivation des gènes *Hoxa13* et *Hoxd13* entraîne l'absence totale de la formation des doigts (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b). Ainsi, la fonction principale des gènes *Hox13* est redondante et essentielle à la formation des doigts dans l'autopode. Cependant, les gènes *Hoxa13* et *Hoxd13* semblent avoir des fonctions partiellement spécifiques car les phénotypes diffèrent légèrement entre les deux mutants simples, notamment avec la présence d'une polydactylie postaxiale chez le mutant *Hoxd13* (Figure 1.10).



**Figure 1.10. Les gènes *Hox* sont requis pour la formation des différents segments du membre**

Lors de l'inactivation génétique des gènes *Hoxa13* et *Hoxd13*, le stylopode (S) et le zeugopode (Z) sont normaux alors que les doigts de l'autopode (A) sont absents. En l'absence des gènes *Hox* du groupe 11, le stylopode est normal alors que le zeugopode présente une sévère troncation. Seulement des défauts mineurs sont observés au niveau de l'autopode. L'absence combinée des gènes du groupe *HoxA* et *HoxD* entraîne une troncation sévère du membre, avec absence de l'autopode et du zeugopode. Seulement la partie la plus proximale du stylopode se forme. Adapté de (Zakany and Duboule, 2007).

Les inactivations en cis des gènes *Hox*, c'est à dire des inactivations simultanées de plusieurs gènes *Hox* situés sur le même chromosome, ont permis d'apprécier les interactions génétiques existantes entre ces gènes. Ainsi les différentes souris mutantes présentent des altérations dans la formation du stylopode, du zeugopode (de la Cruz *et al.*, 1999; Raines *et al.*, 2015) et de l'autopode (Davis and Capecchi, 1996; Kondo *et al.*, 1998; Raines *et al.*, 2015) en fonction de

la combinaison des gènes inactivés en cis. Ces analyses ont donc permis de montrer des fonctions redondantes des gènes *Hox*, autre qu'entre groupe paralogue, dans la formation des différents segments du membre.

Afin de comprendre la régulation des gènes *Hox*, notamment celle des gènes *HoxD* et les effets sur le développement des membres, une autre approche génétique a été utilisée, celle de la délétion en cis de ces gènes. Par exemple, la délétion du gène *Hoxd13* n'affecte la formation de l'autopode que de façon mineure avec une absence des phénotypes observés lors de l'inactivation de *Hoxd13* (rupture du cadre de lecture). En effet, la délétion de *Hoxd13* entraîne un repositionnement de *Hoxd12* à la position de *Hoxd13* (par rapport aux enhancers distaux), qui devient alors exprimé comme ce dernier dans l'autopode et compensant en partie la perte du gène *Hoxd13*. En revanche, la délétion de *Hoxd13* et *Hoxd12* cause le repositionnement de *Hoxd11* et engendre une expression de *Hoxd11* dans l'autopode similaire à *Hoxd13*, ce qui a pour conséquence le développement d'une polydactylie sévère. Quant au gain d'expression de *Hoxd10* dans l'autopode suite à une délétion en cis des gènes *Hoxd11* à *Hoxd13*, il n'entraîne pas de polydactylie, suggérant une divergence fonctionnelle entre *Hoxd11* et les autres gènes 5'*HoxD* (Kmita *et al.*, 2002).

Pour finir, la délétion complète du complexe *HoxA* de façon conditionnelle dans le membre entraîne l'absence du doigt 1, des doigts plus courts et affecte le zeugopode (Kmita *et al.*, 2005). La délétion du complexe *HoxD* cause une réduction de la taille des différents segments du membre et plus particulièrement des doigts (Zakany *et al.*, 2007). Lors d'une délétion des deux complexes *HoxA* et *HoxD*, les souris présentent un phénotype sévère de troncation du membre au niveau de l'humérus, causé par un arrêt précoce de la formation du membre (Kmita *et al.*, 2005) (Figure 1.10).

Ainsi les différentes approches génétiques de perte de fonction des gènes *Hox* ont démontré l'importance de leur fonction dans la mise en place de l'architecture générale du membre. Ces différentes stratégies ont aussi permis de mettre en évidence les fonctions spécifiques et redondantes des gènes *Hox* dans l'acquisition de l'identité des différents segments du membre.

### **1.3. Rôle des gènes *Hox* dans l'émergence de la pentadactylie**

# Insights on the role of *Hox* genes in the emergence of the pentadactyl ground state

Yacine Kherdjemil and Marie Kmita

*Laboratory of Genetics and Development, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), 110 avenue des Pins Ouest, H2W1R7, Montréal Québec, Canada.*

*Département de Médecine (Programme de Biologie Moléculaire), Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T 1J4, Canada*

\* Corresponding authors: Marie Kmita  
Email: Marie.Kmita@ircm.qc.ca  
Tel: (1) 514-987-5749

Yacine Kherdjemil  
Email: Yacine.Kherdjemil@ircm.qc.ca  
Tel: (1) 514-987-5741

## Abstract

Tetrapods are characterized by the presence of digits at the distal end of their limbs, which have emerged during the transition from fins to limbs. While variations in digit number are observed in extant tetrapods, most have five digits per limb and divergence from this pentadactyl ground state is always a reduction in digit number. Paleontological data revealed that stem-group tetrapods were polydactylous indicating that the evolution from fish fin to modern tetrapod limbs involved two major transitions; the emergence of digits and the shift from polydactyly to pentadactyly. The absence of living polydactyl tetrapod species is a major limitation in assessing the foundation of the pentadactyl constraint. Nonetheless, several genes having the capacity of modulating digit number have been identified and studying their functional and regulatory phylogeny will likely be critical in our comprehension of the emergence of the pentadactyl state. In this review, we provide an overview of the data obtained from mouse genetics that uncovered the role of *Hox* genes in controlling digit number and discuss regulatory changes that could have been implicated in the emergence of the pentadactyl ground state.



## Introduction

In *On the Origin of Species* (Darwin, 1859), Darwin wrote: “What can be more curious than that the hand of a man, formed for grasping, that of a mole for digging, the leg of the horse, the paddle of the porpoise, and the wing of the bat, should all be constructed on the same pattern, and should include similar bones, in the same relative positions?” Homologies in the construction of the appendage of those different species can be observed along the limb proximal-distal axis with the same segmentation into three domains, namely the stylopod, the zeugopod and the autopod. This conserved organization can be traced back to the Devonian, in stem-group tetrapods. In contrast, the pattern of the distal limb is markedly distinct in ancestral tetrapods. While most modern tetrapods are pentadactyl, which is the state defined as having five fingers or toes on each hand and foot, fossil records indicate that stem-group tetrapods in the late Devonian, 360 Ma ago, were polydactylous (Coates *et al.*, 2002; Wagner and Chiu, 2001). Indeed, *Acanthostega* had eight digits and *Ichthyostega* had seven digits (Coates and Clack, 1990). The first known tetrapod harbouring five digits on the hindlimb is *Pederpes*, that lived about 350 Ma ago, in the Carboniferous period, although the presence of a small supernumerary digit on the forelimb autopod prevented its classification as a pentadactyl tetrapod (Clack, 2002). Strikingly, variations in digit number observed in extant tetrapod species are always a reduction from the five-digits state (Cooper *et al.*, 2014; Lopez-Rios *et al.*, 2014), suggesting that the ancestral polydactyl organization has not been stabilized in the course of evolution. The presence of a small sixth digit in the frog *Xenopus tropicalis* was interpreted as a possible re-emergence of the polydactyl state (Hayashi *et al.*, 2015), and it is the only reported example of polydactyly in extant tetrapods other than those arising from impaired limb development in otherwise pentadactyl species. Such evolutionary constraint on digit number raises the question of why and how the canalized transition from polydactyly to pentadactyly occurred. In this review, we focus on the possible implication of *Hox* genes and the evolution of their regulation in the emergence of the pentadactyl state.

## *Hox* genes and digit development

*Hox* genes encode transcription factors that play a key role in establishing the body architecture. During embryonic development, genes from each *Hox* cluster are sequentially activated both in time and space following their relative order on the chromosome, resulting in the differential expression of *Hox* genes along the main body axis that establishes morphological diversity (reviewed in e.g. (Deschamps and van Nes, 2005; Kmita and Duboule, 2003)). The patterning of the limb skeleton requires the activity of *Hox* genes mainly from the *HoxA* and *HoxD* clusters (Davis *et al.*, 1995; Fromental-Ramain *et al.*, 1996b; Kmita *et al.*, 2005; Wellik and Capecchi, 2003; Xu and Wellik, 2011; Zakany and Duboule, 2007). In developing limbs, *Hox* genes are expressed in two phases. In early limb buds, they are expressed in a nested pattern along the anterior-posterior (A-P) axis, with the expression of late activated genes being restricted to the posterior bud. As the limb develops, the second phase of *Hox* expression gets implemented and *HoxA/D* genes from paralogous group 9 to 13 become differentially expressed along the proximal-distal (P-D) axis, with a progressive switch from proximal (group 9) to distal expression (group 13) (Zakany and Duboule, 2007). Loss of function experiments provided evidence that the differential expression of *HoxA/D* genes along the P-D axis is responsible for the patterning of the three limb segments. For instance, the combined loss of function of *Hoxa11* and *Hoxd11* severely impairs zeugopod development (Davis *et al.*, 1995), whereas the inactivation of both *Hoxa13* and *Hoxd13* results in complete digit agenesis (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b). Interestingly, *Hoxa13* and *Hoxd13* not only provide the competence to form digits, but also have the capacity to modulate digit number. The initial evidence for their impact on digit number came from the finding that *Hoxd13* inactivation results in the formation of an extra digit (Dolle *et al.*, 1993) and removing one copy of *Hoxa13* in the *Hoxd13*<sup>-/-</sup> background leads to an exacerbated polydactyly (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b). The other distally expressed *HoxD* genes also influence digit number in conjunction with *Hoxd13*, as suggested with the slightly more severe polydactyly observed in knockout mice carrying the deletion of the genomic region encompassing *Hoxd11* to *Hoxd13* (*HoxDdel(11-13)/del(11-13)*) compared to the simple *Hoxd13* knockout mice (Zakany *et al.*, 1997). The atavistic character of these phenotypes led

to the idea that these 5'*HoxA/D* genes could be involved in the evolutionary remodelling of the autopod, notably the transition from the ancestral polydactyl state to the pentadactyl state (Zakany and Duboule, 1999; Zakany *et al.*, 1997). Moreover, based on the different phenotypes observed in the *Hoxa13*; *HoxDdel(11-13)* allelic series, it was proposed that during the course of evolution, the remodelling of the distal limb, from adactyly to polydactyly and eventually pentadactyly, may have relied on changes in *Hox* regulation that occurred independently for the *HoxA* and *HoxD* clusters (Zakany *et al.*, 1997).

## Over-expression of 5'*HoxA/D* genes and the expansion of the digit progenitor pool

While loss of function studies uncovered an inverse correlation between 5'*HoxA/D* gene dosage and digit number, polydactyly was also observed in mutants carrying a 5'*HoxA/D* transgene driving its over-expression in developing limbs (Knezevic *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2006). This apparent discrepancy actually reflects distinct mechanisms underlying the formation of extra-digits in these mutants. The polydactyly resulting from reduced *Hox* dosage occurs without A-P expansion of the presumptive autopod (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b), while over-expression of 5'*HoxA/D* genes leads to an anterior expansion of the distal limb and subsequent preaxial polydactyly (Knezevic *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2006). The *Hox*-mediated polydactyly resulting from the expansion of the digit progenitor pool is reminiscent of *Shh*-dependent polydactyly. Accordingly, ectopic *Shh* expression was systematically associated with the preaxial polydactyly in limbs over-expressing 5'*HoxA/D* genes (Knezevic *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2006), consistent with the function of 5'*HoxA/D* genes in controlling *Shh* expression (Kmita *et al.*, 2005; Knezevic *et al.*, 1997; Tarchini *et al.*, 2006; Zakany *et al.*, 2004). However, the exact extent to which the ectopic *Shh* expression resulting from the over-expression of 5'*HoxA/D* genes is responsible for the polydactyly observed in these mutants remains unclear. The evidence that distally expressed HOX proteins directly interact with GLI3 (Chen *et al.*, 2004), a key target of *Shh*, suggested another *modus operandi* for HOX proteins in autopod patterning. *Shh*, by blocking GLI3 proteolytic cleavage into its

transcriptional repressor form (GLI3R), restricts GLI3R to the anterior distal domain (Wang *et al.*, 2000). Importantly, *Gli3Xt/Xt* mutation, which corresponds to a complete loss of function of *Gli3* (Hui and Joyner, 1993), results in the expansion of the presumptive autopod anteriorly and the formation of preaxial supplementary digits, even in the absence of *Shh* (Litington *et al.*, 2002; te Welscher *et al.*, 2002b). The autopod-specific *Gli3* inactivation provided further evidence for its role in controlling digit number by restraining the growth of the anterior domain of the autopod and promoting chondrogenesis (Lopez-Rios *et al.*, 2012). Interestingly, HOXD12 binding to GLI3R was shown to switch GLI3R function from transcriptional repressor to activator and the formation of supernumerary digits associated with HOXD12 overexpression was thus proposed to result from the switch in GLI3R function mediated by HOXD12 (Chen *et al.*, 2004). Based on the evidence that HOXD11 and HOXD13 also bind to GLI3R, it was proposed that the ratio between GLI3 and distal HOX impacts on the digit-forming capacity of the distal limb and thereby on digit number (Chen *et al.*, 2004).

## *Hox* genes and the modulation of the digit wavelength

Studies of the *Gli3Xt/Xt* mutation revealed that *Gli3* inactivation triggers an anterior upregulation of 5' *HoxD* genes, and this upregulation was proposed as a driver for the increase in digit number in *Gli3Xt/Xt* mice (Büscher *et al.*, 1997; Zuniga and Zeller, 1999). However, *Gli3* inactivation results in polydactyly even in absence of *HoxD* genes, indicating that polydactyly in *Gli3Xt/Xt* limbs is not due to the upregulation of 5' *HoxD* genes (Sheth *et al.*, 2007; Zakany *et al.*, 2007). Actually, the analysis of the *Gli3Xt; HoxDdel(11-13)* allelic series revealed an increase in digit number compared to the *Gli3Xt* single mutant, which led to the conclusion that 5' *HoxD* genes have a negative effect on digit number in the absence of *Gli3* function (Sheth *et al.*, 2007). Interestingly, reducing the *Hoxa13* dosage in the *Gli3Xt; HoxDdel(11-13)* double homozygote background results in the most severe polydactyl phenotype ever observed in mice, with 12 to 14 digits per limb (Sheth *et al.*, 2012). Thus, in absence of *Gli3*, there is an inverse relationship between the number of 5' *HoxA/D* genes and digit number, reminiscent of the results obtained with the 5' *HoxA/D* inactivation series in the

wild type *Gli3* background (e.g. (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b)). Importantly, the swift increase in digit number and the associated reduction in digit and interdigit width observed in the *Gli3Xt; HoxDdel(11-13); Hoxa13* allelic series, are consistent with digit number relying on a Turing-like mechanism (Sheth *et al.*, 2012), whereby cross-talks between an activator and an inhibitor molecule eventually define the wavelength of a periodic pattern of spots or stripes (Turing, 1952). Mathematical modelling combined with genetic data pointed to *HoxA/D* genes as modulators of the wavelength (Sheth *et al.*, 2012), providing a mechanism by which *HoxA/D* genes modulate digit number independently of their influence on the expansion of the digit progenitor pool. Intriguingly, these two *Hox*-dependent mechanisms appear somehow antagonistic as a decrease in *HoxA/D* gene dosage reduces the digit wavelength (thereby increasing digit number) but also reduces *Shh* signaling and thus decreases the expansion of the digit progenitor pool. Such apparently opposite effects of *HoxA/D* genes may have actually contributed to the stabilization of the pentadactyl state.

## Evolution of *Hox13* regulation

Functional studies in mice have uncovered mechanisms by which *Hox* genes, notably *Hoxa13* and *Hoxd13*, can modulate digit number, thereby providing grounds for a possible implication of these genes in the transition from polydactyly in stem-group tetrapods to pentadactyly in modern tetrapods. Mutations at cis-regulatory modules or emergence of novel cis-regulatory elements are widely considered as the most prevalent cause for morphological evolution (reviewed in e.g. (Carroll, 2008; Stern, 2000)). Thus, assessing molecular events underlying morphological changes/adaptation requires the identification of regulatory innovations or variations, in distinct species, to establish a regulatory phylogeny, which can then be tested for its functional significance. Investigating genetic changes responsible for the emergence of the pentadactyl state is largely limited by the absence of living polydactylous species. As these changes must have occurred after the fin to limb transition, the comparison between fin and limb developmental programs offers an alternative to identify genetic novelties that could have contributed to the transition toward pentadactyly. Numerous studies have revealed that

modulations in the regulation of *Hox* genes were likely instrumental in the fin to limb transition (Freitas *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2007; Shubin *et al.*, 1997; Sordino *et al.*, 1995; Wagner and Chiu, 2001; Woltering *et al.*, 2014), in particular changes in the control of *Hoxa13* and *Hoxd13* (hereafter *Hox13*) expression, whose function in tetrapods is mandatory for digit development (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b). Interestingly, recent work revealed that in zebrafish, inactivation of *hox13* results in a drastic reduction of fin rays combined with an increased number of endochondral distal radials (Nakamura *et al.*, 2016), providing evidence that the formation of distal structures relies on *Hox13*, both in fish and tetrapods. The most obvious difference in *Hox13* expression in fin versus limb buds, is the expansion of the *Hox13* expression domain in tetrapods, raising the possibility that regulatory variance resulting in the broadening of the *Hox13* domain contributed to the emergence of digits (Schneider and Shubin, 2013; Woltering and Duboule, 2010). Consistent with this model, overexpression of *hoxd13* in fin buds triggers the formation of additional chondrogenic tissue distally as well as fin fold reduction (Freitas *et al.*, 2012), akin to the morphological changes that have occurred in the course of fin to limb evolution. For further discussion of this topic, see also reviews by Freitas, Schneider, in this issue.

In mice, a rather large series of remote transcriptional enhancers control the “late phase”/ distal expression of the *HoxA* and *HoxD* genes required for the development of the autopod (Berlivet *et al.*, 2013; Montavon *et al.*, 2011). Only a subset of these enhancers was identified in fish species and it is thus considered that the emergence of novel regulatory elements, specific to tetrapods, contributed to the evolution of *Hox13* regulation leading to the expansion of the *Hox13* domain and subsequent formation of digits. Amongst the “digit” enhancers apparently conserved in fish genomes, some are capable of driving distal limb reporter expression in mouse transgenic assays while others are not (Gehrke *et al.*, 2015; Gehrke and Shubin, 2016; Schneider *et al.*, 2011; Spitz *et al.*, 2003; Woltering *et al.*, 2014). It is thus likely that both the emergence of novel cis-regulatory elements and modifications at ancestral enhancers resulted in the broadening of the *Hox13* domain during the fin-to-limb transition. Such series of molecular changes suggests that the evolution of *Hox13* expression was a progressive process and thus could have persisted during the transition from stem-group tetrapods to modern tetrapods. In turn, based on the inverse correlation between *Hox13* dosage

and digit number (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b; Sheth *et al.*, 2012; Zakany *et al.*, 1997), the strengthening of *Hox13* expression from stem-group tetrapods to modern tetrapods could have triggered or favored the transition from polydactyly to pentadactyly.

## The mutually exclusive expression of *Hoxa11* and *Hoxa13* in modern tetrapods

In addition to changes in the regulation of *Hox13*, the transition from fin to limb was also accompanied by the parting of *Hoxa11* and *Hoxa13* expression domains. While these genes are expressed in mutually exclusive domains in limb buds, *hoxa11* and *hoxa13* expression are largely overlapping in fish fins (Ahn and Ho, 2008; Davis *et al.*, 2007; Metscher *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2009; Sordino *et al.*, 1996). In mice, *HoxA* expression in presumptive digit cells relies on a series of remote transcriptional enhancers (Berlivet *et al.*, 2013). These enhancers, spread over several hundred of kilobases, spatially contact each other and the 5' part of the *HoxA* cluster (*Hoxa9* to *Hoxa13*) (Berlivet *et al.*, 2013). Yet, despite being in contact with the “digit” enhancers, *Hoxa11* expression is absent in distal cells and its transcription is restricted to the presumptive zeugopod domain. This distal exclusion results from a repressive mechanism involving *Hox13* function (Kherdjemil *et al.*, 2016; Sheth *et al.*, 2013a; Woltering *et al.*, 2014). Indeed, it was recently shown that the binding of HOX13 to an enhancer element located in *Hoxa11* intron, triggers *Hoxa11* antisense transcription in distal cells, which eventually abrogates *Hoxa11* expression (Kherdjemil *et al.*, 2016). Interestingly, a series of transgenic-based transcription assays, both in mouse and zebrafish, provided evidence for a lack of distal enhancer in the intron of the zebrafish *hoxa11* genes whereas the enhancer from the mouse *Hoxa11* intron is capable of triggering reporter expression in the *hox13* domain of the fin buds. These results thus indicate that *Hoxa11* exclusion from the *Hox13* domain arose from the emergence of a cis-regulatory element within *Hoxa11* intron, for which trans-acting factors already existed in fish (Kherdjemil *et al.*, 2016). Although, CRISPR/Cas9-mediated deletion of the endogenous mouse enhancer in *Hoxa11* intron abolishes antisense transcription distally, and results in ectopic expression of *Hoxa11* in the

presumptive digit domain, *Hoxa11* antisense transcription is not totally abolished suggesting that other(s) regulatory region(s) could be implicated. Because *Hoxa11* and *Hox13* expression domains are largely overlapping in fins of extant fish species, the *Hox13*-mediated repression of *Hoxa11* must have been implemented during or after the fin-to-limb transition. The polydactyl limbs resulting from distal expression of *Hoxa11* suggests that the evolution of *Hoxa11* regulation, restricting its expression to the presumptive zeugopod, accompanied the emergence of pentadactyl tetrapods and could have been key to the evolution toward the pentadactyl state (Kherdjemil *et al.*, 2016) (Figure 1.11).

The question remains as to how distal expression of *Hoxa11* leads to polydactyly. The presence of postaxial supernumerary digit resulting from distal *Hoxa11* expression indicates that *Hoxa11* can trigger the formation of extra-digit independently of *Shh*. Yet, it remains possible that variations in digit number in the anterior part of the autopod could be, at least in part, associated with an upregulation of *Shh* signaling caused by distal *Hoxa11* expression. Such potential implication of the *Shh* pathway to the *Hoxa11*-mediated polydactyly could be tested, for instance, by generating mutants expressing *Hoxa11* distally in the *Shh*<sup>+/-</sup> background. Interestingly, severe polydactyly was previously observed upon increase *Hoxd11* expression in the presumptive autopod, resulting from the deletion of the genomic region encompassing *Hoxd12* and *Hoxd13* (Kmita *et al.*, 2002). In contrast, the gain of *Hoxd12* expression upon deletion of *Hoxd13* and the gain of *Hoxd10* upon deletion of *Hoxd11* to *Hoxd13* do not trigger the formation of additional digits (Kmita *et al.*, 2002), suggesting a functional divergence between *Hoxa11* and *Hoxd11* (hereafter *Hox11*) and the others 5'*HoxA/D* genes. It also raises the possibility that the level of *Hox11* expression or the ratio between the level of *Hox11* and *Hox13* expression in distal cells contribute to defining digit number. The functional divergence between *Hox11* and the other 5'*HoxA/D* genes could be mediated by distinct targets or different impacts on the same targets. A recent exhaustive mapping of 5'*HOXA/D* TF binding, using micromass culture from chick limb mesenchyme, revealed that *HOX11* and *HOX13* share globally the same genomic targets in these cells (Jerkovic *et al.*, 2017), which favors the hypothesis that, at least for some common targets, *HOX11* and *HOX13* likely trigger opposite/distinct transcriptional outputs. Identifying which genes are differentially expressed upon distal expression of *Hoxa11* and the changes in the



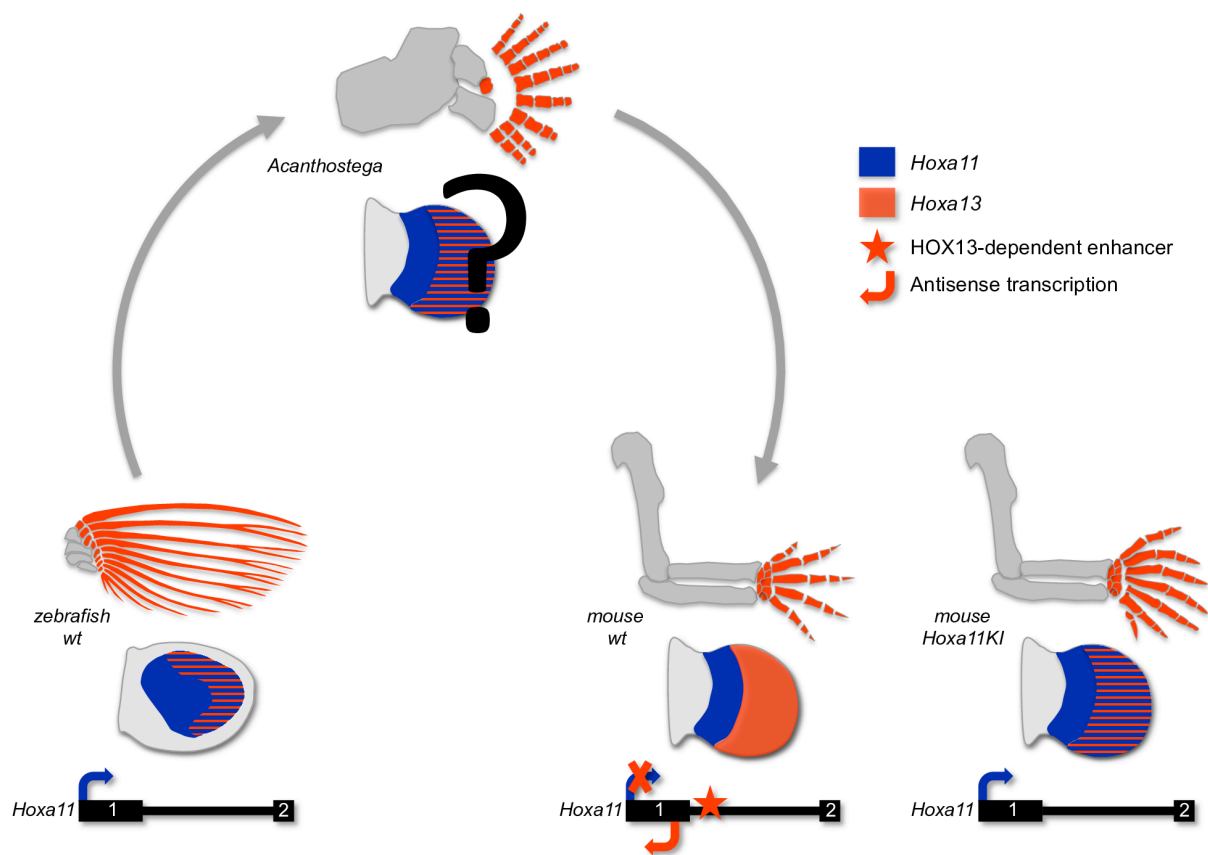
activity of cis-regulatory elements, will be required to gain insights into *Hox11* and *Hox13* functional divergence in patterning the distal limb.

Importantly, the evidence that distal *Hoxa11* repression relies on *Hox13* function suggests an alternative mechanism underlying the polydactyly observed upon reduced dosage of the *Hox13* genes. Previous analysis of the *Gli3Xt; HoxD(del11-13); Hoxa13* allelic series combined with mathematical modeling provided evidence for distal *Hox* genes modulating the wavelength of a Turing-like mechanism in the presumptive autopod, whereby reducing the *Hox* gene dosage elicits the formation of additional digits (Sheth *et al.*, 2012). Rather than reduced *Hox* dosage *per se*, it is possible that distal *Hoxa11* expression (resulting from reduced *Hox13* dosage) is the main trigger for the development of supernumerary digits. Alternatively, *Hox13* and *Hoxa11* could act as polar modulators of a self-organizing Turing mechanism, whereby *Hox13* reduction and *Hoxa11* gain would both contribute to reducing the digit wavelength. These alternative models could be tested for instance by analyzing the *Gli3Xt; HoxD(del11-13); Hoxa13* allelic series in absence of *Hoxa11* function. Moreover, the discovery that the self-organizing Turing network relies on Bmp, Sox9 and Wnt (Raspopovic *et al.*, 2014), now provides an experimental framework to assess the precise mechanism by which 5'*HoxA/D* genes, notably *Hox13* and *Hox11*, modulate the wavelength of the Turing-like mechanism.

## Conclusion

Genetic studies in mice have provided clear evidence for the capacity of 5'*HoxA/D* genes, and in particular *Hox11* and *Hox13*, to modulate digit number. The extent to which evolution of these genes have contributed to the emergence of pentadactyly is difficult to assess in absence of living polydactylous species. Nonetheless, studies that have assessed the phenotypic impact of changes in *Hox* regulation associated with the transition from fins to limbs suggest that the evolution of 5'*HoxA/D* expression contributed to the emergence of digits and subsequent transition from polydactyly to pentadactyly. Potential changes in the functional properties of

the 5'*HoxA/D* proteins, such as changes in DNA binding specificity, interacting partners or active/repressive activity, may also have played a role in distal limb evolution. For instance, it has been shown that the emergence of a new HOXA11 function, between Therian and Eutherian mammals and associated with the origin of decidual cells, arose through interaction with FOXO1, which disrupts the intramolecular repression of the activation domain in the HOXA11 protein (Nnamani *et al.*, 2016). Moreover, it has been suggested that the increase in polyalanine repeats within tetrapod HOXA11 and HOXA13 proteins may have changed their function and could have been instrumental for limb evolution (Chiu *et al.*, 2000; Leite-Castro *et al.*, 2016; Mortlock *et al.*, 2000). Such evolution of the functional properties of the 5'*HoxA/D* proteins remains to be explored in the context of the fin to limb transition and emergence of the pentadactyl state. Finally, it is reasonable to think that the pentadactyl constraint stems from the convergent evolution of additional genes and pathways implicated in distal limb patterning, reminiscent of the distinct mechanisms associated with the emergence of oligodactyly in artiodactyls (Cooper *et al.*, 2014; Lopez-Rios *et al.*, 2014).



**Figure 1.11. Evolution of *Hoxa11* regulation in vertebrates is linked to the pentadactyl state.**

During fin development (bottom left), *hoxa11* and *hoxa13* expression are overlapping in the distal domain of the fin bud. Genetic lineage tracing experiments in zebrafish provided evidence that this distal domain, the *hox13* domain, develops into distal endochondral bony elements and multiple distal rays (Nakamura *et al.*, 2016). In wild type mice (bottom middle), *Hoxa11* and *Hoxa13* expression domains are mutually exclusive. The absence of *Hoxa11* distally is due to the presence of a transcriptional enhancer within *Hoxa11* intron, which upon HOX13-dependent activation, drives antisense transcription that prevents *Hoxa11* expression in the presumptive digit-forming region. Distal expression of *Hoxa11* in mice (mouse *Hoxa11KI*; bottom right) results in the development of polydactyl limbs with six to eight digits. Based on the fossil records indicating that early tetrapods were polydactylous (top), the evolution of *Hoxa11* regulation leading to *Hoxa11* repression in the *Hoxa13* domain must

have been implemented prior the emergence of pentadactyl species and has possibly contributed to the transition from polydactyly in stem-group (extinct) tetrapods to pentadactyly in extant tetrapods (Kherdjemil *et al.*, 2016).

## Acknowledgements

We are grateful to Artur Kania for comments on the manuscript. This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (MOP-126110 to MK). YK was supported by a fellowship from the Molecular Biology Program of the Université de Montréal and the IRCM fellowship Michel-Bélanger.

## 1.4. Les objectifs de recherche

Le développement des membres nécessite la fonction des gènes des complexes *HoxA* et *HoxD*, qui sont exprimés de façon différentielle le long de l'axe proximo-distal, colinéaire avec leur position sur le chromosome. Cette stratégie régulatrice est essentielle afin de spécifier l'identité de chaque segment au cours du développement des membres. Précédemment, nous avons montré que l'expression des gènes *HoxA* dans la partie distale du membre dépend de plusieurs régions cis-régulatrices localisées à longue distance mais qui en 3D sont en contact avec les gènes *Hoxa9* à *Hoxa13*. Cependant, *Hoxa11* n'est pas exprimé dans la partie distale du membre. Une série d'évidence indique qu'un mécanisme restreint l'expression de *Hoxa11* à la partie proximale du membre. Alors que chez la souris, les domaines d'expression de *Hoxa11* et *Hoxa13* sont mutuellement exclusifs dans le bourgeon de membre, chez le poisson zèbre, les gènes *hoxa11* et *hoxa13* sont exprimés dans des domaines chevauchants dans la nageoire. De plus, il a été montré que le locus de *Hoxa11* de souris produit de la transcription antisense de longs ARNs non-codants dans le domaine distal du membre (complémentaire au domaine d'expression de *Hoxa11*).

Basé sur ces observations, nous avons émis l'hypothèse qu'un changement de régulation de *Hoxa11* survenue lors de la transition de la nageoire au membre et impliquant la transcription antisense a entraîné la séparation des domaines d'expression de *Hoxa11* et *Hoxa13* au cours de l'évolution.

### 1.4.1. Objectif 1 (Chapitre 2)

Dans l'objectif 1, nous avons caractérisé le mécanisme permettant la restriction de l'expression de *Hoxa11* à la partie proximale du membre. Nous avons montré que l'absence d'expression distale de *Hoxa11* dans le bourgeon de membre est due à la présence d'une région régulatrice localisée dans l'intron de *Hoxa11*. Sous le contrôle des protéines HOXA13 et HOXD13, cette région régulatrice induit une transcription antisense, empêchant ainsi la

transcription de *Hoxa11* dans l'autopode. Nous avons montré que cette région régulatrice est absente chez le poisson zèbre, indiquant que son émergence a eu lieu lors de la transition de la nageoire au membre.

### 1.4.2. Objectif 2 (Chapitre 2)

Dans l'objectif 2, nous avons voulu comprendre la signification d'un tel changement de régulation de *Hoxa11* au cours de l'évolution. Nous avons montré que l'expression de *Hoxa11* dans le domaine d'expression de *Hoxa13* engendre la formation d'un membre polydactyle chez la souris (lignée de souris *Prx1Cre ; Rosa<sup>Hoxa11/Hoxa11</sup>* ou *A11KI*). Alors que la grande majorité des tétrapodes actuels possèdent des membres pentadactyles, les données fossiles nous indiquent que les premiers tétrapodes étaient polydactyles. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'évolution de la régulation de *Hoxa11* (ayant entraîné la séparation des domaines d'expression de *Hoxa11* et *Hoxa13*) a contribué à la transition des membres polydactyles des premiers tétrapodes aux membres pentadactyles des tétrapodes actuels.

### 1.4.3. Objectifs 3 (Chapitre 3)

Dans un second temps, nous avons étudié les causes moléculaires du développement de la polydactylie résultant de l'expression distale de *Hoxa11* chez les souris *A11KI*. L'utilisation de la génétique de la souris et notamment le croisement des lignées de souris *A11KI* et *Xt/Xt* (inactivation génétique de *Gli3*), nous a permis d'élucider la cause probable de la polydactylie chez les souris *A11KI*. Nos résultats indiquent que l'expression distale de *Hoxa11* contribue à la régulation de la boucle SHH-GREM1-FGF, nécessaire à la croissance du membre et à la formation des doigts. En présence de *Gli3*, l'expression distale de *Hoxa11* a une action positive sur l'expression de *Grem1*, entraînant le développement d'un membre polydactyle. En l'absence de *Gli3*, *Hoxa11* distal réprime l'expression de *Grem1* causant la formation d'un membre oligodactyle (nombre de doigts inférieur à 5).

## **CHAPITRE 2**

# **L'ÉVOLUTION DE LA RÉGULATION DE *HOXA11* CHEZ LES VERTÉBRÉS EST LIÉE AU STADE PENTADACTYLE**



## Authors contributions

Y.K. and M.K. conceived the study and analysed the data. Y.K. designed and conducted all mouse experiments with the help of R.S. for the generation of the mouse lines. All fish experiments were performed by R.L.L. under the supervision of M.-A.A. R.S. performed the ChIP-seq experiments. A.D. provided technical help for the mouse experiments. G.M. performed preliminary experiments related to Figures 2.2a and 2.3c, e. D.M.W. and K.M.P provided *Hoxa11*<sup>eGFP/eGFP</sup> embryos. H.S.S. provided the HOXA13 and HOXD13 antibodies. M.K. wrote the paper. All authors commented on the manuscript.

# Evolution of *Hoxa11* regulation in vertebrates is linked to the pentadactyl state

Yacine Kherdjemil<sup>1,2</sup>, Robert L. Lalonde<sup>3</sup>, Rushikesh Sheth<sup>1</sup>, Annie Dumouchel<sup>1</sup>, Gemma de Martino<sup>1†</sup>, Kyriel M. Pineault<sup>4</sup>, Deneen M. Wellik<sup>4</sup>, H. Scott Stadler<sup>5</sup>, Marie-Andrée Akimenko<sup>3</sup> and Marie Kmita<sup>1,2,6\*</sup>

<sup>1</sup>*Genetics and Development Research Unit, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Québec, H2W 1R7, Canada.*

<sup>2</sup>*Département de Médecine (Programme de Biologie Moléculaire), Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T 1J4, Canada*

<sup>3</sup>*Department of Biology and CAREG, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, K1N 6N5, Canada*

<sup>4</sup>*Department of Internal Medicine, Division of Molecular Medicine and Genetics, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, 48109-2200, USA.*

<sup>5</sup>*Shriners Hospital for Children, Portland, Oregon, 97239, USA*

<sup>6</sup>*Department of Experimental Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, H3A 1A3, Canada*

<sup>†</sup> Present address: *Department of Biology, McGill University, Montreal, Quebec, H3A 1B1, Canada*

\* Corresponding author: Marie Kmita  
Email: Marie.Kmita@ircm.qc.ca  
Tel: (1) 514-987-5749

## Abstract

The fin-to-limb transition represents one of the major vertebrate morphological innovations associated with the transition from aquatic to terrestrial life and is an attractive model to gain insights into mechanisms implicated in morphological diversity between species (Shubin *et al.*, 2009). One of the characteristic limb features is the presence of digits at their extremities. Although most tetrapods have limbs with five digits (pentadactyl limbs), palaeontological data indicate that digits emerged in lobed fins of early tetrapods, which were polydactylous (Coates *et al.*, 2002). How the transition to pentadactyl limbs occurred remains unclear. Here we show that the mutually exclusive expression of the mouse genes *Hoxa11* and *Hoxa13*, which were previously proposed to be involved in the origin of the tetrapod limb (Coates *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2007; Metscher *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2009; Shubin *et al.*, 2009; Sordino *et al.*, 1996), is required for the pentadactyl state. We further demonstrate that the exclusion of *Hoxa11* from the *Hoxa13* domain relies on an enhancer driving antisense transcription at the *Hoxa11* locus after activation by HOXA13 and HOXD13. Finally, we show that the enhancer driving *Hoxa11* antisense transcription is absent in zebrafish, which, together with the largely overlapping expression of *hoxa11* and *hoxa13* genes reported in fish (Ahn and Ho, 2008; Davis *et al.*, 2007; Metscher *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2009; Sordino *et al.*, 1996), suggests that this enhancer emerged in the course of the fin-to-limb transition. On the basis of the polydactyly that we observed after expression of *Hoxa11* in distal limbs, we propose that the evolution of *Hoxa11* regulation contributed to the transition from polydactyl limbs in stem-group tetrapods to pentadactyl limbs in extant tetrapods.

## Main text

Several studies provided evidence for the implication of Hox genes in the fin-to-limb transition (Freitas *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2007; Shubin *et al.*, 1997; Sordino *et al.*, 1995; Wagner and Chiu, 2001; Woltering *et al.*, 2014), notably *Hoxa13* and *Hoxd13* (*Hox13* hereafter), which are required for digit morphogenesis (Freitas *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2007; Fromental-Ramain *et al.*, 1996b; Sordino *et al.*, 1995; Woltering *et al.*, 2014). Comparison of their expression pattern in fin and limb buds revealed a significant expansion of the *Hox13* domain in distal limbs (Schneider and Shubin, 2013) and engineered enlargement of the *Hoxd13* domain in fish resulted in more chondrogenic tissue forming distally as well as fin fold reduction (Freitas *et al.*, 2012), that is, morphological changes associated with the fin-to-limb transition. It was thus proposed that the evolution of *Hox13* regulation has likely been instrumental to the emergence of the limb characteristic feature, that is, the digits (Freitas *et al.*, 2012; Sordino *et al.*, 1995). In mice, this regulation relies on a series of remote transcriptional enhancers (Berlivet *et al.*, 2013; Montavon *et al.*, 2011), and although a subset of these enhancers exists in fish (Gehrke *et al.*, 2015), the expansion of the *Hox13* domain in limb was probably associated with the emergence of tetrapod-specific enhancers during the fin-to-limb transition (Freitas *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2007; Sordino *et al.*, 1995; Woltering *et al.*, 2014). Another notable difference is the mutually exclusive expression of *Hoxa11* and *Hoxa13* in tetrapod limbs, contrasting with their largely overlapping expression in fins (Ahn and Ho, 2008; Davis *et al.*, 2007; Metscher *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2009; Sordino *et al.*, 1996). Two hypotheses have been put forward to explain how *Hoxa11* gets proximally restricted in tetrapod limbs. One hypothesis suggested a *Hoxa13*-dependent repression of *Hoxa11* in the presumptive autopod (Sheth *et al.*, 2013a; Wagner and Chiu, 2001; Woltering *et al.*, 2014), whereas the second proposed that antisense transcription at the *Hoxa11* locus prevents expression of the gene distally (Hsieh-Li *et al.*, 1995; Leite-Castro *et al.*, 2016; Potter and Branford, 1998), but the functional importance of the mutually exclusive expression of *Hoxa11* and *Hoxa13* in tetrapod limbs is unknown.

Previous chromatin conformation analyses revealed that, in distal limbs, 5' *HoxA* genes (that is, *Hoxa9* to *Hoxa13*) are grouped within a chromatin sub-topological domain (sub-TAD) interacting with sub-TADs containing distal limb enhancers (Berlivet *et al.*, 2013). Yet, although *Hoxa10* and *Hoxa13* are both expressed distally, *Hoxa11* expression is proximally restricted (Figure 2.1a–c), suggesting that *Hoxa11* is part of the distal limb regulatory landscape, but a specific, yet unknown, mechanism prevents its expression distally (Sheth *et al.*, 2013a; Woltering *et al.*, 2014). To test this possibility, we first took advantage of a mouse line in which the *Hoxa11* gene is replaced by a PGK-neomycin cassette (Small and Potter, 1993), which we used as a reporter transgene. We found neomycin expression in distal limbs (Figure 2.1d), indicating that *Hoxa11* proximal restriction is linked to specific feature(s) of the gene itself. We next analysed the putative implication of antisense long non-coding RNAs previously identified at the *Hoxa11* locus (Hsieh-Li *et al.*, 1995; Potter and Branford, 1998) and robustly expressed in the distal limb bud (Hsieh-Li *et al.*, 1995) (Figure 2.1e). Among the distinct *Hoxa11* antisense transcripts (*Hoxallas*, also known as *Hoxallos*), two initiate upstream of the *Hoxa11* gene and are thus non-overlapping with *Hoxa11* (*Hoxallas-a*; Figure 2.1e) and the other two initiate within *Hoxa11* exon 1 (*Hoxallas-b*; Figure 2.1f). Notably, only *Hoxallas-b* expression pattern is mutually exclusive with *Hoxa11* expression domain (Figure 2.1f, compare with Figure 2.1b). To test whether antisense transcription overlapping with *Hoxa11* exon 1 prevents *Hoxa11* expression distally, we took advantage of the *Hoxa11*<sup>eGFP</sup> mutant line, which lacks *Hoxallas-b* start sites as the enhanced green fluorescent protein (eGFP) coding sequence replaces most of *Hoxa11* exon 1 (Nelson *et al.*, 2008). This mutation disrupted antisense transcription normally initiating 3' to *Hoxa11* promoter (Figure 2.S1a, b) while *gfp* expression driven by the *Hoxa11* promoter was present both in the proximal and distal domains (Figure 2.1g). By contrast, ectopic expression of *Hoxallas-b* in the entire limb had no effect on *Hoxa11* expression (Figure 2.S2c–e), thereby excluding a *trans*-acting effect of *Hoxallas-b* on *Hoxa11* expression. Together, our data suggest that *Hoxa11* distal repression is due to the antisense transcription event or the antisense *Hoxallas-b* transcripts acting in *cis*.

Previous mapping of active enhancers in distal limbs (Berlivet *et al.*, 2013) (referred to as ‘digit’ enhancers hereafter) uncovered a putative ‘digit’ enhancer embedded in *Hoxa11* intron. We thus proposed that this enhancer might control *Hoxa11as-b* expression. We first tested the transcriptional enhancer activity of this DNA region in transgenic embryos and confirmed its ability to act as a transcriptional enhancer in distal limbs (Figure 2.2a). Next, we generated mutant mice lacking this enhancer (*Hoxa11*<sup>ΔInt/ΔInt</sup>; Figure 2.S2) to examine its potential implication in *Hoxa11as-b* expression. Analysis of antisense transcription in *Hoxa11*<sup>ΔInt/ΔInt</sup> limbs showed no detectable expression of *Hoxa11as-b* in the most distal cells (Figure 2.2b, c), indicating that in these cells, the identified enhancer is required for antisense transcription overlapping with *Hoxa11* exon 1. Some *Hoxa11as-b* expression remained in proximal cells of the presumptive handplate (presumptive carpal region; Figure 2.2c), which suggests that additional *cis*-regulatory element(s) trigger antisense transcription in these cells. Notably, the deletion of the enhancer abrogating *Hoxa11as-b* expression in the most distal cells also resulted in ectopic expression of *Hoxa11* in the presumptive digits (Figure 2.2d, e). The gain-of-sense transcription in *Hoxa11*<sup>eGFP/eGFP</sup> distal limbs (Figure 2.1g) indicates that it is not the intronic regulatory region per se but *Hoxa11as-b* expression or the antisense transcription event that represses *Hoxa11* expression distally.

Analysis of the enhancer sequence revealed several putative binding sites for HOXA13, the expression of which occurs in digit progenitor cells (Scotti *et al.*, 2015) and is required in conjunction with HOXD13 for digit morphogenesis (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b). Chromatin immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing (ChIP-seq) indicated that, in distal limb cells, HOXA13 as well as HOXD13 bind to the identified enhancer (Figure 2.S3a). Moreover, transcription assay in 293T cells shows that HOXA13 has a positive effect on the enhancer activity (Figure 2.S3b). Together, these results raised the possibility that distal *Hoxa11* antisense transcription relies on HOX13. We thus analysed *Hoxa11* antisense transcription in the *Hoxa13;Hoxd13* allelic series. We used the probe recognizing all antisense transcripts such that expression in the proximal limb, where *Hox13* genes are not expressed, served as internal control. We found that although antisense transcription is barely modified in single mutants (Figure 2.S4), it markedly decreases in the

*Hoxa13*<sup>-/-</sup>*Hoxd13*<sup>+/-</sup> mutant (Figure 2.3c, compare to Figure 2.3a), and is completely abrogated in *Hoxa13*<sup>-/-</sup>*Hoxd13*<sup>-/-</sup> distal limbs (Figure 2.3e). Analysis of the distal-specific antisense transcripts (*Hoxa11as-b*) confirmed that distal antisense transcription requires HOX13 function (Figure 2.S5). Importantly, concomitant with the abrogation of antisense transcription, *Hoxa11* expression was gained distally (Figure 2.3d–f, compare with Figure 2.3b) consistent with the requirement of antisense transcription for *Hoxa11* proximal restriction.

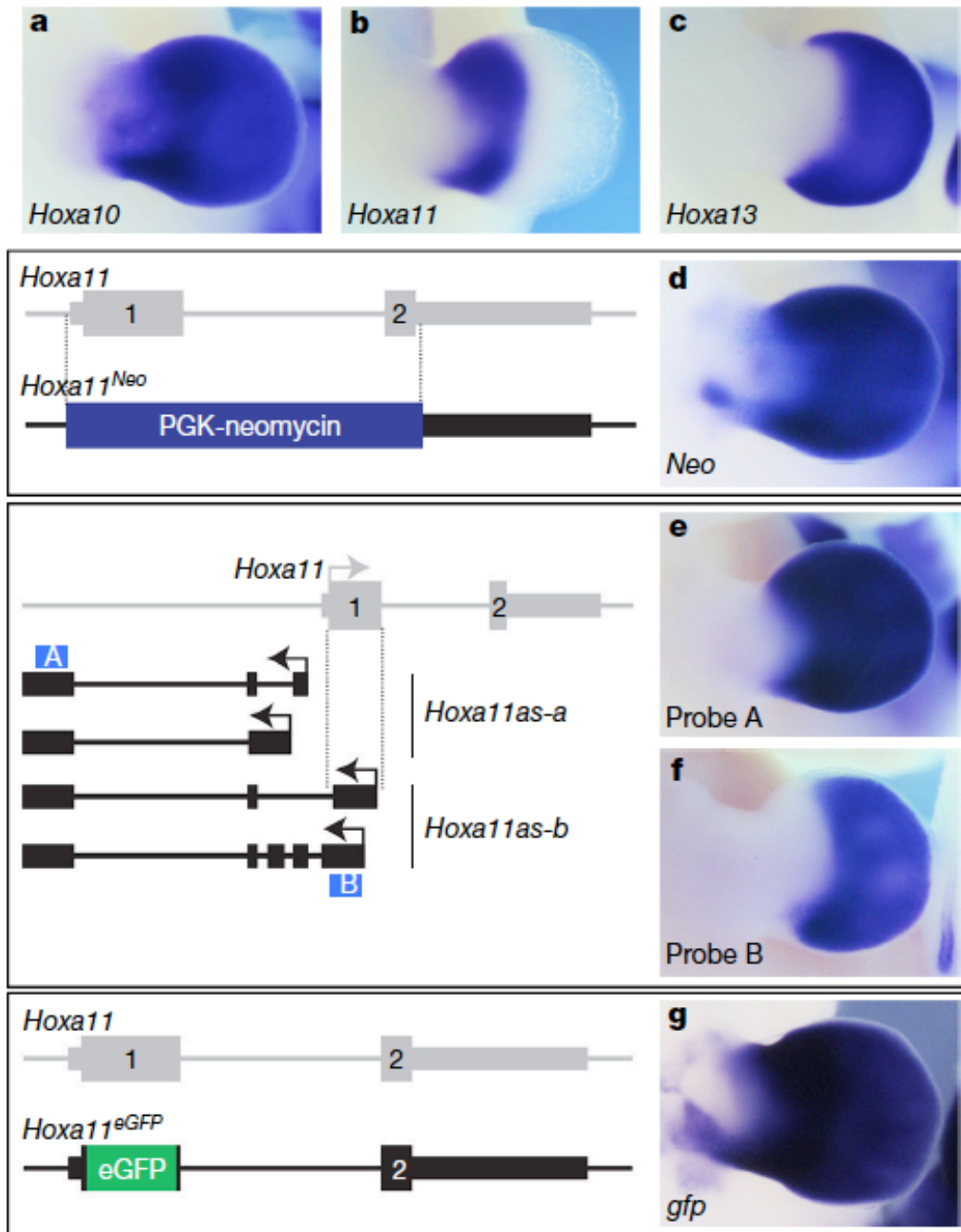
To assess the functional significance of the HOXA13/D13-mediated repression of *Hoxa11*, we investigated the phenotypic outcome of distal *Hoxa11* expression. Although the deletion of the enhancer driving antisense transcription results in *Hoxa11* expression in distal limbs, the deletion extends up to the exon 1–intron boundary, thereby precluding the use of this mutant line to assess the phenotype resulting from distal *Hoxa11* expression. We thus generated a *Hoxa11* conditional gain-of-function allele (*Rosa26*<sup>*Hoxa11*</sup>; Figure 2.S6) to express *Hoxa11* ectopically and distally. We found that embryos carrying the *Rosa26*<sup>*Hoxa11*</sup> allele and either *Hoxa13Cre* (Scotti *et al.*, 2015) or *Prx1Cre* (Logan *et al.*, 2002) have limbs with extra digits (Figure 2.3g, h), including postaxial extra digits (arrow in Figure 2.3h and Figure 2.S7). While some variations in the digit phenotype were observed among individuals, all homozygous mutants analysed were polydactylous (Figure 2.S7c–e). Increased expression of *Hoxd11* in the presumptive autopod in the absence of *Hoxd13* also resulted in polydactyly, whereas a similar gain of *Hoxd10* or *Hoxd12* had no effect on digit number (Kmita *et al.*, 2002). These data raise the possibility that the formation of extra digits upon ectopic expression of *Hoxa11* or *Hoxd11* distally reflects the divergence between *Hoxa11/Hoxd11* targets and those of the other 5' *HoxA/D* genes. Notably, the evidence that *Hoxa11* expression in the distal limb results in the formation of extra digits indicates that the proximal restriction of *Hoxa11* expression is required for the pentadactyl state.

In contrast to the mutually exclusive *Hoxa11* and *Hoxa13* pattern in tetrapod limbs, *hoxa11* and *hoxa13* gene expression is largely overlapping in zebrafish fins (Ahn and Ho, 2008; Davis

*et al.*, 2007; Metscher *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2009; Sordino *et al.*, 1996) (Figure 2.S8) as well as in other teleosts (Takamatsu *et al.*, 2007) (the medaka *Oryzias latipes*) and in fish models of both chondrichthyans (Sakamoto *et al.*, 2009) (*Scyliorhinus canicula*) and basal actinopterygians (Davis *et al.*, 2007) (*Polyodon spathula*). The HOXA13/D13-mediated repression of *Hoxa11* identified in distal limb cells was thus probably implemented after the separation of actinopterygians and chondrichthyans, during the evolution of vertebrates towards tetrapod species. Consistent with this hypothesis, no *hoxa11* antisense transcription has been reported in fish (Leite-Castro *et al.*, 2016; Ulitsky *et al.*, 2011) (Figure 2.S9). Moreover, sequence comparison of the mouse *Hoxa11* intron showed robust conservation among tetrapods, whereas considerably weaker sequence conservation was observed with fish *hoxa11* orthologues (Figure 2.4a). To examine whether the lack of *hoxa11* antisense transcription in fish could be due to the absence of a distal enhancer within *hoxa11* intron, we tested the zebrafish *hoxa11a* and *hoxa11b* intronic sequences for potential enhancer activity using transgenic reporter assays in both zebrafish and mice. Neither the *hoxa11a* nor *hoxa11b* intron was capable of triggering expression of a reporter gene in fin nor in mouse limb buds (Table 2.S1), indicating that there is no distal enhancer in *hoxa11a* nor *hoxa11b* intron. By contrast, when we tested the transcriptional activity of the mouse *Hoxa11* intron in zebrafish, the analysis of four stable transgenic lines revealed that the mouse *Hoxa11* intron was able to drive reporter gene expression in the pectoral fin mesenchyme (Figure 2.4b, c). At 60 hours post-fertilization (hpf), eGFP-positive cells were present at the distal rim of the endoskeletal disc and migrating into the fin fold (Figure 2.4b) and by 72 hpf most eGFP-positive cells were found in the fin fold mesenchyme (Figure 2.4c). The expression of the reporter transgene was reminiscent of *hoxa13a* expression at 60 hpf (Figure 2.4d) and 72 hpf (Figure 2.4e), indicating that the mouse enhancer in *Hoxa11* intron was active in the *Hoxa13* domain also in zebrafish. Together, our data indicate that all the transcription factors required for the activity of the mouse enhancer are present in zebrafish fins, and that the enhancer driving *Hoxa11* antisense transcription does not exist in the intron of the zebrafish *hoxa11a* and *hoxa11b* genes. We therefore propose that the emergence of the enhancer triggering *Hoxa11* antisense transcription, and thus distal repression of *Hoxa11*, occurred in the course of evolution towards tetrapod species.



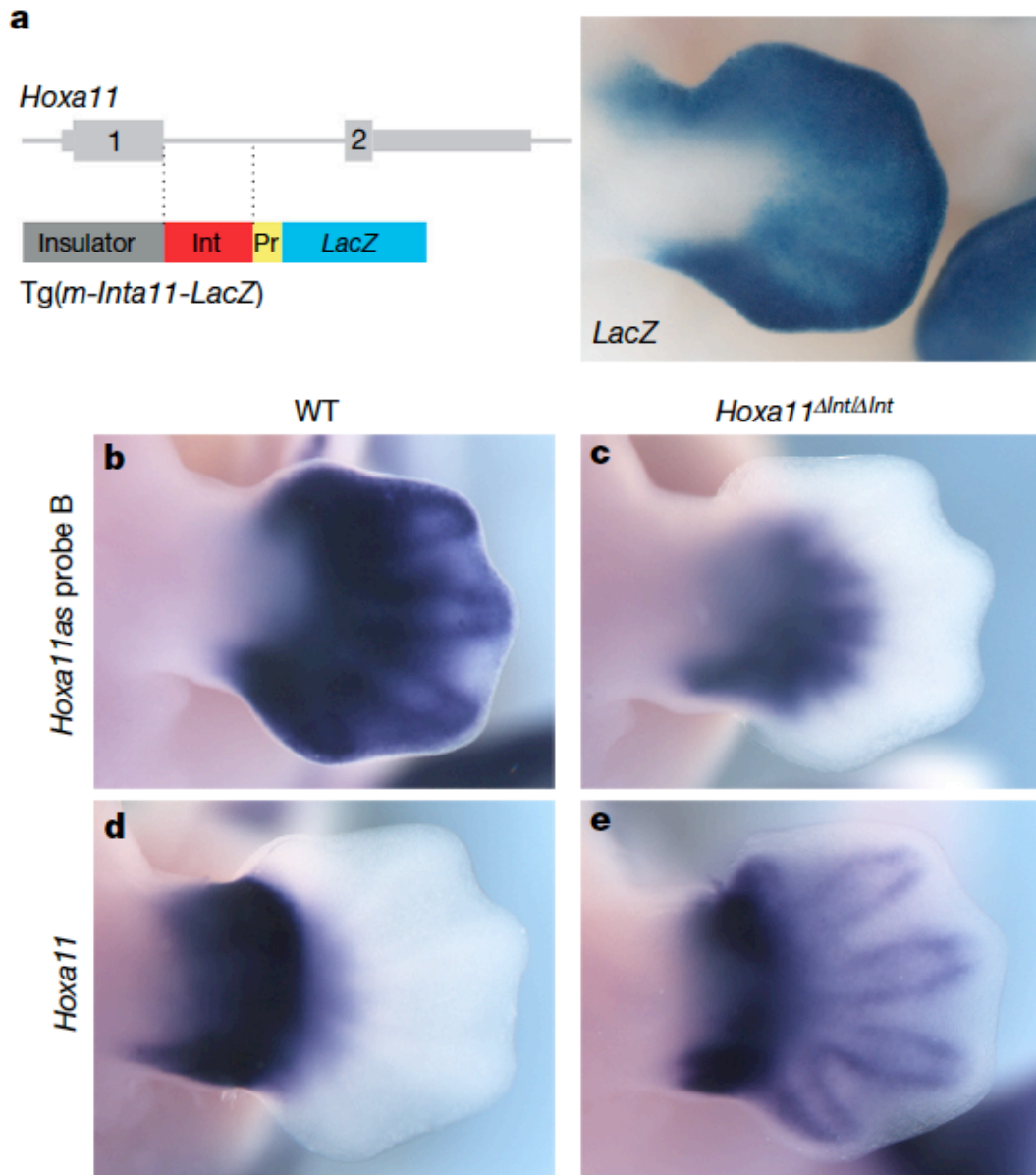
In summary, our work reveals that the mutually exclusive expression of *Hoxa11* and *Hoxa13* in tetrapods is associated with the emergence of a transcriptional enhancer in *Hoxa11* intron, which upon HOXA13/D13-dependent activation, triggers antisense transcription and thereby prevents *Hoxa11* expression distally. On the basis of the evidence that this HOX13-mediated regulation of *Hoxa11* probably emerged during the fin-to-limb transition and the polydactyly resulting from distal expression of *Hoxa11* in mice, we propose that the evolution of *Hoxa11* regulation has contributed to the transition from polydactyly in stem-group (extinct) tetrapods to pentadactyly in extant tetrapods.



**Figure 2.1. The proximal restriction of *Hoxa11* is linked to antisense transcription at the *Hoxa11* locus**

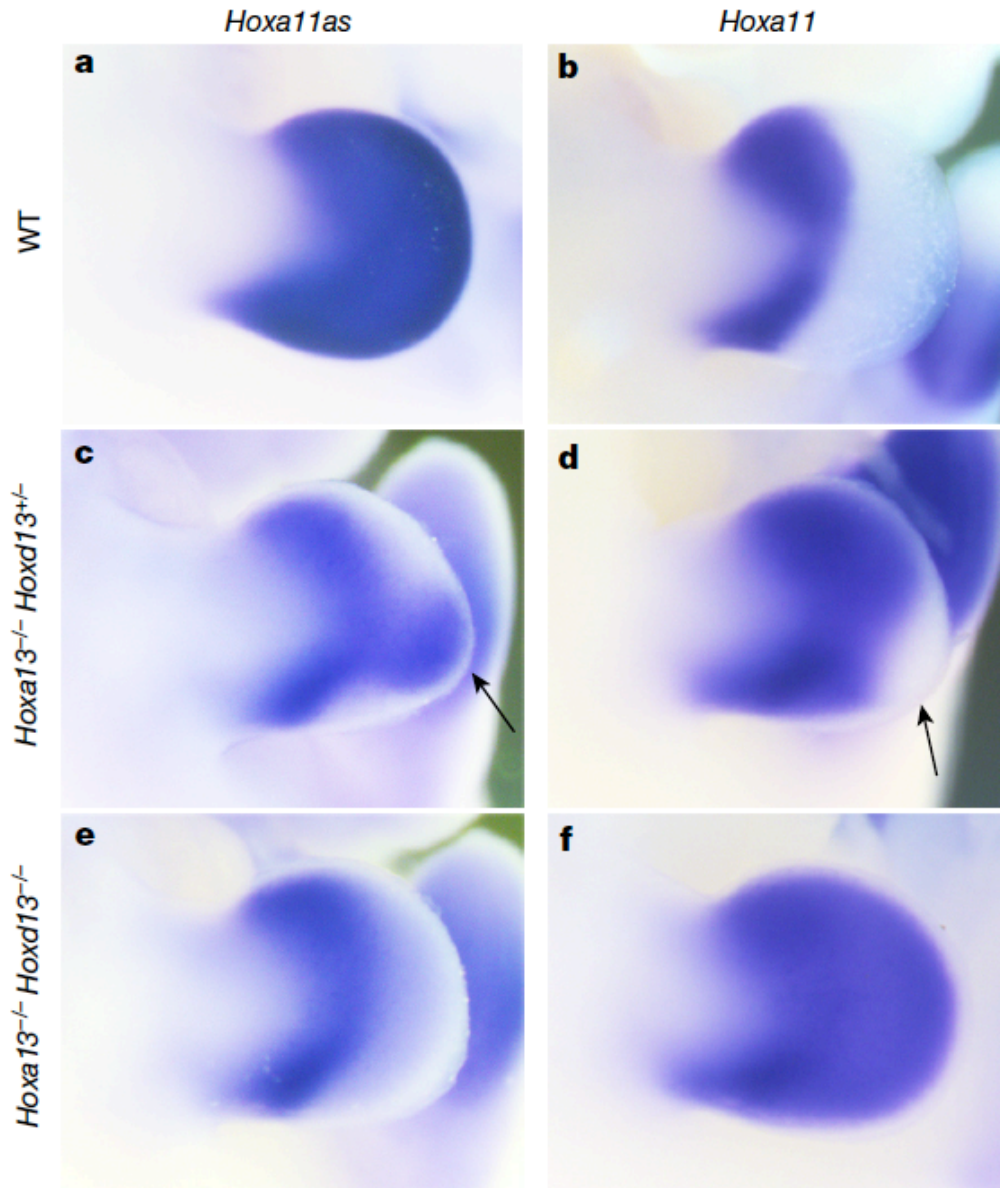
a–c, Expression of *Hoxa10* (a), *Hoxa11* (b) and *Hoxa13* (c) in wild-type limb bud from embryonic day (E) 11.5 mouse. d, Replacement of the *Hoxa11* gene with the PGK-neomycin cassette (*Hoxa11<sup>Neo</sup>*; scheme to the left), results in neomycin expression both in the proximal

and distal domains. **e, f**, Expression of all antisense transcripts (**e**) and antisense transcripts overlapping with *Hoxa11* exon 1 (**f**) in E11.5 wild-type limb. Schemes of the antisense transcripts and the probes used (blue boxes) are on the left. Note that the antisense transcripts overlapping with *Hoxa11* exon 1 (*Hoxa11as-b*) are distally restricted (**f**), reminiscent of *Hoxa13* expression (**c**) and mutually exclusive with the *Hoxa11* pattern (**b**). **g**, Deletion of the antisense transcript start sites in *Hoxa11* exon 1, via replacement of most of exon 1 with the eGFP coding sequence (*Hoxa11<sup>eGFP</sup>*; scheme to the left) and expression of *gfp* under the control of the *Hoxa11* promoter (right). Original magnification, x31.5 (for all images).



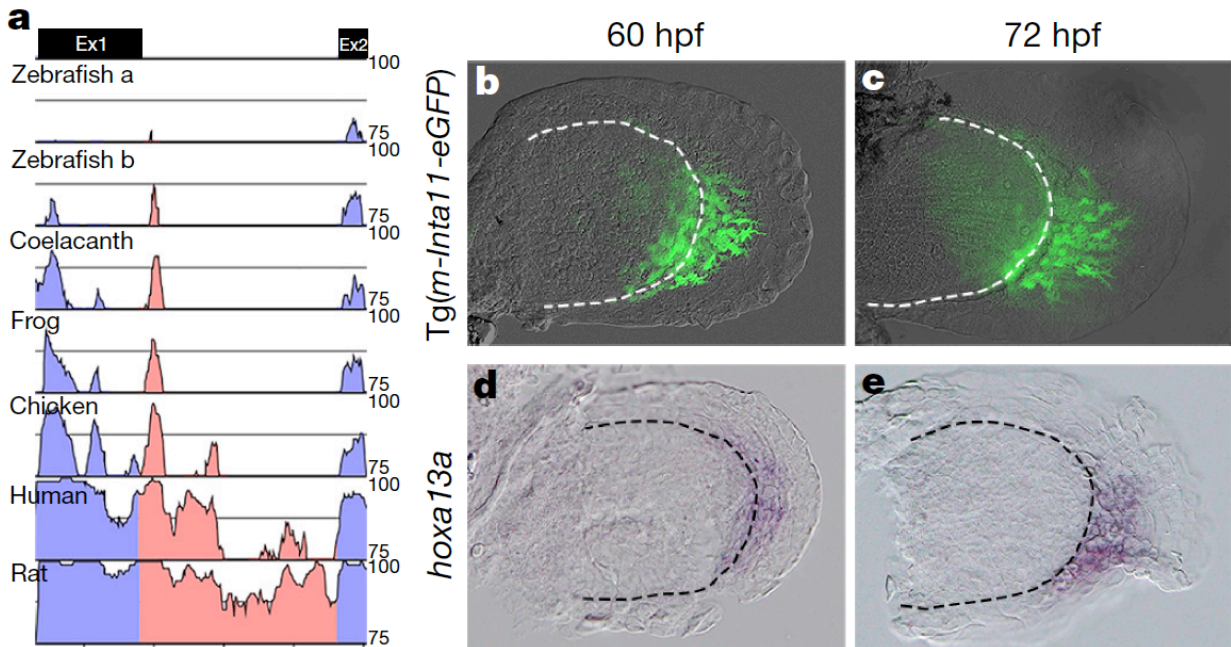
**Figure 2.2. Deletion of the distal enhancer in *Hoxa11* intron results in impaired antisense transcription and gain of sense transcription in distal cells**

**a**, Left, scheme of the *Tg(m-Inta11-LacZ)* transgene carrying the predicted distal enhancer (Int, red box). Right, X-gal staining of E12.5 transgenic embryos ( $n = 5$ ). **b–e**, Expression of *Hoxa11<sup>as</sup>* (b, c) and *Hoxa11* (d, e) in wild-type (WT; b, d) and *Hoxa11<sup>ΔInt/ΔInt</sup>* (c, e) mouse limbs at E12.5. Note that based on the observed gain of *Hoxa11* expression, other regulatory input(s) could be implicated in *Hoxa11* regulation in distal cells. Pr, minimal promoter. Original magnification, x31.5 (for all images).



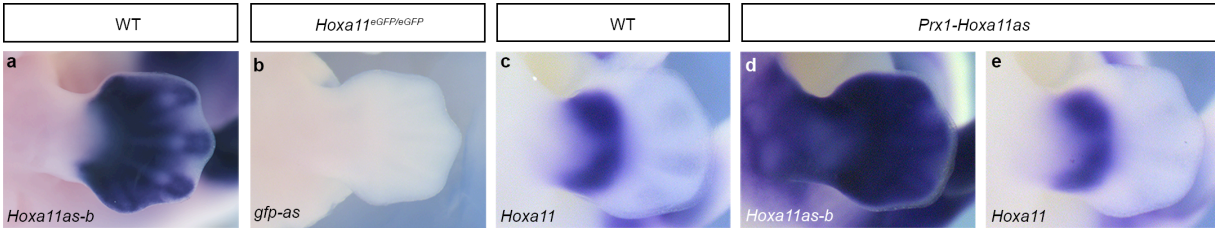
**Figure 2.3. *Hox13* inactivation disrupts *Hoxa11* antisense transcription in distal cells and distal *Hoxa11* expression results in the formation of supernumerary digits**

**a–f**, *Hoxa11as* (probe A) (**a**, **c**, **e**) and *Hoxa11* (**b**, **d**, **f**) expression in E11.5 limb buds from wild-type (**a**, **b**), *Hoxa13*<sup>-/-</sup> *Hoxd13*<sup>+/-</sup> (**c**, **d**) and *Hoxa13*<sup>-/-</sup> *Hoxd13*<sup>-/-</sup> (**e**, **f**) mouse embryos. Arrows in **c** and **d** show the group of cells still expressing *Hoxa11as* in *Hoxa13*<sup>-/-</sup> *Hoxd13*<sup>+/-</sup> limbs (**c**), which corresponds to distal cells in which *Hoxa11* expression is not gained (**d**). **g**, **h**, Skeleton of *Rosa*<sup>*Hoxa11/Hoxa11*</sup> (**g**) and *Prx1Cre*; *Rosa*<sup>*Hoxa11/Hoxa11*</sup> (**h**) distal forelimb at postnatal day 0 (P0). Anterior is up. Original magnification, x31,5 (**a–f**) and x20 (**g**, **h**).



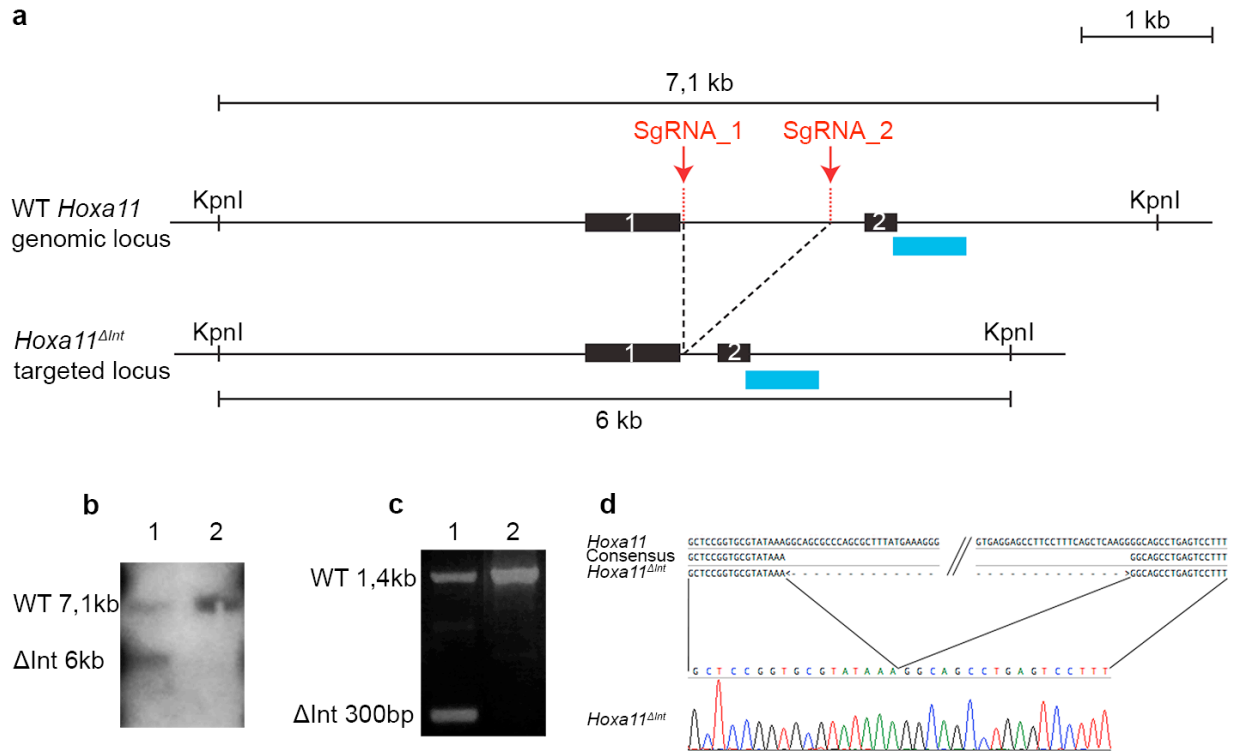
**Figure 2.4. The mouse *Hoxa11* antisense enhancer is functional in distal fins**

**a**, mVISTA sequence conservation plot of the mouse *Hoxa11* intron (red) with tetrapod (rat, human, chicken and frog) and fish representatives (coelacanth and zebrafish). Ex1, exon 1 ; Ex2, exon 2. Note that zebrafish has two *hoxa11* genes expressed in developing fins, *hoxa11a* and *hoxa11b*. **b**, **c**, GFP expression in fin buds of Tg(*m-Inta11-eGFP*) transgenic zebrafish embryos at 60 hpf (**b**) and 72 hpf (**c**), revealing the enhancer activity of the mouse *Hoxa11* intron in fish. Note the filopodia-like protrusions in GFP<sup>+</sup> mesenchymal cells suggestive of a migration towards the fin fold. **d**, **e**, *hoxa13a* expression in developing fins at 60 hpf (**d**) and 72 hpf (**e**). Original magnification, x400.



**Figure 2.S1. Absence of antisense transcription 3' to the *Hoxa11* promoter in the *Hoxa11<sup>eGFP/eGFP</sup>* limb and evidence that *Hoxa11as-b* transcripts produced in *trans* have no effect on *Hoxa11* expression.**

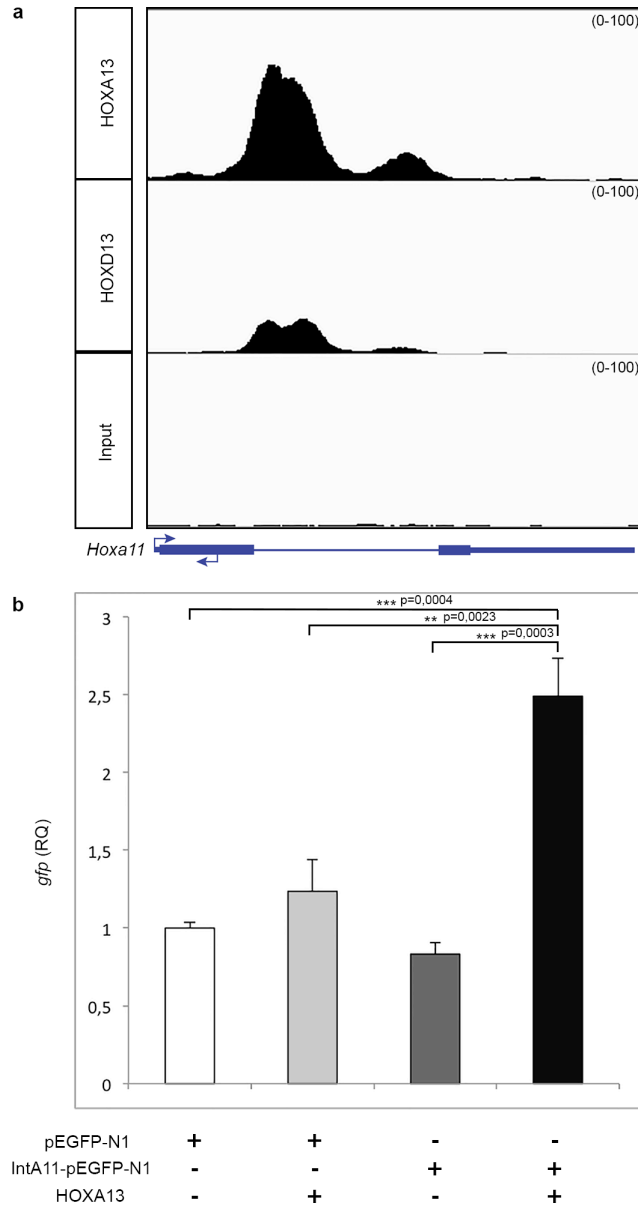
**a, b**, Detection of *Hoxa11as-b* transcripts in wild-type limb buds at E12.5 (**a**), and whole-mount *in situ* hybridization to detect *gfp* antisense transcripts in *Hoxa11<sup>eGFP/eGFP</sup>* limb buds at E12.5 (**b**). **c–e**, *Hoxa11* expression in wild-type limb buds (**c**), and *Hoxa11as-b* (**d**) and *Hoxa11* (**e**) expression in *Prx1-Hoxa11as* limb buds. Original magnification, x31.5.



**Figure 2.S2. Deletion of the distal enhancer in *Hoxa11* intron using CRISPR-Cas9**

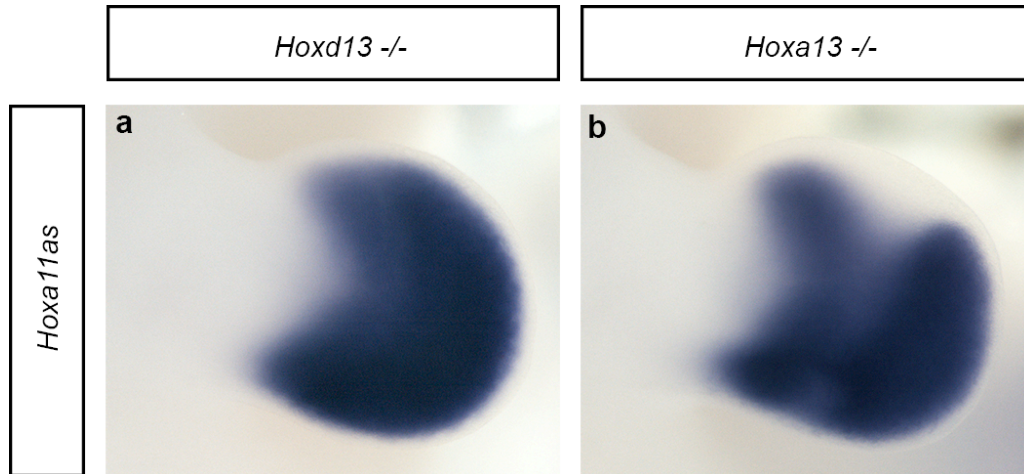
**a**, Scheme of the wild-type and targeted (*Hoxa11*<sup>ΔInt</sup>) loci. Sites targeted by the single-guide RNAs (sgRNA\_1 and sgRNA\_2) for the CRISPR-Cas9-mediated deletion of the distal enhancer. The blue rectangles indicate the position of the DNA probe used to confirm the deletion by Southern blot in **b**. **b**, Lane 1 shows the 6-kb KpnI band resulting from the CRISPR-Cas9-mediated deletion. Lane 2 was loaded with wild-type DNA. **c**, PCR reaction using a forward primer located upstream of sgRNA\_1 and a reverse primer located downstream sgRNA\_2 shows the presence of a 300 bp (ΔInt 300 bp) fragment expected for the *Hoxa11*<sup>ΔInt</sup> allele. **d**, The sequence of the 300-bp PCR fragment confirms the CRISPR-Cas9-mediated deletion of the *Hoxa11* intronic region containing the distal enhancer (only the sequence encompassing the deletion breakpoints is shown).





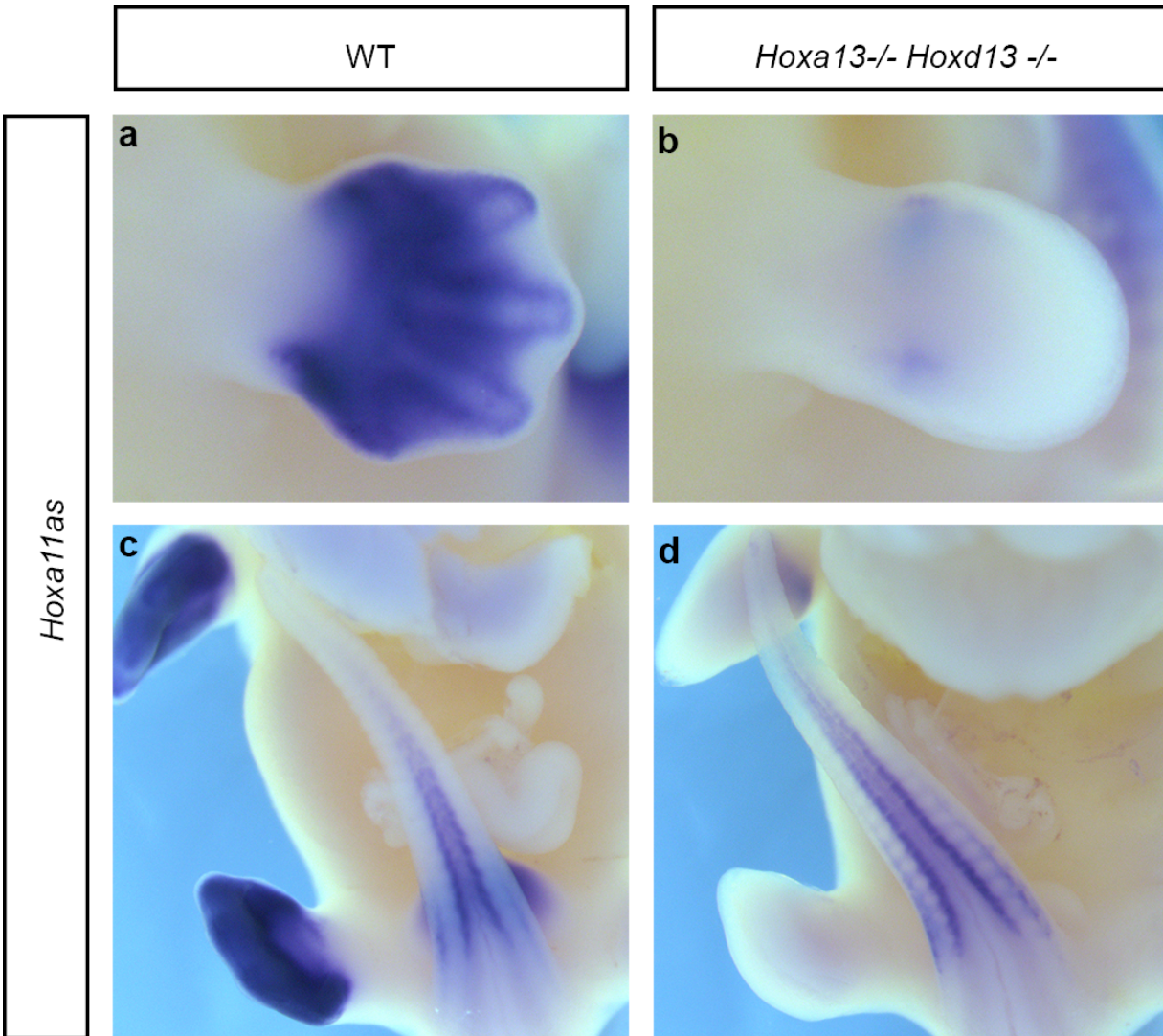
**Figure 2.S3. The distal enhancer located in the *Hoxa11* intron is bound by HOXA13 and HOXD13 in distal limb cells and its activity is increased by HOXA13 in 293T cells**

**a**, Integrative genomics viewer (IGV) screenshot showing HOXA13 and HOXD13 ChIP-seq data at the *Hoxa11* locus. These ChIP-seq data were obtained using chromatin from distal forelimb buds of wild-type E11.5 mouse embryos (Sheth *et al.*, 2016). **b**, Transfection assay shows HOXA13 dependent activation of *Hoxa11* intron driving reporter gene expression. Two-tailed Tukey's multiple comparisons test was performed. Error bar indicate s.d ( $n = 3$ ). RQ, Relative Quantification.



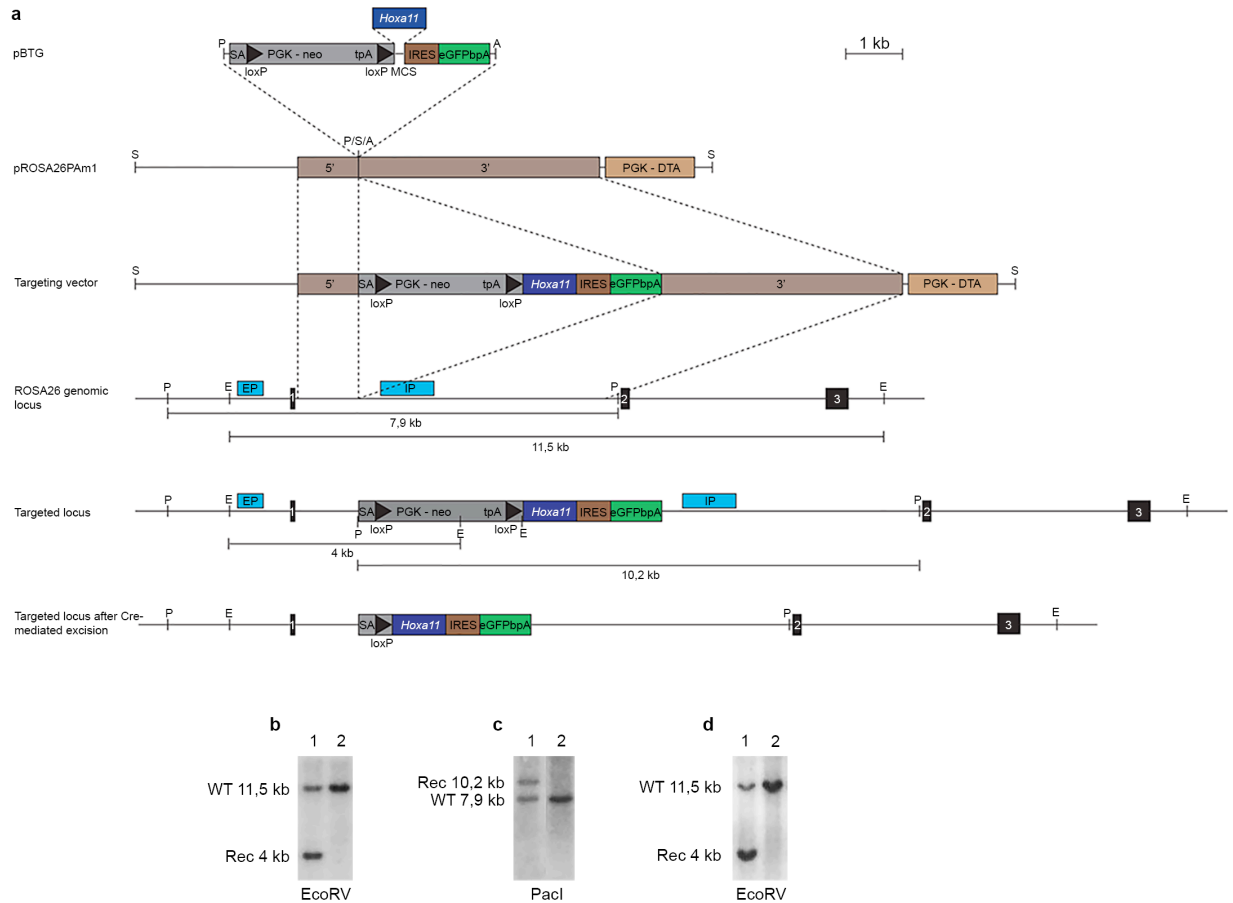
**Figure 2.S4. Individual inactivation of *Hoxa13* or *Hoxd13* is not sufficient to fully abrogate antisense transcription in distal limbs**

**a, b**, Whole-mount *in situ* hybridization, using probe A (see Figure 2.1) to detect all antisense transcripts, on *Hoxd13*<sup>-/-</sup> (**a**) and *Hoxa13*<sup>-/-</sup> (**b**) mouse limb buds at E11.5. Antisense transcription in distal limbs remains robust in both mutants but a clear reduction is seen in the distal *Hoxa13*<sup>-/-</sup> limbs. Original magnification, x31.5.



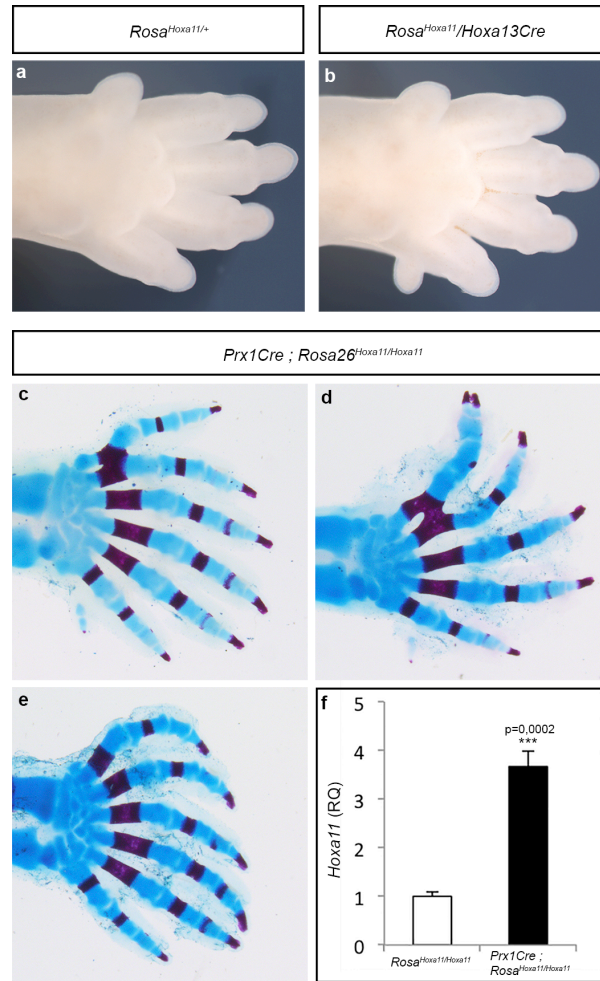
**Figure 2.S5. Inactivation of both *Hoxa13* and *Hoxd13* disrupts antisense transcription overlapping with the *Hoxa11* exon 1**

**a–d**, *Hoxa11as-b* expression (probe B in Figure 2.1) in limb buds (**a**, **b**) and tail buds (**c**, **d**) from wild-type (**a**, **c**) and *Hoxa13*<sup>-/-</sup> *Hoxd13*<sup>-/-</sup> (**b**, **d**) E12.5 mouse embryos. Whole-mount *in situ* hybridization shows that *Hoxa11as-b* expression in tail buds (internal control) is similar in both the wild-type (**c**) and double-mutant (**d**) embryos, whereas there is almost no expression remaining in *Hoxa13*<sup>-/-</sup> *Hoxd13*<sup>-/-</sup> limb buds (**b**). Original magnification, x31.5.



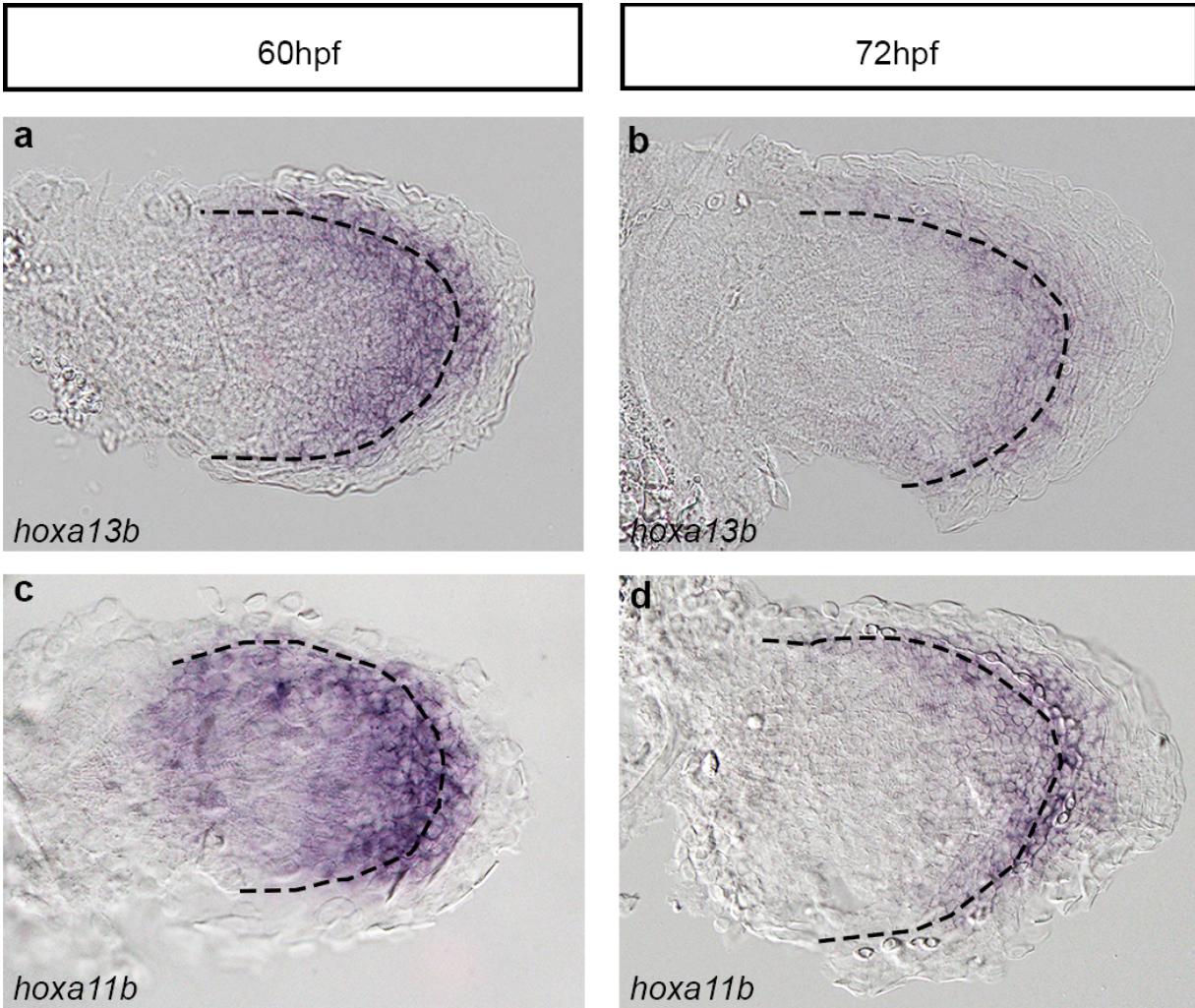
**Figure 2.S6. Generation of the *Rosa<sup>Hoxa11</sup>* knock-in mouse line**

**a**, Targeting of the endogenous *Rosa26* locus (top three lines). The wild-type *Rosa26* locus is shown below (middle). Regions used as homologous arms for the recombination in ES cells are indicated by brown rectangles labelled 5' and 3', respectively. Scheme of the targeted locus after homologous recombination in ES cells and after Cre-mediated recombination is shown at the bottom. The position of the internal (IP) and external (EP) probes and restriction sites used for Southern blot analysis are indicated on both the wild-type and targeted locus. **b**, **c**, Southern blots of ES cells clones using the internal probe (**b**) and external probe (**c**) to detect the targeted allele (lane 1). **d**, Southern blot of wild-type (lane 2) and heterozygous (lane 1) mice. A, AscI; E, EcoRV; P, PacI; S, SwaI.



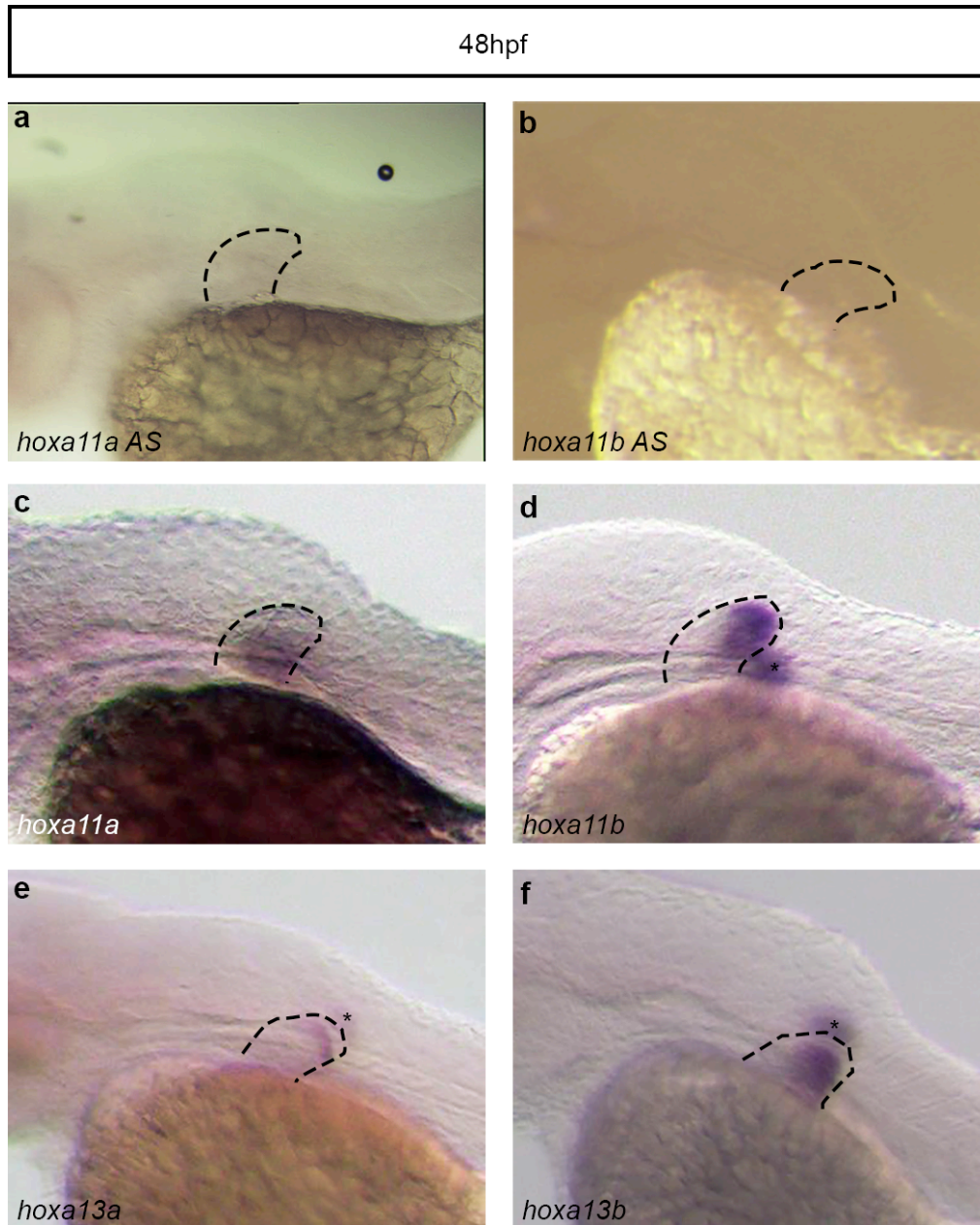
**Figure 2.S7. The conditional gain of *Hoxa11* using the *Hoxa13Cre* allele results in the formation of supernumerary digits**

**a, b**, Autopod of *Rosa<sup>Hoxa11/+</sup>* (**a**) and *Rosa<sup>Hoxa11</sup> Hoxa13Cre* (**b**) at E15.5. Anterior is up. The *Rosa26* locus and *Hoxa13Cre* allele being on the same chromosome (Chr6), the gain-of-function phenotype was assessed with only one copy of the *Rosa<sup>Hoxa11</sup>* allele. **c–e**, Autopod skeletons of *Prx1Cre; Rosa<sup>Hoxa11/Hoxa11</sup>* mice at P0 from four distinct mutants (anterior is up). The number of digits varies from 6 to 7, with often a small post-axial extra-digit (posterior). The extra-digit phenotype is fully penetrant upon Cre-activation of two copies of the *Rosa<sup>Hoxa11</sup>* allele ( $n = 10$ ). Original magnification, x20. **d**, Quantification of *Hoxa11* expression level by quantitative reverse transcriptase PCR (RT-qPCR) on RNA extracted from E11.5 forelimb, relative to both *Gapdh* and *Tbp* mRNA of *Prx1Cre; Rosa<sup>Hoxa11/Hoxa11</sup>* embryos. Two-tailed *t*-test was performed. Error bars indicate s.d ( $n = 4$ ).



**Figure 2.S8. *hoxa11* and *hoxa13* are expressed in overlapping domains in zebrafish fins**

**a–d**, Expression of *hoxa13b* (**a**, **b**) and *hoxa11b* (**c**, **d**) in zebrafish fins at 60 hpf (**a**, **c**) and 72 hpf (**b**, **d**). Dotted lines indicate the boundary between the endochondral disc and the fin fold. Original magnification, x400.



**Figure 2.S9. Absence of antisense transcription at the *hoxa11a* and *hoxa11b* loci in zebrafish fins**

**a, b**, Whole-mount *in situ* hybridization with probes designed to detect putative antisense transcription at *hoxa11a* (**a**) and *hoxa11b* (**b**). **c–f**, No antisense transcription is detected, whereas expression of *hoxa11a* (**c**), *hoxa11b* (**d**), *hoxa13a* (**e**) and *hoxa13b* (**f**) is observed in zebrafish fins at the same stage. Asterisks correspond to the staining from the fin on the other side of the embryo.

<b>Zebrafish Transient Transgenics</b>	
Construct	% of eGFP positive fish
Tg( <i>HBB:eGFP</i> )	0% (n=74)
Tg( <i>z-Inta11a-eGFP</i> )	0% (n=105)
Tg( <i>z-Inta11b-eGFP</i> )	1.19% (n=84)
Tg( <i>m-Inta11-eGFP</i> )	91.9% (n=123)
Tg( <i>HBB:eGFP; cmlc2:mCherry</i> )	1.25% (n=94)
Tg( <i>z-Inta11a-eGFP; cmlc2:mCherry</i> )	0% (n=200)
Tg( <i>z-Inta11b-eGFP; cmlc2:mCherry</i> )	0% (n=300)
Tg( <i>m-Inta11-eGFP; cmlc2:mCherry</i> )	88.9% (n=53)
<b>Mouse Transient Transgenics</b>	
Construct	% of eGFP positive embryos (# eGFP positive / # genotyped positive)
Tg( <i>z-Inta11a-eGFP</i> )	0% (n=0/10)
Tg( <i>z-Inta11b-eGFP</i> )	0% (n=0/7)

**Table 2.S1. Summary of transient transgenic embryos analysed**

Zebrafish stable lines for Tg(*z-Inta11a-eGFP; cmlc2:mCherry*); Tg(*z-Inta11b-eGFP; cmlc2:mCherry*) were also generated and three genotyped F<sub>1</sub> embryos per line were analysed and confirmed the absence of *gfp* expression. For Tg(*m-Inta11-eGFP; cmlc2:mCherry*), four distinct transgenic lines were also generated and analysed.



## Materials and Methods

No statistical methods were used to predetermine sample size.

### Mouse lines.

*Hoxa11<sup>Neo</sup>*, *Hoxa11<sup>eGFP</sup>*, *Hoxa13null (Hoxa13<sup>Str</sup>)* and *Hoxd13null (Hoxd13<sup>lacZ</sup>)* mouse lines were previously described (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b; Kmita *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2008; Small and Potter, 1993).

*Rosa<sup>Hoxa11</sup>* knock-in allele was constructed as followed: PacI-AscI fragment from pBTG (Addgene plasmid 15037) (Murtaugh *et al.*, 2003) was inserted into the previously described *Rosa26* targeting vector (Soriano, 1999) pROSA26Am1 (Addgene plasmid 15036) (Murtaugh *et al.*, 2003). The mouse *Hoxa11* cDNA was inserted at the SmaI site within the MCS. The vector was linearized by SmaI digest prior electroporation into embryonic stem (ES) cells. After double selection using G418 and DTA negative selection, 96 ES cell clones were analysed by Southern blot for homologous recombination. Two independent clones were injected into blastocysts obtained from C57BL/6J mice, subsequently implanted into pseudo-pregnant females. After germline transmission of the *Rosa<sup>Hoxa11</sup>* allele, mice and embryos were genotyped by Southern blot (a scheme with restriction sites and probes used is presented in Figure 2.S6) and PCR. The following PCR primers were used:

fw\_wt : 5'-GCAATACCTTTCTGGGAGTTCT-3',

rev\_wt : 5'-TCGGGTGAGCATGTCTTTTAATC-3',

rev\_flox : 5'-TTCAATGGCCGATCCCATATT-3',

rev\_del : 5'-AGGTTGGAGGAGTAGGAGTATG-3'.

Wild-type band: 384 bp, flox band: 881 bp, del band: 583 bp. The moderate transcription resulting from the *Rosa26* promoter allowed for *Rosa26<sup>Hoxa11</sup>* expression at a level comparable to the *Hoxa11* gain observed in our series of mutants.

*Hoxa11<sup>ΔInt</sup>* mouse line was generated through pronuclei injection of single-guide RNAs (sgRNAs). We used the CRISPR (<http://crispr.mit.edu/>) platform to design sgRNAs flanking

the region to delete. Complementary strands were annealed, phosphorylated and cloned into the BbsI site of pX330 CRISPR/Cas9 vector (Addgene plasmid 42230) (Cong *et al.*, 2013).

SgInt1\_fw : 5'-CACCGACTCCCCTTTCATAAAGCCC-3';

SgInt1\_rev : 5'-AAACGCGCTTTATGAAAGGGGAGTC-3';

SgInt2\_fw : 5'-CACCGAGCAACAGGCGAGTTTGCGC-3';

SgInt2\_rev : 5'-AAACGCGCAAACCTCGCCTGTTGCTC-3'.

Mice and embryos were genotyped by Southern blot (a scheme with restriction sites and probe used is presented in Figure 2.S2) as well as PCR. The Southern blot probe corresponds to the ScaI-HpaI fragment in the 3' untranslated region (UTR) of the *Hoxa11* gene. Primers used for PCR genotyping :

fw: 5'-GGCCACCTAAGGAAGGAGAG-3';

rev: 5'-GGCTCCGGTGCGTATAAAG-3'.

Three *Prx1-Hoxa11as* transgenic lines were derived from three distinct founders obtained from pronuclear injection of the *Prx1-Hoxa11as* transgene. The *Prx1-Hoxa11as* transgene carries the *Prx1* promoter upstream of the mouse *Hoxa11as* (GenBank: U20367.1 and U20366.1) and the SV40 polyadenylation sequence was inserted downstream *Hoxa11as*. Embryos were genotyped by PCR using DNA from the amniotic membrane and the following pair of primers:

fw : 5'-CTTTCTCTCTGGCTCTGATG-3'

and rev : 5'-GACAAGAACGCCGAGAA-3' (for U20367.1)

or fw : 5'-GTCCGAGGAAAAGGAGGTAG-3'

and rev : 5'-GCTCCTCTAACATGTATTTG-3' (for U20366.1).

All mice were of mixed background (C57BL/6 X 129).

The Tg(*m-Inta11-LacZ*) transgene was generated by subcloning the mouse *Hoxa11* intron upstream of the *Hbb* ( $\beta$ -globin) minimal promoter and a LacZ $\Delta$ CpG NLS reporter. The *H19*

insulator was inserted upstream of the *Hoxa11* intron. Tg(*m-Inta11-LacZ*) embryos were produced by pronuclear injection.

### **Whole-mount *in situ* hybridization, X-gal staining, skeletal preparations and imaging**

For skeletal preparation, newborn mice were processed using the standard alcian blue alizarin red staining protocol (Sheth *et al.*, 2012) ( $n = 10$  for each genotype).

Whole-mount *in situ* hybridizations were performed using previously described protocol (Scotti and Kmita, 2012) and probes (Scotti and Kmita, 2012) (*gfp* (Mattar *et al.*, 2008), *Neo*, *Hoxa11*, *Hoxa13*). Embryos were genotyped prior *in situ* hybridization (no blinding). *Hoxa11as* probes were generated using limb cDNA and the following primers: fw : 5'-AGAGGCGCTGAGGAGCCTTCTC-3'

and rev : 5'-GGCCGCTGTGGACACTAGCATATACC-3' (probe A);

fw : 5'-CCTTCTCGGCGTTCTTGTC-3'

and rev : 5'-GGCATACTCCTACTCCTCCAACCT-3' (probe B).

X-gal staining was performed using standard protocol (Scotti and Kmita, 2012). Embryos were genotyped after X-gal staining (which results in blinding test).

All mouse specimens were imaged using the Leica DFC450C camera. For each experiment, a minimum of three embryos per genotype was used as we considered that reproducible staining/expression patterns with three distinct embryos of the same genotype are significant. The experiments shown were repeated at least twice. We did not use the randomization method.

### **Subcloning of zebrafish *hoxa11a/b* intron and microinjections in zebrafish embryos**

The zebrafish *hoxa11a* (713 bp; gene ID 58061, NCBI) and *hoxa11b* (747bp; gene ID 30382, NCBI) introns were amplified from zebrafish genomic DNA using the following primers:

*hoxa11a* intron Fw : 5'-GAATTCAACAGTAAGTACGAGCTCAAC-3';

and Rev : 5'-GGTACCACCTAAATGTAAATACACGT-3';

*hoxa11b* intron: fw : 5'-GAATTCAGCGGCAGCAGCAGTACGT-3';

and rev : 5'-GGTACCCCGTGTCTTTTGTCCATCTAA-3'.

The zebrafish *hoxa11a* and *hoxa11b* and the mouse *Hoxa11* introns were sub-cloned into the pEGFP-N1 vector (CLONTECH Laboratories, Inc.) in which the CMV promoter upstream of eGFP was replaced with the human *HBB* minimal promoter using the following primers:

Fw :5'-GGATCCCTGGGCATAAAAAGTCAG-3',

Rev :5'-ACCGGTTCTGCTTCTGGAAGGCT-3'.

This vector also contains the Tol2 arms to increase transgenesis efficiency. For screening purposes, a heart marker (*cmlc2:mCherry* (Yelon *et al.*, 1999)) was added to zebrafish Tg(*z-Inta11a-eGFP*) and Tg(*z-Inta11b-eGFP*) constructs. All constructs were microinjected in one-cell stage wild-type zebrafish embryos at a concentration of 100 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  together with 50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  transposase mRNA.

### **Generation of zebrafish transgenic lines**

Primary injected zebrafish (P<sub>1</sub>) are raised until 3 months of age, and then are screened for transgenic progeny (F<sub>1</sub>). P<sub>1</sub> fish are crossed with wild-type fish and the embryos are screened at 2 days post-fertilization (dpf). Owing to lack of fin fold eGFP expression in the Tg(*z-Inta11a-eGFP*; *cmlc2:mCherry*), Tg(*z-Inta11b-eGFP*; *cmlc2:mCherry*) injected fish, embryos were screened for the presence of the *cmlc2:mCherry* heart marker and genotyped to confirm the presence of the *hoxa11a/b intron:eGFP* elements. The following primers were used for genotyping:

*hoxa11a* Fw 5'-GGTACCACCTAAATGTAAATACACGT-3',

and Rev (eGFP) : 5'-GTCCTCCTTGAAGTCGATGC-3';

*hoxa11b* fw : 5'-GGTACCCCGTGTCTTTTGTCCATCTAA-3',

and rev (eGFP) : 5'-GTCCTCCTTGAAGTCGATGC-3'.

Three transgenic lines for Tg(*m-Inta11-eGFP*) were obtained to confirm the expression pattern. A fourth line containing the *cmlc2:mCherry* heart marker was also created. To

confirm the *Hbb* minimal promoter does not drive tissue-specific expression alone, a transgenic line Tg(*HBB:eGFP*; *cmlc2:mCherry*) was also created and genotyped using the following primers:

*Hbb* fw : 5'-GGATCCCTGGGCATAAAAGTCAG-3',

rev (eGFP) : 5'-GTCCTCCTTGAAGTCGATGC-3'.

### **Zebrafish *in situ* hybridization**

*In situ* hybridization on whole-mount embryos was performed as previously described (Thisse and Thisse, 2008). Digoxigenin-labelled antisense RNA probes were generated using the following cDNAs: *hoxa13a* (500 bp; Addgene 36463), *hoxa13b* (700 bp; Addgene 36568), *hoxa11b* (probe 1 (Figure 2.S8c, d); 800 bp; Addgene 36466). For *hoxa11a/b* antisense/sense RNA probes (Figure 2.S9a, b), *hoxa11a* (713 bp; Gene ID 58061, NCBI) and *hoxa11b* (747 bp; gene ID 30382, NCBI) partial cDNAs (exon 1) were obtained by PCR with reverse transcription from total RNA of 24–48 hpf embryos using the following primers:

*hoxa11a* exon 1 fw : 5'-ATGATGGATTTTGACGAAAGGGTT-3',

and rev : 5'-TGTTCCCACCGCTAGTTTTTTCCT-3';

*hoxa11b* exon 1 fw : 5'-ATGATGGATTTTGATGAGCGGGTA-3',

and rev : 5'-TGCTGCTGCCGCTGAATTTATCTT-3'.

For accurate comparison, *hoxa11a* and *hoxa11b* sense and antisense probes, respectively, are identical in length and were transcribed using the same RNA polymerase. *In situ* hybridizations were also performed in parallel with identical staining times.

### **Transfection and gene expression analysis**

293T cells (ATCC) were transfected using lipofactamine. Cells (800,000) were plated in 6-well plates. Cells were checked for mycoplasma contamination using Venor GeM Mycoplasma Detection Kit (MP0025 SIGMA). A total of 2 µg of DNA (250 ng reporter plasmid, 250 ng effector plasmid or empty expression vector), 25ng of mCherry expression vector as internal control and 1.45 µg carrier pBSK plasmid was used for each transfection. All transfections were performed in duplicates. Then, 24 h after transfection, the medium was

changed and 48 h after transfection, cells were processed for RNA extraction. Reporter gene expression was normalized to internal control mCherry ( $n = 3$ ). Gene expression (*Hoxa11*) was measured in dissected E11.5 forelimb buds of the *Rosa<sup>Hoxa11</sup>* knock-in embryos that were stored in RNA later before RNA extraction ( $n = 4$ ).

RNA extraction was done using RNeasy Plus mini kit (Qiagen 74134). cDNA synthesis was performed using M-MuLV reverse transcriptase (NEB) and a mix of random primers and oligo-dT on 1 $\mu$ g of total RNA. Quantitative real-time-PCR was performed with cDNA and the SYBR Green kit (applied biosystems) using the following primers:

*Hoxa11* fw : 5'-AGGAGAAGGAGCGACGG-3'

*Hoxa11* rev : 5'-GGTATTTGGTATAAGGGCAGCG-3';

*Gapdh* fw : 5'-CTTTGTCAAGCTCATTTCTGG-3'

*Gapdh* rev : 5'-TCTTGCTCAGTGCCTTGC-3';

*Tbp* fw : 5'-TTGACCTAAAGACCATTGCACTTC-3'

*Tbp* rev : 5'-TTCTCATGATGACTGCAGCAAA-3';

*mCherry* fw : 5'-GCCTACAACGTCAACATCAAG-3'

*mCherry* rev : 5'-GCGTTCGTAAGTTCAC-3';

*gfp* fw : 5'-GACCCTGAAGTTCATCTGCA-3'

*gfp* rev : 5'-CCGTCGTCCTGAAGAAGA-3'.

### **Study approval**

All mice experiments described in this article were approved by the Animal Care Committee of the Institut de Recherches Cliniques de Montréal (protocols 2011-39 and 2014-14) and zebrafish experiments were approved by uOttawa Animal Care Committee (protocol BL-2317-R1).

## Acknowledgements

We thank Q. Zhu and L. Lian from the IRCM transgenic core facility for the ES cell work and production of transgenic mouse lines. We are particularly grateful to A. Kania for critical reading of the manuscript as well as laboratory members for insightful discussions and sharing reagents. This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (MOP-115127) and the Canada Research Chair program to M.K. (RCHS0192), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (155817-2012) to M.-A.A. and Shriners Hospital Research grant 85400 to H.S.S. Y.K. was supported by a fellowship from the Molecular Biology program of the Université de Montréal and the IRCM fellowship Michel-Bélanger. R.S. was supported by a post-doctoral fellowship from the Canadian Institute for Health Research. D.M.W. and K.M.P. were supported by NIH NIAMS AR061402, with K.M.P. additionally supported by NIH T32 DE007057.

## **CHAPITRE 3**

**HOXA11 ET GLI3 INTÉRAGISSENT POUR  
CONTRÔLER L'EXPRESSION DE *GREM1* ET LE  
NOMBRE DE DOIGTS DANS LES SOURIS *A11KI*.**



## 3.1. Contributions des auteurs

Figure 3.1 : Yacine Kherdjemil

Figure 3.2 : Yacine Kherdjemil, Elias Elhaie, Alexandre Mayran

Figure 3.3. Yacine Kherdjemil, Elias Elhaie

Figure 3.4 : Yacine Kherdjemil, Elias Elhaie, Alexandre Mayran

Figure 3.5 : Yacine Kherdjemil, Mariane Fugulin

Figure 3.S1 : Yacine Kherdjemil

Figure 3.S2 : Yacine Kherdjemil, Alexandre Mayran

Figure 3.S3 : Yacine Kherdjemil, Alexandre Mayran

Figure 3.S4 : Elias Elhaie

Figure 3.S5 : Yacine Kherdjemil

Figure 3.S6 : Yacine Kherdjemil, Alexandre Mayran

Yacine Kherdjemil et Dre Marie Kmita ont conçu le projet et planifié les expériences.

Yacine Kherdjemil, Elias Elhaie et Mariane Fugulin ont réalisé les expériences.

Alexandre Mayran a réalisé l'analyse bioinformatique du RNA-seq et du CHIP-seq.

Yacine Kherdjemil, Alexandre Mayran et Dre Marie Kmita ont analysés les résultats.

Yacine Kherdjemil a fait les figures et écrit le manuscrit.

## 3.2. Résumé

Au cours du développement du membre, la fonction des gènes *Hox* est cruciale à la formation des différents segments le long de l'axe proximo-distal. Alors que les gènes *Hox13* sont requis pour formation de l'autopode, l'expression de *Hoxa11* est restreinte à la partie proximale du bourgeon de membre. Récemment nous avons montré qu'une expression distale de *Hoxa11* dans les souris (lignée *A11KI*) entraîne la formation de membres polydactyles mais le mécanisme moléculaire à l'origine de ce phénotype reste inconnu. Dans cette étude, nous montrons que l'expression distale de *Hoxa11* entraîne une expansion de l'expression de *Grem1* dans la partie antérieure du bourgeon renforçant la boucle SHH-GREM1-FGF requise à la croissance du bourgeon de membre et probablement responsable de l'émergence de la polydactylie. Nous montrons également que la polydactylie du mutant *A11KI* dépend de la fonction de *Gli3*. En effet, alors que les mutants simples pour *A11KI* et *Gli3* (*Xt/Xt*) sont polydactyles, les embryons doubles mutants sont oligodactyles, avec un nombre de doigts variant de 3 à 4 par membre.

### 3.3. Introduction

Dans le bourgeon de membre, le modelage le long de l'axe antéro-postérieur (A-P) (i.e., du pousse à l'annulaire) est contrôlé par la zone d'activité polarisante ou ZPA, un centre organisateur localisé dans la région postérieure du bourgeon de membre. *Sonic Hedgehog* (*Shh*), molécule de signal produite par la ZPA, est essentielle à l'expansion proliférative des cellules du mésenchyme afin de générer un nombre suffisant de cellules formant les condensations cartilagineuses des doigts (Riddle *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 2008). L'inactivation génétique de *Shh* chez la souris cause un phénotype sévère de perte des doigts où seul une condensation cartilagineuse rudimentaire correspondant au doigt le plus antérieur se forme (Chiang *et al.*, 2001). En accord avec cette fonction, une activation ectopique de *Shh* dans la région antérieure du bourgeon entraîne un phénotype de polydactylie préaxiale qui se caractérise par la présence de doigts surnuméraires dans la partie antérieure de l'autopode. *Shh* maintient l'expression des *Fibroblast growth factors* (*Fgfs*), exprimés dans la crête apicale ectodermique (AER), centre de signalisation formé par une ligne de cellules épithéliales à l'extrémité distale du bourgeon de membre. *Shh* induit l'expression de *Gremlin1* (*Grem1*) dans le mésenchyme du bourgeon, qui à son tour antagonise l'action répressive de la signalisation *Bmp* sur les *Fgfs* dans l'AER mettant ainsi en place la boucle SHH-GREM1-FGF nécessaire à la croissance et au modelage du bourgeon de membre (Benazet *et al.*, 2009; Zeller *et al.*, 2009). Un gradient d'activité spatial de la signalisation *Shh*, avec un plus fort niveau dans le mésenchyme postérieur du bourgeon et un plus faible niveau dans la partie antérieure, est absolument requis pour un modelage correct du membre le long de l'axe A-P. Chez les vertébrés, la signalisation *Shh* est médiée par les trois gènes *Gli* (*Gli1*, *Gli2*, *Gli3*). Parmi eux, *Gli3* est celui qui est essentiel pour le développement du membre comme l'illustre le phénotype de polydactylie engendré par la mutation « *Extra-toes* » (*Xt*) chez la souris, correspondant à une perte de fonction totale de *Gli3* (Hui and Joyner, 1993; Schimmang *et al.*, 1992). *Gli3* code pour une molécule bi-fonctionnelle pouvant agir comme activateur (GLI3A) ou comme répresseur (GLI3R). En l'absence de *Shh*, GLI3 est protéolysé, permettant la production de la forme tronquée GLI3R à activité répressive forte. Ainsi un gradient inverse de GLI3R est établi le long de l'axe A-P dans le mésenchyme du bourgeon, avec un niveau

maximal dans la région la plus antérieure (Wang *et al.*, 2000). Les embryons *Xt/Xt* présentent une expression ectopique de *Shh* dans la région antérieure du bourgeon de membre. Cependant, le double mutant *Xt/Xt ; Shh*<sup>-/-</sup> présente le même phénotype de polydactylie que le simple mutant *Gli3*, montrant ainsi que la polydactylie résultant de l'inactivation génétique de *Gli3* est indépendante de *Shh* (Litingtung *et al.*, 2002; te Welscher *et al.*, 2002b). La signalisation *Shh* contrôle le ratio entre GLI3A et GLI3R, requis pour le contrôle du nombre de doigts.

Il a aussi été clairement démontré que les gènes de la famille *Hox* jouent un rôle primordial dans la morphogénèse du membre (Dolle *et al.*, 1993; Fromental-Ramain *et al.*, 1996b; Zakany and Duboule, 1999; Zakany *et al.*, 1997). Lors du développement des membres, les gènes *Hox* sont exprimés en deux phases. Dans le bourgeon précoce, ils sont exprimés selon un patron imbriqué le long de l'axe A-P, avec l'expression des gènes 5' (tardifs) restreinte à la région postérieure du bourgeon. Dans le bourgeon tardif, lors de la seconde phase, les gènes *Hox* des groupes paralogues 9 à 13 deviennent exprimés de façon différentielles le long de l'axe P-D, avec les gènes du groupe 9 exprimés dans la région proximale et les gènes du groupe 13 exprimés dans les structures les plus distales (Zakany and Duboule, 2007). Les analyses génétiques de gain et perte de fonction des gènes *Hox* ont démontré leur impact sur le contrôle du nombre de doigts (Dolle *et al.*, 1993; Fromental-Ramain *et al.*, 1996b; Knezevic *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2006; Zakany and Duboule, 1999, 2007; Zakany *et al.*, 1997). De plus, plusieurs évidences indiquent que les facteurs HOX interagissent génétiquement et physiquement avec GLI3 dans le contrôle du nombre de doigts et le modelage de l'autopode (Chen *et al.*, 2004; Sheth *et al.*, 2007; Sheth *et al.*, 2012; Zakany *et al.*, 2007). Notamment, l'étude des séries alléliques *Xt ; HoxD(del11-13) ; Hoxa13* a permis de montrer que la réduction du dosage des gènes 5' *Hox* dans un fond génétique *Gli3* mutant augmente le nombre de doigts selon un mécanisme de type Turing (Sheth *et al.*, 2012). Chez les tétrapodes, les domaines d'expression de *Hoxa11* et *Hoxa13* sont mutuellement exclusifs (Kherdjemil *et al.*, 2016). *Hoxa11* est exprimé dans le domaine proximal du bourgeon et responsable de la formation du zeugopode, conjointement avec *Hoxd11* (Davis *et al.*, 1995). *Hoxa13* quant à lui, est exprimé dans le domaine distal et responsable de la formation des doigts de l'autopode, conjointement avec *Hoxd13* (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b). Chez les espèces poissons, les domaines d'expression de *hoxa11* et *hoxa13* sont chevauchant dans la partie distale de la

nageoire (Ahn and Ho, 2008; Davis *et al.*, 2007; Kherdjemil *et al.*, 2016; Metscher *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2009; Sordino *et al.*, 1996). Récemment, il a été montré qu'une expression ectopique de *Hoxa11* dans le domaine formant les doigts chez la souris *Prx1Cre* ; *Rosa<sup>Hoxa11/Hoxa11</sup>* (*A11KI*), recréant la régulation de *Hoxa11* de « type poisson », résulte en la formation d'un membre polydactyle (Kherdjemil *et al.*, 2016). Cependant, le mécanisme moléculaire à l'origine de cette polydactylie n'est pas connu.

Dans cette étude, nous montrons que l'expression distale de *Hoxa11* dans le bourgeon de membre des souris *A11KI* entraîne une activation ectopique de la signalisation *Shh*, cependant celle-ci n'est pas responsable du développement de la polydactylie, la réduction du dosage de *Shh* dans le mutant *A11KI* n'empêchant pas son développement. Les souris *A11KI* présentent notamment une perte de l'identité antérieure du bourgeon de membre ainsi qu'une expansion de l'expression de *Grem1* dans le bourgeon antérieur renforçant la boucle SHH-GREM1-FGF requise à la croissance du bourgeon de membre et probablement responsable de l'émergence de la polydactylie dans ces souris. Nous montrons également que la polydactylie du mutant *A11KI* dépend de la fonction de *Gli3*, son absence entraînant une perte de l'expression de *Grem1* dans le bourgeon de membre et le passage d'un membre polydactyle à un membre oligodactyle.

### 3.4. Résultats

#### 3.4.1. L'activation ectopique de la signalisation *Shh* n'est pas responsable de la polydactylie des souris *A11KI*.

L'expression distale de *Hoxa11* dans les souris *A11KI* cause un phénotype de polydactylie postaxial et préaxial (Kherdjemil *et al.*, 2016) (Figure 3.1 A et B). Une activation ectopique de la signalisation *Shh* dans le bourgeon de membre est une des causes principales de polydactylie préaxiale. Afin de vérifier l'implication de la signalisation *Shh* dans la polydactylie médiée par l'expression distale de *Hoxa11*, nous avons procédé à des hybridations *in situ* pour *Shh*. Au jour embryonnaire 10.5 (E10.5), les bourgeons de membres

des embryons *A11KI* présentent, de façon variable, une légère dérégulation du patron d'expression de *Shh* avec une expansion du domaine d'expression vers la partie antérieure distale en comparaison avec les embryons sauvages (WT) (Figure 3.1 C, D et E). À E11.5, une activation ectopique de *Shh* peut être observée dans la région antérieure du bourgeon de membres chez certains embryons *A11KI*, mais il n'y a pas de corrélation systématique entre la polydactylie et une expression ectopique de *Shh* (Figure 3.S1 A-D). En accord avec l'activation ectopique de *Shh*, *Gli1*, une cible transcriptionnelle de *Shh*, est exprimé de façon ectopique dans la partie antérieure du bourgeon de membre des embryons *A11KI* (Figure 3.1 F et G). La présence d'une polydactylie postaxiale et la faible pénétrance des gains de *Shh* dans les embryons *A11KI* rendent peu probable que la signalisation *Shh* soit à l'origine de ce phénotype. Afin de tester si *Shh* joue un rôle, même minime, dans le développement de la polydactylie des souris *A11KI*, nous avons génétiquement réduit le dosage de *Shh* chez le mutant *A11KI* (*Shh*<sup>+/-</sup> ; *A11KI*), en utilisant l'allèle *Shh* mutant. La réduction du dosage de *Shh* chez les embryons *A11KI* entraîne l'absence de signalisation ectopique de *Shh* dans la partie antérieure des bourgeons de membres, comme le confirme l'expression de *Gli1*, une des cibles directes de *Shh* (comparaison Figure 3.S1 E et F et Figure 3.1 F et G). Malgré l'absence de signalisation ectopique de *Shh*, les embryons *Shh*<sup>+/-</sup> ; *A11KI* présentent toujours le même phénotype de polydactylie (Figure 3.1 H et I), indiquant que l'expression ectopique occasionnelle de *Shh* dans le mutant *A11KI* n'est pas la cause principale du phénotype. De plus lors d'une inactivation totale de *Shh* dans les embryons *Shh*<sup>-/-</sup> ; *A11KI*, l'expression distale de *Hoxa11* est capable d'induire la formation d'un doigt supplémentaire avec de multiples phalanges en comparaison avec le simple mutant *Shh*<sup>-/-</sup> (Figure 3.1 J, K, L et M). Ces résultats montrent que l'expression distale de *Hoxa11* chez la souris *A11KI* entraîne une activation ectopique occasionnelle de la signalisation *Shh* fonctionnant en aval de *Hoxa11*. Cependant, la présence de doigts surnuméraires dans le mutant *Shh*<sup>+/-</sup> ; *A11KI* et la capacité à former un doigt additionnel dans le mutant *Shh*<sup>-/-</sup> ; *A11KI* suggèrent que d'autres mécanismes pourraient être impliqués dans la polydactylie des souris *A11KI*.

### 3.4.2. L'expression distale de *Hoxa11* dans le bourgeon de membre des souris *A11KI* est associée à une perte de l'identité antérieure et renforce l'expansion proliférative du bourgeon en contrôlant la boucle SHH-GREM1-FGF

Afin de mieux appréhender les changements d'expression géniques engendrés par le gain distal de *Hoxa11*, nous avons procédé à une analyse plus globale par séquençage à haut débit des ARNs (RNA-seq) dans les bourgeons de membres d'embryons WT et *A11KI*. Cette analyse montre une diminution de l'expression de gènes impliqués dans le développement et l'identité de la région antérieure du bourgeon de membre. Ainsi l'expression des gènes *Iroquois 3 (Irx3)* et *Iroquois 5 (Irx5)*, marqueurs de l'identité antérieure et requis pour le développement du doigt 1 (Li *et al.*, 2014), est diminué dans le bourgeon de membre des embryons *A11KI* (Figure 3.2 A et Figure 3.S3 C et D). De même, le facteur de transcription à homéodomaine LIM *Lhx9* voit son expression diminuer dans le bourgeon *A11KI* (Figure 3.2 A). La fonction de *Lhx9* conjointement avec celle de *Lhx2* est requise pour le modelage de l'autopode et la formation des doigts, sous influence de la signalisation *Fgf* provenant de l'AER (Tzchori *et al.*, 2009). D'autres gènes importants pour le développement de la partie antérieure du bourgeon de membre ont aussi une baisse d'expression chez les embryons *A11KI*. Ainsi *Pax9*, exprimé dans la région antérieure du bourgeon de membre WT voit son expression complètement abolie dans l'autopode du mutant *A11KI* (Figure 3.2 A-D). De façon intéressante, les souris perte de fonction pour le gène *Pax9* présentent un phénotype de polydactylie préaxiale avec une duplication du doigt 1 (Peters *et al.*, 1998). L'expression de *Hoxc5* est diminuée dans le gain de fonction *A11KI* (Figure 3.2 A) alors que l'inactivation des gènes du groupe paralogue 5 (*Hox5*) engendre aussi de la polydactylie (Xu *et al.*, 2013). Enfin, les souris *Alx4* mutantes ont des membres polydactyles (Kuijper *et al.*, 2005) et l'expression du marqueur de l'identité antérieure *Alx4* se trouve diminuée dans les bourgeons de membres *A11KI* (Figure 3.2 A et Figure 3.S3 A). De façon plus générique, les termes associés aux gènes dont l'expression est diminuée dans le bourgeon de membre des embryons *A11KI*, tels que « spécification/modelage de l'axe A-P » et « morphogenèse du système squelettique embryonnaire », sont en accord avec le type de phénotype observé dans les souris *A11KI* (Figure 3.2 E). De plus, nous avons voulu établir l'existence de liens directs entre les gènes

dérégulés et la présence du facteur de transcription HOXA11 au niveau d'éléments régulateurs de ces gènes. Nous avons donc réalisé une immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage à haut débit (ChIP-seq) à l'aide d'un anticorps spécifique contre la protéine HOXA11 (Figure 3.S2 A) dans des bourgeons de membres d'embryons WT à E11.5. De façon générale, les résultats du ChIP-seq pour HOXA11 montrent la présence de 39270 pics (régions liées par HOXA11) dans le génome, avec une liaison préférentielle au niveau des régions intra et inter-géniques et très peu de liaison au niveau des promoteurs (Figure 3.S2 B). De façon intéressante, le Chip-seq montre de la liaison de HOXA11 au niveau de régions potentiellement régulatrices situées à proximité de gènes dont l'expression est dérégulée lors d'une expression distale de *Hoxa11* dans les bourgeons de membres des embryons *A11KI*. Ainsi, la présence de pics HOXA11 à proximité des gènes *Pax9* (Figure 3.2 B), *Irx3* et *Irx5* (Figure 3.S2 B) et dans la région régulatrice identifiée du gène *Alx4* (Kuijper *et al.*, 2005) (Figure 3.S3 A) suggère une régulation directe de leur expression par le facteur de transcription HOXA11. Ces résultats montrent que l'expression distale de *Hoxa11* dans le bourgeon de membre des embryons *A11KI* entraîne une baisse de l'expression de gènes antérieurs, vraisemblablement régulés de façon directe et causant la perte de l'identité antérieure du bourgeon de membre.

Chez les souris présentant un phénotype de polydactylie préaxiale, l'autopode présente une expansion antérieure du domaine d'expression de gènes normalement « postérieur » (Kozhemyakina *et al.*, 2014; Kuijper *et al.*, 2005; Sheth *et al.*, 2007). Ainsi nous avons réalisé des hybridations *in situ* afin d'apprécier les changements spatiaux des domaines d'expression. Dans le bourgeon de membre des embryons *A11KI*, l'expression des gènes *Hand2* (Figure 3.3 B et F), *Grem1* (Figure 3.3 C et G) et *Jag1* (Figure 3.3 D et H) s'étend dans le mésenchyme antérieur du bourgeon en comparaison à l'expression chez le WT. De la même manière, l'expression de *Fgf8* s'étend dans la région antérieure de l'AER des embryons *A11KI* en comparaison à l'expression observée chez le WT (Figure 3.3 A et E). De plus, la région cis-régulatrice de *Grem1*, localisée dans le gène *Formin (Fmn)* (Zuniga *et al.*, 2012; Zuniga *et al.*, 2004) présente de la liaison de HOXA11, suggérant une régulation directe de son expression (Figure 3.5 Q). Ces résultats montrent que HOXA11 dans la partie distale du membre entraîne l'expansion antérieure des domaines d'expression de gènes impliqués dans la croissance du bourgeon de membre.



L'ensemble de ces résultats suggère que lors d'une activation distale, HOXA11 est capable d'entraîner la perte de l'identité antérieure du bourgeon de membre en régulant de façon directe l'expression de gènes responsables de l'identité antérieure. De plus, HOXA11 est capable de contrôler l'expression de *Grem1*, vraisemblablement de façon directe en se liant à sa région régulatrice. Ainsi l'expression distale de *Hoxa11* renforce la boucle SHH-GREM1-FGF nécessaire à l'expansion proliférative des cellules progénitrices du mésenchyme du bourgeon de membre et ce gain d'activité de la boucle SHH-GREM1-FGF est probablement responsable de la polydactylie chez les souris *A11KI*.

### 3.4.3. L'expansion antérieure du domaine d'expression des gènes 5'*HoxD* n'est pas responsable de la polydactylie chez les souris *A11KI*

Les gènes 5'*Hox*, notamment *Hox13*, sont des facteurs essentiels à la formation des doigts de l'autopode (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b). Les nombreuses analyses des pertes et des gains de fonction des gènes 5'*Hox* chez la souris ont montré leur implication dans la formation des doigts mais aussi dans le contrôle du nombre de doigts. De plus, les souris polydactyles présentent de façon systématique une expansion antérieure du domaine d'expression des gènes 5'*HoxD* (Büscher *et al.*, 1997; Kozhemyakina *et al.*, 2014; Kuijper *et al.*, 2005; Sheth *et al.*, 2007). Dans le bourgeon de membre, l'expression des gènes *HoxD* est sous le contrôle d'éléments cis-régulateurs situés de part et d'autre du complexe *HoxD*. L'expression distale des gènes 5'*HoxD* est sous le contrôle des éléments cis-régulateurs, localisés dans le désert de gènes en 5' du complexe (région centromérique) et est responsable de la formation de l'autopode (Andrey *et al.*, 2013; Montavon *et al.*, 2011). Nous avons ainsi procédé à l'analyse par hybridation *in situ* de l'expression des gènes 5'*HoxD* dans les bourgeons de membres des embryons polydactyles *A11KI*. De façon attendue, les bourgeons de membres des embryons *A11KI* présentent une expansion antérieure du domaine d'expression des gènes *Hoxd10* (Figure 3.S4 A et C), *Hoxd11* (Figure 3.4 D et G) et *Hoxd12* (Figure 3.4 C et F) avec une expression ectopique dans le doigt le plus antérieur alors que l'expression de ces gènes est absente du doigt 1 dans embryons WT. De même *Hoxd13*, seul gène 5'*HoxD* à être exprimé dans le doigt 1, présente aussi un domaine d'expression étendu antérieurement dans les

bourgeons des embryons *A11KI* en comparaison à l'expression dans un bourgeon de membre WT (Figure 3.4 B et E et Figure 3.S4 B et D). De plus les éléments régulateurs contrôlant l'expression des gènes *HoxD* dans le bourgeon de membre, à savoir les régions télomériques et centromériques, contiennent plusieurs pics HOXA11. La liaison de HOXA11 dans ces régions cis-régulatrices suggère un contrôle direct de l'expression des gènes 5'*HoxD*. La présence de liaison de HOXA11, à la fois dans les éléments cis-régulateurs télomériques et centromériques laisse présager deux mécanismes d'actions possibles. Ainsi, dans les bourgeons de membres *A11KI*, soit HOXA11 régule l'expression des gènes 5'*HoxD* dans l'autopode par l'intermédiaire des régions régulatrices de la seconde phase (centromériques), soit HOXA11 distal permet un changement du mode de contrôle des gènes 5'*HoxD* en les activant dans l'autopode par l'intermédiaire des régions régulatrices responsables de l'expression proximale, où *Hoxa11* est normalement exprimé dans le bourgeon de membre WT. Afin de déterminer si l'expression ectopique des gènes 5'*HoxD* est impliquée dans le développement de la polydactylie chez les souris *A11KI*. Nous avons génétiquement réduit le dosage des gènes *HoxD* dans le fond génétique *A11KI* en utilisant un allèle où le complexe *HoxD* est entièrement délété. La réduction du dosage des gènes *HoxD* n'empêche pas le développement de la polydactylie chez les souris *A11KI*. En effet, les embryons *A11KI* avec une copie en moins des gènes *HoxD* (*D*<sup>+/-</sup> ; *A11KI*) ou absence totale des gènes *HoxD* (*D*<sup>-/-</sup> ; *A11KI*) présentent toujours un bourgeon de membre polydactyle comme le montre le marquage *Sox9* (Figure 3.4 H, I, J et K). Ces résultats montrent que l'expression distale de *Hoxa11* dans le bourgeon de membre entraîne l'activation ectopique des gènes 5'*HoxD* dans la région antérieure du bourgeon. Cependant l'analyse génétique réduisant le dosage des gènes *HoxD* dans le fond génétique *A11KI* indique que l'expansion du domaine d'expression des gènes 5'*HoxD* n'est pas la cause de la polydactylie chez les souris *A11KI*.

#### 3.4.4. La polydactylie des souris *A11KI* dépend de la fonction de *Gli3*

Les analyses génétiques de gain et perte de fonction des gènes 5'*Hox* d'une part et de *Gli3* d'autre part, ont démontré leur impact sur le contrôle du nombre de doigts chez la souris. De plus, les analyses des mutants gain/perte de fonction de 5'*Hox* et *Gli3* ont montré une

interaction génétique et physique entre ces facteurs (Chen *et al.*, 2004; Dolle *et al.*, 1993; Fromental-Ramain *et al.*, 1996b; Hui and Joyner, 1993; Knezevic *et al.*, 1997; Sheth *et al.*, 2007; Sheth *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2006; Zakany and Duboule, 1999; Zakany *et al.*, 1997). Les bourgeons de membres polydactyles des embryons dont la fonction de *Gli3* est inactivée présentent une expansion antérieure du domaine d'expression des gènes *5'HoxD* et *Hoxa13*, qui a longtemps été considérée comme responsable du phénotype de polydactylie chez ces mutants (Büscher *et al.*, 1997). Cependant la réduction du dosage des gènes *5'Hox* dans un fond génétique *Gli3* mutant résulte en une polydactylie plus sévère, avec la présence de 12 à 13 doigts chez le mutant *Xt/Xt ; HoxD(del11-13/del11-13) ; Hoxa13+/-* (Sheth *et al.*, 2007; Sheth *et al.*, 2012; Zakany *et al.*, 2007). Ces analyses ont conduit à la conclusion que les gènes *5'HoxD* et *Hoxa13* contrôlent le nombre de doigts selon un mécanisme de type Turing (Sheth *et al.*, 2012). Récemment, il a été montré que le contrôle de l'expression des gènes *Hox* dans le membre était soumis à des mécanismes d'auto-régulation, dont un mécanisme de répression de l'expression de *Hoxa11* par les gènes *Hox13* dans la partie distale du bourgeon de membre (Kherdjemil *et al.*, 2016; Sheth *et al.*, 2013a; Woltering *et al.*, 2014). Ainsi les mutants *Xt/Xt ; HoxD(del11-13/del11-13) ; Hoxa13+/-*, où le dosage des gènes *Hox13* est réduit, ont des bourgeon de membre avec une expression distale de *Hoxa11*. La combinaison de ces résultats et de l'observation qu'un gain d'expression distale de *Hoxa11* entraîne le développement d'une polydactylie ouvre la possibilité que plutôt que la réduction du dosage des gènes *5'Hox* en soi, le gain d'expression distale de *Hoxa11* pourrait être la cause principale de l'augmentation du nombre de doigts dans le fond génétique *Gli3* mutant. Par ailleurs, les changements d'expressions des gènes tels que *Pax9*, *Jag1*, *Grem1*, ou même les *5'HoxD*, sont tous des changements observés lors du développement de la polydactylie chez les embryons *Xt/Xt*. Dans le mutant *A11KI* l'expression distale de *Hoxa11* n'entraîne pas de changement d'expression de *Gli3* (Figure 3.S5 A et B) montrant que la polydactylie de ce mutant n'est pas due à une diminution de l'expression de *Gli3*. Nous avons donc décidé de procéder à l'analyse génétique des mutants multiples *Gli3* et *A11KI*. Les embryons mutants *A11KI*, dont une copie de *Gli3* est inactive (*Xt+/- ; A11KI*) présente une polydactylie avec un nombre de doigts similaire au simple mutant *A11KI* comme le montre le marquage *Sox9* (Figure 3.S5 C-J). De façon surprenante, alors que les simples mutants *A11KI* (Figure 3.5 C, D) et *Xt/Xt* (Figure 3.5 E, F) sont polydactyles, le double mutant *Xt/Xt ; A11KI* est

oligodactyle (Figure 3.5 G, H). La réduction du nombre de doigts dans le double mutant *Xt/Xt* ; *A11KI* est toujours observée, néanmoins variable dans sa sévérité (Figure 3.5 K-N). Ces résultats indiquent que la polydactylie dans le mutant *A11KI* dépend de la fonction de *Gli3*. En l'absence de *Gli3*, *Hoxa11* exprimé dans la partie distale du bourgeon de membre semble contrôler de façon négative le développement des doigts résultant en la formation d'un membre oligodactyle.

Le mutant polydactyle *Xt/Xt*, tout comme *A11KI*, présente une expansion antérieure du domaine d'expression de *Grem1* (Figure 3.3 C et G) (Lopez-Rios *et al.*, 2012; Sheth *et al.*, 2007). L'expression de *Grem1* est réprimée par GLI3R dans le bourgeon de membre afin de permettre la chondrogenèse des doigts (Lopez-Rios *et al.*, 2012). GLI3 permet le contrôle de l'expression de *Grem1* de façon directe en se liant à sa région régulatrice (Zuniga *et al.*, 2012). De plus, le double mutant *Xt/Xt* ; *limb deformity* (mutation de la région régulatrice de *Grem1*) est oligodactyle (Zuniga and Zeller, 1999). La similarité de phénotype avec le double mutant *Xt/Xt* ; *A11KI* suggère que l'oligodactylie de ce mutant pourrait résulter d'une diminution de l'expression de *Grem1*. Nous avons donc réalisé des hybridations *in situ* pour le gène *Grem1* dans le double mutant *Xt/Xt* ; *A11KI*. Alors que le domaine *Grem1* est étendu à la partie antérieure du bourgeon de membre des embryons *A11KI* et *Xt/Xt* en comparaison aux embryons contrôles (Figure 3.5 I-N), l'expression de *Grem1* dans le double mutant *Xt/Xt* ; *A11KI* est diminuée de façon importante jusqu'à une absence totale d'expression dans certains bourgeons de membres (Figure 3.5 O et P). Cette variation n'est pas surprenante aux vues de la variation de sévérité de l'oligodactylie observée chez les doubles mutants. De plus, nos résultats de CHIP-seq indiquent que HOXA11 se lie à la région régulatrice de *Grem1* (Figure 3.5 Q), tout comme GLI3 (Zuniga *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que HOXA11 ET GLI3 interagissent dans le contrôle de l'expression de *Grem1* lors de la formation des doigts chez la souris *A11KI*. HOXA11, exprimé distalement, régule de façon positive l'expression de *Grem1* en présence de *Gli3* (Figure 3.5 K et L) conduisant à la polydactylie (Figure 3.5 C et D). En revanche en l'absence de *Gli3*, l'expression distale de *Hoxa11* conduit à une action répressive sur le contrôle de l'expression de *Grem1* (Figure 3.5 O et P), engendrant la formation d'un membre oligodactyle (Figure 3.5 G et H).

## 3.5. Matériels et méthodes

### Lignées de souris

Les lignées de souris suivantes ont été utilisées : *Hoxa11<sup>Neo</sup>* (*A11-KO*) (Small and Potter, 1993), *Rosa<sup>Hoxa11</sup>* (*A11KI*) (Kherdjemil *et al.*, 2016), *HoxDnull* (*D*) (Zakany *et al.*, 2007), *Gli3<sup>XtJ</sup>* (*Xt*) (Hui and Joyner, 1993), *Prx1Cre* (Logan *et al.*, 2002) et *Shhnull* (*Shh*) (Sheth *et al.*, 2013a). Les souris et les embryons sont génoypés par PCR en utilisant l'ADN génomique extrait de biopsies de queue et des sacs vitelins respectivement.

Toutes les expérimentations décrites dans cet article ont été approuvées par le comité des animaux de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (protocole 2014-14).

### Hybridation *in situ* sur embryon entier, préparation squelettique et Imagerie

Pour les préparations de squelettes, les embryons à E16.5 ont été soumis à un protocole standard de coloration au bleu alcian et au rouge alizarin (Kherdjemil *et al.*, 2016).

Les hybridations *in situ* ont été réalisées selon un protocole standard décrit précédemment (Kherdjemil *et al.*, 2016) en utilisant des sondes ARNs décrites précédemment (Kherdjemil *et al.*, 2016; Kmita *et al.*, 2002; Sheth *et al.*, 2007; Sheth *et al.*, 2013b).

### Chip-seq

L'immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée en utilisant des bourgeons de membres à E11.5 issue de souris CD1 (WT) maintenues dans l'animalerie de l'IRCM. La fixation de la chromatine a été réalisée comme précédemment décrit (Iraci *et al.*, 2011; Sheth *et al.*, 2016). La sonication de la chromatine a été réalisée afin d'obtenir des fragments d'une taille moyenne de 100 à 600 paires de bases. 5µg d'anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine HOXA11 (anti souris HOXA11 produit chez le lapin, SAB1304728 Sigma ; Figure 3.S2A) ont été incubés avec une quantité égale de protéine A et G d'Invitrogen (Dynabeads) pendant 6 heures à 4 degrés Celsius. Après incubation avec l'anticorps, la précipitation de la chromatine a été

réalisée comme précédemment décrite (Berlivet *et al.*, 2013; Sheth *et al.*, 2016). L'ADN a ensuite été purifié sur colonnes QIAquick (Qiagen) et la qualité a été contrôlée à l'aide du bioanalyseur Agilent. La librairie pour le Chip-Seq a été préparée par la plateforme de biologie moléculaire de l'IRCM en utilisant la trousse de préparation de librairie Illumina TruSeq suivi par séquençage sur le séquenceur Illumina HiSeq 2000.

### **RNA-seq**

Les bourgeons de membres micro-disséqués à E11.5 d'embryons WT et *A11KI* ont été préservés dans du « RNAlater » (Qiagen) à -80 degrés celsius jusqu'à génotypage. Pour chaque génotype, l'ARN a été extrait de bourgeons de membres issus de deux embryons et en duplicat biologique à l'aide de la trousse « Qiagen RNeasy mini plus » en suivant le protocole. La qualité des ARNs a été analysée à l'aide de la trousse « RNA 6000 Pico » (Agilent 2100 bioanalyzer), suivi par une déplétion des ARNs ribosomiaux en utilisant la trousse « Ribo-Zero Magnetic Gold » (Epicenter). Le séquençage a été réalisé par l'instrument HiSeq 2000.

## **3.6. Discussion**

Dans cette étude, nous avons trouvé que l'expression distale de *Hoxa11*, dans le bourgeon de membre des embryons *A11KI*, entraîne occasionnellement une activation ectopique de *shh*. L'expression ectopique de *Shh* est une des causes principales de polydactylie. Cependant chez la souris *A11KI*, l'expression ectopique de *Shh* est faible et variable, suggérant qu'un autre mécanisme est à l'origine du développement de la polydactylie. De plus, nous avons montré qu'une réduction du dosage *Shh* dans le mutant *A11KI* (*Shh*<sup>+/-</sup> ; *A11KI*) entraîne une absence de signalisation *Shh* ectopique dans le bourgeon de membre. En revanche, ces embryons développent toujours des membres avec une polydactylie préaxiale, démontrant que l'activation ectopique de la signalisation *Shh* n'est pas la cause de la polydactylie. La polydactylie chez les souris *A11KI* est associée à une diminution/perte de l'expression de gènes responsables du développement et de l'identité antérieure du bourgeon de membre, tels

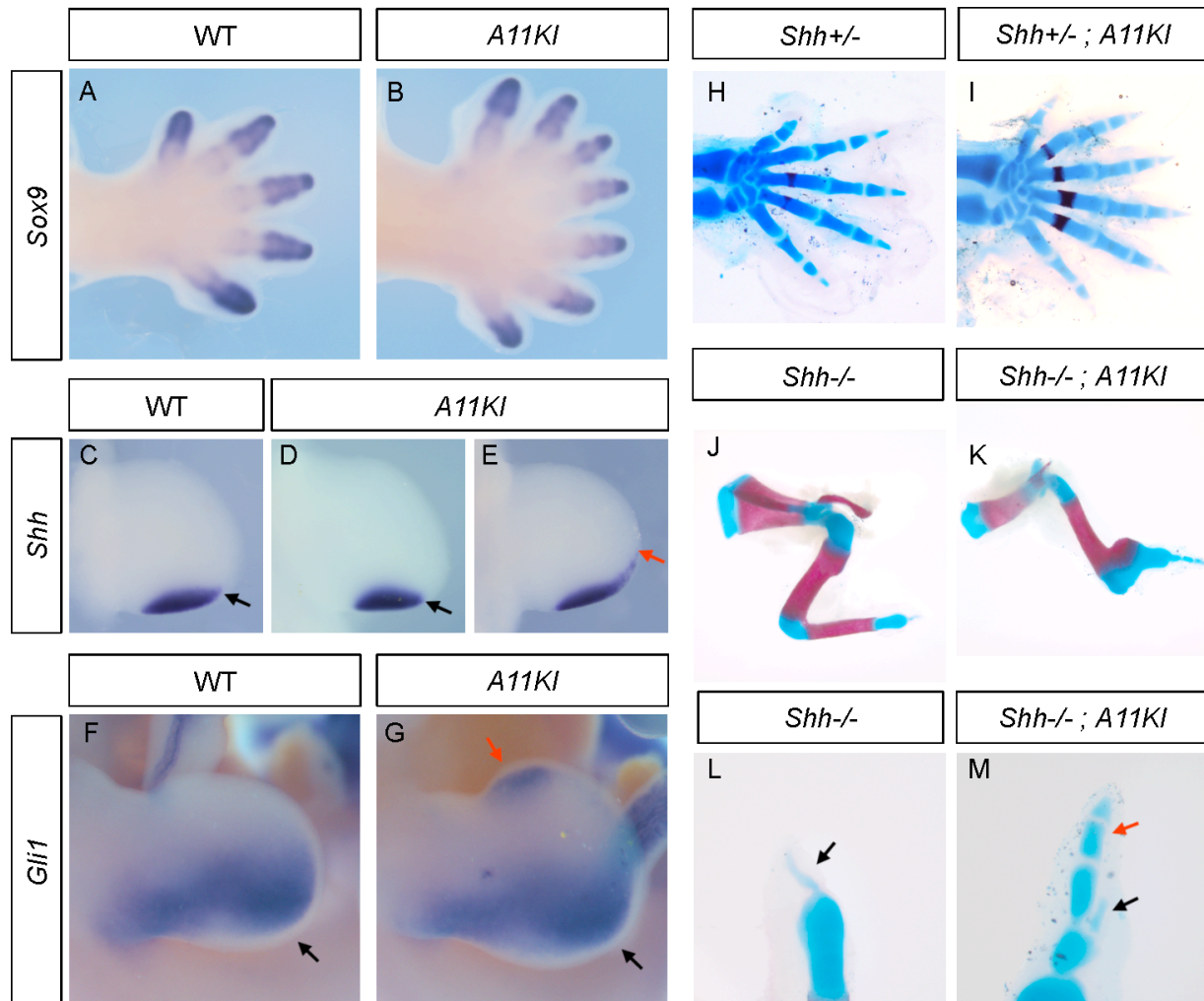
que *Pax9*, *Alx4*, *Irx3* et *Irx5*. Les domaines d'expressions de gènes postérieurs, tels que *Grem1*, *Jag1* ou encore des gènes 5'*HoxD* sont étendus à la région antérieure du bourgeon de membre *A11KI*. L'augmentation de l'expression de *Grem1* dans le bourgeon *A11KI* permet un renforcement de la boucle SHH-GREM1-FGF, en accord avec le gain d'expression de *Fgf8* dans le domaine antérieur de l'AER. Le gain de fonction de *Grem1* entraîne la persistance de la signalisation *Fgf* et le développement de membres polydactyles (Norrie *et al.*, 2014). Ainsi, il est vraisemblable que la polydactylie résultant de l'expression distale de *Hoxa11* soit une conséquence d'un renforcement de la boucle SHH-GREM1-FGF. De plus, la persistance de la polydactylie lors d'une réduction du dosage des gènes *HoxD* chez le mutant *A11KI*, exclue un rôle causal des gènes 5'*HoxD* dans le développement de la polydactylie. Les gènes dont l'expression est altérée dans le mutant *A11KI* sont aussi des gènes dont l'expression nécessite la fonction de *Gli3* et dont l'expression est changée dans le mutant *Xt/Xt*. Ainsi l'analyse des mutants multiples *Xt/Xt ; A11KI* nous a permis de montrer que la polydactylie des souris *A11KI* nécessite la fonction de *Gli3*. En effet alors que les simples mutants *Xt/Xt* ou *A11KI* sont polydactyles, les doubles mutants *Xt/Xt ; A11KI* possèdent des membres oligodactyles, avec un nombre de doigts inférieur à 5. La formation d'un membre oligodactyle dans le double mutant *Xt/Xt ; A11KI* est accompagnée d'une baisse d'expression de *Grem1* dans le bourgeon de membre. *Grem1* étant nécessaire à la croissance du bourgeon de membre et à la formation des doigts, cette perte d'expression de *Grem1* est vraisemblablement la cause de la formation d'un membre oligodactyle dans les souris *Xt/Xt ; A11KI*. GLI3 régule l'expression de *Grem1* dans le bourgeon de membre en se liant à sa région régulatrice (Lopez-Rios *et al.*, 2012; Zuniga *et al.*, 2012). Nous avons montré que HOXA11 se lie aussi à la région régulatrice de *Grem1*, suggérant une action directe sur le contrôle de l'expression de *Grem1*. Nos résultats semblent indiquer que l'expression distale de *Hoxa11* pourrait avoir d'une part une action positive sur l'expression de *Grem1* dans les embryons *A11KI* et une action répressive sur l'expression de *Grem1* en absence de la fonction de *Gli3* dans les embryons *Xt/Xt ; A11KI*. De façon intéressante, il a été montré que dans un contexte de gain de fonction, HOXD12 était capable d'interagir physiquement avec GLI3R, changeant sa fonction répressive sur les cibles de *Shh* en fonction activatrice (Chen *et al.*, 2004). Il est donc possible que HOXA11 interagisse avec GLI3R, régulant positivement les cibles de *Shh* en présence de GLI3R dans le domaine antérieur des membres *A11KI*. Cette possibilité est en accord avec l'expansion de

*Grem1* dans le domaine antérieur des membres *AI1KI*. Alternativement, il a été montré que les mammifères tels que les bovins ou les porcins, ont subi des changements dans la régulation de la signalisation *Shh*. En effet, il a été suggéré qu'un changement dans la régulation du gène *Patched1* (*Ptch1*), récepteur de SHH, serait à l'origine de la réduction du nombre de doigts dans ces espèces (Cooper *et al.*, 2014; Lopez-Rios *et al.*, 2014). De façon intéressante, un élément cis-régulateur de *Ptch1*, identifié comme l'élément responsable du changement de sa régulation chez le bovin, montre une co-liaison des protéines HOXA11 et de GLI3 (Figure 3.S6 A). Par conséquent, l'oligodactylie des souris *Xt/Xt ; AI1KI* pourrait être le résultat d'une action répressive de HOXA11 sur *Ptch1* en l'absence de *Gli3*, résultant en la perte de réponse à la signalisation *Shh* et donc à une réduction du nombre de doigts, similaire à l'oligodactylie des bovidés. Il est aussi possible que HOXA11 réprime de façon combinée l'expression de *Grem1* et de *Ptch1* en agissant sur leurs éléments cis-régulateurs. L'analyse par ChIP-seq des marqueurs d'activation (H3K27Ac) et de répression (H3K27me3) de la chromatine au niveau de ces régions cis-régulatrices dans les mutants *Xt/Xt ; AI1KI* nous permettra de tester cette hypothèse.

### 3.7. Remerciements

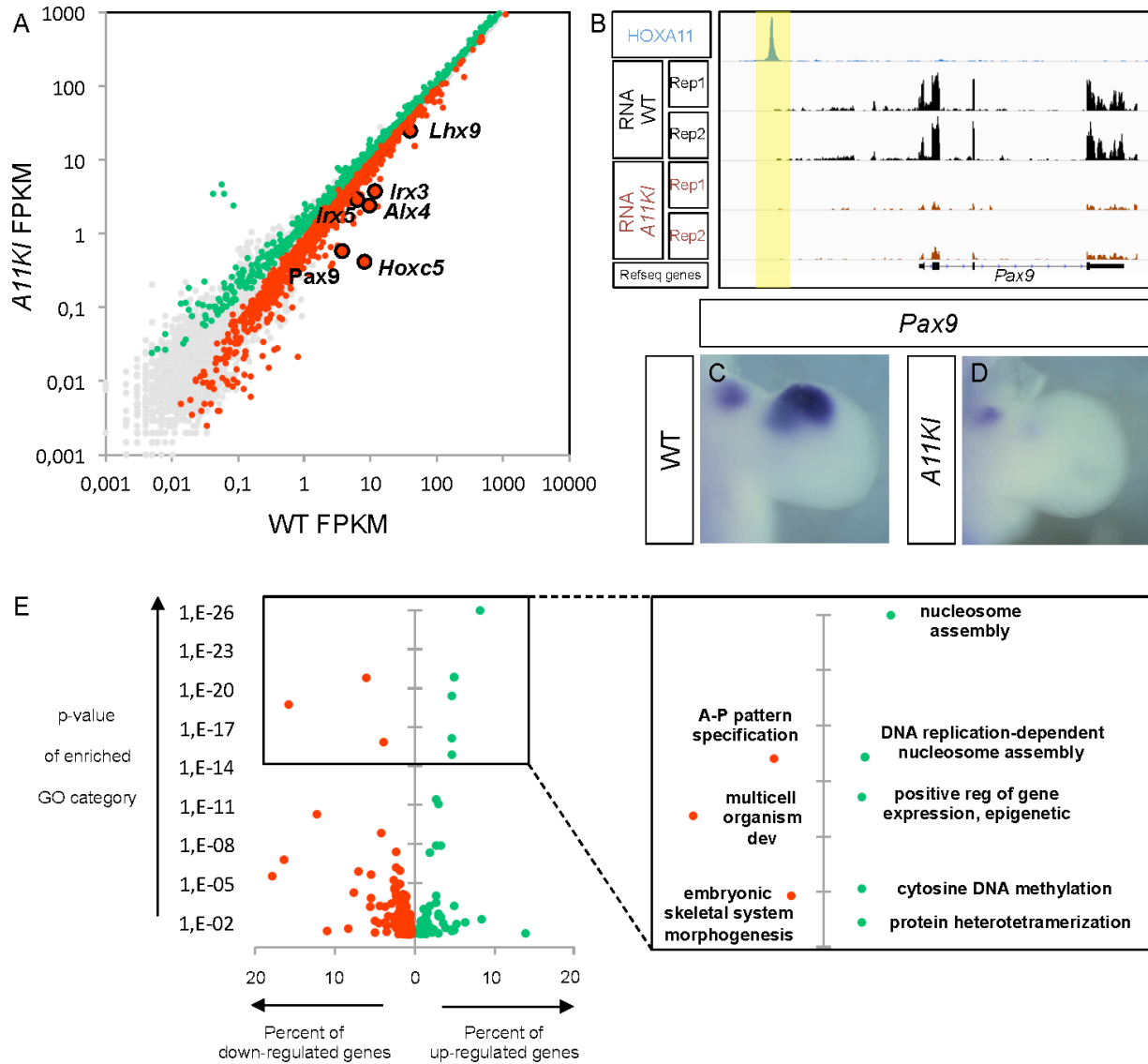
Nous remercions Jessica Barthe pour la gestion de lignées de souris ainsi que Odile Neyret de la plateforme de biologie moléculaire. Ce travail a été supporté par les fonds de recherche attribués à MK par l'institut de recherche en santé du Canada (IRSC, MOP-115127 et 126110). YK a été supporté par une bourse des programmes de biologie moléculaire de l'Université de Montréal et la bourse « Michel Bélanger » de l'IRCM.





**Figure 3.1. L'activation ectopique de la signalisation *Shh* n'est pas responsable de la polydactylie des souris *A11KI***

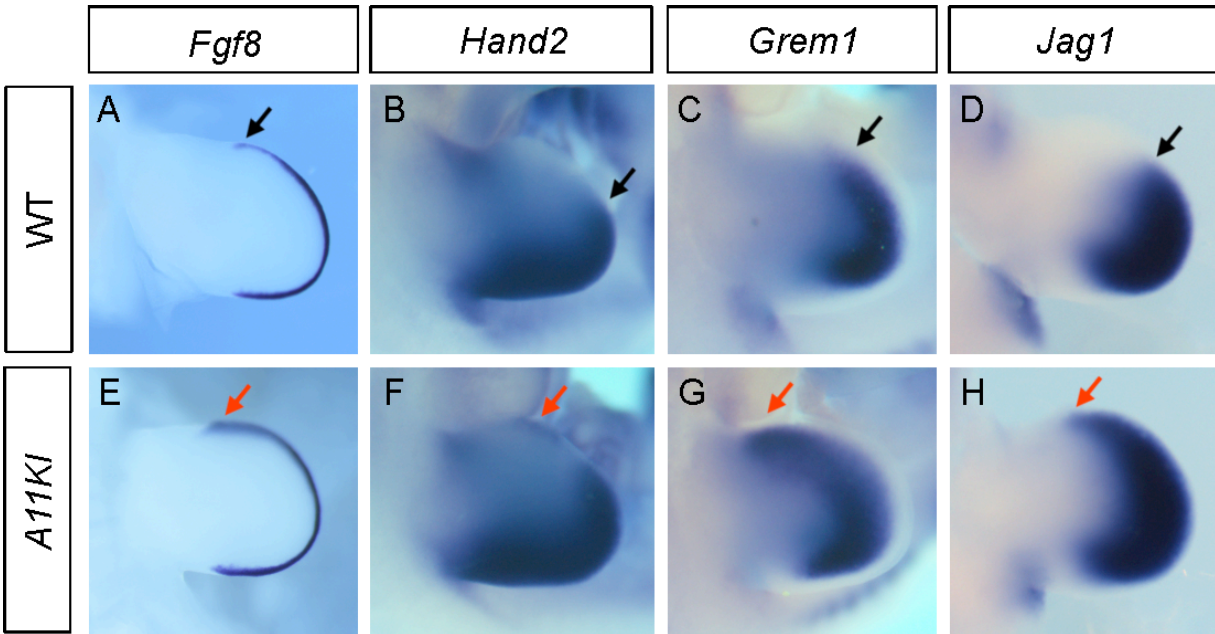
Expression de *Sox9* dans un bourgeon de membre WT (A) et *A11KI* (B) au stade embryonnaire (E) 13.5. Expression de *Shh* dans un bourgeon de membre WT (C) et *A11KI* (D, E) à E10.5. Expression de *Gli1* dans un bourgeon de membre WT (F) et *A11KI* (G) à E11.5. Squelette de l'autopode d'un embryon *Shh*<sup>+/-</sup> (H) et *Shh*<sup>+/-</sup> ; *A11KI* (I) à E16.5. Squelette du membre d'un embryon *Shh*<sup>-/-</sup> (J, L) et *Shh*<sup>-/-</sup> ; *A11KI* (K, M). Agrandissement de la partie distale du membre des embryons *Shh*<sup>-/-</sup> (L) et *Shh*<sup>-/-</sup> ; *A11KI* (M) en vue vue antérieure.



**Figure 3.2. L'expression distale de *Hoxa11* dans le bourgeon de membre des souris *A11KI* est associée à une perte de l'identité antérieure**

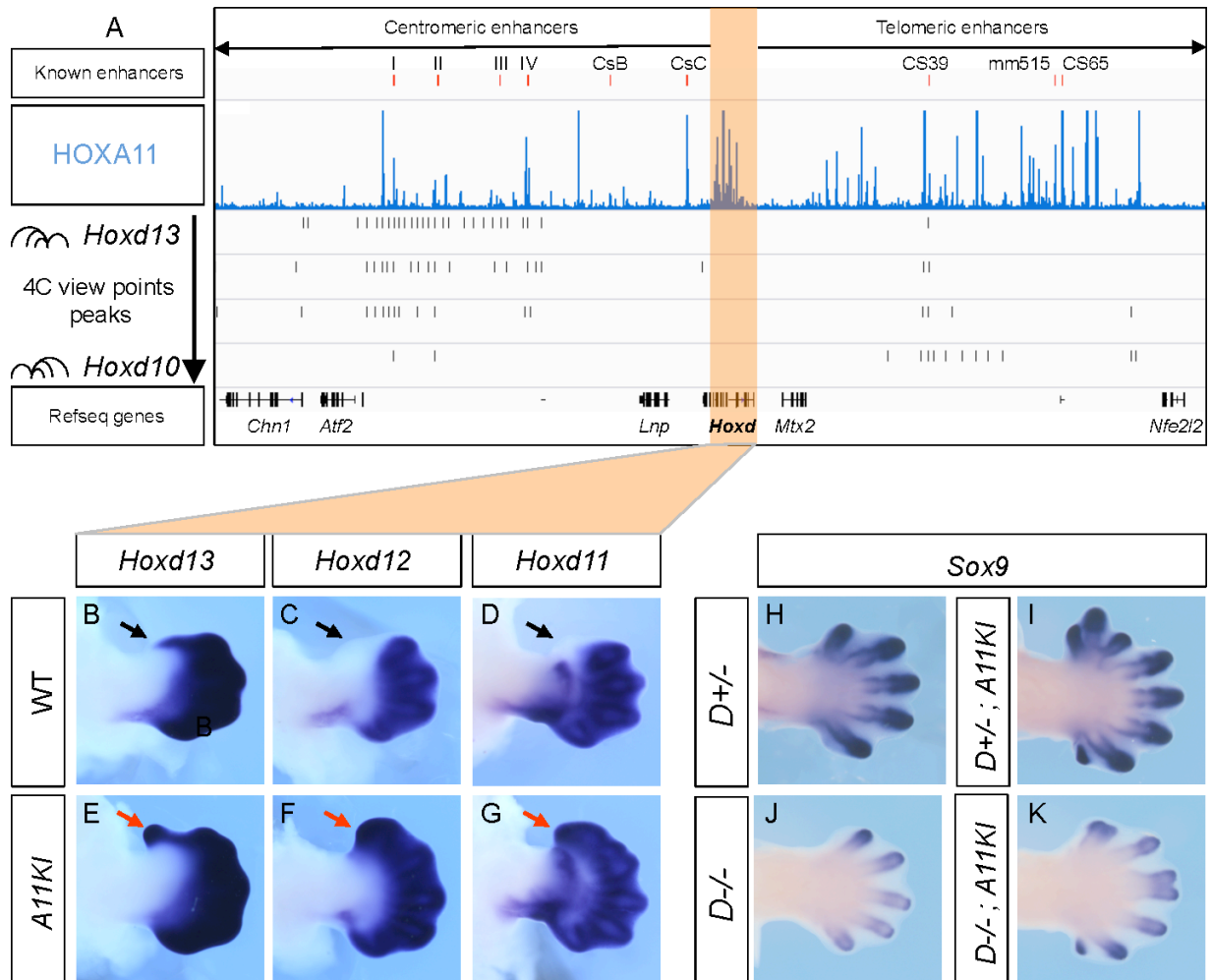
Représentation en diagramme de point de l'expression différentielle des gènes (FPKM), issue des données du RNA-seq dans des bourgeons de membres WT et *A11KI* à E11.5. Les points rouges représentent les gènes dont l'expression est diminuée ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ). Les points verts représentent les gènes dont l'expression est augmentée ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ). Les points gris représentent les gènes dont l'expression n'est pas changée ( $p\text{-value} \geq 0,05$ ) (A). Capture d'écran « Integrative Genomics Viewer » du locus *Pax9* montrant l'expression du gène dans

des bourgeons de membres WT et *AllKI* (RNA-seq) et la liaison de HOXA11 en amont du gène *Pax9* (ChIP-seq) (**B**). Expression de *Pax9* dans un bourgeon de membre WT (**C**) et *AllKI* (**D**). Représentation en diagramme de points des termes associés aux gènes dont l'expression est diminuée (pvalue  $\leq 0,05$  ; rouge) et augmentée (pvalue  $\leq 0,05$  ; vert) (**E**).



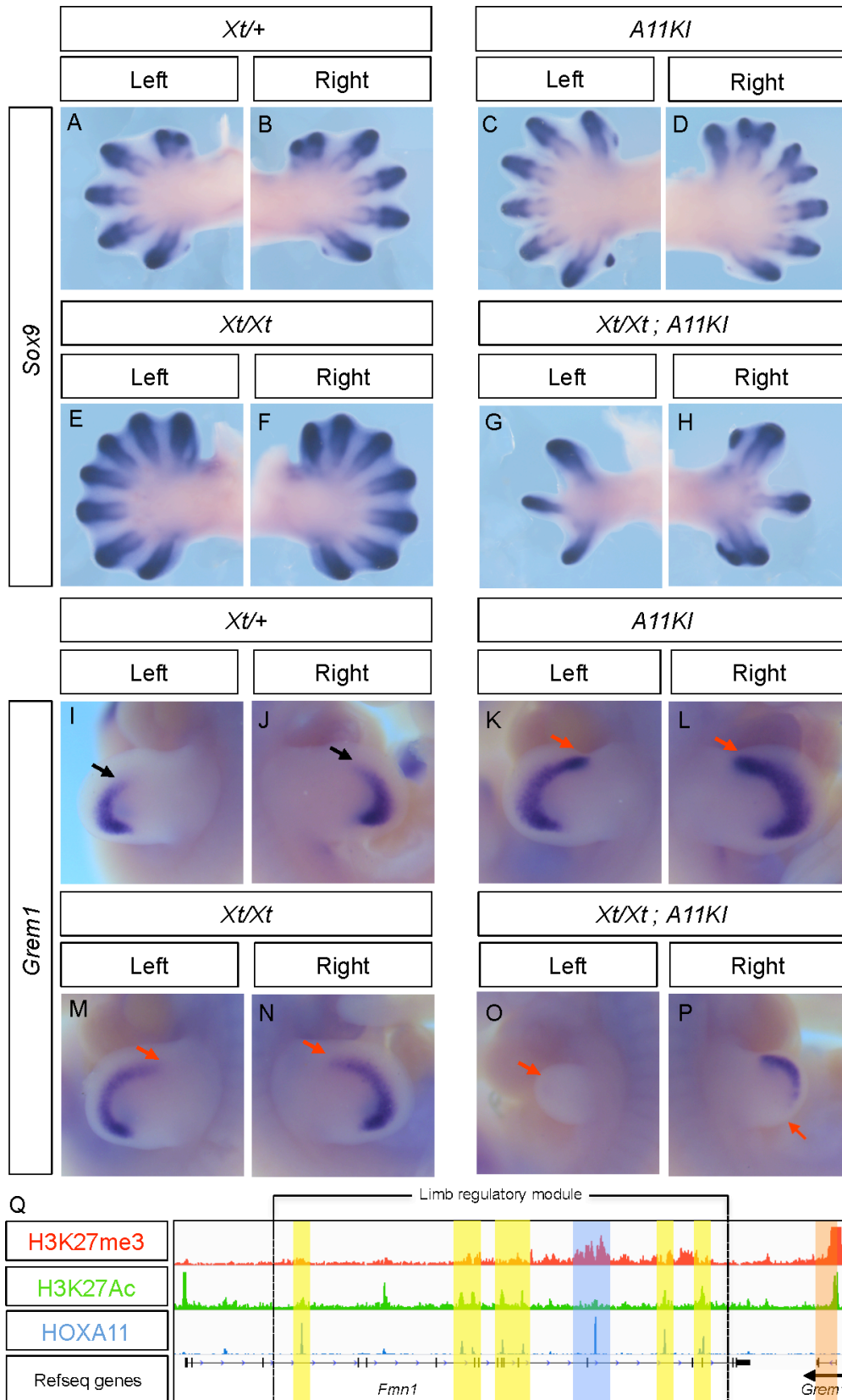
**Figure 3.3. L'expression distale de *Hoxa11* dans le bourgeon de membre des souris *A11KI* renforce l'expansion proliférative du bourgeon en contrôlant la boucle SHH-GREM1-FGF**

Expression de *Fgf8* (A, E), *Hand2* (B, F), *Grem1* (C, G) et *Jag1* (D, H) dans des bourgeons de membres WT (A-D) et *A11KI* (E-H).



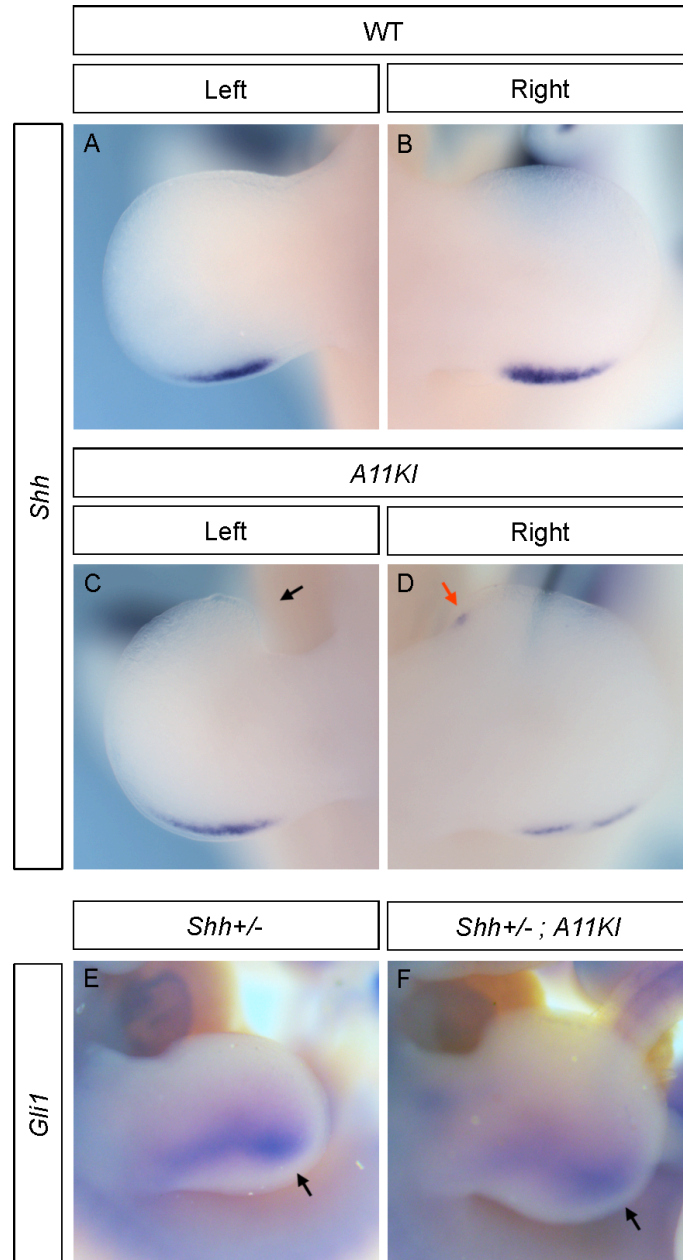
**Figure 3.4. L'expansion antérieure du domaine d'expression des gènes 5'*HoxD* n'est pas responsable de la polydactylie chez les souris *A11KI***

Capture d'écran « Integrative Genomics Viewer » du locus *HoxD*. Noter la liaison de HOXA11 au niveau des régions cis-régulatrices localisées en 5' et 3' du locus faisant contact avec les promoteurs des gènes *Hoxd10* à *Hoxd13* (A). Expression de *Hoxd11* (B, E), *Hoxd12* (C, F) et *Hoxd13* (D, G) dans des bourgeons de membres WT (B-D) et *A11KI* (E-G) à E12.5. Expression de *Sox9* dans des bourgeons de membres D+/- (H), D+/- ; *A11KI* (I), D-/- (J) et D-/- ; *A11KI* (K) à E13.5.



**Figure 3.5. La polydactylie des souris *A11KI* dépend de la fonction de *Gli3***

Expression de *Sox9* dans les bourgeons de membres *Xt/+* (**A, B**), *A11KI* (**C, D**), *Xt/Xt* (**E, F**), *Xt/Xt ; A11KI* (**G, H**) à E13.5. Expression de *Grem1* dans les bourgeons de membres *Xt/+* (**I, J**), *A11KI* (**K, L**), *Xt/Xt* (**M, N**), *Xt/Xt ; A11KI* (**O, P**) à E11.5. Capture d'écran « Integrative Genomics Viewer » du locus *Grem1* montrant la liaison de HOXA11 colocalisant avec des marques actives (H3K27Ac) et répressive (H3K27me3) de chromatine dans sa région cis-régulatrice, localisée dans le gène *Fmn1* (ChIP-seq) (**Q**).

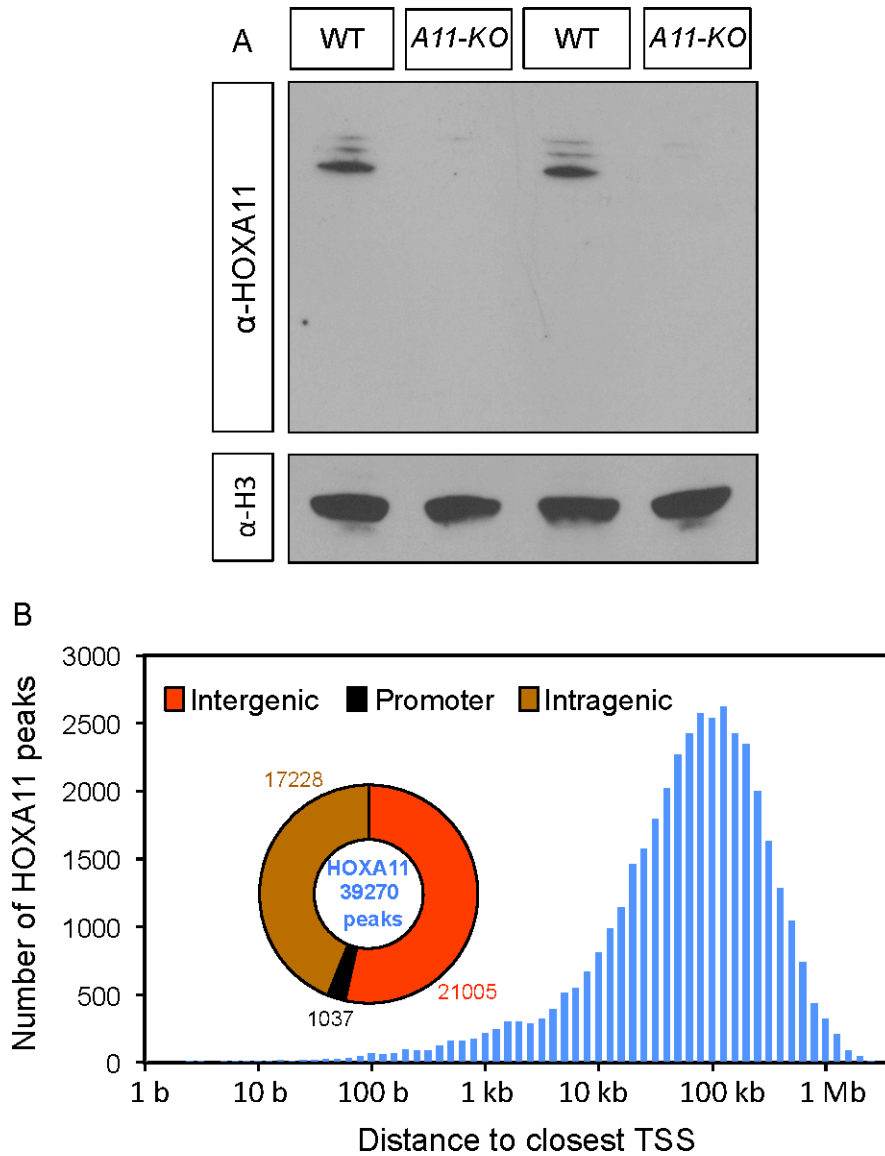


**Figure 3.S1. La signalisation *Shh* dans les bourgeons de membres des souris *A11KI***

Expression de *Shh* dans les bourgeons de membres WT (A, B) et *A11KI* (C, D) à E11.5.

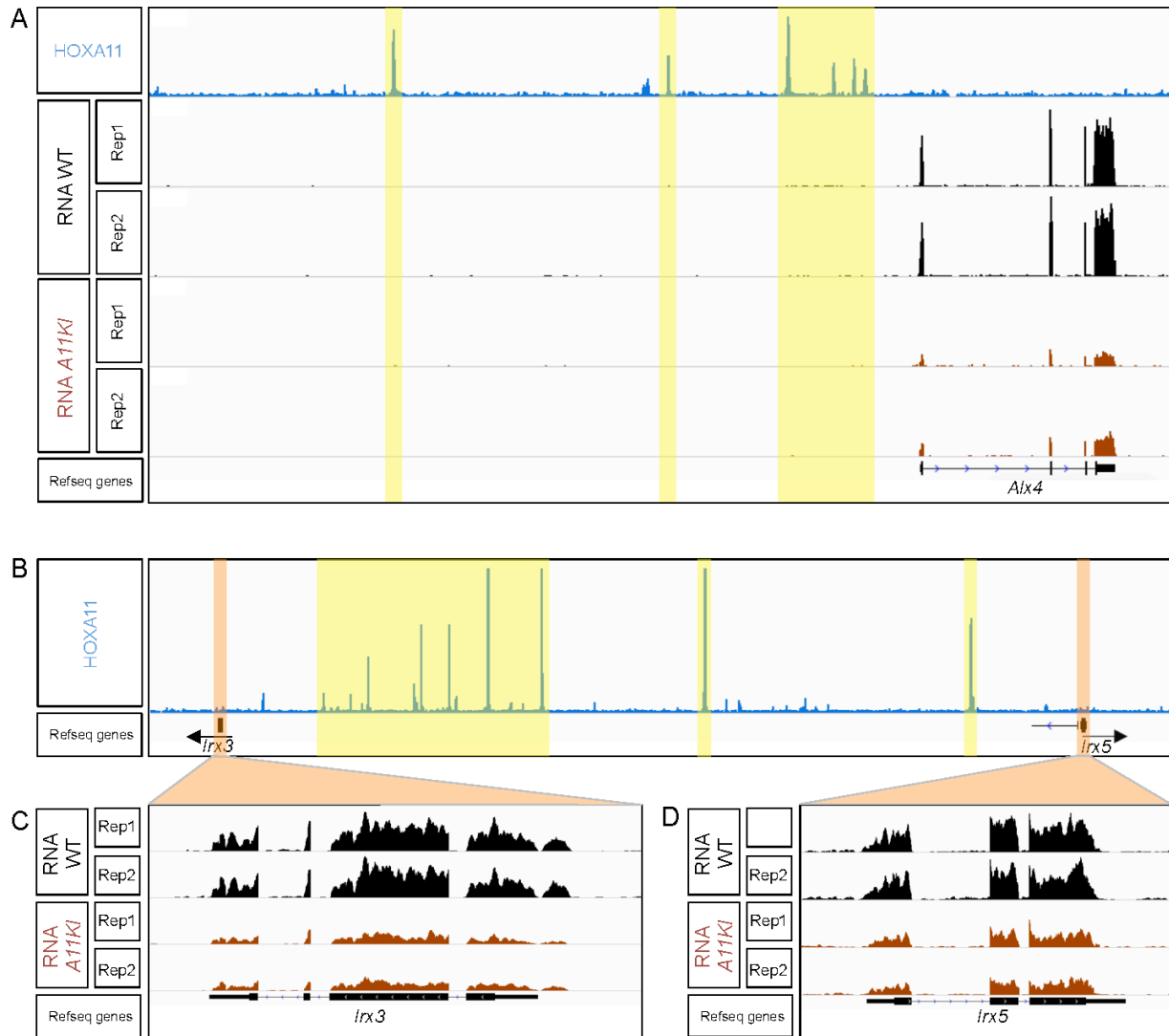
Expression de *Gli1* dans les bourgeons de membres *Shh*<sup>+/-</sup> (E) et *Shh*<sup>+/-</sup> ; *A11KI* (F).





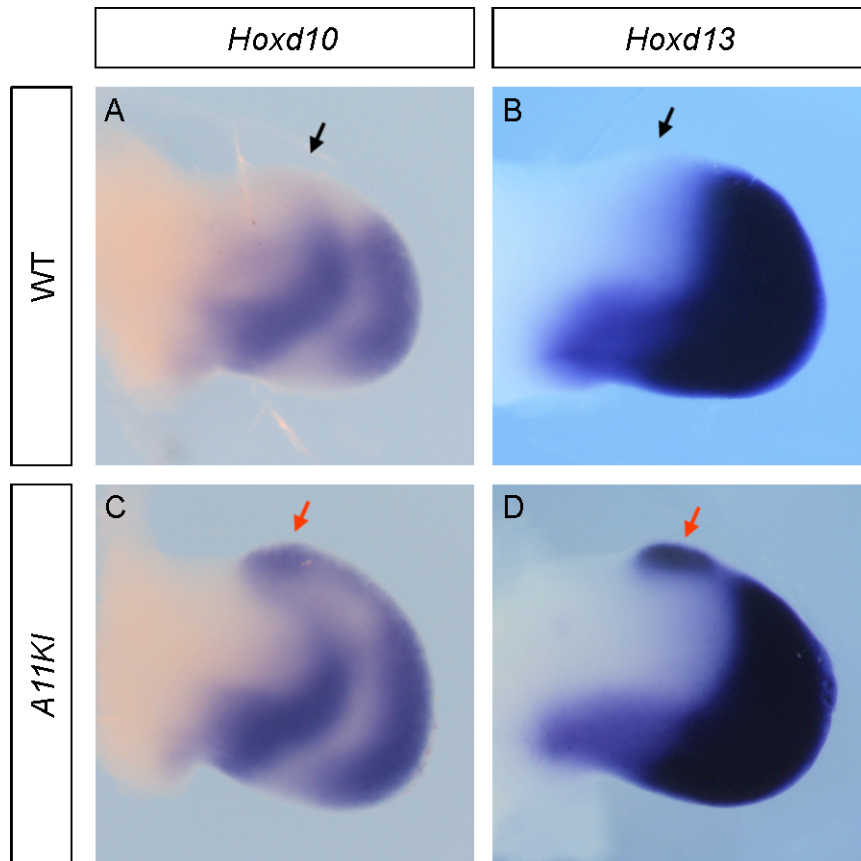
**Figure 3.S2. Validation de la spécificité de l'anticorps anti-HOXA11 pour le Chip-Seq**

Western blot réalisé avec l'anticorps anti-HOXA11 sur des extraits nucléaires de bourgeons de membres WT et *A11-KO* à E11.5 (A). Distribution des pics HOXA11 du ChIP-seq réalisé avec des bourgeons de membres WT à E11.5 (B).



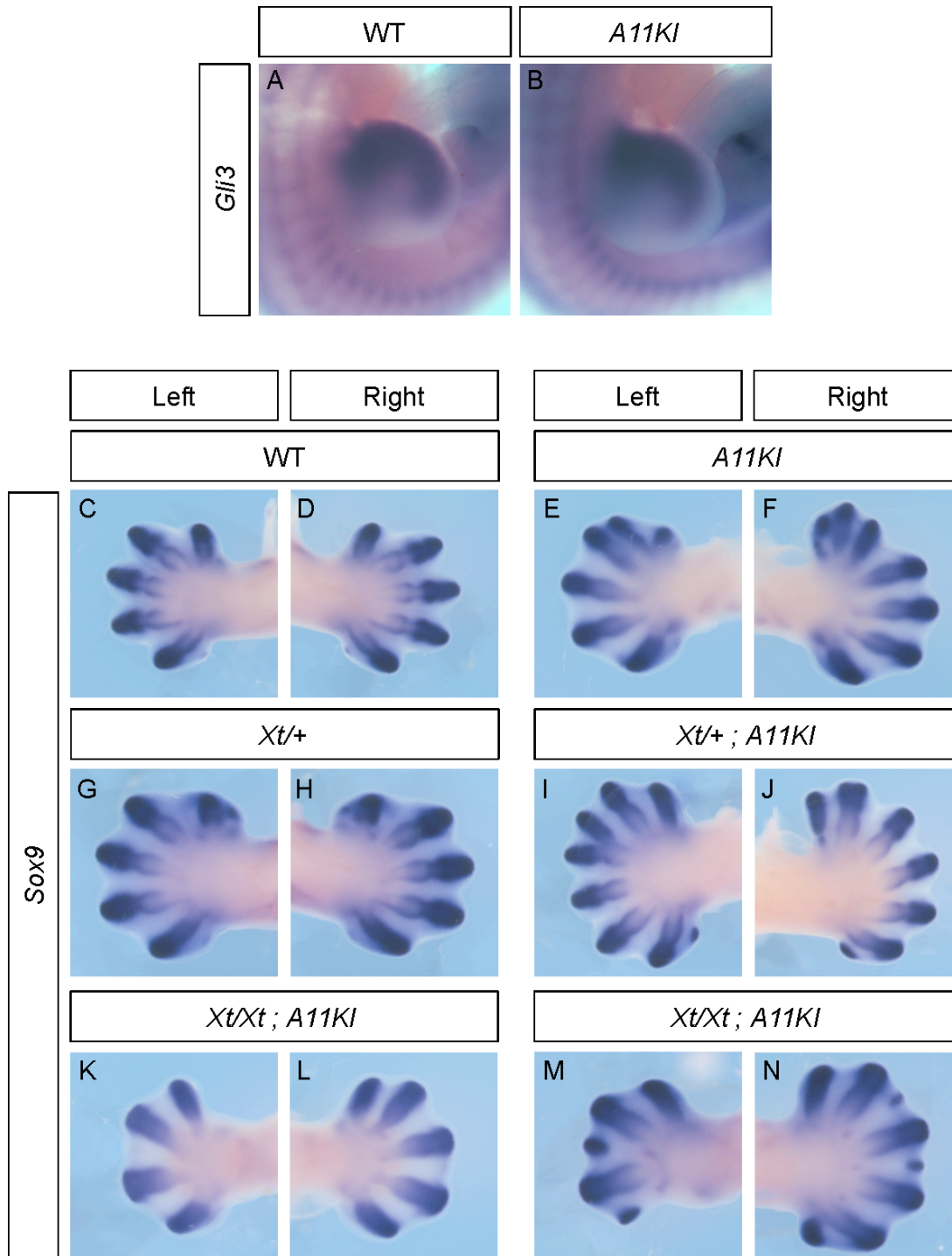
**Figure 3.S3. L'expression distale de *Hoxa11* dans le bourgeon de membre des souris *A11KI* est associée à une perte de l'identité antérieure**

Capture d'écran « Integrative Genomics Viewer » du locus *Alx4* montrant l'expression du gène dans des bourgeons de membres WT et *A11KI* (RNA-seq) et la liaison de HOXA11 en amont du gène *Alx4* (ChIP-seq) (A). Capture d'écran « Integrative Genomics Viewer » du locus *Irx3* et *Irx5* montrant la liaison de HOXA11 en amont des gènes (ChIP-seq) (B) et l'expression des gènes *Irx3* (C) et *Irx5* (D) dans des bourgeons de membres WT et *A11KI* (RNA-seq).



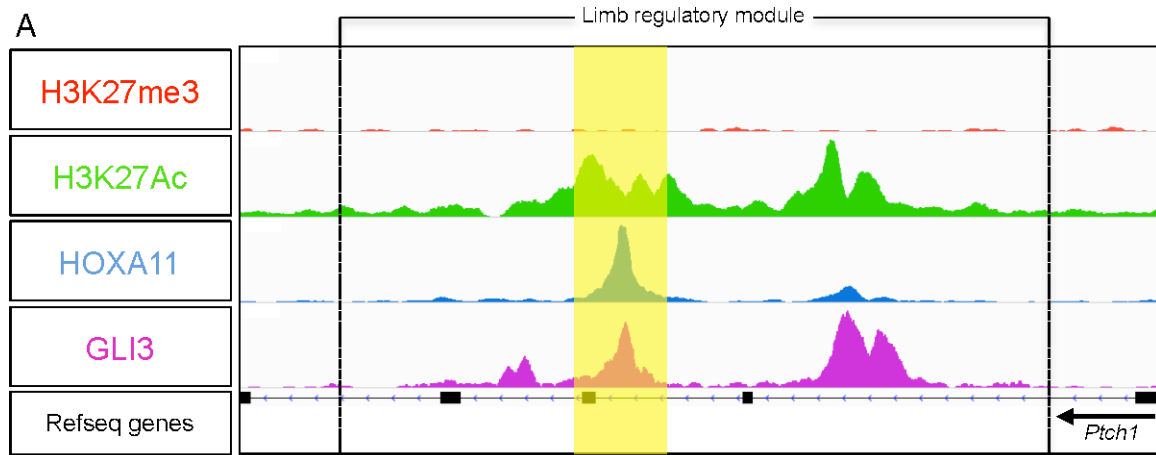
**Figure 3.S4. L'expression distale de *Hoxa11* dans le bourgeon de membre des souris *A11KI* est associée à expansion antérieure du domaine d'expression des gènes 5'*HoxD***

Expression de *Hoxd10* (A, C), et *Hoxd13* (B, D) dans des bourgeons de membres WT (A-B) et *A11KI* (C-D) à E11.5.



**Figure 3.S5. La polydactylie des souris *A11KI* dépend de la fonction de *Gli3***

Expression de *Gli3* dans les bourgeons de membres WT (A) et *A11KI* (B) à E11.5. Expression de *Sox9* dans des bourgeons de membres WT (C, D), *A11KI* (E, F), *Xt/+* (G, H), *Xt/+ ; A11KI* (I, J) et *Xt/Xt ; A11KI* (K-N) à E13.5.



**Figure 3.S6. La liaison de HOXA11 et GLI3 colocalisent dans la région régulatrice de *Ptch1***

Capture d'écran « Integrative Genomics Viewer » du locus *Ptch1* montrant la liaison de HOXA11 et de GLI3 colocalisant avec des marques actives de chromatine (H3K27Ac) dans sa région cis-régulatrice (ChIP-seq) (A).

## **CHAPITRE 4**

## **DISCUSSION**

## 4.1. L'évolution de la régulation de *Hoxa11* chez les vertébrés et la pentadactylie

Au cours de l'évolution, la transition de la nageoire au membre fût l'une des adaptations morphologiques cruciales lors du passage d'un mode de vie aquatique à un mode de vie terrestre. Alors que la grande majorité des espèces actuelles possèdent des membres pentadactyles, les données fossiles nous indiquent que les premiers tétrapodes étaient polydactyles (Coates and Clack, 1990; Coates *et al.*, 2002; Wagner and Chiu, 2001). Dans le chapitre 2, nous avons montré qu'un changement dans la régulation du gène *Hoxa11* au cours de l'évolution des vertébrés a vraisemblablement joué un rôle dans l'acquisition/stabilisation du stade pentadactyle chez les tétrapodes (Kherdjemil *et al.*, 2016).

Chez le poisson zèbre, les gènes *hoxa11* et *hoxa13* sont exprimés dans des domaines chevauchants dans la nageoire (Ahn and Ho, 2008; Kherdjemil *et al.*, 2016; Sordino *et al.*, 1996). En revanche, chez la souris, les domaines d'expression de *Hoxa11* et *Hoxa13* sont mutuellement exclusifs dans le bourgeon de membre. *Hoxa11* est exprimé dans la partie proximale du bourgeon de membre (futur zeugopode) alors que *Hoxa13* est exprimé dans la partie la plus distale (futur autopode). Nous avons montré que l'absence d'expression distale de *Hoxa11* dans le bourgeon de membre est due à la présence d'une région régulatrice localisée dans l'intron de *Hoxa11*. Sous le contrôle des protéines HOXA13 et HOXD13, cette région régulatrice entraîne la transcription d'ARNs antisense empêchant ainsi la transcription de *Hoxa11* dans l'autopode. De plus nous avons montré que cette région régulatrice est absente chez le poisson zèbre, indiquant que son émergence a eu lieu lors de la transition de la nageoire au membre. Nous avons procédé à la délétion de cette région régulatrice chez la souris et observé une expansion distale du domaine d'expression de *Hoxa11* dans le bourgeon de membre. Nous avons aussi montré que l'expression de *Hoxa11* dans le domaine d'expression de *Hoxa13* engendre la formation d'un membre polydactyle chez la souris. Ainsi, nos résultats indiquent que l'émergence d'une région régulatrice dans l'intron de *Hoxa11*, au cours de l'évolution, a permis la restriction du domaine d'expression de *Hoxa11* à la région proximale du membre via un mécanisme de répression impliquant les protéines HOX13 et la

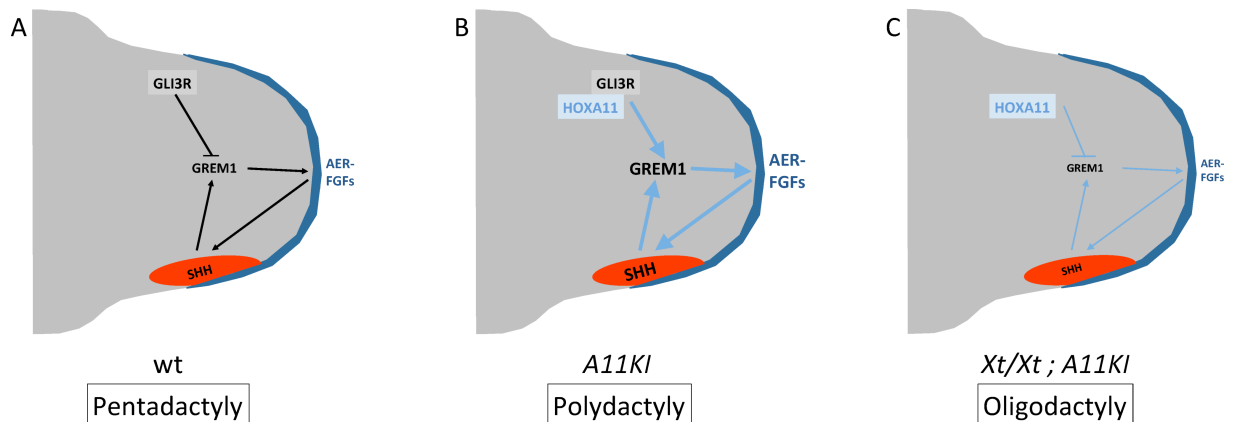
transcription antisense. De plus, basé sur le phénotype de polydactylie observé après expression de *Hoxa11* dans la région distale du bourgeon de membre, nos résultats suggèrent que l'évolution de la régulation de *Hoxa11* (ayant entraîné la séparation des domaines d'expression de *Hoxa11* et *Hoxa13*) a contribué à la transition des membres polydactyles des premiers tétrapodes aux membres pentadactyles des espèces actuelles (Kherdjemil *et al.*, 2016).

## **4.2. Interaction entre HOXA11 et GLI3 : de la polydactylie à l'oligodactylie**

Dans le chapitre 3, nous avons étudié les causes moléculaires du développement de la polydactylie résultant de l'expression distale de *Hoxa11* chez les souris *A11KI*. La polydactylie est souvent engendrée par l'expression ectopique de *Shh* dans la partie antérieure du bourgeon de membre. En revanche, nos résultats suggèrent que l'activation ectopique de *Shh* dans le bourgeon de membre des souris *A11KI* est une conséquence du développement de la polydactylie et non la cause. L'analyse du transcriptome des membres *A11KI* indique que l'expression distale de *Hoxa11* a pour conséquence une diminution de l'expression des gènes donnant l'identité antérieure au bourgeon de membre ainsi qu'une antériorisation de l'expression de gènes « postérieurs ». Par ailleurs, nous avons montré que HOXA11 se lie à la région régulatrice de *Grem1*, gène dont l'expression est essentielle à la croissance du membre et la formation des doigts (Benazet *et al.*, 2009; Zuniga and Zeller, 1999). Nos résultats indiquent que l'expression distale de *Hoxa11* a pour conséquence un renforcement de la boucle SHH-GREM1-FGF qui est probablement la cause de la polydactylie des souris *A11KI*. De plus, notre étude du double mutant *Xt/Xt ; A11KI*, nous a permis de montrer que la polydactylie, résultant de l'expression distale de *Hoxa11*, est dépendante de *Gli3*. En effet les doubles mutants *Xt/Xt ; A11KI* développent des membres oligodactyles (nombre de doigts inférieur à 5). L'analyse moléculaire de ce double mutant nous a aussi permis d'établir que l'expression de *Grem1* est absente/diminuée dans les bourgeons de membres, suggérant fortement que l'oligodactylie observée est le résultat d'une altération de la boucle SHH-



GREM1-FGF ayant pour conséquence un défaut d'expansion des cellules progénitrices des doigts. Ainsi pour conclure, nos résultats indiquent que l'expression distale de *Hoxa11* contribue à la régulation de la boucle SHH-GREM1-FGF. En présence de *Gli3*, l'expression distale de *Hoxa11* a une action positive sur l'expression de *Grem1*, entraînant le développement d'un membre polydactyle. En l'absence de *Gli3*, *Hoxa11* distal réprime l'expression de *Grem1* causant la formation d'un membre oligodactyle.



**Figure 4.1. Modèle d'action hypothétique de HOXA11 distal dans le contrôle du nombre de doigts.**

(A) Dans un bourgeon de membre sauvage, la boucle de rétrocontrôle positive SHH-GREM1-FGF est nécessaire à la croissance du bourgeon de membre et à la formation des doigts. GLI3R dans la région antérieure du bourgeon réprime l'expression de *Grem1*. (B) Lors d'une expression distale de *Hoxa11*, HOXA11 change l'activité de GLI3R de répressive à activatrice des cibles de *Shh*, tel que *Grem1*. Ainsi la boucle SHH-GREM1-FGF est renforcée et probablement la cause de la polydactylie. (C) Lors d'une expression distale de *Hoxa11* en l'absence de la fonction de *Gli3*, HOXA11 a eu une action répressive sur l'expression de *Grem1* et ainsi altère le bon fonctionnement de la boucle SHH-GREM1-FGF et est probablement la cause de la formation d'un membre oligodactyle.

### 4.3. Homologie de structures nageoire/membre

Chez la souris les différentes inactivations des gènes *Hox* ont permis de montrer leurs rôles respectifs dans la formation des différents segments du membre. Par exemple, les gènes du groupe paralogue 13 (*Hox13*) sont requis pour la formation des doigts (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b). Récemment, le groupe de Neil Shubin a réalisé une inactivation génétique des gènes *hox13* chez le poisson zèbre, en utilisant la technique CRISPR/Cas9. Ces résultats ont permis de lever le voile sur une question qui fût le sujet de nombreux débats, à savoir : les structures distales des nageoires des poissons (rayons) et des membres des tétrapodes (doigts) sont elles homologues? Les poissons zèbres mutants pour *hox13* développent des nageoires avec une réduction drastique de la formation des rayons, structures distales de la nageoire. Ainsi, bien que structurellement et histologiquement distincts, les rayons et les doigts requièrent la fonction des gènes *Hox13*, montrant une homologie du programme développemental de ces deux structures (Nakamura *et al.*, 2016). De plus, l'analyse des patrons d'expression des gènes dans d'autres espèces de poissons ainsi que l'analyse par transgéniques des éléments régulateurs 5'*Hox* confortent les résultats montrant que les structures distales des nageoires et des membres ont une homologie moléculaire (Ahn and Ho, 2008; Davis *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2007; Gehrke *et al.*, 2015). Nous avons notamment montré que la région cis-régulatrice localisée dans l'intron de *Hoxa11* de souris, contrôlant la transcription antisense, est capable d'induire l'expression d'un gène rapporteur dans la partie distale de la nageoire du poisson zèbre (Kherdjemil *et al.*, 2016).

Chez la souris, les gènes *Hoxa11* et *Hoxd11* sont nécessaires à la formation de l'avant bras (zeugopode) (Davis *et al.*, 1995). Cependant le rôle de *hoxa11* dans le développement de la nageoire n'est pas connu. Chez le poisson zèbre, *hoxa11* est exprimé dans le même domaine que les gènes *hox13*, suggérant que *hoxa11* pourrait contribuer à la formation des rayons des nageoires. De plus, nos résultats chez la souris montrent que *Hoxa11* exprimé distalement entraîne la formation d'un membre polydactyle (Kherdjemil *et al.*, 2016). Ainsi il serait intéressant de questionner le rôle de *hoxa11* dans la formation de la nageoire. Ceci pourrait être réalisé avec une approche d'inactivation génétique de *hoxa11* (*hoxa11a* et *hoxa11b*) chez le poisson zèbre, à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9. Aussi, afin d'évaluer l'importance

du changement de régulation de *Hoxa11* au cours de l'évolution, il serait intéressant de réintroduire l'élément cis-régulateur de l'intron de *Hoxa11* de souris, responsable de la transcription antisense (Kherdjemil *et al.*, 2016), dans le génome du poisson zèbre. Ainsi, nous pourrions nous attendre à une perte de l'expression distale de *hoxa11* dans le bourgeon de la nageoire. Dans ce cas, cette expérience nous permettrait également d'évaluer la contribution de l'expression distale de *hoxa11* dans la formation de la nageoire.

#### **4.4. HOXA11 : de l'activation à la répression**

Nos résultats dans le chapitre 3 montrent que l'expression distale de *Hoxa11* active la transcription du gène *Grem1* dans les souris *A11KI* alors que l'expression de *Grem1* est réprimée chez le double mutant *Xt/Xt ; A11KI*. L'expression de *Gli3*, n'étant pas changée dans le mutant *A11KI*, ces résultats suggèrent l'existence d'une interaction entre les protéines HOXA11 et GLI3. La protéine GLI3 existe sous deux formes dans le bourgeon de membre. En présence de la signalisation *Shh*, dans la partie postérieure du bourgeon de membre, GLI3 est présent sous sa forme complète (GLI3A, forme activatrice). Dans la partie antérieure du bourgeon de membre, l'absence de signalisation *Shh* abolie le blocage du clivage protéolytique et la protéine GLI3 est présente sous sa forme tronquée (GLI3R, forme répressive). Ainsi un gradient A-P de la protéine GLI3R se forme dans le bourgeon de membre avec un niveau maximum de GLI3R dans la partie antérieure du bourgeon (Wang *et al.*, 2000). De façon intéressante, il a été suggéré que dans un contexte de gain de fonction HOXD12 est capable de changer la fonction répressive de GLI3R en fonction activatrice sur les cibles de *Shh*, conduisant à l'activation ectopique de ses gènes cibles (Chen *et al.*, 2004). Nous avons montré que les bourgeons de membres des embryons *A11KI* présentent occasionnellement une activation ectopique de *Shh* et de ses gènes cibles, tels que *Gli1* ou encore *Grem1* dans la partie antérieure du bourgeon. Ainsi il est possible que lorsque HOXA11 est exprimé distalement, il forme un complexe protéique avec GLI3R dans la région antérieure du bourgeon de membre, changeant l'action répressive de GLI3R en action activatrice sur les cibles de *Shh*. Il serait intéressant de tester cette interaction. Par exemple, nous pourrions

réaliser des expériences de co-immunoprécipitations (co-IP) à partir de bourgeons de membres *A11KI* à l'aide des anticorps reconnaissant spécifiquement les protéines HOXA11, GLI3A et GLI3R. De plus, afin de tester la capacité activatrice ou répressive de HOXA11, il serait possible de réaliser, *in vitro*, des essais luciférase. La co-transfection de HOXA11 et GLI3R devrait nous permettre de voir si un changement d'activité des régions régulatrices des cibles de Shh a lieu, en comparant avec la transfection individuelle de GLI3R, d'une part, et de HOXA11 d'autre part. De façon plus élégante, il serait intéressant de croiser les souris transgéniques portant un BAC (bacterial artificial chromosome) contenant la région régulatrice de *Grem1* ainsi qu'un gène rapporteur LacZ (Zuniga *et al.*, 2012) avec nos souris *A11KI*, *Xt/Xt*, et *Xt/Xt ; A11KI*. Cette analyse nous permettrait de tester *in vivo* l'effet des protéines HOXA11 et GLI3R, seule ou en complexe, sur l'activité spatiale et temporelle de la région régulatrice de *Grem1*. De façon plus globale, l'analyse des profils de marques épigénétiques (H3K27Ac : marque active de la chromatine / H3K27me3 : marque répressive de la chromatine) associée à la liaison de HOXA11 dans les bourgeons de membres WT, *A11KI* et *Xt/Xt ; A11KI* nous permettrait d'évaluer l'impact de HOXA11, exprimé distalement, en présence ou en l'absence de la fonction de *Gli3* sur l'activité des régions cis-régulatrices des gènes dérégulés.

Il a été suggéré que l'interaction entre les gènes 5'*Hoxd* et *Gli3* a contribué à la transition de la nageoire au membre (Sheth *et al.*, 2012; Tanaka, 2016). De plus, chez les espèces poissons (catshark, poisson zèbre, skate, bamboo shark, elephant shark), *Gli3* présente un patron d'expression inversé avec une expression dans la partie postérieure de la nageoire contrairement à l'expression antérieure de *Gli3* dans le bourgeon de membre des tétrapodes (Nakamura *et al.*, 2015; Onimaru *et al.*, 2015). Ainsi, étant donné l'expression distale de *hoxa11* dans la nageoire des poissons, il est aussi possible que l'interaction entre HOXA11 et GLI3R ait contribué à la transition de la nageoire au membre en modifiant la balance d'activité entre GLI3A et GLI3R.

Les poissons « skate » ont des nageoires pectorales qui s'étendent antérieurement de manière à fusionner avec la tête. Il a été montré que cette adaptation morphologique extrême est due à une boucle alternative HOX-FGF-WNT dans la région antérieure du bourgeon de la nageoire qui permet son expansion (Nakamura *et al.*, 2015). Ainsi il serait intéressant de vérifier l'existence de la mise en place d'une telle boucle dans la souris *A11KI*.

## 4.5. Réduction du nombre de doigts chez les mammifères

Bien que la pentadactylie soit le schéma le plus classique, certains mammifères présentent des variations dans le développement de leurs membres. Par exemple l'autopode des bovins dévie de la pentadactylie classique des mammifères, où seulement deux longues condensations donnant naissance aux doigts se forment (Lopez-Rios *et al.*, 2014). Les bourgeons de membres de bovins présentent une distalisation précoce et une perte d'asymétrie dans l'expression de gènes répondant à la signalisation *Shh*, tels que *Grem1*, *Hoxd13*, *Fgf8*. Il a été montré que la signalisation *Shh*, via l'altération de l'expression de *Ptch1* est responsable de cette perte d'asymétrie et de la réduction du nombre de doigts chez les bovins (Lopez-Rios *et al.*, 2014). De façon intéressante, chez la souris, l'inactivation conditionnelle de *Ptch1* dans le mésenchyme du bourgeon de membre engendre le développement d'un membre avec un phénotype d'oligodactylie similaire à celui des bovins (Lopez-Rios *et al.*, 2014). Un changement dans la régulation de *Ptch1*, due à une altération de son élément cis-régulateur aurait entraîné la perte de réponse à la signalisation *Shh* et donc la réduction du nombre de doigts chez les bovins (Lopez-Rios *et al.*, 2014). La réduction du nombre de doigts chez les porcins semble aussi être due à une altération de la régulation de *Ptch1* (Cooper *et al.*, 2014). En revanche, d'autres mécanismes donnant lieu à une réduction du nombre de doigts ont été identifiés dans d'autres espèces, telles que le chameau, le cheval ou le jerboa. Chez ces espèces, un mécanisme impliquant la mort cellulaire dépendante de *Msx2* pendant le développement des doigts est à l'origine de la réduction du nombre de doigts (Cooper *et al.*, 2014).

Nos résultats indiquent que la réduction du nombre de doigts dans le mutant *Xt/Xt ; A11KI* pourrait être dépendante de la baisse d'expression de *Grem1* entraînant une altération de la boucle SHH-GREM1-FGF. Cependant, étant donné la diversité des mécanismes pouvant mener à la réduction du nombre de doigts chez les différentes espèces, il serait intéressant d'étudier des mécanismes alternatifs. De plus, notre analyse génomique a montré que GLI3 et HOXA11 se lient à la région cis-régulatrice de *Ptch1*. Ainsi il est possible que l'interaction entre ces protéines ait une action sur la régulation de *Ptch1*. Notamment nous pourrions envisager qu'en l'absence de la fonction de *Gli3*, l'expression distale de *Hoxa11* altère

l'activité de la région régulatrice de *Ptch1* entraînant une répression de son activité dans les bourgeons de membres de souris *Xt/Xt* ; *A11KI* causant le phénotype d'oligodactylie. L'altération de l'expression de *Ptch1* entrainerait une perte de la signalisation *Shh*. Ainsi la diminution de l'expression de *Grem1* dans les bourgeons de membres des embryons *Xt/Xt* ; *A11KI* pourrait être une conséquence d'une altération de la régulation de *Ptch1* et de la perte de la réponse à la signalisation *Shh*. Nous pourrions réaliser des hybridations in situ afin de vérifier si l'expression distale de *Hoxa11* dans les bourgeons de membres *Xt/Xt* ; *A11KI* est altérée. Aussi, ici encore l'analyse des profils de marques épigénétiques dans les mutants nous permettrait d'évaluer l'impact de HOXA11, exprimé distalement, sur l'activité de la région cis-régulatrice de *Ptch1*. Alternativement, afin d'envisager d'autres mécanismes possibles, nous pourrions réaliser des essais « TUNEL » (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling) dans les bourgeons de membres *Xt/Xt* ; *A11KI* pour tester si un mécanisme dépendant de la mort cellulaire lors de la formation des doigts est à l'origine de l'oligodactylie des souris *Xt/Xt* ; *A11KI*.

## 4.6. Le contrôle du nombre de doigts et le mécanisme de Turing

L'étude des mutants *Xt/Xt* a montré que l'inactivation génétique de *Gli3* entraîne une expansion antérieure de l'expression des gènes 5'*HoxD* (Büscher *et al.*, 1997). Cependant l'inactivation génétique de *Gli3* en absence des gènes 5'*HoxD* (*Xt/Xt* ; *HoxDdel(11-13)*) entraîne tout de même la formation d'un membre polydactyle, augmentant même le nombre de doigts en comparaison au simple mutant *Xt/Xt* (Sheth *et al.*, 2007). De plus, la réduction du dosage de *Hoxa13* dans le double mutant *Xt/Xt* ; *HoxDdel(11-13)* augmente davantage le nombre de doigts (Sheth *et al.*, 2012). L'augmentation du nombre de doigts lors de la réduction du dosage des gènes 5'*Hox* dans le fond génétique *Xt/Xt* a été proposée comme dépendant d'un mécanisme de type Turing (Sheth *et al.*, 2012). De façon intéressante, la diminution du dosage des gènes *Hox13* entraîne une augmentation de l'expression de *Hoxa11* dans l'autopode (Kherdjemil *et al.*, 2016; Sheth *et al.*, 2013a; Woltering *et al.*, 2014). De plus,

nous avons montré que l'expression distale de *Hoxa11* dans les souris *A11KI* entraîne la formation d'un membre polydactyle (Kherdjemil *et al.*, 2016). Ainsi, l'expression distale de *Hoxa11*, plutôt que la réduction du dosage des gènes *5'Hox*, pourrait être responsable de l'augmentation du nombre de doigts dépendant d'un mécanisme de type Turing. De façon surprenante, notre analyse des souris *Xt/Xt ; A11KI* a révélé que l'expression distale de *Hoxa11* en l'absence de la fonction de *Gli3* entraîne le développement d'un membre oligodactyle (nombre de doigts inférieur à 5). Ces résultats suggèrent que le gain d'expression distale de *Hoxa11* lors d'une réduction du dosage des gènes *5'Hox* dans le fond génétique *Gli3* mutant n'est plus capable d'entraîner la formation de doigts surnuméraires. Le contrôle du nombre de doigts et la stabilisation du stade pentadactyle est probablement le résultat d'une interaction génétique complexe entre les gènes *Hox*, *Gli3* et la signalisation *Shh*, tous trois impliqués dans la formation et le contrôle du nombre de doigts, ayant connus des changements de régulation au cours de l'évolution (Cooper *et al.*, 2014; Gehrke *et al.*, 2015; Gehrke and Shubin, 2016; Kherdjemil *et al.*, 2016; Lopez-Rios *et al.*, 2014; Onimaru *et al.*, 2015; Tanaka, 2016).

## 4.7. Divergence fonctionnelle entre HOXA11 et HOXA13

Récemment, l'analyse génomique de la liaison des facteurs de transcription HOX13 ainsi que des profils épigénétiques et transcriptionnels des bourgeons de membres des embryons *Hox13*<sup>-/-</sup> a révélé que la terminaison du programme transcriptionnel précoce (formant la partie proximale du membre) et l'activation du programme distal sont coordonnées et requièrent la fonction des protéines HOX13 se liant aux éléments cis-régulateurs de gènes régissant le développement du bourgeon de membre (Sheth *et al.*, 2016). Chez la souris, les domaines d'expression de *Hoxa11* et *Hoxa13* sont mutuellement exclusif. Nous avons montré que la répression de *Hoxa11* dans la partie distale du membre est nécessaire à la pentadactylie, les souris *A11KI* étant polydactyles (Kherdjemil *et al.*, 2016). De plus, l'expression des gènes *Hox13* dans la partie proximale du membre cause la malformation du zeugopode avec une réduction drastique de la taille des os (Williams *et al.*, 2006). La nécessité de cette exclusion

mutuelle de l'expression des gènes *Hoxa11* et *Hoxa13* dans le bourgeon de membre soulève de nouvelles questions quant à la spécificité de liaison/d'action de ces deux protéines. De façon intéressante, la délétion en cis des gènes *Hoxd12* et *Hoxd13* entraîne une augmentation de l'expression de *Hoxd11* dans l'autopode (*Hoxd11* devenant contrôlé tel *Hoxd13* dans un contexte WT) causant la polydactylie. En revanche, le gain d'expression de *Hoxd12* lors de la délétion de *Hoxd13* ou le gain de *Hoxd10*, après délétion en cis de *Hoxd11* à *Hoxd13*, n'entraîne pas le développement de doigts supplémentaires (Kmita *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent une divergence fonctionnelle entre les facteurs de transcription HOX11 et les autres membres 5'HOX. La divergence fonctionnelle entre *Hoxa11* et *Hoxa13* pourrait être médiée par la présence de cibles transcriptionnelles différentes et/ou par une action opposée sur des cibles transcriptionnelles communes. L'analyse récente de la liaison des facteurs de transcription 5'HOXA/D par ChIP-seq, en utilisant des cultures de micromasse issue de mésenchyme de bourgeons de membres de poulet, suggère que HOX11 et HOX13 partagent des cibles communes (Jerkovic *et al.*, 2017). Nous avons réalisé une analyse comparative de la liaison de HOXA11 (cette étude) et HOXA13 (Sheth *et al.*, 2016) (ChIP-seq) dans les bourgeons de membres WT à E11.5. Nos résultats indiquent que HOXA11 et HOXA13 se lient principalement dans les régions introniques et intragéniques (ref et Annexe 1 A) correspondant à des éléments cis-régulateurs actifs lors du développement des membres (Annexe 1 B et C). De plus, nos résultats indiquent que la liaison de HOXA11 et HOXA13 peut être répartie en trois catégories : les pics communs, les pics HOXA11-spécifiques et les pics HOXA13-spécifiques (Annexe 2 A et B). Nous trouvons également la présence de pics HOXA11-spécifiques et HOXA13-spécifiques au niveau de régions cis-régulatrices actives spécifiquement dans la partie proximale et distale du bourgeon de membre respectivement (Annexe 2 D). Ainsi la divergence fonctionnelle entre HOXA11 et HOXA13 pourrait être le résultat d'une action opposée sur des cibles communes mais aussi être le fruit d'une action exclusive sur des cibles spécifiques à chacun de ces facteurs de transcription. De façon intéressante, l'analyse des motifs associés aux trois catégories de pics a révélé la présence d'une spécificité de liaison des facteurs de transcription HOXA11 et HOXA13. La liaison spécifique de HOXA11 semble nécessiter la présence d'un C en position -1 de la séquence ATAAA alors que la liaison spécifique de HOXA13 semble requérir la présence d'un C en position -3. La liaison communes de HOXA11 et HOXA13 montrent la présence du C aux



positions -1 et -3 (Annexe 2 C). De plus, la présence de sites de liaison de type *Tbox* dans la catégorie de pic HOXA11-spécifique et absents de la catégorie HOXA13-spécifique, suggère que la divergence fonctionnelle associée aux facteurs de transcription HOXA11 et HOXA13 pourrait aussi provenir d'une action médiée par association avec des co-facteurs spécifiques à HOXA11 ou HOXA13 (Annexe 2 C). Afin de mieux appréhender les différences fonctionnelles associées à la liaison de HOXA11 et HOXA13 dans le bourgeon de membre proximal et distal respectivement, il serait intéressant d'analyser les profils transcriptionnels et épigénétiques des bourgeons de membres *Hoxa11*<sup>-/-</sup> ; *Hoxd11*<sup>-/-</sup> en comparaison à l'analyse réalisée dans les mutants *Hoxa13*<sup>-/-</sup> ; *Hoxd13*<sup>-/-</sup> (Sheth *et al.*, 2016). De plus, il serait intéressant de réaliser un ChIP-seq pour HOXA11 dans le mutant *A11KI* en utilisant la partie distale du bourgeon de membre. Cette analyse nous permettrait de savoir si l'expression distale de *Hoxa11* engendre le développement d'un membre polydactyle en se liant à des sites ectopiques ou bien en se liant dans la partie distale du bourgeon à ses cibles « naturelles », spécifiques de la partie proximale dans un contexte WT. L'analyse comparative des profils transcriptionnelles, épigénétiques et de la liaison de HOXA11 et HOXA13 dans les bourgeons de membres WT, *A11KI*, *Hox13*<sup>-/-</sup> et *Hox11*<sup>-/-</sup> nous permettrait de questionner de façon globale le rôle de HOXA11 et HOXA13 dans la mise en place de l'identité et du développement P-D du bourgeon de membre.

## Bibliographie

Agarwal P, Wylie JN, Galceran J, Arkhitko O, Li C, Deng C, Grosschedl R, Bruneau BG. 2003. *Tbx5* is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development* 130: 623-633.

Ahn D, Ho RK. 2008. Tri-phasic expression of posterior Hox genes during development of pectoral fins in zebrafish: implications for the evolution of vertebrate paired appendages. *Dev Biol* 322: 220-233.

Ahn S, Joyner AL. 2004. Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* 118: 505-516.

Amemiya CT, Alfoldi J, Lee AP, Fan S, Philippe H, Maccallum I, Braasch I, Manousaki T, Schneider I, Rohner N, Organ C, Chalopin D, Smith JJ, Robinson M, Dorrington RA, Gerdol M, Aken B, Biscotti MA, Barucca M, Baurain D, Berlin AM, Blatch GL, Buonocore F, Burmester T, Campbell MS, Canapa A, Cannon JP, Christoffels A, De Moro G, Edkins AL, Fan L, Fausto AM, Feiner N, Forconi M, Gamielien J, Gnerre S, Gnirke A, Goldstone JV, Haerty W, Hahn ME, Hesse U, Hoffmann S, Johnson J, Karchner SI, Kuraku S, Lara M, Levin JZ, Litman GW, Mauceli E, Miyake T, Mueller MG, Nelson DR, Nitsche A, Olmo E, Ota T, Pallavicini A, Panji S, Picone B, Ponting CP, Prohaska SJ, Przybylski D, Saha NR, Ravi V, Ribeiro FJ, Sauka-Spengler T, Scapigliati G, Searle SM, Sharpe T, Simakov O, Stadler PF, Stegeman JJ, Sumiyama K, Tabbaa D, Tafer H, Turner-Maier J, van Heusden P, White S, Williams L, Yandell M, Brinkmann H, Volff JN, Tabin CJ, Shubin N, Scharl M, Jaffe DB, Postlethwait JH, Venkatesh B, Di Palma F, Lander ES, Meyer A, Lindblad-Toh K. 2013. The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature* 496: 311-316.

Andrey G, Duboule D. 2014. SnapShot: Hox gene regulation. *Cell* 156: 856-856.e851.

Andrey G, Montavon T, Mascrez B, Gonzalez F, Noordermeer D, Leleu M, Trono D, Spitz F, Duboule D. 2013. A switch between topological domains underlies HoxD genes collinearity in mouse limbs. *Science* 340: 1234167.

Bastida MF, Sheth R, Ros MA. 2009. A BMP-Shh negative-feedback loop restricts Shh expression during limb development. *Development* 136: 3779-3789.

Beccari L, Yakushiji-Kaminatsui N, Woltering JM, Necsulea A, Lonfat N, Rodriguez-Carballo E, Mascrez B, Yamamoto S, Kuroiwa A, Duboule D. 2016. A role for HOX13 proteins in the regulatory switch between TADs at the HoxD locus. *Genes Dev* 30: 1172-1186.

Benazet JD, Bischofberger M, Tiecke E, Goncalves A, Martin JF, Zuniga A, Naef F, Zeller R. 2009. A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science* 323: 1050-1053.

- Berlivet S, Paquette D, Dumouchel A, Langlais D, Dostie J, Kmita M. 2013. Clustering of Tissue-Specific Sub-TADs Accompanies the Regulation of HoxA Genes in Developing Limbs. *PLoS Genet* 9: e1004018.
- Boulet AM, Capecchi MR. 2004. Multiple roles of Hoxa11 and Hoxd11 in the formation of the mammalian forelimb zeugopod. *Development* 131: 299-309.
- Boulet AM, Moon AM, Arenkiel BR, Capecchi MR. 2004. The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Dev Biol* 273: 361-372.
- Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C. 1995. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* 121: 333-346.
- Büscher D, Bosse B, Heymer J, Rüther U. 1997. Evidence for genetic control of Sonic hedgehog by Gli3 in mouse limb development. *Mechanisms of Development* 62: 175-182.
- Capdevila J, Tsukui T, Rodriguez Esteban C, Zappavigna V, Izpisua Belmonte JC. 1999. Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2 and distal antagonism of BMPs by Gremlin. *Mol Cell* 4: 839-849.
- Capellini TD, Di Giacomo G, Salsi V, Brendolan A, Ferretti E, Srivastava D, Zappavigna V, Selleri L. 2006. Pbx1/Pbx2 requirement for distal limb patterning is mediated by the hierarchical control of Hox gene spatial distribution and Shh expression. *Development* 133: 2263-2273.
- Carpenter EM, Goddard JM, Davis AP, Nguyen TP, Capecchi MR. 1997. Targeted disruption of Hoxd-10 affects mouse hindlimb development. *Development* 124: 4505-4514.
- Carroll SB. 1995. Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* 376: 479-485.
- Carroll SB. 2008. Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. *Cell* 134: 25-36.
- Charite J, McFadden DG, Olson EN. 2000. The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development* 127: 2461-2470.
- Chen Y, Knezevic V, Ervin V, Hutson R, Ward Y, Mackem S. 2004. Direct interaction with Hoxd proteins reverses Gli3-repressor function to promote digit formation downstream of Shh. *Development* 131: 2339-2347.
- Chiang C, Litingtung Y, Harris MP, Simandl BK, Li Y, Beachy PA, Fallon JF. 2001. Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol* 236: 421-435.
- Chiu CH, Nonaka D, Xue L, Amemiya CT, Wagner GP. 2000. Evolution of Hoxa-11 in lineages phylogenetically positioned along the fin-limb transition. *Mol Phylogenet Evol* 17: 305-316.
- Clack JA. 2002. An early tetrapod from 'Romer's Gap'. *Nature* 418: 72-76.
- Coates MI, Clack JA. 1990. Polydactyly in the earliest known tetrapod limbs. *Nature* 347: 66-69.

- Coates MI, Jeffery JE, Rut M. 2002. Fins to limbs: what the fossils say. *Evol Dev* 4: 390-401.
- Cohn MJ, Izpisua-Belmonte JC, Abud H, Heath JK, Tickle C. 1995. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* 80: 739-746.
- Cohn MJ, Patel K, Krumlauf R, Wilkinson DG, Clarke JD, Tickle C. 1997. Hox9 genes and vertebrate limb specification. *Nature* 387: 97-101.
- Cohn MJ, Tickle C. 1999. Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes. *Nature* 399: 474-479.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819-823.
- Cooper KL, Hu JK, ten Berge D, Fernandez-Teran M, Ros MA, Tabin CJ. 2011. Initiation of proximal-distal patterning in the vertebrate limb by signals and growth. *Science* 332: 1083-1086.
- Cooper KL, Sears KE, Uygur A, Maier J, Baczkowski KS, Brosnahan M, Antczak D, Skidmore JA, Tabin CJ. 2014. Patterning and post-patterning modes of evolutionary digit loss in mammals. *Nature* 511: 41-45.
- Dahn RD, Fallon JF. 2000. Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* 289: 438-441.
- Darwin C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection*. London,: J. Murray. p. ix, 1 , 502 p.
- Davis AP, Capecchi MR. 1994. Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of *hoxd-11*. *Development* 120: 2187-2198.
- Davis AP, Capecchi MR. 1996. A mutational analysis of the 5' HoxD genes: dissection of genetic interactions during limb development in the mouse. *Development* 122: 1175-1185.
- Davis AP, Witte DP, Hsieh-Li HM, Potter SS, Capecchi MR. 1995. Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature* 375: 791-795.
- Davis MC, Dahn RD, Shubin NH. 2007. An autopodial-like pattern of Hox expression in the fins of a basal actinopterygian fish. *Nature* 447: 473-476.
- de Bakker MA, Fowler DA, den Oude K, Dondorp EM, Navas MC, Horbanczuk JO, Sire JY, Szczerbinska D, Richardson MK. 2013. Digit loss in archosaur evolution and the interplay between selection and constraints. *Nature* 500: 445-448.
- de la Cruz CC, Der-Avakian A, Spyropoulos DD, Tieu DD, Carpenter EM. 1999. Targeted disruption of *Hoxd9* and *Hoxd10* alters locomotor behavior, vertebral identity, and peripheral nervous system development. *Dev Biol* 216: 595-610.
- Delaurier A, Burton N, Bennett M, Baldock R, Davidson D, Mohun TJ, Logan MP. 2008. The Mouse Limb Anatomy Atlas: an interactive 3D tool for studying embryonic limb patterning. *BMC Dev Biol* 8: 83.
- Delgado I, Torres M. 2016. Gradients, waves and timers, an overview of limb patterning models. *Semin Cell Dev Biol* 49: 109-115.

- Deschamps J, van Nes J. 2005. Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development* 132: 2931-2942.
- Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS, Ren B. 2012. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485: 376-380.
- Dolle P, Dierich A, LeMeur M, Schimmang T, Schuhbaur B, Chambon P, Duboule D. 1993. Disruption of the Hoxd-13 gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell* 75: 431-441.
- Dolle P, Izpisua-Belmonte JC, Boncinelli E, Duboule D. 1991. The Hox-4.8 gene is localized at the 5' extremity of the Hox-4 complex and is expressed in the most posterior parts of the body during development. *Mech Dev* 36: 3-13.
- Drossopoulou G, Lewis KE, Sanz-Ezquerro JJ, Nikbakht N, McMahon AP, Hofmann C, Tickle C. 2000. A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signalling. *Development* 127: 1337-1348.
- Duboule D. 1992. The vertebrate limb: a model system to study the Hox/HOM gene network during development and evolution. *Bioessays* 14: 375-384.
- Duboule D. 2007. The rise and fall of Hox gene clusters. *Development* 134: 2549-2560.
- Duboule D, Dolle P. 1989. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *Embo j* 8: 1497-1505.
- Dudley AT, Ros MA, Tabin CJ. 2002. A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* 418: 539-544.
- Fallon JF, Lopez A, Ros MA, Savage MP, Olwin BB, Simandl BK. 1994. FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* 264: 104-107.
- Favier B, Le Meur M, Chambon P, Dolle P. 1995. Axial skeleton homeosis and forelimb malformations in Hoxd-11 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 310-314.
- Favier B, Rijli FM, Fromental-Ramain C, Fraulob V, Chambon P, Dolle P. 1996. Functional cooperation between the non-paralogous genes Hoxa-10 and Hoxd-11 in the developing forelimb and axial skeleton. *Development* 122: 449-460.
- Fernandez-Teran M, Piedra ME, Kathiriya IS, Srivastava D, Rodriguez-Rey JC, Ros MA. 2000. Role of dHAND in the anterior-posterior polarization of the limb bud: implications for the Sonic hedgehog pathway. *Development* 127: 2133-2142.
- Fernandez-Teran M, Ros MA. 2008. The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways. *Int J Dev Biol* 52: 857-871.
- Freitas R, Gomez-Marin C, Wilson JM, Casares F, Gomez-Skarmeta JL. 2012. Hoxd13 contribution to the evolution of vertebrate appendages. *Dev Cell* 23: 1219-1229.
- Freitas R, Zhang G, Cohn MJ. 2007. Biphase Hoxd gene expression in shark paired fins reveals an ancient origin of the distal limb domain. *PLoS One* 2: e754.

Fromental-Ramain C, Warot X, Lakkaraju S, Favier B, Haack H, Birling C, Dierich A, Dollé P, Chambon P. 1996a. Specific and redundant functions of the paralogous Hoxa-9 and Hoxd-9 genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development* 122: 461-472.

Fromental-Ramain C, Warot X, Messadecq N, LeMeur M, Dollé P, Chambon P. 1996b. Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development* 122: 2997-3011.

Galceran J, Farinas I, Depew MJ, Clevers H, Grosschedl R. 1999. Wnt3a<sup>-/-</sup>-like phenotype and limb deficiency in Lef1<sup>(-/-)</sup>Tcf1<sup>(-/-)</sup> mice. *Genes Dev* 13: 709-717.

Galli A, Robay D, Osterwalder M, Bao X, Benazet JD, Tariq M, Paro R, Mackem S, Zeller R. 2010. Distinct roles of Hand2 in initiating polarity and posterior Shh expression during the onset of mouse limb bud development. *PLoS Genet* 6: e1000901.

Gaunt SJ. 1988. Mouse homeobox gene transcripts occupy different but overlapping domains in embryonic germ layers and organs: a comparison of Hox-3.1 and Hox-1.5. *Development* 103: 135-144.

Gehrke AR, Schneider I, de la Calle-Mustienes E, Tena JJ, Gomez-Marin C, Chandran M, Nakamura T, Braasch I, Postlethwait JH, Gomez-Skarmeta JL, Shubin NH. 2015. Deep conservation of wrist and digit enhancers in fish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 803-808.

Gehrke AR, Shubin NH. 2016. Cis-regulatory programs in the development and evolution of vertebrate paired appendages. *Semin Cell Dev Biol* 57: 31-39.

Goodman FR. 2003. Congenital abnormalities of body patterning: embryology revisited. *Lancet* 362: 651-662.

Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R. 1989. The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 57: 367-378.

Gros J, Tabin CJ. 2014. Vertebrate limb bud formation is initiated by localized epithelial-to-mesenchymal transition. *Science* 343: 1253-1256.

Haack H, Gruss P. 1993. The establishment of murine Hox-1 expression domains during patterning of the limb. *Dev Biol* 157: 410-422.

Haramis AG, Brown JM, Zeller R. 1995. The limb deformity mutation disrupts the SHH/FGF-4 feedback loop and regulation of 5' HoxD genes during limb pattern formation. *Development* 121: 4237-4245.

Harfe BD, Scherz PJ, Nissim S, Tian H, McMahon AP, Tabin CJ. 2004. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* 118: 517-528.

Hayashi S, Kobayashi T, Yano T, Kamiyama N, Egawa S, Seki R, Takizawa K, Okabe M, Yokoyama H, Tamura K. 2015. Evidence for an amphibian sixth digit. *Zoological Lett* 1: 17.

Hsieh-Li HM, Witte DP, Weinstein M, Branford W, Li H, Small K, Potter SS. 1995. Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development* 121: 1373-1385.

Huang BL, Trofka A, Furusawa A, Norrie JL, Rabinowitz AH, Vokes SA, Mark Taketo M, Zakany J, Mackem S. 2016. An interdigit signalling centre instructs coordinate phalanx-joint formation governed by 5'Hoxd-Gli3 antagonism. *Nat Commun* 7: 12903.

Hui CC, Joyner AL. 1993. A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene. *Nat Genet* 3: 241-246.

Iraci N, Diolaiti D, Papa A, Porro A, Valli E, Gherardi S, Herold S, Eilers M, Bernardoni R, Della Valle G, Perini G. 2011. A SP1/MIZ1/MYCN repression complex recruits HDAC1 at the TRKA and p75NTR promoters and affects neuroblastoma malignancy by inhibiting the cell response to NGF. *Cancer Res* 71: 404-412.

Jerkovic I, Ibrahim DM, Andrey G, Haas S, Hansen P, Janetzki C, Gonzalez Navarrete I, Robinson PN, Hecht J, Mundlos S. 2017. Genome-Wide Binding of Posterior HOXA/D Transcription Factors Reveals Subgrouping and Association with CTCF. *PLoS Genet* 13: e1006567.

Kawakami Y, Capdevila J, Buscher D, Itoh T, Rodriguez Esteban C, Izpisua Belmonte JC. 2001. WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* 104: 891-900.

Kawakami Y, Marti M, Kawakami H, Itou J, Quach T, Johnson A, Sahara S, O'Leary DD, Nakagawa Y, Lewandoski M, Pfaff S, Evans SM, Izpisua Belmonte JC. 2011. Islet1-mediated activation of the beta-catenin pathway is necessary for hindlimb initiation in mice. *Development* 138: 4465-4473.

Kherdjemil Y, Lalonde RL, Sheth R, Dumouchel A, de Martino G, Pineault KM, Wellik DM, Stadler HS, Akimenko MA, Kmita M. 2016. Evolution of Hoxa11 regulation in vertebrates is linked to the pentadactyl state. *Nature* 539: 89-92.

Khokha MK, Hsu D, Brunet LJ, Dionne MS, Harland RM. 2003. Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat Genet* 34: 303-307.

Kmita M, Duboule D. 2003. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science* 301: 331-333.

Kmita M, Fraudeau N, Herault Y, Duboule D. 2002. Serial deletions and duplications suggest a mechanism for the collinearity of Hoxd genes in limbs. *Nature* 420: 145-150.

Kmita M, Kondo T, Duboule D. 2000. Targeted inversion of a polar silencer within the HoxD complex re-allocates domains of enhancer sharing. *Nat Genet* 26: 451-454.

Kmita M, Tarchini B, Zakany J, Logan M, Tabin CJ, Duboule D. 2005. Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* 435: 1113-1116.

Knezevic V, De Santo R, Schughart K, Huffstadt U, Chiang C, Mahon KA, Mackem S. 1997. Hoxd-12 differentially affects preaxial and postaxial chondrogenic branches in the limb and regulates Sonic hedgehog in a positive feedback loop. *Development* 124: 4523-4536.

Kondo T, Zakany J, Duboule D. 1998. Control of colinearity in AbdB genes of the mouse HoxD complex. *Mol Cell* 1: 289-300.

- Kozhemyakina E, Ionescu A, Lassar AB. 2014. GATA6 is a crucial regulator of Shh in the limb bud. *PLoS Genet* 10: e1004072.
- Krumlauf R. 1992. Evolution of the vertebrate Hox homeobox genes. *Bioessays* 14: 245-252.
- Krumlauf R. 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78: 191-201.
- Kuijper S, Feitsma H, Sheth R, Korving J, Reijnen M, Meijlink F. 2005. Function and regulation of Alx4 in limb development: complex genetic interactions with Gli3 and Shh. *Dev Biol* 285: 533-544.
- Kvon EZ, Kamneva OK, Melo US, Barozzi I, Osterwalder M, Mannion BJ, Tissieres V, Pickle CS, Plajzer-Frick I, Lee EA, Kato M, Garvin TH, Akiyama JA, Afzal V, Lopez-Rios J, Rubin EM, Dickel DE, Pennacchio LA, Visel A. 2016. Progressive Loss of Function in a Limb Enhancer during Snake Evolution. *Cell* 167: 633-642.e611.
- Leal F, Cohn MJ. 2016. Loss and Re-emergence of Legs in Snakes by Modular Evolution of Sonic hedgehog and HOXD Enhancers. *Curr Biol* 26: 2966-2973.
- Leite-Castro J, Beviano V, Rodrigues PN, Freitas R. 2016. HoxA Genes and the Fin-to-Limb Transition in Vertebrates. *Journal of Developmental Biology* 4: 10.
- Lettice LA, Heaney SJ, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, Goode D, Elgar G, Hill RE, de Graaff E. 2003. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* 12: 1725-1735.
- Lettice LA, Horikoshi T, Heaney SJ, van Baren MJ, van der Linde HC, Breedveld GJ, Joosse M, Akarsu N, Oostra BA, Endo N, Shibata M, Suzuki M, Takahashi E, Shinka T, Nakahori Y, Ayusawa D, Nakabayashi K, Scherer SW, Heutink P, Hill RE, Noji S. 2002. Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7548-7553.
- Lewandoski M, Sun X, Martin GR. 2000. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* 26: 460-463.
- Lewis EB. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276: 565-570.
- Li D, Sakuma R, Vakili NA, Mo R, Puvindran V, Deimling S, Zhang X, Hopyan S, Hui CC. 2014. Formation of proximal and anterior limb skeleton requires early function of Irx3 and Irx5 and is negatively regulated by Shh signaling. *Dev Cell* 29: 233-240.
- Litingtung Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C. 2002. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 418: 979-983.
- Logan M, Martin JF, Nagy A, Lobe C, Olson EN, Tabin CJ. 2002. Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer. *Genesis* 33: 77-80.
- Lonfat N, Montavon T, Darbellay F, Gitto S, Duboule D. 2014. Convergent evolution of complex regulatory landscapes and pleiotropy at Hox loci. *Science* 346: 1004-1006.



- Lopez-Martinez A, Chang DT, Chiang C, Porter JA, Ros MA, Simandl BK, Beachy PA, Fallon JF. 1995. Limb-patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of Sonic hedgehog cleavage. *Curr Biol* 5: 791-796.
- Lopez-Rios J. 2016. The many lives of SHH in limb development and evolution. *Semin Cell Dev Biol* 49: 116-124.
- Lopez-Rios J, Duchesne A, Speziale D, Andrey G, Peterson KA, Germann P, Unal E, Liu J, Floriot S, Barbey S, Gallard Y, Muller-Gerbl M, Courtney AD, Klopp C, Rodriguez S, Ivanek R, Beisel C, Wicking C, Iber D, Robert B, McMahon AP, Duboule D, Zeller R. 2014. Attenuated sensing of SHH by *Ptch1* underlies evolution of bovine limbs. *Nature* 511: 46-51.
- Lopez-Rios J, Speziale D, Robay D, Scotti M, Osterwalder M, Nusspaumer G, Galli A, Hollander GA, Kmita M, Zeller R. 2012. *GLI3* constrains digit number by controlling both progenitor proliferation and BMP-dependent exit to chondrogenesis. *Dev Cell* 22: 837-848.
- Maas SA, Fallon JF. 2005. Single base pair change in the long-range Sonic hedgehog limb-specific enhancer is a genetic basis for preaxial polydactyly. *Dev Dyn* 232: 345-348.
- Mariani FV, Ahn CP, Martin GR. 2008. Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature* 453: 401-405.
- Masuya H, Sezutsu H, Sakuraba Y, Sagai T, Hosoya M, Kaneda H, Miura I, Kobayashi K, Sumiyama K, Shimizu A, Nagano J, Yokoyama H, Kaneko S, Sakurai N, Okagaki Y, Noda T, Wakana S, Gondo Y, Shiroishi T. 2007. A series of ENU-induced single-base substitutions in a long-range cis-element altering Sonic hedgehog expression in the developing mouse limb bud. *Genomics* 89: 207-214.
- Mattar P, Langevin LM, Markham K, Klenin N, Shivji S, Zinyk D, Schuurmans C. 2008. Basic helix-loop-helix transcription factors cooperate to specify a cortical projection neuron identity. *Mol Cell Biol* 28: 1456-1469.
- Medina-Martinez O, Bradley A, Ramirez-Solis R. 2000. A large targeted deletion of *Hoxb1-Hoxb9* produces a series of single-segment anterior homeotic transformations. *Dev Biol* 222: 71-83.
- Menke DB, Guenther C, Kingsley DM. 2008. Dual hindlimb control elements in the *Tbx4* gene and region-specific control of bone size in vertebrate limbs. *Development* 135: 2543-2553.
- Mercader N, Leonardo E, Azpiazu N, Serrano A, Morata G, Martinez C, Torres M. 1999. Conserved regulation of proximodistal limb axis development by *Meis1/Hth*. *Nature* 402: 425-429.
- Mercader N, Leonardo E, Piedra ME, Martinez AC, Ros MA, Torres M. 2000. Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of *Meis* genes. *Development* 127: 3961-3970.
- Metscher BD, Takahashi K, Crow K, Amemiya C, Nonaka DF, Wagner GP. 2005. Expression of *Hoxa-11* and *Hoxa-13* in the pectoral fin of a basal ray-finned fish, *Polyodon spathula*: implications for the origin of tetrapod limbs. *Evol Dev* 7: 186-195.

- Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, Zeller R, Zuniga A. 2004. Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development* 131: 3401-3410.
- Min H, Danilenko DM, Scully SA, Bolon B, Ring BD, Tarpley JE, DeRose M, Simonet WS. 1998. Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev* 12: 3156-3161.
- Minguillon C, Nishimoto S, Wood S, Vendrell E, Gibson-Brown JJ, Logan MP. 2012. Hox genes regulate the onset of Tbx5 expression in the forelimb. *Development* 139: 3180-3188.
- Monkley SJ, Delaney SJ, Pennisi DJ, Christiansen JH, Wainwright BJ. 1996. Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. *Development* 122: 3343-3353.
- Montavon T, Soshnikova N, Mascrez B, Joye E, Thevenet L, Splinter E, de Laat W, Spitz F, Duboule D. 2011. A regulatory archipelago controls Hox genes transcription in digits. *Cell* 147: 1132-1145.
- Moon AM, Capecchi MR. 2000. Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet* 26: 455-459.
- Mortlock DP, Sateesh P, Innis JW. 2000. Evolution of N-terminal sequences of the vertebrate HOXA13 protein. *Mamm Genome* 11: 151-158.
- Murillo-Ferrol NL. 1965. [Causal study of the earliest differentiation of the morphological rudiments of the extremities. Experimental analysis on bird embryos]. *Acta Anat (Basel)* 62: 80-103.
- Murtaugh LC, Stanger BZ, Kwan KM, Melton DA. 2003. Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14920-14925.
- Naiche LA, Papaioannou VE. 2003. Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois. *Development* 130: 2681-2693.
- Nakamura T, Gehrke AR, Lemberg J, Szymaszek J, Shubin NH. 2016. Digits and fin rays share common developmental histories. *Nature* 537: 225-228.
- Nakamura T, Klomp J, Pieretti J, Schneider I, Gehrke AR, Shubin NH. 2015. Molecular mechanisms underlying the exceptional adaptations of batoid fins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 15940-15945.
- Nelson CE, Morgan BA, Burke AC, Laufer E, DiMambro E, Murtaugh LC, Gonzales E, Tessarollo L, Parada LF, Tabin C. 1996. Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development* 122: 1449-1466.
- Nelson LT, Rakshit S, Sun H, Wellik DM. 2008. Generation and expression of a Hoxa11eGFP targeted allele in mice. *Dev Dyn* 237: 3410-3416.
- Ng JK, Kawakami Y, Buscher D, Raya A, Itoh T, Koth CM, Rodriguez Esteban C, Rodriguez-Leon J, Garrity DM, Fishman MC, Izpisua Belmonte JC. 2002. The limb identity gene Tbx5 promotes limb initiation by interacting with Wnt2b and Fgf10. *Development* 129: 5161-5170.

- Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. 1999. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 21: 444-448.
- Nishimoto S, Wilde SM, Wood S, Logan MP. 2015. RA Acts in a Coherent Feed-Forward Mechanism with Tbx5 to Control Limb Bud Induction and Initiation. *Cell Rep* 12: 879-891.
- Niswander L, Tickle C, Vogel A, Booth I, Martin GR. 1993. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* 75: 579-587.
- Nnamani MC, Ganguly S, Erkenbrack EM, Lynch VJ, Mizoue LS, Tong Y, Darling HL, Fuxreiter M, Meiler J, Wagner GP. 2016. A Derived Allosteric Switch Underlies the Evolution of Conditional Cooperativity between HOXA11 and FOXO1. *Cell Rep* 15: 2097-2108.
- Noordermeer D, Duboule D. 2013. Chromatin architectures and Hox gene collinearity. *Curr Top Dev Biol* 104: 113-148.
- Norrie JL, Lewandowski JP, Bouldin CM, Amarnath S, Li Q, Vokes MS, Ehrlich LI, Harfe BD, Vokes SA. 2014. Dynamics of BMP signaling in limb bud mesenchyme and polydactyly. *Dev Biol* 393: 270-281.
- Onimaru K, Kuraku S, Takagi W, Hyodo S, Sharpe J, Tanaka M. 2015. A shift in anterior-posterior positional information underlies the fin-to-limb evolution. *Elife* 4.
- Osterwalder M, Speziale D, Shoukry M, Mohan R, Ivanek R, Kohler M, Beisel C, Wen X, Scales SJ, Christoffels VM, Visel A, Lopez-Rios J, Zeller R. 2014. HAND2 targets define a network of transcriptional regulators that compartmentalize the early limb bud mesenchyme. *Dev Cell* 31: 345-357.
- Panman L, Zeller R. 2003. Patterning the limb before and after SHH signalling. *J Anat* 202: 3-12.
- Perez WD, Weller CR, Shou S, Stadler HS. 2010. Survival of Hoxa13 homozygous mutants reveals a novel role in digit patterning and appendicular skeletal development. *Dev Dyn* 239: 446-457.
- Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R. 1998. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 12: 2735-2747.
- Pizette S, Abate-Shen C, Niswander L. 2001. BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development* 128: 4463-4474.
- Pizette S, Niswander L. 1999. BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development* 126: 883-894.
- Potter SS, Branford WW. 1998. Evolutionary conservation and tissue-specific processing of Hoxa 11 antisense transcripts. *Mamm Genome* 9: 799-806.
- Raines AM, Magella B, Adam M, Potter SS. 2015. Key pathways regulated by HoxA9,10,11/HoxD9,10,11 during limb development. *BMC Dev Biol* 15: 28.

- Rallis C, Bruneau BG, Del Buono J, Seidman CE, Seidman JG, Nissim S, Tabin CJ, Logan MP. 2003. Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth. *Development* 130: 2741-2751.
- Raspopovic J, Marcon L, Russo L, Sharpe J. 2014. Modeling digits. Digit patterning is controlled by a Bmp-Sox9-Wnt Turing network modulated by morphogen gradients. *Science* 345: 566-570.
- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401-1416.
- Robert B. 2007. Bone morphogenetic protein signaling in limb outgrowth and patterning. *Dev Growth Differ* 49: 455-468.
- Ros MA. 2016. HOX13 proteins: the molecular switcher in Hoxd bimodal regulation. *Genes Dev* 30: 1135-1137.
- Ros MA, Lopez-Martinez A, Simandl BK, Rodriguez C, Izpisua Belmonte JC, Dahn R, Fallon JF. 1996. The limb field mesoderm determines initial limb bud anteroposterior asymmetry and budding independent of sonic hedgehog or apical ectodermal gene expressions. *Development* 122: 2319-2330.
- Rosello-Diez A, Arques CG, Delgado I, Giovinazzo G, Torres M. 2014. Diffusible signals and epigenetic timing cooperate in late proximo-distal limb patterning. *Development* 141: 1534-1543.
- Rosello-Diez A, Ros MA, Torres M. 2011. Diffusible signals, not autonomous mechanisms, determine the main proximodistal limb subdivision. *Science* 332: 1086-1088.
- Rubin L, Saunders JW, Jr. 1972. Ectodermal-mesodermal interactions in the growth of limb buds in the chick embryo: constancy and temporal limits of the ectodermal induction. *Dev Biol* 28: 94-112.
- Sagai T, Hosoya M, Mizushima Y, Tamura M, Shiroishi T. 2005. Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific Shh expression and truncation of the mouse limb. *Development* 132: 797-803.
- Sagai T, Masuya H, Tamura M, Shimizu K, Yada Y, Wakana S, Gondo Y, Noda T, Shiroishi T. 2004. Phylogenetic conservation of a limb-specific, cis-acting regulator of Sonic hedgehog (Shh). *Mamm Genome* 15: 23-34.
- Saiz-Lopez P, Chinnaiya K, Campa VM, Delgado I, Ros MA, Towers M. 2015. An intrinsic timer specifies distal structures of the vertebrate limb. *Nat Commun* 6: 8108.
- Sakamoto K, Onimaru K, Munakata K, Suda N, Tamura M, Ochi H, Tanaka M. 2009. Heterochronic shift in Hox-mediated activation of sonic hedgehog leads to morphological changes during fin development. *PLoS One* 4: e5121.
- Saunders JW, Jr. 1948. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool* 108: 363-403.
- Savard P, Gates PB, Brockes JP. 1988. Position dependent expression of a homeobox gene transcript in relation to amphibian limb regeneration. *Embo j* 7: 4275-4282.

- Scherz PJ, McGlenn E, Nissim S, Tabin CJ. 2007. Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb. *Dev Biol* 308: 343-354.
- Schimmang T, Lemaistre M, Vortkamp A, Ruther U. 1992. Expression of the zinc finger gene Gli3 is affected in the morphogenetic mouse mutant extra-toes (Xt). *Development* 116: 799-804.
- Schneider I, Aneas I, Gehrke AR, Dahn RD, Nobrega MA, Shubin NH. 2011. Appendage expression driven by the Hoxd Global Control Region is an ancient gnathostome feature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 12782-12786.
- Schneider I, Shubin NH. 2013. The origin of the tetrapod limb: from expeditions to enhancers. *Trends Genet* 29: 419-426.
- Scotti M, Kherdjemil Y, Roux M, Kmita M. 2015. A Hoxa13:Cre mouse strain for conditional gene manipulation in developing limb, hindgut, and urogenital system. *Genesis* 53: 366-376.
- Scotti M, Kmita M. 2012. Recruitment of 5' Hoxa genes in the allantois is essential for proper extra-embryonic function in placental mammals. *Development* 139: 731-739.
- Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, Kato S. 1999. Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* 21: 138-141.
- Sheth R, Barozzi I, Langlais D, Osterwalder M, Nemeč S, Carlson HL, Stadler HS, Visel A, Drouin J, Kmita M. 2016. Distal Limb Patterning Requires Modulation of cis-Regulatory Activities by HOX13. *Cell Rep* 17: 2913-2926.
- Sheth R, Bastida MF, Kmita M, Ros M. 2013a. "Self-regulation," a new facet of Hox genes' function. *Dev Dyn* 243: 182-191.
- Sheth R, Bastida MF, Ros M. 2007. Hoxd and Gli3 interactions modulate digit number in the amniote limb. *Dev Biol* 310: 430-441.
- Sheth R, Gregoire D, Dumouchel A, Scotti M, Pham JM, Nemeč S, Bastida MF, Ros MA, Kmita M. 2013b. Decoupling the function of Hox and Shh in developing limb reveals multiple inputs of Hox genes on limb growth. *Development* 140: 2130-2138.
- Sheth R, Marcon L, Bastida MF, Junco M, Quintana L, Dahn R, Kmita M, Sharpe J, Ros MA. 2012. Hox genes regulate digit patterning by controlling the wavelength of a Turing-type mechanism. *Science* 338: 1476-1480.
- Shubin N, Tabin C, Carroll S. 1997. Fossils, genes and the evolution of animal limbs. *Nature* 388: 639-648.
- Shubin N, Tabin C, Carroll S. 2009. Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature* 457: 818-823.
- Small KM, Potter SS. 1993. Homeotic transformations and limb defects in Hox A11 mutant mice. *Genes Dev* 7: 2318-2328.

- Sordino P, Duboule D, Kondo T. 1996. Zebrafish *Hoxa* and *Evx-2* genes: cloning, developmental expression and implications for the functional evolution of posterior Hox genes. *Mech Dev* 59: 165-175.
- Sordino P, van der Hoeven F, Duboule D. 1995. Hox gene expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits. *Nature* 375: 678-681.
- Soriano P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21: 70-71.
- Spitz F, Gonzalez F, Duboule D. 2003. A global control region defines a chromosomal regulatory landscape containing the HoxD cluster. *Cell* 113: 405-417.
- Stephens TD, McNulty TR. 1981. Evidence for a metameric pattern in the development of the chick humerus. *J Embryol Exp Morphol* 61: 191-205.
- Stern DL. 2000. Evolutionary developmental biology and the problem of variation. *Evolution* 54: 1079-1091.
- Stratford T, Horton C, Maden M. 1996. Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud. *Curr Biol* 6: 1124-1133.
- Suemori H, Noguchi S. 2000. Hox C cluster genes are dispensable for overall body plan of mouse embryonic development. *Dev Biol* 220: 333-342.
- Summerbell D, Lewis JH, Wolpert L. 1973. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 244: 492-496.
- Sun X, Mariani FV, Martin GR. 2002. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 418: 501-508.
- Suzuki T. 2013. How is digit identity determined during limb development? *Dev Growth Differ* 55: 130-138.
- Suzuki T, Hasso SM, Fallon JF. 2008. Unique SMAD1/5/8 activity at the phalanx-forming region determines digit identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 4185-4190.
- Sweeney RM, Watterson RL. 1969. Rib development in chick embryos analyzed by means of tantalum foil blocks. *Am J Anat* 126: 127-149.
- Tabin C, Wolpert L. 2007. Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes Dev* 21: 1433-1442.
- Tabin CJ. 1989. Isolation of potential vertebrate limb-identity genes. *Development* 105: 813-820.
- Takamatsu N, Kurosawa G, Takahashi M, Inokuma R, Tanaka M, Kanamori A, Hori H. 2007. Duplicated *Abd-B* class genes in medaka *hoxAa* and *hoxAb* clusters exhibit differential expression patterns in pectoral fin buds. *Dev Genes Evol* 217: 263-273.
- Tanaka M. 2016. Fins into limbs: Autopod acquisition and anterior elements reduction by modifying gene networks involving 5'Hox, Gli3, and Shh. *Dev Biol* 413: 1-7.
- Tarchini B, Duboule D, Kmita M. 2006. Regulatory constraints in the evolution of the tetrapod limb anterior-posterior polarity. *Nature* 443: 985-988.

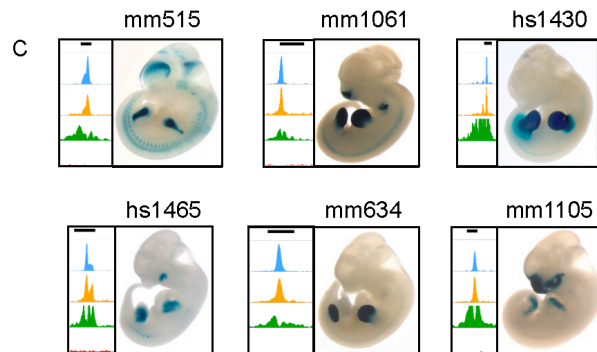
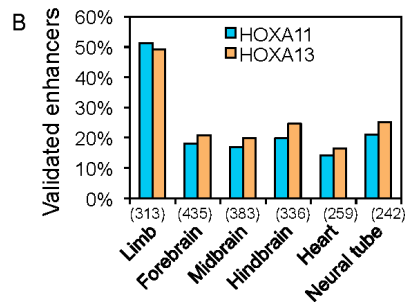
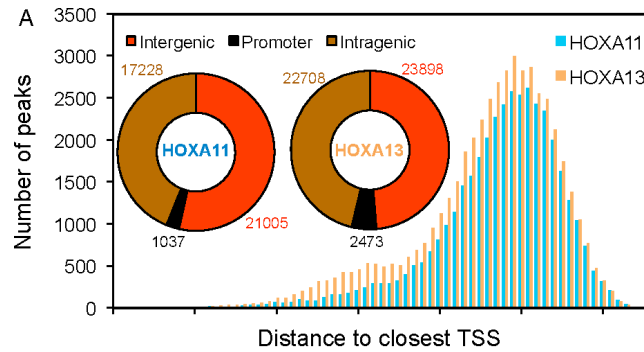
- te Welscher P, Fernandez-Teran M, Ros MA, Zeller R. 2002a. Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *Genes Dev* 16: 421-426.
- te Welscher P, Zuniga A, Kuijper S, Drenth T, Goedemans HJ, Meijlink F, Zeller R. 2002b. Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science* 298: 827-830.
- ten Berge D, Brugmann SA, Helms JA, Nusse R. 2008. Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development* 135: 3247-3257.
- Thewissen JG, Cohn MJ, Stevens LS, Bajpai S, Heyning J, Horton WE, Jr. 2006. Developmental basis for hind-limb loss in dolphins and origin of the cetacean bodyplan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8414-8418.
- Thisse C, Thisse B. 2008. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc* 3: 59-69.
- Tickle C. 1981. The number of polarizing region cells required to specify additional digits in the developing chick wing. *Nature* 289: 295-298.
- Tickle C. 2006. Making digit patterns in the vertebrate limb. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 45-53.
- Tickle C, Alberts B, Wolpert L, Lee J. 1982. Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* 296: 564-566.
- Towers M, Mahood R, Yin Y, Tickle C. 2008. Integration of growth and specification in chick wing digit-patterning. *Nature* 452: 882-886.
- Turing AM. 1952. The Chemical Basis of Morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 237: 37-72.
- Tzchori I, Day TF, Carolan PJ, Zhao Y, Wassif CA, Li L, Lewandoski M, Gorivodsky M, Love PE, Porter FD, Westphal H, Yang Y. 2009. LIM homeobox transcription factors integrate signaling events that control three-dimensional limb patterning and growth. *Development* 136: 1375-1385.
- Ulitsky I, Shkumatava A, Jan CH, Sive H, Bartel DP. 2011. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell* 147: 1537-1550.
- van der Hoeven F, Sordino P, Fraudeau N, Izpisua-Belmonte JC, Duboule D. 1996. Teleost HoxD and HoxA genes: comparison with tetrapods and functional evolution of the HOXD complex. *Mech Dev* 54: 9-21.
- Verheyden JM, Sun X. 2008. An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth. *Nature* 454: 638-641.
- Wagner GP, Chiu CH. 2001. The tetrapod limb: a hypothesis on its origin. *J Exp Zool* 291: 226-240.
- Wahba GM, Hostikka SL, Carpenter EM. 2001. The paralogous Hox genes Hoxa10 and Hoxd10 interact to pattern the mouse hindlimb peripheral nervous system and skeleton. *Dev Biol* 231: 87-102.

- Wanek N, Gardiner DM, Muneoka K, Bryant SV. 1991. Conversion by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chick wing bud. *Nature* 350: 81-83.
- Wang B, Fallon JF, Beachy PA. 2000. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100: 423-434.
- Wellik DM, Capecchi MR. 2003. Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* 301: 363-367.
- Williams ME, Lehoczy JA, Innis JW. 2006. A group 13 homeodomain is neither necessary nor sufficient for posterior prevalence in the mouse limb. *Dev Biol* 297: 493-507.
- Witte F, Chan D, Economides AN, Mundlos S, Stricker S. 2010. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2) and Indian hedgehog regulate digit outgrowth mediated by the phalanx-forming region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14211-14216.
- Wolpert L. 1969. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* 25: 1-47.
- Woltering JM, Duboule D. 2010. The origin of digits: expression patterns versus regulatory mechanisms. *Dev Cell* 18: 526-532.
- Woltering JM, Noordermeer D, Leleu M, Duboule D. 2014. Conservation and divergence of regulatory strategies at hox Loci and the origin of tetrapod digits. *PLoS Biol* 12: e1001773.
- Woltering JM, Vonk FJ, Muller H, Bardine N, Tudu IL, de Bakker MA, Knochel W, Sirbu IO, Durston AJ, Richardson MK. 2009. Axial patterning in snakes and caecilians: evidence for an alternative interpretation of the Hox code. *Dev Biol* 332: 82-89.
- Xu B, Hrycaj SM, McIntyre DC, Baker NC, Takeuchi JK, Jeannotte L, Gaber ZB, Novitsch BG, Wellik DM. 2013. Hox5 interacts with Plzf to restrict Shh expression in the developing forelimb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 19438-19443.
- Xu B, Wellik DM. 2011. Axial Hox9 activity establishes the posterior field in the developing forelimb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 4888-4891.
- Xu X, Weinstein M, Li C, Naski M, Cohen RI, Ornitz DM, Leder P, Deng C. 1998. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* 125: 753-765.
- Yang Y, Drossopoulou G, Chuang PT, Duprez D, Marti E, Bumcrot D, Vargesson N, Clarke J, Niswander L, McMahon A, Tickle C. 1997. Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* 124: 4393-4404.
- Yashiro K, Zhao X, Uehara M, Yamashita K, Nishijima M, Nishino J, Saijoh Y, Sakai Y, Hamada H. 2004. Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb. *Dev Cell* 6: 411-422.
- Yelon D, Horne SA, Stainier DY. 1999. Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish. *Dev Biol* 214: 23-37.
- Zakany J, Duboule D. 1999. Hox genes in digit development and evolution. *Cell Tissue Res* 296: 19-25.



- Zakany J, Duboule D. 2007. The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev* 17: 359-366.
- Zakany J, Fromental-Ramain C, Warot X, Duboule D. 1997. Regulation of number and size of digits by posterior Hox genes: a dose- dependent mechanism with potential evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13695-13700.
- Zakany J, Kmita M, Duboule D. 2004. A dual role for Hox genes in limb anterior-posterior asymmetry. *Science* 304: 1669-1672.
- Zakany J, Zacchetti G, Duboule D. 2007. Interactions between HOXD and Gli3 genes control the limb apical ectodermal ridge via Fgf10. *Dev Biol* 306: 883-893.
- Zeller R, Lopez-Rios J, Zuniga A. 2009. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat Rev Genet* 10: 845-858.
- Zhu J, Nakamura E, Nguyen MT, Bao X, Akiyama H, Mackem S. 2008. Uncoupling Sonic hedgehog control of pattern and expansion of the developing limb bud. *Dev Cell* 14: 624-632.
- Zhulyan O, Li D, Deimling S, Vakili NA, Mo R, Puvindran V, Chen MH, Chuang PT, Hopyan S, Hui CC. 2014. A switch from low to high Shh activity regulates establishment of limb progenitors and signaling centers. *Dev Cell* 29: 241-249.
- Zuniga A. 2015. Next generation limb development and evolution: old questions, new perspectives. *Development* 142: 3810-3820.
- Zuniga A, Laurent F, Lopez-Rios J, Klasen C, Matt N, Zeller R. 2012. Conserved cis-regulatory regions in a large genomic landscape control SHH and BMP-regulated Gremlin1 expression in mouse limb buds. *BMC Dev Biol* 12: 23.
- Zuniga A, Michos O, Spitz F, Haramis AP, Panman L, Galli A, Vintersten K, Klasen C, Mansfield W, Kuc S, Duboule D, Dono R, Zeller R. 2004. Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression. *Genes Dev* 18: 1553-1564.
- Zuniga A, Zeller R. 1999. Gli3 (Xt) and formin (ld) participate in the positioning of the polarising region and control of posterior limb-bud identity. *Development* 126: 13-21.

# Annexe 1 : HOXA11 et HOXA13 se lient aux régions cis-régulatives actives dans le bourgeon de membre



Distribution des pics HOXA11 et HOXA13 des Chip-seq réalisés avec des bourgeons de membres WT à E11.5 (A). Diagramme représentant la liaison de HOXA11 et HOXA13 au niveau des régions cis-régulatives actives (« vista enhancer browser ») dans le membre, le cerveau, le cœur et le tube neural (B). Exemples de régions cis-régulatives actives dans le bourgeon de membre et liées par HOXA11 et HOXA13 (C).

## Annexe 2 : Spécificité de HOXA11 vs HOXA13

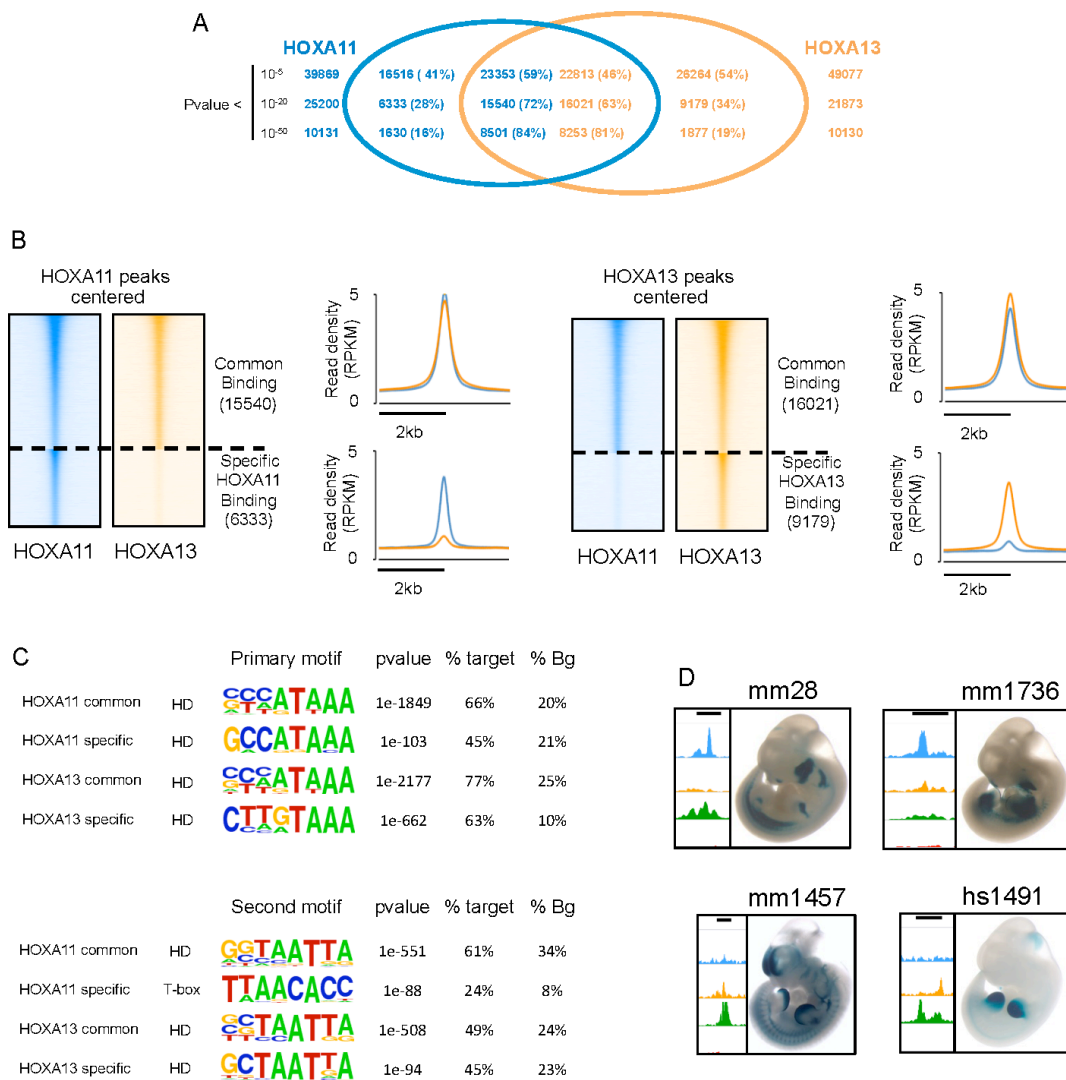


Diagramme de Venn représentant la colocalisation des pics HOXA11 et HOXA13 (A). Représentation en « heatmap » de la colocalisation des pics HOXA11 et HOXA13 montrant trois catégories de pics : communs, HOXA11 spécifique, HOXA13 spécifique et les courbes moyennes de la densité de liaison dans ces catégories (B). Motifs de liaison à l'ADN associés aux différentes catégories de pics (C). Exemples de régions cis-régulatrices actives dans la partie proximale et distale du bourgeon de membre respectivement et liées par HOXA11 et HOXA13 respectivement de façon spécifique.

**Annexe 3 : Article publié dans le journal Genesis (Scotti et al. 2015)**

## TECHNOLOGY REPORT

# A *Hoxa13*:Cre Mouse Strain for Conditional Gene Manipulation in Developing Limb, Hindgut, and Urogenital System

Martina Scotti, Yacine Kherdjemil, Marine Roux, and Marie Kmita\*

Laboratory of Genetics and Development, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Université de Montréal, Montréal Québec, Canada

Received 16 December 2013; Revised 13 May 2015; Accepted 14 May 2015

**SUMMARY:** The developing limb is a useful model for studying organogenesis and developmental processes. Although Cre alleles exist for conditional loss- or gain-of-function in limbs, Cre alleles targeting specific limb subdomains are desirable. Here we report on the generation of the *Hoxa13*:Cre line, in which the Cre gene is inserted in the endogenous *Hoxa13* gene. We provide evidence that the Cre is active in embryonic tissues/regions where the endogenous *Hoxa13* gene is expressed. Our results show that cells expressing *Hoxa13* in developing limb buds contribute to the entire autopod (hand/feet) skeleton and validate *Hoxa13* as a distal limb marker as far as the skeleton is concerned. In contrast, in the limb musculature, Cre-based fate mapping shows that almost all muscle masses of the zeugopod (forearm) and part of the triceps contain *Hoxa13*-expressing cells and/or their descendants. Besides the limb, the activity of the Cre is detectable in the urogenital system and the hindgut, primarily in the epithelium and smooth muscles. Together our data show that the *Hoxa13*:Cre allele is a useful tool for conditional gene manipulation in the urogenital system, posterior digestive tract, autopod and part of the limb musculature. genesis 53:366–376, 2015. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** genetics; process; mammal; organism; organogenesis; process; fate specification; process; limb/wing/appendage; tissue; muscle; tissue; skeletal; tissue; reproductive; tissue; gut; tissue

## INTRODUCTION

The Hox family of transcription factors plays a key role in the establishment of the body architecture (Iimura

and Pourquie, 2007; Kmita and Duboule, 2003; Krumlauf, 1994; Young and Deschamps, 2009). In the course of evolution, *Hox* genes have been repetitively recruited to achieve novel functions, as illustrated with their role in vertebrate limb morphogenesis (Zakany and Duboule, 2007). In mammals, there are 39 *Hox* genes organized in four clusters, referred to as *HoxA*, *B*, *C*, and *D*. Each *Hox* cluster contains a series of 9 to 11 contiguous genes transcribed from the same DNA strand, thus defining a 5' to 3' polarity to the cluster. *Hoxa13* is the most 5' member of the *HoxA* cluster. In the mouse, its expression is first detected at embryonic day 7.5 (E7.5) in the allantois (Scotti and Kmita, 2012; Shaut *et al.*, 2008), an epiblast derivative located in the exocoelom. At E9.5, *Hoxa13* mRNA is observed in the tail bud, and by E10 in the distal posterior region of the developing forelimb bud mesenchyme (Haack and Gruss, 1993). A similar expression pattern is detected in the hindlimb by E11. Subsequently, *Hoxa13* expression domain in the limb encompasses the mesenchyme of the entire presumptive autopod (hand/foot) and by

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Yacine Kherdjemil and Marine Roux contributed equally to this work.

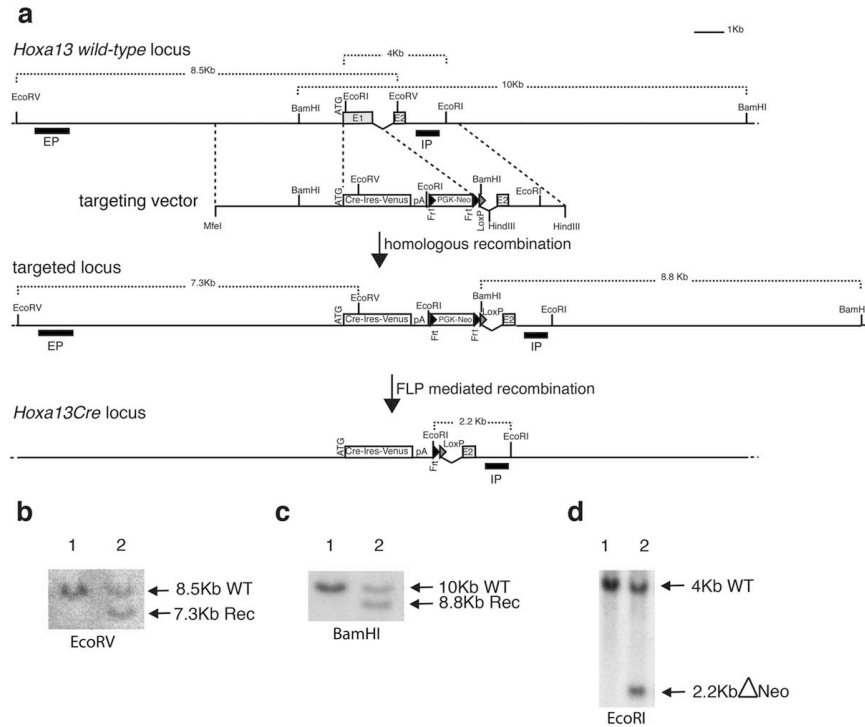
\*Correspondence to: Marie Kmita, Laboratory of Genetics and Development, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), 110 avenue des Pins Ouest, H2W1R7, Université de Montréal, Montréal Québec, Canada. E-mail: Marie.Kmita@ircm.qc.ca

Contract grant sponsor: Canadian Institute for Health Research, Contract grant number: MOP-126110; Contract grant sponsors: Canada Research Chair program (to M.K.) and Molecular Biology Program of the University of Montréal (to M.S. and Y.K.).

Published online 30 May 2015 in

Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/dvg.22859

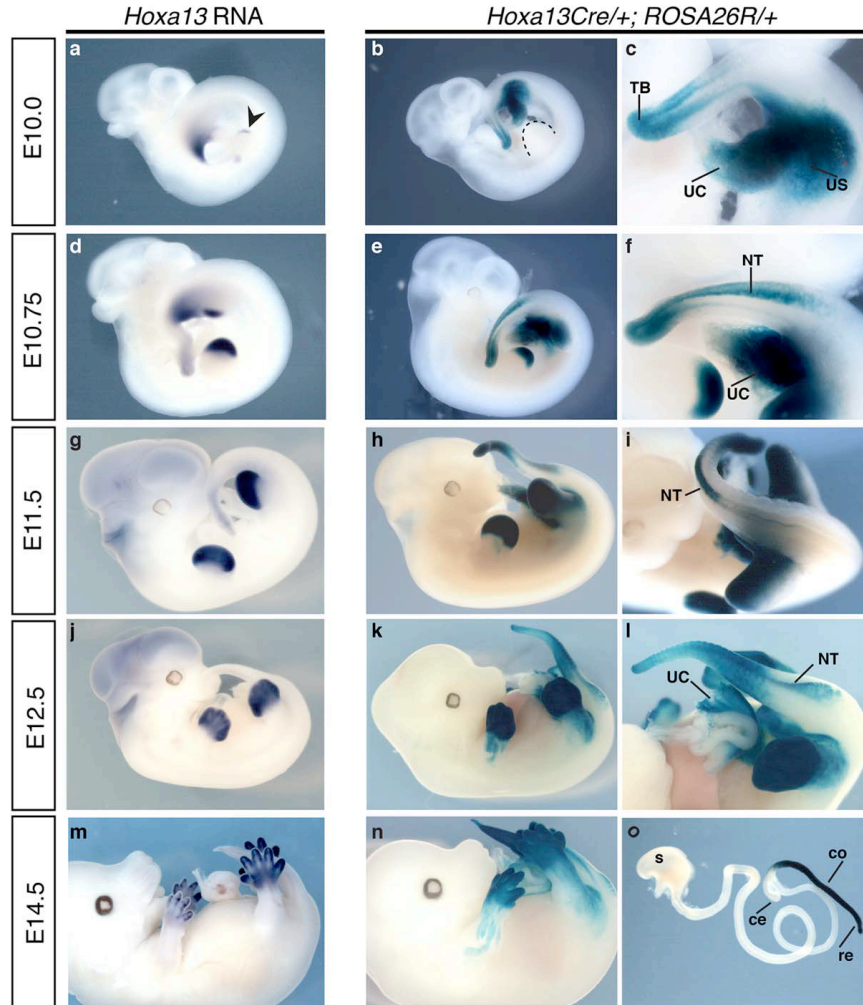


**FIG. 1.** Generation of the *Hoxa13:Cre* mouse line. **(a)** Targeting of the endogenous *Hoxa13* locus. (Top) Wild-type *Hoxa13* locus. The targeting vector is shown below and dotted lines indicate the position of the homologous arms. (Middle) Scheme of the targeted locus after homologous recombination in ES cells. The position of the internal (IP) and external probes (EP) and restriction sites used for Southern analysis are indicated. (Bottom) The targeted locus after FLP-mediated deletion of the PGK-Neo selection cassette. **(b)** Southern blots of ES clones using the external probe and **(c)** the internal probe to detect the targeted allele (lane 2). **(d)** Southern blot analysis of wild type (lane 1) and heterozygous (lane 2) mice after in vivo FLP-mediated deletion.

E14, it becomes restricted to peridigital tissue and inter-articular condensations of digits (Stadler *et al.*, 2001). A fainter *Hoxa13* expression is also found in the zeugopod (forearm) and stylopod (arm), in a domain corresponding to the developing musculature (Yamamoto and Kuroiwa, 2003). Finally, *Hoxa13* is expressed in the genital bud starting from E11.5, and at E14 in the urogenital system and gastrointestinal tract (Warot *et al.*, 1997).

In mouse, *Hoxa13* loss of function is embryonic lethal at mid-gestation due to impaired development of the vasculature within the placental labyrinth (Fromental-Ramain *et al.*, 1996; Scotti and Kmita, 2012; Shaut *et al.*, 2008). Mutant embryos also display a severely defective urogenital system, characterized by hypoplasia of the urogenital sinus and abnormal localization of ureters extremities (Warot *et al.*, 1997). In the limb, inactivation of *Hoxa13* causes defects in the autopod,

including the lack of digit 1, shortening and malformation of the other digits and fusion of the interdigital tissue (Fromental-Ramain *et al.*, 1996; Perez *et al.*, 2010). The autopod phenotype of *Hoxa13*<sup>-/-</sup> mutants is, at least in part, due to cell adhesion defects in cartilage condensations and reduced apoptosis in the interdigital tissue (Knosp *et al.*, 2004; Salsi and Zappavigna, 2006; Stadler *et al.*, 2001). *Hoxa13*<sup>-/-</sup> mutants have also defects in the placenta and this phenotype is associated with *Hoxa13* expression in the allantois (Scotti and Kmita, 2012), which contains precursor cells of the fetal vasculature of the placenta. Such delay between gene expression and its functional outcome prompted us to identify all tissues and organs originating from *Hoxa13*-expressing cells. To this end, we took advantage of the loxP-Cre system to perform fate-mapping experiments and generated a novel Cre allele, in which

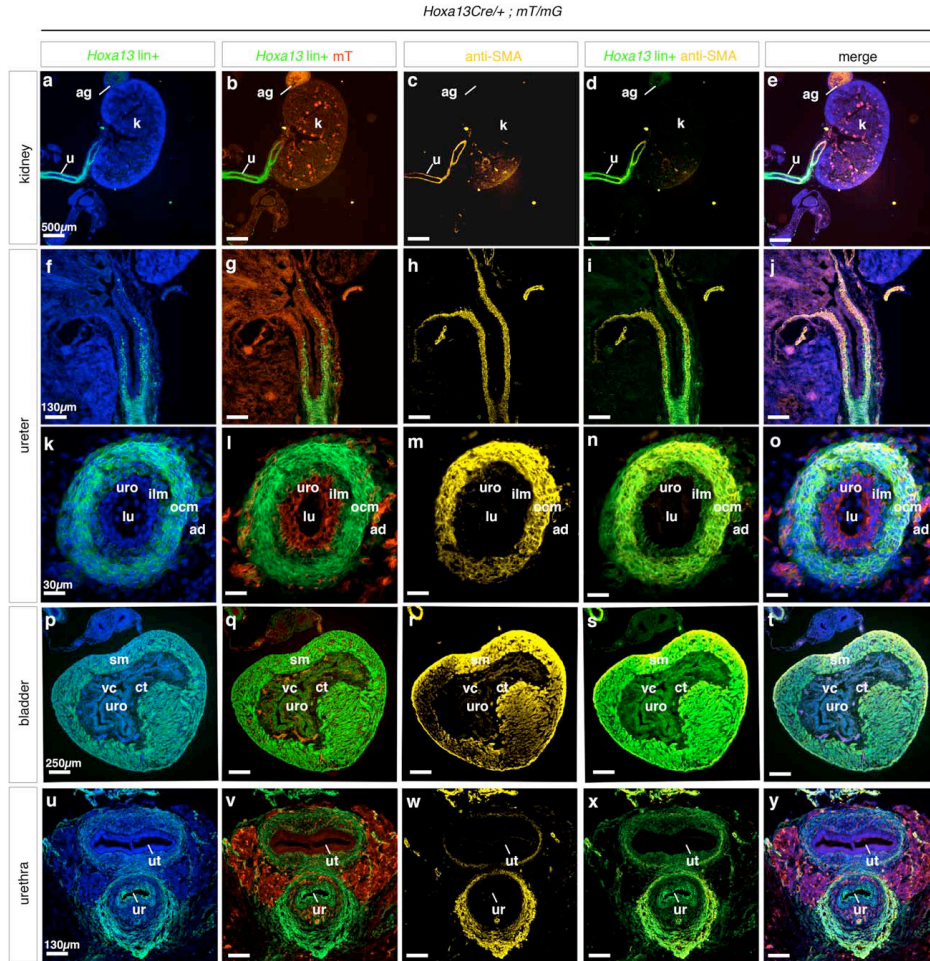


**FIG. 2.** Comparison between *Hoxa13* expression and the localization of *Hoxa13*<sup>lin+</sup> cells in the developing embryo. (a, d, g, j, m, p) Whole-mount in situ hybridization of wild-type embryos with the *Hoxa13* RNA probe. (b, c, e, f, h, i, k, l, n, o) Whole-mount X-gal staining of *Hoxa13:Cre/+; Rosa26R/+* embryos. Black arrowhead in (a) indicates *Hoxa13* expression domain in the developing limb bud. Dotted lines in (b) demarcate the forelimb bud. (o) X-gal staining of the gastro-intestinal track. TB: tail bud; UC: umbilical cord; US: urogenital sinus; NT: neural tube; s: stomach; ce: caecum; co: colon; re: rectum.

the *Cre* gene is inserted at the *Hoxa13* start codon. Here, we describe the generation of the *Hoxa13:Cre* allele and report on the fate of *Hoxa13* expressing cells. These data also reveal the tissues/organs in which the *Hoxa13:Cre* allele can be used as a tool for conditional gain- and loss-of-function.

## RESULTS AND DISCUSSION

To genetically label *Hoxa13*-expressing cells and their descendants, we targeted a *Cre:ires:Venus* cassette into the *Hoxa13* start codon via homologous recombination in ES cells (Fig. 1a). Successful targeting was confirmed

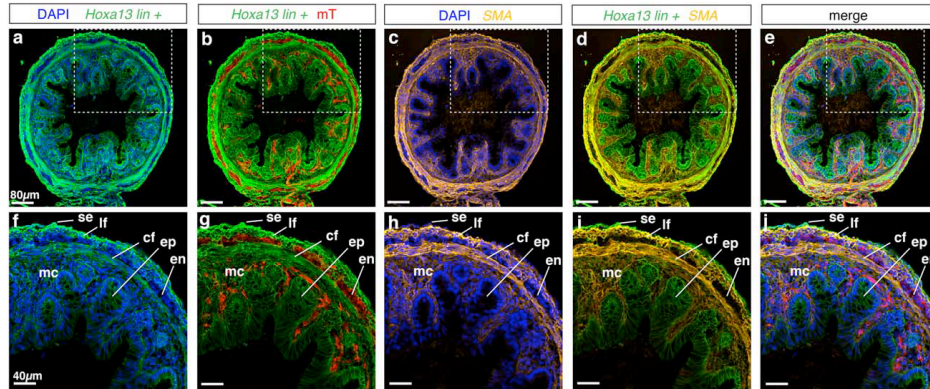


**FIG. 3.** Contribution of *Hoxa13*<sup>lin+</sup> cells to the urogenital system. (a–y) Co-immunostaining for GFP and alpha smooth muscle actin (SMA) on cryosections of E18.5 *Hoxa13Cre<sup>+/+</sup>; mT/mG* fetuses. (a–e) Frontal section showing the presence *Hoxa13*<sup>lin+</sup> cells in ureter but not to the adrenal (suprarenal) gland (ag) nor kidney (k). (f–j) Higher magnification of the proximal region of the ureter. Note the absence of *Hoxa13*<sup>lin+</sup> cells in the kidney-ureter junction. (k–o) Transverse section through the ureter. (p–t) Frontal sections of the bladder. Nuclei are stained with DAPI in panels a, f, k, p, u. *mT* (red fluorescence) is shown as a control of GFP-negative cells. ad: adventitia; ag: adrenal gland; ct: connective tissue; ilm: inner longitudinal muscular layer; k: kidney; lu: lumen; ocm: outer circular muscular layer; sm: smooth muscle; u: ureter; ur: urethra; uro: urothelium; ut: uterus; vc: vesicular cavity.

by restriction fragment length polymorphism detectable using a probe external to the targeting vector while the absence of additional random insertion was verified using an internal probe (Fig. 1b,c). Two targeted clones were injected into mouse blastocysts to generate chimeras. Following germline transmission of the *Hoxa13:Cre<sup>neo+</sup>*

allele, the neomycin selection cassette was eliminated *in vivo* by crossing *Hoxa13:Cre<sup>neo+</sup>/+* mice with *FLPeR* partners (Farley *et al.*, 2000) (Fig. 1d). *Hoxa13:Cre<sup>neo-</sup>/+* animals (*Hoxa13:Cre<sup>+/+</sup>* hereafter) are fully viable and fertile but *Hoxa13:Cre* homozygous mutants die at mid-gestation of placental defects, consistent with the





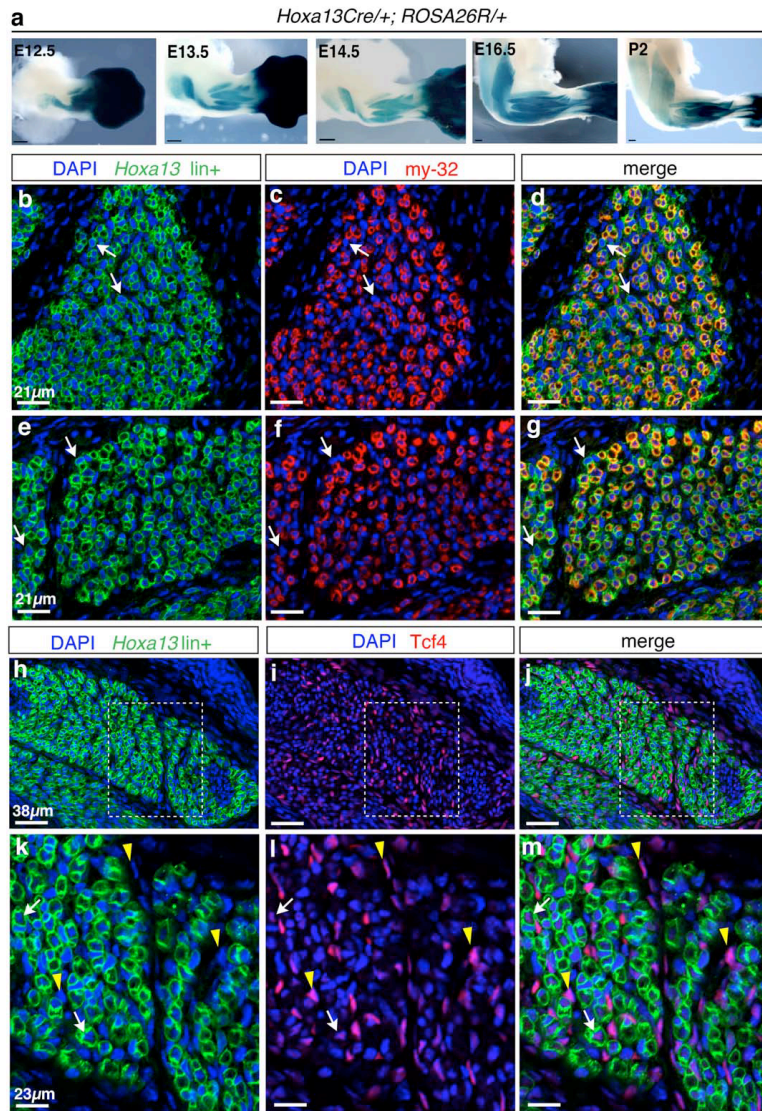
**FIG. 4.** Fate map of *Hoxa13*-expressing cells in the developing hindgut. (a–j) Transverse section of E18.5 developing colon isolated from *Hoxa13<sup>Cre/+</sup>; mT-mG<sup>+/+</sup>* embryos. (f–j) High magnification of the dotted square in panels a–e. *Hoxa13<sup>lin+</sup>* cells (green, *mT-mG*-expressing cells) are present in the serosa (se), longitudinal fibers (lf), and circular fibers (cf) (muscular coat), mucous coat (mc) and the epithelium lining the lumen (ep). en: enteric plexus.

lethality of other *Hoxa13*-null mutant previously reported (Fromental-Ramain *et al.*, 1996; Shaut *et al.*, 2008; Stadler *et al.*, 2001). While an IRES-Venus cassette was inserted downstream of the *Cre* coding sequence to directly monitor *Hoxa13-Cre* expression, we were unable to detect any fluorescence from the IRES-Venus cassette. We therefore focused our analyses on the expression of the Cre-reporter transgenes.

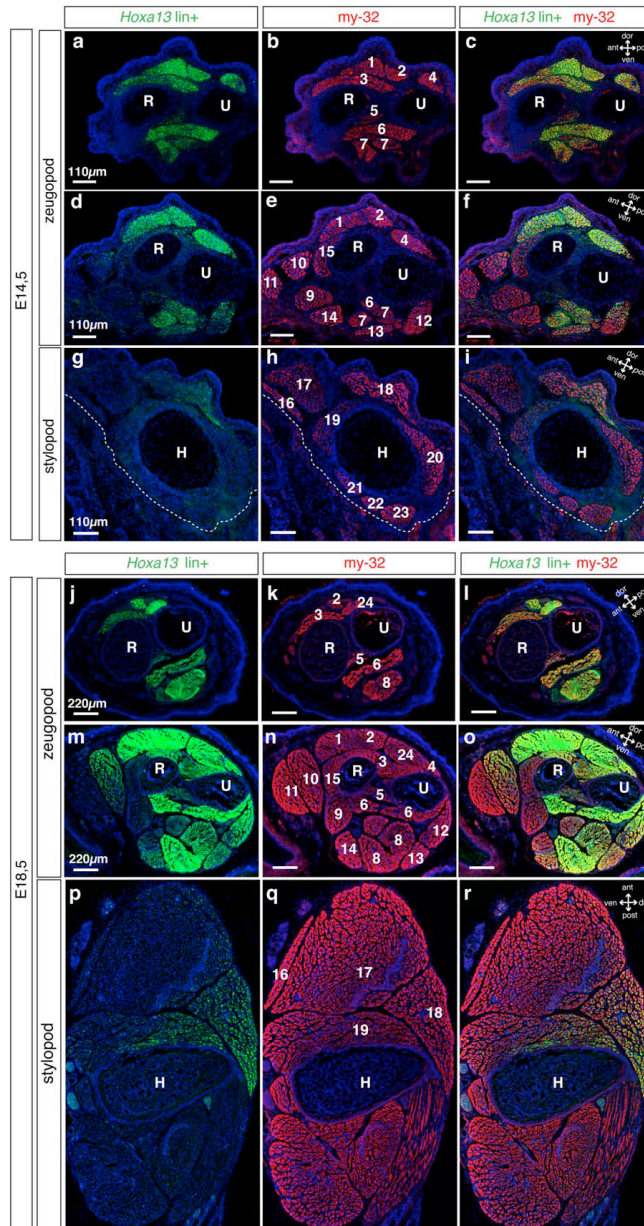
We first compared the Cre-reporter expression with *Hoxa13* expression pattern at various stages of development. For whole-mount Cre-reporter expression, we used the *Rosa26R* reporter mice (Soriano, 1999). In *Hoxa13-Cre/+; Rosa26R/+* embryos, a transcriptional stop cassette is excised in presence of the *Cre* recombinase, irreversibly activating the  $\beta$ -gal reporter expression in all *Hoxa13* expressing cells and their descendants (hereafter referred to as *Hoxa13<sup>lin+</sup>* cells). As previously reported, *Hoxa13* expression in the developing forelimb initiates at E10.0 in the distal bud (Fig. 2a, arrowhead). In contrast, X-gal staining starts to be detectable in the forelimb bud at E10.75 (Fig. 2b,e), consistent with the delay existing between the transcriptional activation of the *Cre* gene and the synthesis of the  $\beta$ -gal reporter protein (Scotti and Kmita, 2012). X-gal staining is also observed in the tail bud (Fig. 2b–c,e–f) consistent with *Hoxa13* expression (Fig. 2a,d), which is first observed in this tissue at E9.0 (not shown). Subsequently, X-gal positive cells are located in the posterior mesoderm and neural tube, with a rostral limit being more posterior in the mesoderm (Fig. 2f,i,l). *Hoxa13<sup>lin+</sup>* cells are also detected in the umbilical cord and developing genitals (Fig. 2c,f,l), reminiscent of *Hoxa13* expression in these structures (Warot *et al.*, 1997).

In order to get a more precise characterization of the fate of *Hoxa13*-expressing cells, in particular within internal organs, we generated *Hoxa13-Cre; mT-mG* embryos to analyze the Cre-reporter expression on sections. The Cre reporter *mT-mG* produces red fluorescence in cells in which the Cre has never been expressed and green fluorescence after Cre-mediated recombination (Muzumdar *et al.*, 2007). In the urogenital system, *Hoxa13<sup>lin+</sup>* cells are found posterior to the kidneys (Fig. 3a–e) in the developing ureters (Fig. 3a–j), bladder (Fig. 3p–t), urethra (Fig. 3u–y). Interestingly, *Hoxa13<sup>lin+</sup>* cells are found only in the smooth muscle compartment in the ureters (Fig. 3k–o) and uterus (Fig. 3u–y) while they are also present in the epithelium of the bladder and urethra (Fig. 3p–y). *Hoxa13<sup>lin+</sup>* cells are also observed in the gastro-intestinal tract, posterior to the caecum (Fig. 2o), although few scattered *Hoxa13<sup>lin+</sup>* cells are detectable in the caecum (Supporting Information Fig. 1). Reminiscent of the fate-map in the bladder and urethra, *Hoxa13<sup>lin+</sup>* cells are found in the epithelium lining the lumen of the developing colon (Fig. 4a,b,f,g). Co-immunostaining for GFP and smooth muscle actin also reveals that in the developing hindgut, *Hoxa13<sup>lin+</sup>* cells are located in the smooth muscle layers but not in the enteric plexus (Fig. 4b–e, g–j and Supporting Information Fig. 2).

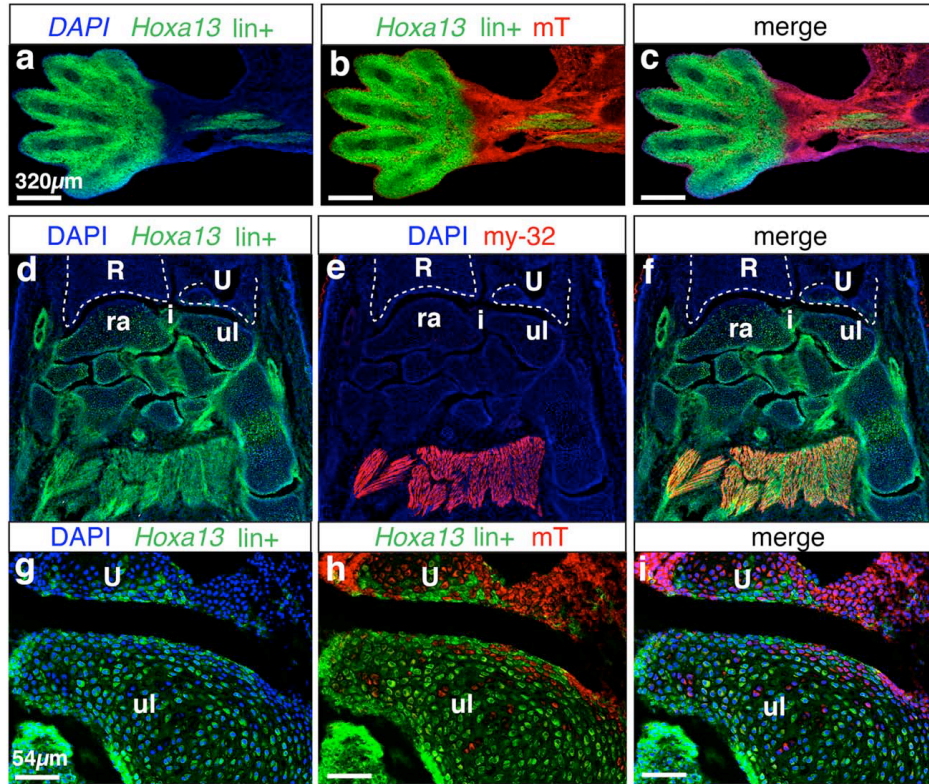
As far as the developing limb is concerned, *Hoxa13<sup>lin+</sup>* cells are initially located in the distal limb bud (Fig. 2e), similar to *Hoxa13* expression (Fig. 2d). Analysis of longitudinal sections of E10.5 limb buds shows that *Hoxa13<sup>lin+</sup>* cells are in the mesenchyme of the distal limb, but not in the ectoderm nor in blood vessels (Supporting Information Fig. 3a). From E11.5 to



**FIG. 5.** Cre reporter expression in the developing forelimb muscles. **(a)** Whole-mount X-gal staining of *Hoxa13:Cre/+;Rosa26R/+* forelimb buds from e12.5 to postnatal day 2 (P2). The Cre reporter expression is observed in the entire autopod as well as in more proximal regions of the developing limb, where its expression suggests expression in the developing limb musculature and/or associated connective tissue. Scale bars = 100 mm. **(b-g)** Co-immunostaining for GFP and fast skeletal Myosin on transverse section of the *Hoxa13:Cre/+; mT-mG/+* zeupogod at E14.5. View of the flexor digitorum sublimis **(b-d)** and extensor digitorum communis **(e-g)**. Note that there are few scattered *Hoxa13*lin+ cells that do not express fast skeletal Myosin (white arrows). **(h-m)** Co-immunostaining for GFP and Tcf4. **(h-j)** View of the extensor digitorum communis and lateralis. **(k-m)** high magnification of the dotted rectangles in panels h to j. Yellow arrowheads point to example of cells expressing Tcf4 but not GFP (i.e. cells that are not *Hoxa13*lin+ cells). White arrowheads point to the few *Hoxa13*lin+ cells that express Tcf4, though at lower level compared with the other Tcf4-expressing cells. **(n-p)** Transverse section of *Hoxa13:Cre/+; mT-mG/+* zeupogod at E14.5 showing the overall distribution of *Hoxa13*lin positive cells (*mG*-expressing cells in green) and *Hoxa13*lin negative cells (*mT*-expressing cells in red). Note the nonuniform distribution of *mG*-expressing cells, in particular in the Extensor Carpi Ulnaris (dotted rectangle), suggesting a clonal contribution of *Hoxa13*lin+ cells to the various muscles.



**FIG. 6.** Differential contribution of *Hoxa13* lin+ cells to the limb muscles. Expression pattern of GFP and fast skeletal Myosin (*my-32*) on transverse sections of *Hoxa13:Cre/+; mT-mG/+* forelimb bud at E14.5 (a-i) and E18.5 (j-r). Transverse sections through the distal (a-c; j-l) and proximal part (d-f; m-o) of the zeugopod and through the stylopod (g-i; p-r). For muscle nomenclature, see Table 1. R: radius; U: ulna; H: humerus; dor: dorsal; ven: ventral; ant: anterior; post: posterior.



**FIG. 7.** *Hoxa13*-expressing cells give rise to all bones of the autopod and mark the boundary between the wrist and the zeugopod. (a–c) Sagittal section through a E14.5 *Hoxa13:Cre/+;mT-mG/+* forelimb showing the overall distribution of *Hoxa13*lin positive cells (*mG*-expressing cells; green) and *Hoxa13*lin negative cells (*mT*-expressing cells; red). Distal is on the left and anterior is up. (d–f) Sagittal section at the autopod-zeugopod boundary of E18.5 *Hoxa13:Cre/+;mT-mG/+* forelimb. *Hoxa13*lin+ cells are visualized by direct detection of GFP fluorescence from the Cre reported allele (green) and immunostaining for my-32 (red) marks muscles. Note that all carpal bones are GFP+ and only few GFP+ cells are present in the ulna head (U). (g–i) high magnification of the ulna head (U) and ulnare (ul) showing few *Hoxa13*lin negative cells in the ulnare (*mT*-expressing cells; red) while a small cluster of *Hoxa13*lin+ cells (green) are present in the ulna head (U). Nuclei are stained with DAPI (blue). R: radius; U: ulna; ra: radiale; i: intermedium; ul: ulnare.

E12.5, *Hoxa13*lin+ cells are primarily found in the presumptive autopod although few *Hoxa13*lin+ cells are also observed in more proximal regions of the developing limb (Fig. 2h–k and Supporting Information Fig. 3b). From E12.5 onwards, the  $\beta$ -gal expression pattern in the proximal domain suggests that *Hoxa13*lin+ cells are located in the developing limb musculature, primarily in the zeugopod muscles and part of the developing triceps (Fig. 5a). Although *Hoxa13* expression in the proximal limb domain is barely detectable by whole-mount in situ hybridization, previous analysis on sections revealed expression in the developing muscles of the zeugopod and stylopod in both mice and chick

(Dolle and Duboule, 1989; Haack and Gruss, 1993; Perez *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 1998; Yamamoto and Kuroiwa, 2003). Limb muscles consist of two different components: muscle cells derived from *Pax3*-expressing myogenic progenitors that delaminate from the hypaxial dermomyotome and migrate in the limb bud and connective tissue originating from the limb mesenchyme (reviewed in e.g. (Murphy and Kardon, 2011)). The latter eventually gives rise to tendons and three layers of connective tissue that surround the muscular mass (Hasson, 2011). We thus performed immunostaining for *Pax3* on sagittal cryosections of *Hoxa13:Cre/+;mEmG* forelimbs to establish the

identity of Hoxa13lin<sup>+</sup> cells in the forming muscles. At 47-somite stage (E11.5), few isolated GFP<sup>+</sup> cells are located in the proximal limb bud (Supporting Information Fig. 4a). Co-immunostaining for Pax3 and GFP suggests that these Hoxa13lin<sup>+</sup> cells are most likely myoblasts (Supporting Information Fig. 4b,c, dotted box and arrowhead). By 53-somite stage (E12.5), there is a significant increase of GFP<sup>+</sup> cells in the dorsal pre-muscular mass (Supporting Information Fig. 4d-f and dotted boxes). To further test for the identity of the proximal Hoxa13lin<sup>+</sup> cells, we performed co-immunostaining for the Myosin Heavy Chain (my-32) and GFP on sections of E14.5 *Hoxa13:Cre/+; mT-mG* forelimbs. Analysis of both dorsal and ventral muscle masses of the zeugopod shows that a large proportion of GFP<sup>+</sup> cells also express my-32, thereby indicating that Hoxa13lin<sup>+</sup> cells contribute to the myogenic lineage (Figs. 5 and 6). Yet, we also found few Hoxa13lin<sup>+</sup> cells that do not express my-32 (Fig. 5b-g, arrows), raising the possibility that Hoxa13lin<sup>+</sup> cells also contribute to the connective tissue. We thus performed co-immunostaining for GFP and Tcf4, a marker for connective tissue, and found that the vast majority of Hoxa13lin<sup>+</sup> cells do not express Tcf4 (Fig. 5h-m). Only few scattered Hoxa13lin<sup>+</sup> cells seem to also express Tcf4 (Fig. 5k-m, white arrows). Together these data indicate that the proximal Hoxa13lin<sup>+</sup> cells are primarily part of the myogenic lineage. This result reveals a major difference between *Hoxa13* and its neighboring gene *Hoxa11*, which expression in limb muscle masses was recently shown to be restricted to the connective tissue (Swinehart *et al.*, 2013). Co-immunostaining for my-32 and GFP confirms that Hoxa13lin<sup>+</sup> cells are present in almost all muscle masses of zeugopod (Fig. 6) while in the stylopod, they are present primarily in the triceps brachii lateralis (#18 in Fig. 6p-r,g-i). Because the localization of Hoxa13lin<sup>+</sup> cells is bias toward distal muscles, the contribution of Hoxa13lin<sup>+</sup> cells to the myogenic lineage may be the consequence of a mechanism that takes place after muscle progenitors have entered the limb bud, which could be triggered by (unknown) signaling emanating from the distal limb bud.

*Hoxa13* is widely used as an autopod marker based on its expression pattern. To establish the contribution of Hoxa13lin<sup>+</sup> cells to the limb skeletal elements we examined sagittal sections of *Hoxa13:Cre/+; mT-mG/+* limbs. At E14.5, the entire autopod is formed of Hoxa13lin<sup>+</sup> cells (Fig. 7a-c) except the ectoderm and capillaries (mT<sup>+</sup> cells in Supporting Information Fig. 5). As far as the skeleton is concerned, the wrist appears to be the boundary between Hoxa13lin<sup>+</sup> and Hoxa13lin<sup>-</sup> cells. To define more precisely this limit, we analyze E18.5 limbs, which confirmed that the entire skeleton of the autopod is composed of Hoxa13lin<sup>+</sup> cells (Fig. 7d-f) with the exception of few cells in the most proximal carpal elements (Fig. 7g-i, GFP-negative,

mT-positive cells in the ulnare). In contrast, no Hoxa13lin<sup>+</sup> cell was detected in the radius, and only few Hoxa13lin<sup>+</sup> cells are found in the ulnar head (Fig. 7g-i). These results confirm the previous assumption that the autopod skeleton originates from *Hoxa13*-expressing cells. Thus, as far as skeletal elements are concerned, *Hoxa13* can be considered as a *bona fide* marker of autopod progenitors. Nonetheless, from E11.5 onwards, the contribution of *Hoxa13*-expressing cells to more proximal muscles should be taken into account when using *Hoxa13* to mark or verify the presence of cells committed to an "autopod" fate.

In summary, our study establishes the fate of *Hoxa13*-expressing cells in the developing embryo and identifies the tissues/organs in which conditional gene loss- or gain-of-function can be achieved with the *Hoxa13:Cre* allele, i.e. the autopod, the hindgut, the urogenital system posterior to the kidneys and part of the limb musculature.

## METHODS

### Generation of the *Hoxa13:Cre* Mice

To generate the targeting vector, a 5.2 kb MfeI-HindIII DNA fragment containing *Hoxa13* exon 1 and a 2.5 kb HindIII DNA fragment containing the exon 2 were ligated and inserted into a modified pBluescript SK<sup>+</sup> vector. A Cre:Ires:Venus cassette (modified from the Venus/PCS2 vector obtained from Atsushi Miyawaki) was inserted at the *Hoxa13* ATG using the Recombinering technique (Copeland *et al.*, 2001) and replaces the entire exon 1. The SV40 666bp sequence and neomycin cassette flanked by two *Frt* sites and a *loxP* site (from the PL451 plasmid obtained from N. Copeland, NCI Frederick) were added to the 3' end of the Cre:Ires:Venus cassette. The vector backbone was eliminated by PacI digest prior electroporation into R1 ES cells. Following selection with G418, approximately 400 individual ES cell clones were analyzed by Southern blot for homologous recombination. Two independent clones were injected into blastocysts obtained from C57BL/6J mice, subsequently implanted into pseudo-pregnant females. Germline transmission of the *Hoxa13:Cre* allele was obtained for both clones and the F1 offspring were intercrossed with homozygous FLP<sub>R</sub> mice (Farley *et al.*, 2000) to delete the neomycin cassette. The *Hoxa13:Cre* mouse line will be publically available upon acceptance of the manuscript. All animal experiments described in this article were approved by the Animal Care Committee of the Institut de Recherches Cliniques de Montréal (protocol #2010-03).

### Genotyping and Mating Schemes

Genotyping of ES cells, tail biopsies and yolk sacs was performed by Southern blot analysis. A scheme

with restriction sites and probes used for ES cell genotyping is presented in Figure 1. *Hoxa13:Cre* mice were genotyped using the internal probe described in Figure 1 and EcoRI digest. The *Cre* recombinase reporter lines were genotyped by PCR as previously described: *Rosa26R* (Soriano, 1999) and *mT/mG* (Muzumdar *et al.*, 2007). For fate mapping, we crossed *Hoxa13:Cre*+/+ males with *Rosa26R* or *mT/mG* homozygous females and used double heterozygous embryos and newborns.

#### Whole Mount In Situ Hybridization, X-Gal Staining, and Imaging

Whole mount in situ hybridizations were performed using previously described protocol (Kondo *et al.*, 1998) and probe (Warot *et al.*, 1997). Whole mount X-gal staining was performed using standard protocols (Zakany *et al.*, 1988). After staining, embryos and newborn specimens were washed three times for 1 h in PBS and stored in 4% PFA at 4°C. All specimens were imaged using the Leica DFC320 camera. X-gal staining was performed on a minimum of five samples per stage.

#### Immunostaining

Whole embryos and limbs were dissected in ice cold PBS and fixed 1 to 2 h in 4% PFA on ice, rinsed three times 10 min in PBS and then placed in 30% sucrose in PBS overnight. Specimens were then embedded in a 1:1 mix of 30% sucrose in PBS and Cryomatrix (Thermo Shandon). Immunostaining for my-32 (1:750, Sigma) was performed using the M.O.M kit (Vector) as in (Warot *et al.*, 1997). Immunostaining with anti Pax3 (1:250, concentrate, Developmental Studies Hybridoma Bank) was performed on 12 µm cryosections as previously described (Relaix *et al.*, 2003). Primary and Secondary antibodies used in this work are presented in Supporting Information Table 2. All images were captured using a ZEISS LSM710 confocal microscope. At least three samples per stage and 10 sections per sample were analyzed.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are particularly grateful to Qinzhang Zhu from the IRCM transgenic core facility for the ES cell work and production of chimeras. The authors thank Annie Dumouchel for technical help and Drs. Artur Kania and Maëva Luxey for critical reading of the manuscript as well as lab members for insightful discussions and sharing reagents.

#### LITERATURE CITED

Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. 2001. Recombinering: A powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet* 2:769–779.

Dolle P, Duboule D. 1989. Two gene members of the murine HOX-5 complex show regional and cell-type specific expression in developing limbs and gonads. *EMBO J* 8:1507–1515.

Farley FW, Soriano P, Steffen LS, Dymecki SM. 2000. Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. *Genesis* 28:106–110.

Fromental-Ramain C, Warot X, Messadecq N, LeMeur M, Dolle P, Chambon P. 1996. Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development* 122:2997–3011.

Haack H, Gruss P. 1993. The establishment of murine Hox-1 expression domains during patterning of the limb. *Dev Biol* 157:410–422.

Hasson P. 2011. "Soft" tissue patterning: Muscles and tendons of the limb take their form. *Dev Dyn* 240:1100–1107.

Imura T, Pourquie O. 2007. Hox genes in time and space during vertebrate body formation. *Dev Growth Differ* 49:265–275.

Kmita M, Duboule D. 2003. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science* 301:331–333.

Knosp WM, Scott V, Bachinger HP, Stadler HS. 2004. HOXA13 regulates the expression of bone morphogenetic proteins 2 and 7 to control distal limb morphogenesis. *Development* 131:4581–4592.

Kondo T, Zakany J, Duboule D. 1998. Control of colinearity in AbdB genes of the mouse HoxD complex. *Mol Cell* 1:289–300.

Krumlauf R. 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78:191–201.

Murphy M, Kardon G. 2011. Origin of vertebrate limb muscle: The role of progenitor and myoblast populations. *Curr Top Dev Biol* 96:1–32.

Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. 2007. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45:593–605.

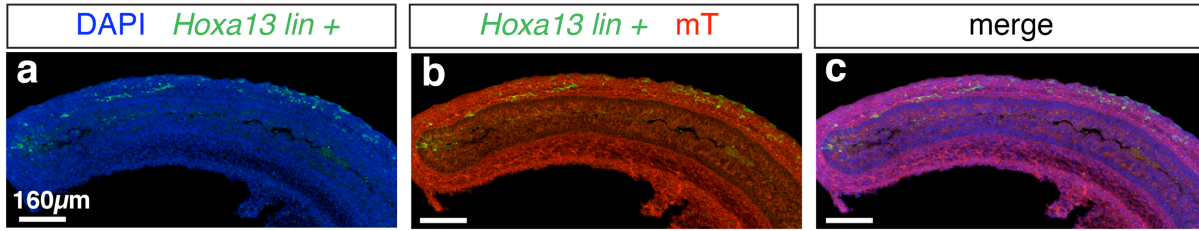
Perez WD, Weller CR, Shou S, Stadler HS. 2010. Survival of Hoxa13 homozygous mutants reveals a novel role in digit patterning and appendicular skeletal development. *Dev Dyn* 239:446–457.

Relaix F, Polimeni M, Rocancourt D, Ponzetto C, Schafer BW, Buckingham M. 2003. The transcriptional activator PAX3-FKHR rescues the defects of Pax3 mutant mice but induces a myogenic gain-of-function phenotype with ligand-independent activation of Met signaling in vivo. *Genes Dev* 17:2950–2965.

Salsi V, Zappavigna V. 2006. Hoxd13 and Hoxa13 directly control the expression of the EphA7 Ephrin tyrosine kinase receptor in developing limbs. *J Biol Chem* 281:1992–1999.

Scotti M, Kmita M. 2012. Recruitment of 5' Hoxa genes in the allantois is essential for proper extra-

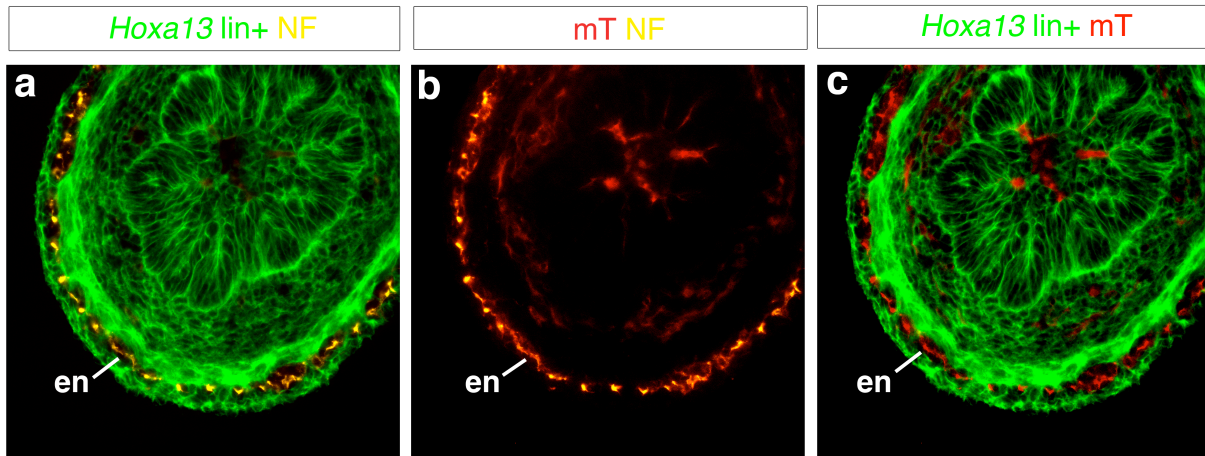
- embryonic function in placental mammals. *Development* 139:731–739.
- Shaut CA, Keene DR, Sorensen LK, Li DY, Stadler HS. 2008. HOXA13 Is essential for placental vascular patterning and labyrinth endothelial specification. *PLoS Genet* 4:e1000073.
- Soriano P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21:70–71.
- Stadler HS, Higgins KM, Capocchi MR. 2001. Loss of Eph-receptor expression correlates with loss of cell adhesion and chondrogenic capacity in Hoxa13 mutant limbs. *Development* 128:4177–4188.
- Warot X, Fromental-Ramain C, Fraulob V, Chambon P, Dolle P. 1997. Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. *Development* 124:4781–4791.
- Yamamoto M, Gotoh Y, Tamura K, Tanaka M, Kawakami A, Ide H, Kuroiwa A. 1998. Coordinated expression of Hoxa-11 and Hoxa-13 during limb muscle patterning. *Development* 125:1325–1335.
- Yamamoto M, Kuroiwa A. 2003. Hoxa-11 and Hoxa-13 are involved in repression of MyoD during limb muscle development. *Dev Growth Differ* 45:485–498.
- Young T, Deschamps J. 2009. Hox, Cdx, and anteroposterior patterning in the mouse embryo. *Curr Top Dev Biol* 88:235–255.
- Zakany J, Duboule D. 2007. The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev* 17:359–366.
- Zakany J, Tuggle CK, Patel MD, Nguyen-Huu MC. 1988. Spatial regulation of homeobox gene fusions in the embryonic central nervous system of transgenic mice. *Neuron* 1:679–691.



**Supplementary Figure 1 : Few *Hoxa13*lin+ cells are found in the caecum.**

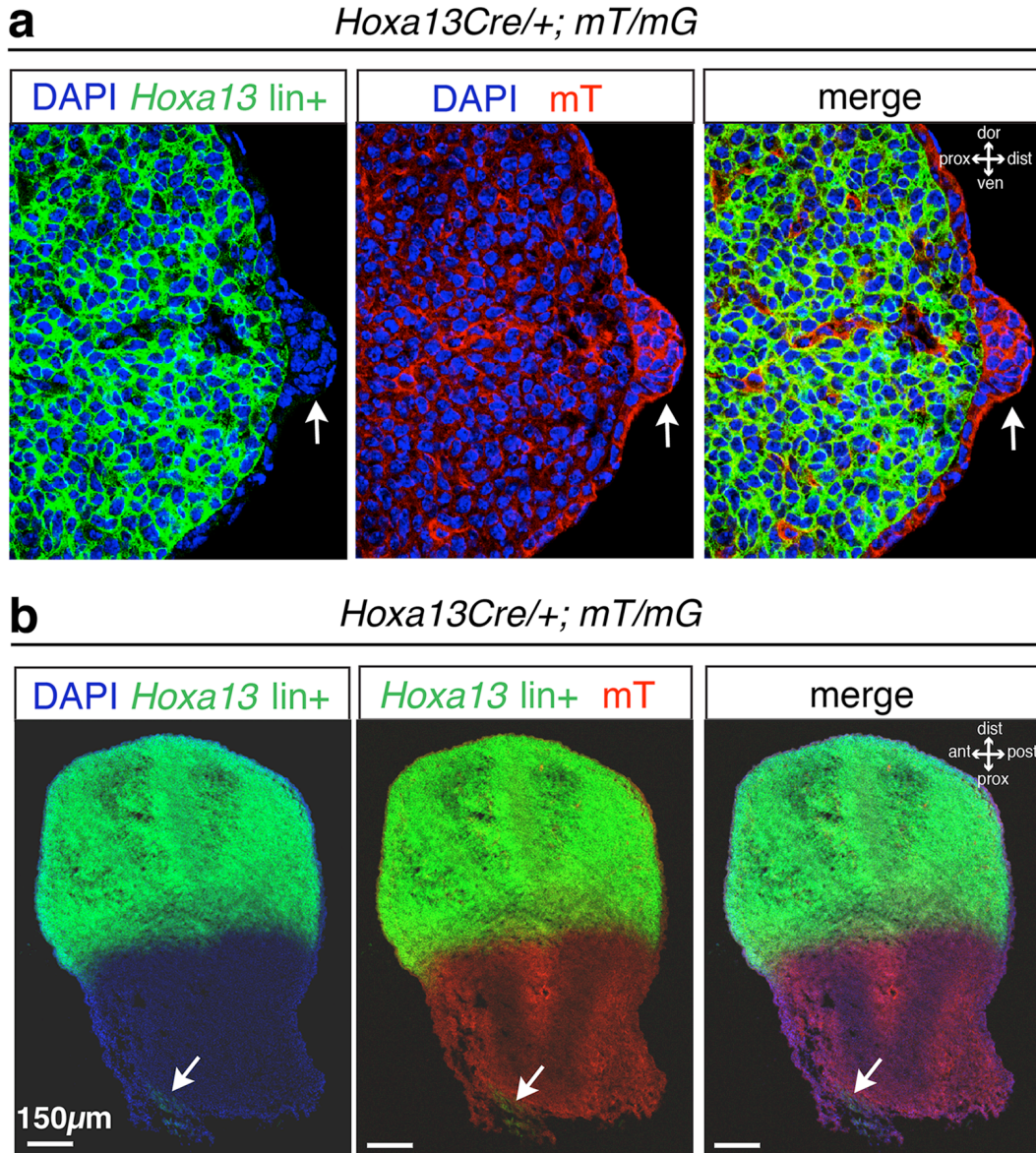
Section through *Hoxa13*Cre/+; *mT-mG*/+ caecum showing *Hoxa13*lin positive cells expressing GFP (green) and *Hoxa13*lin negative cells (*mT*-expressing cells; red). Nuclei are stained with DAPI (blue) in panel a and c. Only few *Hoxa13*lin+ cells are observed in the caecum, both in the mesenchyme and epithelium.





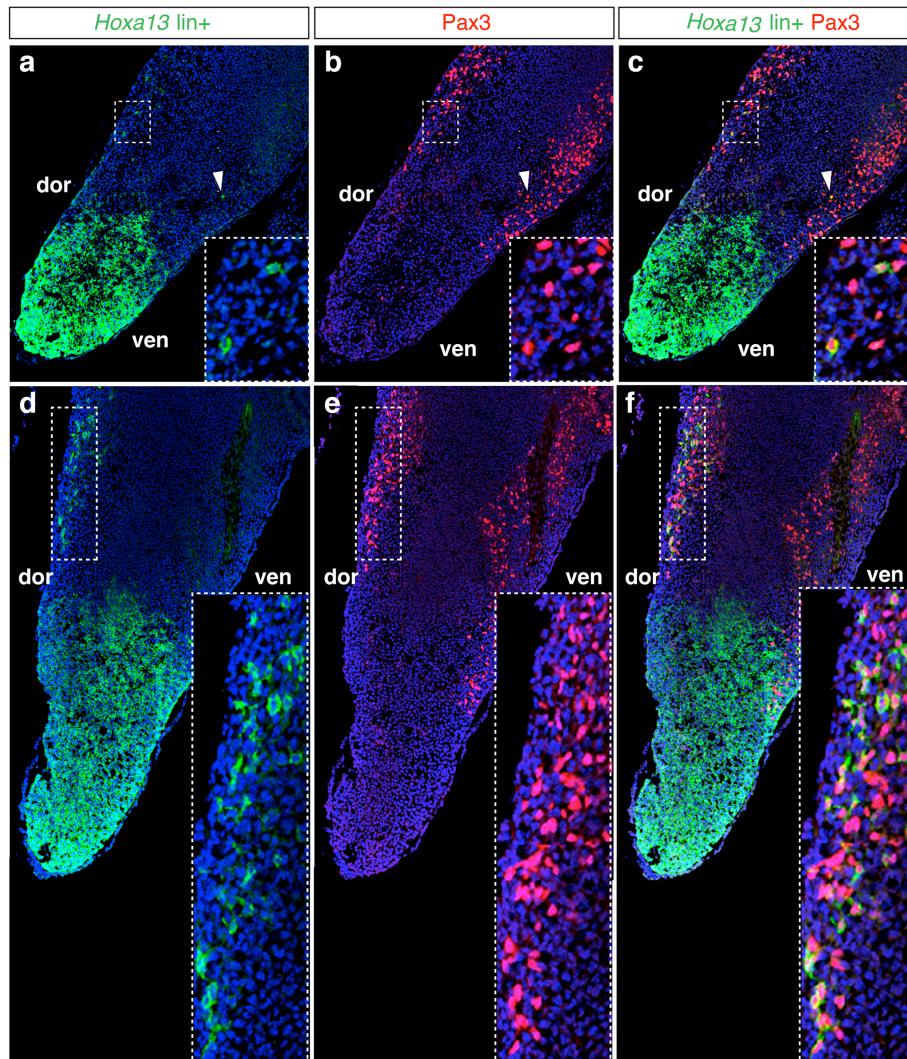
**Supplementary Figure 2: *Hoxa13*lin<sup>+</sup> cells are not found in the enteric plexus**

(a-c) Transverse section through E18.5 colon show no colocalization between the nervous system marker neurofilament (NF) and *Hoxa13*lin<sup>+</sup> cells. en: enteric plexus.



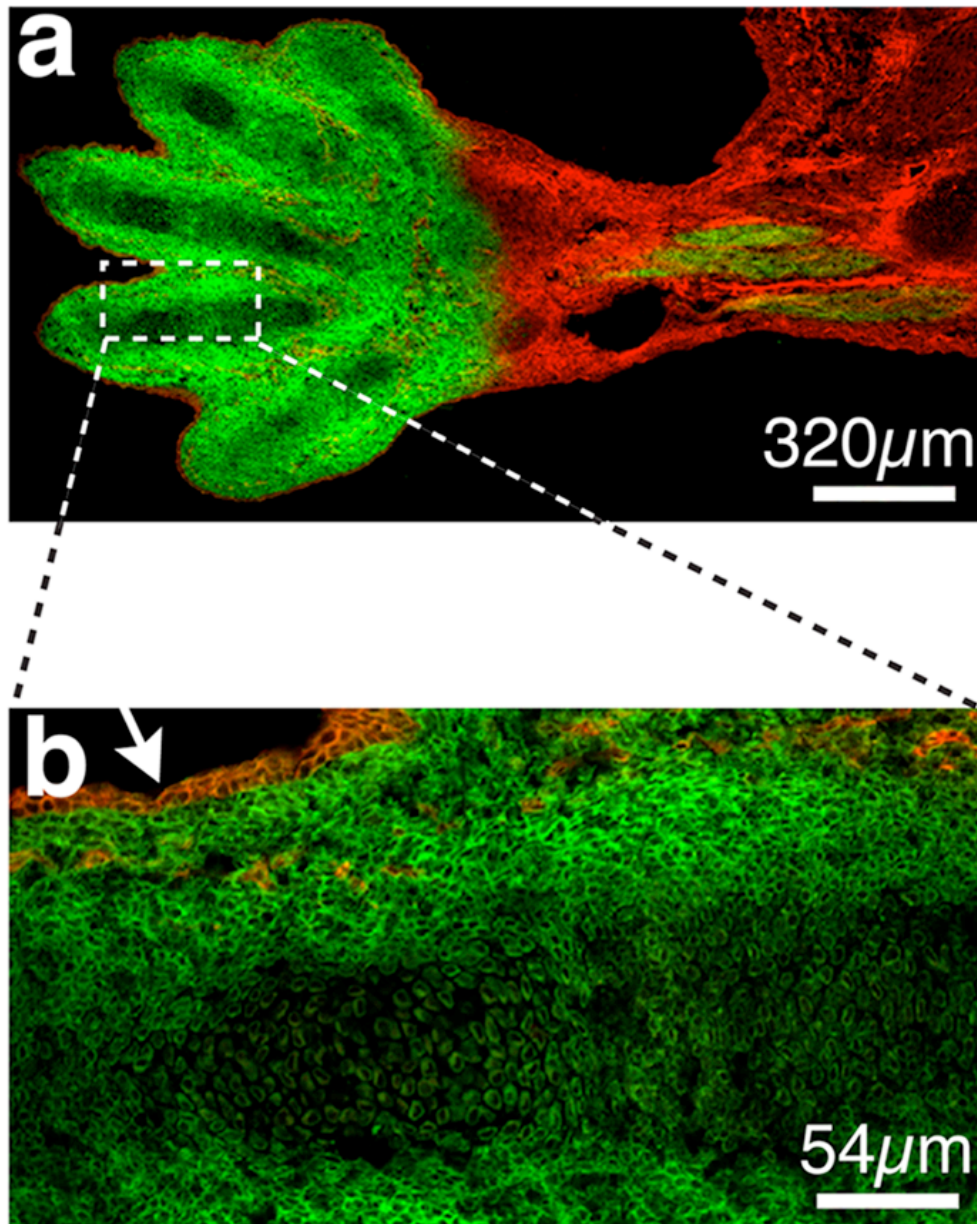
**Supplementary Figure 3: The presumptive autopod is formed of *Hoxa13*lin<sup>+</sup> cells**

(a) Longitudinal section of E10.5 *Hoxa13Cre/+; mT-mG/+* limb bud showing that *Hoxa13*lin<sup>+</sup> cells (green) form the entire distal mesenchyme while they are absent from the ectoderm and blood vessels (capillaries). Arrows point to the Apical Ectodermal Ridge. (b) Frontal section of E12.0 *Hoxa13Cre/+; mT-mG/+* limb bud. *Hoxa13*lin<sup>+</sup> cells are located in the entire mesenchyme compartment of the presumptive autopod, with a proximal limit likely at the autopod/zeugopod boundary. Note the presence of few *Hoxa13*lin<sup>+</sup> cells in the proximal domain (arrow).



**Supplementary Figure 4: *Hoxa13*lin<sup>+</sup> cells are detected within the ventral and dorsal muscle masses of the developing forelimb.**

(a-f) Immunostaining on longitudinal sections of *Hoxa13:Cre/+; mT-mG/+* forelimb bud isolated from 47- (E11.5; a-c) and 53- (E12.5; d-f) somite stage embryos with endogenous GFP staining from *mT-mG* allele (green signal targeted to the cell membrane) and anti-Pax3 (red nuclear signal). Note that no fluorescence from *mT* expression is detectable with the excitation wavelength used to detect the secondary antibody (Cy5). The arrowhead in (a-c) points to *Hoxa13*lin<sup>+</sup>/*Pax3*<sup>+</sup> double positive cell in the ventral muscular mass. Other double positive cells are shown in the higher magnification of the dotted boxes (a-f). Nuclei are stained with DAPI (blue). d: dorsal; v: ventral.



**Supplementary Figure 5 : The entire autopod skeleton is formed of Hoxa13lin+ cells.**

(a) Sagittal section through a E14.5 *Hoxa13:Cre*<sup>+/+</sup>;*mT-mG*<sup>+/+</sup> forelimb as shown in Fig. 7. (b) High magnification of the dotted rectangle in (a) showing the absence of Hoxa13lin+ cells in the ectoderm (arrow; *mT*-expressing cells) while all cells of the chondrogenic lineage are Hoxa13lin+ cells.

**Supplementary Table 1: Nomenclature of the muscles shown in Figure 6**

The nomenclature for the forelimb muscles is taken from the Mouse Limb Anatomy Atlas (Delaurier *et al.*, 2008).

<b>Muscle #</b>	<b>Muscle name</b>
1	Extensor digitorum communis
2	Extensor digitorum lateralis
3	Extensor pollicis
4	Extensor carpi ulnaris
5	Pronator quadratus
6	Flexor digitorum profundis
7	Flexor digitorum superficialis
8	Flexor digitorum sublimis
9	Supinator
10	Extensor carpi radialis brevis
11	Extensor carpi radialis longus
12	Flexor carpi ulnaris
13	Palmaris longus
14	Flexor carpi radialis
15	Pronator teres
16	Dorsoepitrichlearis brachii
17	Triceps brachii longus
18	Triceps brachii lateralis
19	Triceps brachii medialis
20	Brachialis
21	Coracobrachialis
22	Biceps brachii brevis
23	Biceps brachii longus
24	Extensor indicis propius

Primary antibody	Source	Corresponding secondary antibody
Mouse anti-My-32 1:750	M4276 - Sigma-Aldrich	Anti-mouse Dylight649
Rabbit anti-GFP 1:500	A11122 - Molecular Probes	Anti-rabbit Alexa488
Sheep anti-GFP 1 :500	4745-1051 - Serotec	Anti-sheep Alexa488
Mouse anti-SMA 1:1000	A2547 - Sigma-Aldrich	Anti-mouse Dylight649
Rabbit anti-Tcf4 1:100	2569P – Cell Signaling	Anti-rabbit Cy5
Mouse anti-Pax3	Developmental Studies Hybridoma Bank	Anti-mouse Dylight649

**Supplementary Table 2:** Antibodies Used in This Study

