



COLLÈGE  
DE FRANCE  
—1530—

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

## Cours 2025: Régulation des Gènes du Développement: Les Séquences 'Enhancer'

Amphi G. Budé les vendredis 21 février-28 mars 2025; 10h)



Anais Le Nabec, CIRB, Collège de France

@denisduboule.blsk.social

1

Denis Duboule/2025



COLLÈGE  
DE FRANCE  
—1530—

Régulation des Gènes du Développement

Collège de France; Chaire:  
Evolution du Développement et des Génomes

## Colloque 2025: 'Enhancer sequences and gene regulation' 11 avril 2025, 9h



© Raphael Kraus

2



Collège de France; Chaire:  
Evolution du Développement et des Génomes

## Cours 2025: Régulation des Gènes du Développement: Les Séquences 'Enhancer'

Cette année, le cours portera sur les développements actuels dans le domaine de la régulation des gènes du développement, en particulier les effets à grandes distances et en utilisant les technologies les plus récentes telles que les approches à hauts débits et l'apprentissage profond pour identifier et caractériser les séquences régulatrices et en comprendre la logique de fonctionnement. *Ce cours va reprendre, actualiser et compléter le cours réduit et donné en ligne en 2020 suite à la pandémie de Covid-19.*

Pendant le développement des animaux, des gènes doivent être activés (et désactivés) à des temps extrêmement précis et dans des types cellulaires particuliers. Comment cette chorégraphie peut-elle être mise en place, quels sont les signaux impliqués et comment agissent-ils pour donner les 'ordres' à tels ou tels gènes de produire leurs ARNs, à partir desquels les protéines nécessaires seront codées ? Une grande partie de cette information passe par des séquences d'ADN appelées séquences 'enhancer', localisées aux alentours des gènes en question et qui sont capables de transférer ces informations et ainsi de contrôler l'activité génique. Ce cours va considérer en détails plusieurs aspects structurels et fonctionnels de ces séquences de régulation.

3



Collège de France; Chaire:  
Evolution du Développement et des Génomes

## Cours 2025: Régulation des Gènes du Développement: Les Séquences 'Enhancer'

**Leçon #1 :** Introduction et objectifs du cours. Une brève histoire de la découverte des séquences enhancer, importance de ce nouveau concept en relation avec la notion de 'promoteur' d'un gène. Moyens (passés et récents) de détection ainsi que quelques tests fonctionnels.

**Leçon #2:** Structure et fonction de grands paysages de régulations et leur relation avec la structure de la chromatine en sous-domaines fonctionnels. Détection des régulations à grandes distances.

**Leçon #3:** Mécanismes de fonction des enhancers localisés à distance et notion d'enhanceropathies', i.e., de pathologies génétiques dues à des défauts dans les systèmes de régulations.

**Leçon #4:** Origine possible des séquences enhancer au cours de l'évolution, co-option fonctionnelle et recyclage d'éléments transposables comme séquences de régulations.

**Leçon #5:** Comment les séquences ADN des enhancer sont-elles reconnues par les facteurs protéiques qui les lient? Y a-t-il une grammaire particulière et, si oui, quelle en est la logique?

**Leçon #6:** Les comparaisons structurelles et fonctionnelles entre espèces de vertébrés sont-elles informatives sur l'origine évolutive des grands paysages de régulations?

4



Collège de France; Chaire:  
Evolution du Développement et des Génomes

## Cours 2025: Régulation des Gènes du Développement: Les Séquences 'Enhancer'

**Leçon #1** : Introduction et objectifs du cours. Le cours commencera par une série de définitions et une brève histoire de la découverte des séquences enhancer au début des années 1980. L'importance de ce nouveau concept sera discutée en particulier en relation avec la notion de 'promoteur' d'un gène, à savoir l'émergence de la possibilité de séquences qui contrôleraient non pas le démarrage simple de la transcription d'un gène (fabrication d'un ARN), mais son expression spécifique à un type cellulaire particulier. Ce cours abordera également les moyens (passés et récents) de détection de telles séquences d'ADN ainsi que quelques tests fonctionnels appliqués pour en vérifier la nature.

**Objectif du cours 2025**: L'objectif de ce cours est de donner une vision globale de la façon dont les gènes du développement (les gènes ayant une importance particulière pendant l'embryogenèse) sont régulés. Quels sont les mécanismes connus aujourd'hui et estimés comme étant les plus importants, impliqués dans l'activation de gènes particuliers à des temps précis et dans des cellules précises. Le but final étant de comprendre les quelques règles générales qui se sont dégagées des multiples études publiées sur ce sujet ces dernières années.

5



### Activer les gènes dans le temps et dans l'espace Deux questions essentielles:

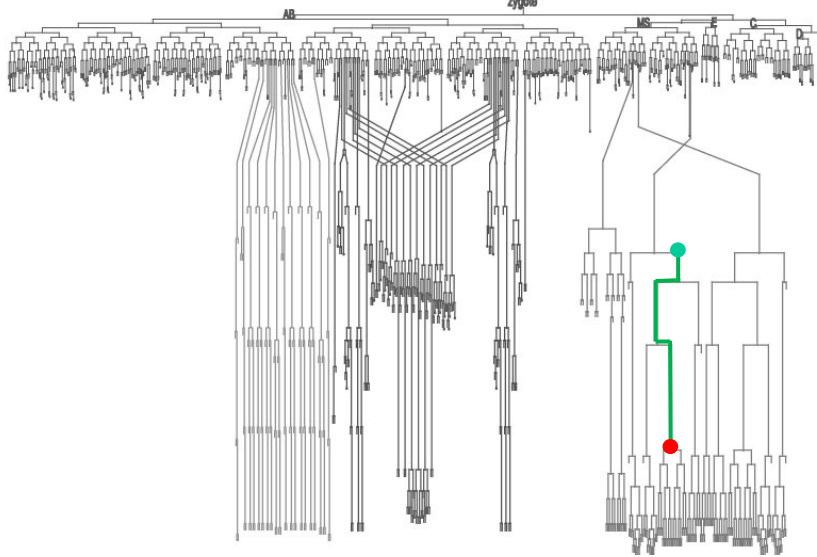
(dans le cadre général de la question de l'**équivalence génomique**)

- 1) Comment déclencher la transcription d'un gène particulier au temps  $t_1$  et l'arrêter au temps  $t_2$  de façon à ce que l'information s'insère dans la temporalité de l'embryon?
- 2) Comment déclencher la transcription d'un gène particulier dans un type cellulaire adéquat de façon à restreindre l'information à un contexte (de plus en plus) limité au cours du développement de l'embryon

6



Linéage cellulaire complet de *C. elegans* (Sulston et al.)  
(trajectoire imaginaire d'une expression génique)



7



Activer les gènes dans le temps et dans l'espace  
Deux questions essentielles:

- 1) Comment déclencher la transcription d'un gène particulier au temps  $t_1$  et l'arrêter au temps  $t_2$  de façon à ce que l'information s'insère dans la temporalité de l'embryon?
- 2) Comment déclencher la transcription d'un gène particulier dans un type cellulaire adéquat de façon à restreindre l'information à un contexte (de plus en plus) limité au cours du développement de l'embryon

**Solution: Mettre la transcription des gènes sous le contrôle de séquences d'ADN jouant le rôle d'interrupteurs' en intégrant des informations à la fois spatiales et temporelles.**

**\*Nécessité de disposer d'interrupteurs 'spécifiques' donc multiples  
(centaines de milliers chez les mammifères)**

8



### La révolution 1985-1995

1985	'Universalité' des gènes
1990	'Universalité' des principes
1995	'Universalité' des génomes



Changement de paradigme

*\*Passage d'une explication basée sur la présence ou l'absence de gènes particuliers à une explication basée sur l'utilisation différentes des mêmes gènes.*

*Difficile à intégrer à notre vue anthropocentrique (cerveau etc...) car le fonctionnement ne porte pas la même signification évolutive que la structure*

9



### La révolution 1985-1995

<i>Nématode (950 cellules):</i>	ca. 15'000 gènes
<i>Homo Sapiens:</i>	ca. 22'000 gènes

Comment alors expliquer les différences de complexité?

\*Complexification des structures géniques  
(isoformes, épissages..)

\*Diversification des fonctions géniques  
(pleïotropie, multifonctionnalité..)

\*Complexification des GRNs et de leurs interactions

10



Allan Wilson



Mary-Claire King

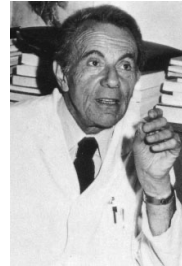
### Evolution at Two Levels in Humans and Chimpanzees

Their macromolecules are so alike that regulatory mutations may account for their biological differences.

Mary-Claire King and A. C. Wilson

11 April 1975, Volume 188, Number 4184

**SCIENCE**



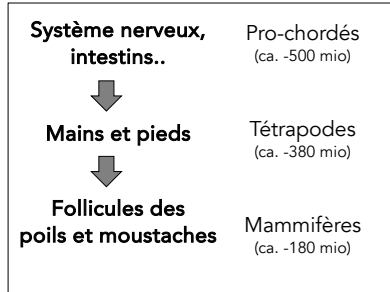
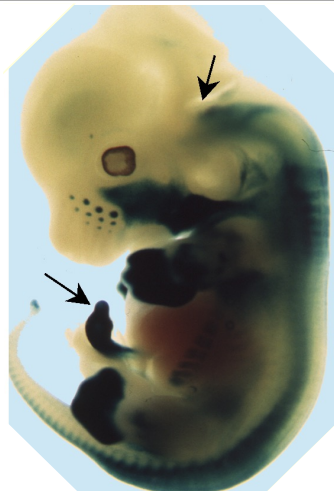
François Jacob

*'C'est une question de régulation, pas de structure !'*  
Conférence de Berkeley sur le **bricolage** de l'évolution en 1977 (Science, 1977)



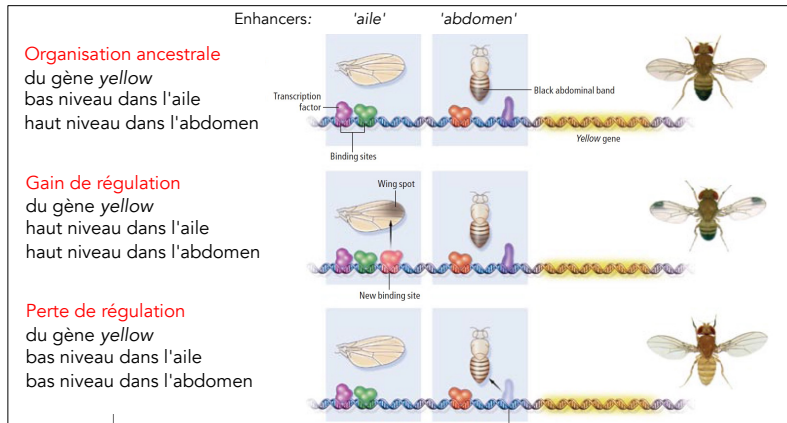
### La multifonctionnalité des gènes du développement

Un domaine d'expression 'ancestral' et des régulations additionnelles 'recrutées' (co-optées) au fil de l'évolution d'innovations structurelles (archéologie des régulations, régulations 'fossiles', récapitulation..).



Les gènes 'de développement sont régulés par des enhancers multiples qui ont une grande modularité, de telle sorte que l'expression de ces gènes peut être modifiée de façon locale, intra- ou interspécifique.

Importance des enhancers pour modifier les régulations au cours de la spéciation (évolution par changement de régulation)



Modifié de: Carroll, Prud'homme et Gompel (mai 2008) *Scientific American*

13

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

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

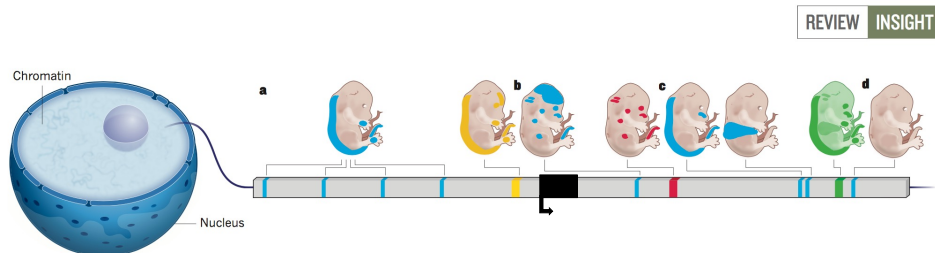
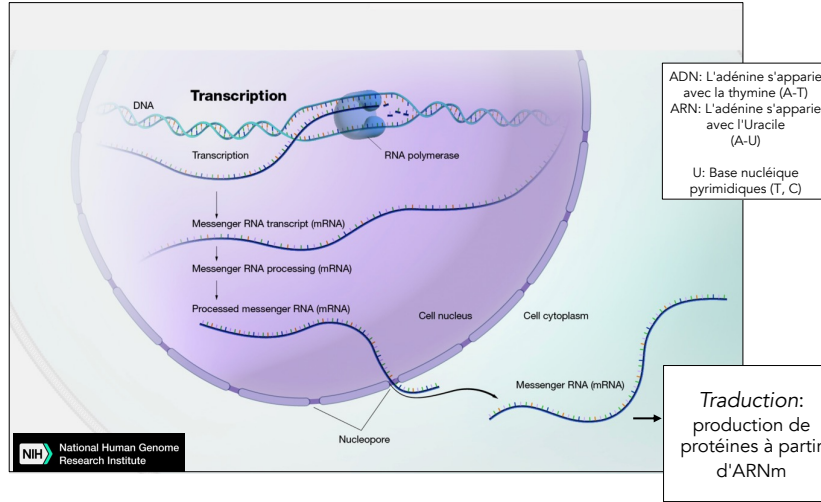


Figure 2 | The mammalian regulatory jungle.

Modifié de: de Laat and Duboule, 2013 *Nature*

14

### La transcription des gènes (produire des ARNs à partir de l'ADN)

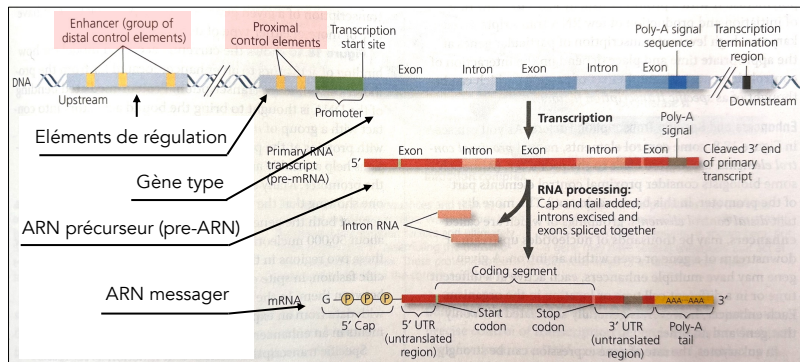


15

Biology  
A Global Approach  
TENTH EDITION  
Campbell • Reece • Urry • Cain • Wasserman • Minorsky • Jackson

GLOBAL EDITION  
10<sup>ème</sup> Edition

### Rappel de la structure d'un gène eucaryote et de l'ARN messager produit



16





## Régulation de la transcription des gènes

### 2 grandes catégories ('stratégies') de régulation:

Régulation basale de gènes dont les produits sont nécessaires de façon ubiquitaire pour le bon fonctionnement des cellules (par exemple des gènes codant pour de nombreuses enzymes nécessaires au métabolisme cellulaire –'housekeeping'-). Transcription stable, généralement à des niveaux assez faibles.

Régulation spécifique de certains gènes dont les produits sont nécessaires à des temps et dans des types cellulaires précis afin de remplir des fonctions particulières aux tissus concernés (différenciation cellulaire, développement, hormones etc). Niveaux de transcription très variables en amplitude.

17



## Régulation de la transcription des gènes

Régulation spécifique de certains gènes dont les produits sont nécessaires à des temps et dans des types cellulaires précis afin de remplir des fonctions particulières aux tissus concernés (différenciation cellulaire, développement, hormones etc). Niveaux de transcription très variables en amplitude.

D'où la nécessité de disposer d'interrupteurs moléculaires donnant une série d'instructions claires aux gènes cibles, telles que: 'En marche', 'stop', 'plus fort' 'moins fort' 'en pause' etc...

Les interrupteurs moléculaires positifs sont appelés de façon assez générique des **séquences enhancer (des enhancers)**.

18

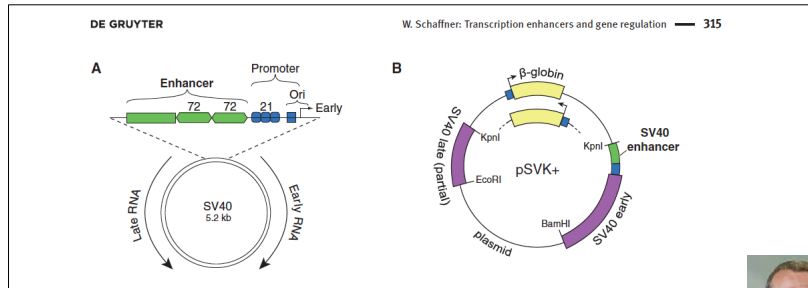


## Un bref historique (1981)

\*SV40, un virus ADN utilisé pour introduire un gène (bêta-globine) dans des cellules en culture

\*Expression (ARN) du gène amplifiée (200X) en présence en cis d'un morceau du virus

\*Ce morceau ('72bp repeat') fonctionne indépendamment de l'endroit et de l'orientation



Walter Schaffner (2015) Biol. Chem.

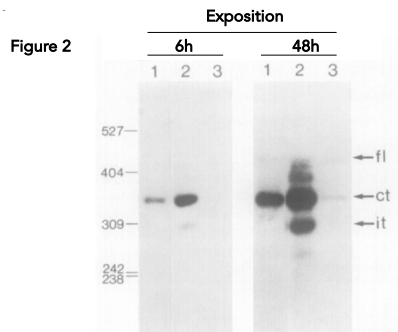
19



## Un bref historique (1981)

### Expression of a $\beta$ -Globin Gene Is Enhanced by Remote SV40 DNA Sequences

Julian Banerji, Sandro Rusconi and  
Walter Schaffner  
Institut für Molekularbiologie II  
Universität Zürich  
Hönggerberg, CH-8093 Zürich, Switzerland



- 1) Contrôle (gène de la beta-globine)
- 2) Bêta-globine + plasmide avec SV40
- 3) Bêta-globine + plasmide sans SV40

Figure 2. Detection of the Correct 5' Terminus of Globin RNA

(A) S1 nuclease mapping scheme (Weaver and Weissmann, 1979). For this experiment, a globin gene clone lacking the first intervening sequence (IVS1; see Figure 1A; Weber et al., 1981) was used as a radioactive probe (for further details see Rusconi and Schaffner, 1981). DNA end-labeled at the Bam HI site was hybridized to unlabeled RNA, treated with S1 nuclease, denatured, fractionated by gel electrophoresis and autoradiographed.

(B and C) Autoradiographs of the same gel after 6 hr and 48 hr of exposure, respectively. (Lanes 1) Hybridization to 0.2 ng rabbit  $\beta$ -globin mRNA. (Lanes 2) Hybridization to RNA from  $2.5 \times 10^6$  HeLa cells transfected with the  $\beta$ -globin-SV40-pBR322 clone pSVK+ (Figure 1C). (Lanes 3) Hybridization to RNA from the  $\beta$ -globin-gene recombinant plasmid p $\beta$ 2+, which does not contain SV40 sequences (Figure 1F). The intensity difference in the major band between lanes 2 and 3 was measured to be 200-fold. This was done by scanning a series of autoradiographs of different exposure times to minimize any nonlinear relation between radioactivity and blackening of the x-ray film.

20



## Un bref historique (1981)

Expression of a  $\beta$ -Globin Gene Is  
Enhanced by Remote SV40 DNA Sequences

Cell, Vol. 27, 299–308, December 1981

Julian Banerji, Sandro Rusconi and  
Walter Schaffner

## Summary

These studies define a class of DNA elements with a mode of action that has not been heretofore described. The activation of genes by specific enhancer elements seems to be a widespread mechanism that may be used for the regulation of gene expression.

## Discussion (fin)

The DNA in chromosomes of higher organisms seems to be organized into loop structures of 10–100 kb (Marsden and Laemmli, 1979; Razin et al., 1979), and it was speculated that these chromosome loops constitute the domains of gene activation (Bernards et al., 1979; Bernards and Flavell, 1980). Taken together it appears possible that cellular "enhancers" are activating the genes within each chromosome domain, and that classes of different "enhancers" are involved in the developmental, as well as tissue-specific, expression of genes.

Volume 9 Number 22 1981

Nucleic Acids Research

The SV40 72 base repair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants

P. Moreau, R. Hen, B. Wasylyk, R. Everett, M.P. Gaub and P. Chambon

Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes du CNRS et Unité 184 de Biologie Moléculaire et de Génie Génétique de l'INSERM, Faculté de Médecine, Institut de Chimie Biologique, 11 Rue Humann, 67085 Strasbourg, France

Received 16 October 1981

Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
Vol. 78, No. 2, pp. 943–947, February 1981  
Biochemistry

Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element of the  
early promoter

(deletion mutants/chromatin/RNA initiation/transcriptional regulation)

PETER CRUSS, RAVI DHAR, AND GEORGE KHOURY

Laboratory of Molecular Virology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20895

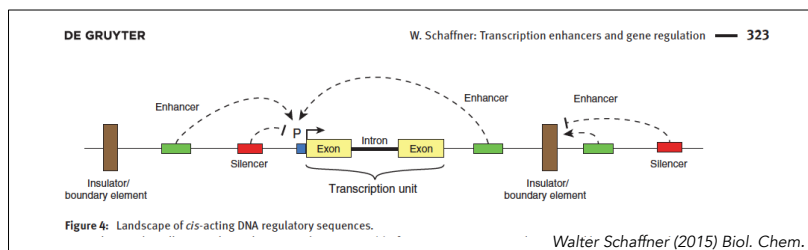
Communicated by Hilary Koprowski, November 17, 1980

'Enhancers': terme proposé par Michael Botchan (Berkeley)

21



## Un bref historique (1981)

Expression of a  $\beta$ -Globin Gene Is  
Enhanced by Remote SV40 DNA SequencesJulian Banerji, Sandro Rusconi and  
Walter SchaffnerInstitut für Molekularbiologie II  
Universität Zürich  
Hönggerberg, CH-8093 Zürich, Switzerland\*Les bases générales du concept d'enhancer' sont énoncées au début des  
années 1980\*Une séquence d'ADN qui peut agir à distance pour augmenter la  
transcription à partir d'un promoteur cible, et cela indépendamment de son  
orientation

Fonction des enhancers: Ce sont des **interrupteurs** qui décident du temps et de l'endroit où un gène particulier est activé

22



## Multifonctionnalité et Pléiotropie

**Pléiotropie:** La mutation d'un gène peut avoir des effets multiples dans différentes structures, organes ou cellules (définition génétique, maladies génétiques syndromiques..)

**Multifonctionnalité:** Un (produit de -) gène peut avoir des fonctions multiples selon les contextes mécanistiques (définition fonctionnelle).

Les enhancers permettent d'éclairer ce concept ancien

23



## Multifonctionnalité et Pléiotropie

### One Hundred Years of Pleiotropy: A Retrospective

Frank W. Stearns<sup>1</sup>

*Department of Biology, University of Maryland, College Park, Maryland 20742*

Genetics 186: 767–773 (November 2010)

McKusick, V. A., 1976 Pleiotropism. Am. J. Hum. Genet. 28: 301–302.

**1910:** Ludwig Plate, étudiant de Ernst Haeckel, Jena.

(du grec "pleion" (πλείων, plus), et tropé (τροπή, changement)

"I call a unit of inheritance pleiotropic if several characteristics are dependent upon it; these characteristics will then always appear together and may thus appear correlated"

'Je qualifie une "unité génétique" de 'pléiotropique' si plusieurs caractéristiques en dépendent; ces caractéristiques apparaîtront toujours ensemble et seront donc corrélées..' (syndromes...)

24



## Multifonctionnalité et Pléiotropie

### One Hundred Years of Pleiotropy: A Retrospective

Frank W. Stearns<sup>1</sup>

Department of Biology, University of Maryland, College Park, Maryland 20742

Genetics 186: 767–773 (November 2010)

McKUSICK, V. A., 1976 Pleiotropism. *Am. J. Hum. Genet.* **28**: 301–302.

**1938**: Hans Grüneberg (scientifique anglais en Allemagne, émigré à Londres en 1933 où il rencontre entre autres R. Goldschmidt... *Hopeful monster*, 1940)

GRUNEBERG, H., 1938 An analysis of the "pleiotropic" effects of a new lethal mutation in the rat (*Mus norvegicus*). *Proc. R. Soc. Lond. B* **125**: 123–144.

Dans cette publication (anatomie des rats), Gruneberg fait une différence entre d'une part une **pléiotropie 'authentique' (genuine)** et, d'autre part, une **pléiotropie 'infondée', fallacieuse ('spurious')**. La première implique la production de deux produits par le même locus, alors que la seconde implique un seul produit ayant des utilisations différentes.

25



## Johann Friedrich Meckel et les Syndromes

\*Anatomiste allemand principalement connu pour le 'diverticule de Meckel' et le 'cartilage de Meckel'.

\*Reconnu comme le fondateur de la tératologie, avec Etienne Geoffroy Saint-Hilaire.

\*Entre 1803 et 1805 il vient à Paris où il rencontre George Cuvier et Etienne Geoffroy Saint-Hilaire, avec qui il collabore (Isidore Geoffroy Saint-Hilaire naît en 1805...)



(Halle, 1781-1833)

\*Johann Meckel remarque que certains traits pathologiques, certaines malformations, sont parfois associés chez le même patient. Il définit ainsi le concept de 'syndrome' et donnera son nom à l'un d'entre eux (aussi appelé 'Meckel-Gruber'), qui produit une polydactylie post-axiale, une polykystose rénale et une encéphalocèle (hernie du cerveau).

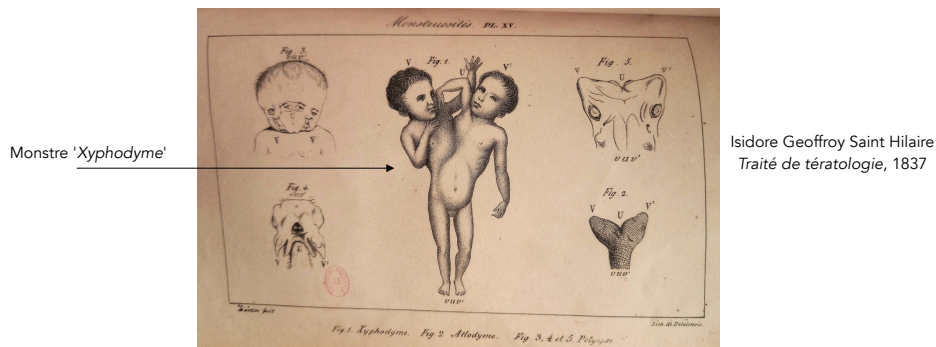
26



## Johann Friedrich Meckel et les Syndromes

\*Le concept du syndrome, donc d'associations (d'une façon ou d'une autre) entre des structures n'ayant apparemment pas d'origine commune amène naturellement à poser la question des contraintes de fabrication, donc de la *possibilité d'une impossibilité de fabrication*...

\*Meckel proposera une 'conjecture', qui sera reprise et développée quelques dizaines d'années plus tard par Isidore Geoffroy Saint-Hilaire, proposant la non-existence de 'monstres' humains tricéphales, alors que de nombreux cas de dicéphales sont décrits.



27



## Approches pour identifier des enhancers

\*Comment trouver et valider fonctionnellement des enhancers?

Historiquement:

- 1) Comparaisons de séquences
- 2) Trappes (pièges) à enhancers
- 3) Marques épigénétiques
- 4) Accessibilité de la chromatine
- 5) Contacts inter-chromatine
- 6) .....

28

### Approches pour identifier des enhancers

**\*Approche par comparaisons de séquence orthologues**

Si les fonctions sont conservées entre espèces, alors les séquences ADN des enhancers doivent l'être également (mais ce n'est pas toujours le cas...)

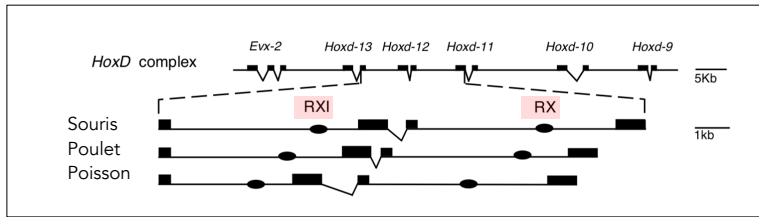
Development 132, 1669-1677 (1999).  
Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 1999  
DEV1271

1669

**Genetic analysis of a *Hoxd-12* regulatory element reveals global versus local modes of controls in the *HoxD* complex**

Yann Hérault, Johannes Beckers, Takashi Kondo, Nadine Fraudeau and Denis Duboule\*

Department of Zoology and Animal Biology, University of Geneva, Sciences III, Quai Ernest Ansermet 30, 1211 Geneva 4, Switzerland

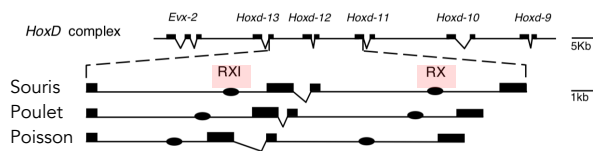


Utilisation des relations de **synténie** et d'**orthologie** pour aligner les séquences d'ADN

### Approches pour identifier des enhancers

**\*Approche par comparaisons de séquence orthologues**

Le degré de conservation des séquences ADN reflète généralement les distances évolutives



Souris	m	GGATCCTTAGACTTCCCCACCCACCCCTCTCCCGCCCCAGAGCT--GGAGGAAGAGGAGGATTGCTCTGAGAGCCGCCAATTGGTCGCCCTAACACACAATAAAG
Poulet	ck	TTATGGAAAGAAGCGGT-CACCTCGGTCTCCGGGAGAAAAAAGAGCGGAAACAAATAAGTTAATAAGGAGGAGATGCANTGGCGACATAACTCAACATAAAAA
Poisson	zf	GGATATGCAAAAGGAGGTATATCA...ATTAAAA

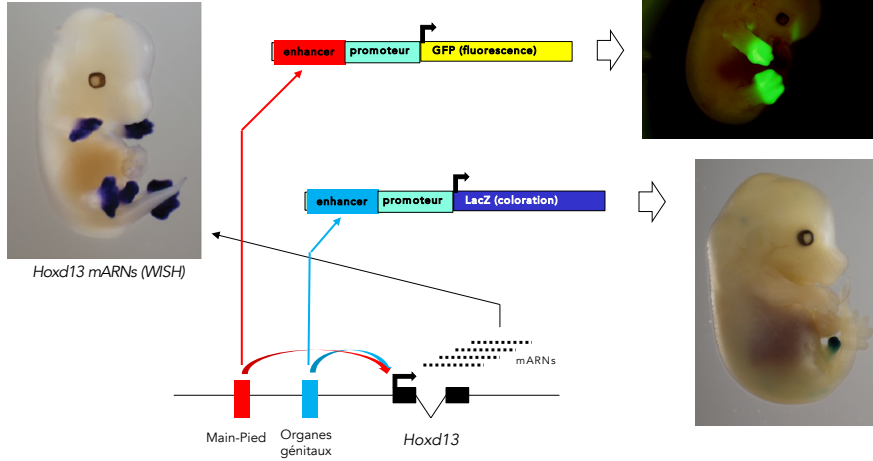
Souris	m	-TCCAGCGAGGTGTGACGCTTGCCCTC--CGCGCCCTGTGTGCTCTCTTCG-CAGAGCTGGGGCCFAACCAGTTCAGCTGGCTCATGGACATGGCTGCTTTAG
Poulet	ck	-ATTAGGGCAGCGGTCAATAATCCFCACGGACCCCTGTGTGCTCGTGTCTCAG----GGAGCCCAATGTTCAACATTTCTCCAGGCCAATGAAATTAATGC
Poisson	zf	AATTGTA----CAATGTTAATAAG



## Approches pour légitimer fonctionnellement des enhancers

WISH, Fluorescence, LacZ/beta-Gal

Transgénèse  
chez l'animal



Lonfat et al., Science, 2014; Chase Bolt, EPFL Lausanne

31



## \*Visualisation de l'activité des enhancers chez les mammifères

Développement du gène 'reporter' LacZ

The EMBO Journal vol.5 no.12 pp.3133-3142, 1986

### Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos

Joshua R.Sanes, John L.R.Rubenstein<sup>1</sup> and Jean-François Nicolas<sup>2</sup>

Department of Anatomy and Neurobiology, Washington University Medical Center, St. Louis, MO 63110, USA, and <sup>2</sup>Unité de Génétique cellulaire de l'Institut Pasteur, Unité associée CNRS 1148, 25, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

<sup>1</sup>Present address: Department of Psychiatry, Stanford Medical Center, Stanford, CA 94305, USA

Communicated by F.Jacob

32



\*Visualisation de l'activité des enhanceurs chez les mammifères  
Développement du gène 'reporter' LacZ

Introduction du gène LacZ en 1986 (virus). Ecole Parisienne (Pasteur)

The EMBO Journal vol.5 no.12 pp.3133–3142, 1986

Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos

Joshua R.Sanes, John L.R.Rubenstein<sup>1</sup> and Jean-François Nicolas<sup>2</sup>

Department of Anatomy and Neurobiology, Washington University Medical Center, St. Louis, MO 63110, USA, and <sup>2</sup>Unité de Génétique cellulaire de l'Institut Pasteur, Unité associée CNRS 1148, 25, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

<sup>1</sup>Present address: Department of Psychiatry, Stanford Medical Center, Stanford, CA 94305, USA

Communicated by F.Jacob

We show that a gene introduced into cells of mouse embryos by a retrovirus can serve as a heritable marker for the study of cell lineage *in vivo*. We constructed a defective recombinant retrovirus in which the *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*) gene is inserted in the genome of a Moloney murine leukemia virus (M-MuLV). Expression of *lacZ* was detected with a histochemical stain that can be applied to cultured cells and embryonic tissue. Infection of cultured cells showed that *lacZ* has no detectable deleterious effects on cell viability or growth, that the enzyme is stably expressed in the progeny of infected cells for many generations in the absence of selective pressure, and that the virus can induce *lacZ* in a variety of cell types. Following injection of the virus into mid-gestation mouse embryos, clones of *lacZ*-positive cells were detected in skin, skull, meninges, brain, visceral yolk sac, and amnion. We identified the cell types comprising a series of *lacZ*-positive clones in the visceral yolk sac and skin to learn the lineage relationships of the labelled cells. In each tissue, we obtained evidence that several cell types have a pluripotential ancestor and that cell fate is progressively restricted as development proceeds.

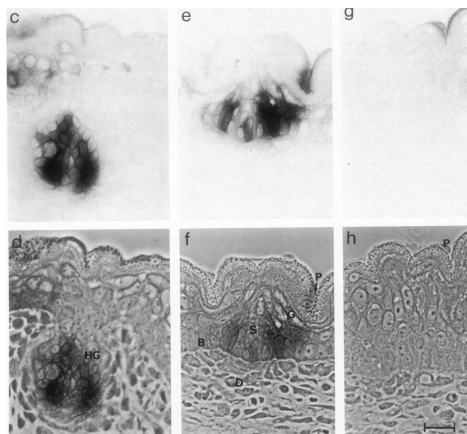
*Key words:* cell lineage/*lacZ*/retrovirus/skin/visceral yolk sac

Injection of the *lacZ* retrovirus into mouse embryos

Concentrated LZ1 virus (0.2–0.5  $\mu$ l, or a few hundred virions) was injected through the uterine wall into E7–11 embryos. Two to eight days later, the embryos and extra-embryonic membranes were dissected, fixed, and stained for *lacZ*. We began by seeking infected cells in the skin, visceral yolk sac, and amnion because these tissues are thin, flat and easy to examine as whole mounts. Table II shows that 60% of the embryos survived in-

33

\*Visualisation de l'activité des enhanceurs chez les mammifères  
Développement du gène 'reporter' LacZ



Des clones de cellules infectées par le virus portant le gène *lacZ* sont détectés dans des sections de peau. Le produit du gène reporter est transmis, stable et détectable

**Fig. 7.** Clonal analysis in the skin. (a) *LacZ*-positive cell types in 10 clones that were embedded in plastic and semi-serially cross sectioned. (b) Lineage diagram constructed from the results in (a). 'O' indicates that no hair germ was present in the tissue fragment. (c–h) Sections from clones #2 (c,d), 3 (e,f) and 10 (g,h), photographed with brightfield (c,e,g) and phase (d,f,h) optics. B, stratum basale; S, stratum spinosum; G, stratum granulosum; P, periderm; HG, hair germ; D, dermis; BL, basal lamina. Bar is 20  $\mu$ m.

Sanes et al., EMBO J. 1986

34



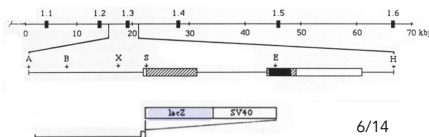
**\*Visualisation de l'activité des enhanceurs chez les mammifères**  
Développement du gène 'reporter' LacZ

\*En 1988, la Coloration *lacZ in embryo* permet de voir directement la spécificité spatio-temporelle du fonctionnement d'un gène/enhancer

Neuron, Vol. 1, 679-691, October, 1988, Copyright © 1988 by Cell Press

**Spatial Regulation of Homeobox Gene Fusions in the Embryonic Central Nervous System of Transgenic Mice**

Jozsef Zakany, Christopher K. Tuggle, Mayuri D. Patel, and M. Chi Nguyen-Huu  
Departments of Microbiology and Urology  
College of Physicians and Surgeons  
Columbia University  
New York, New York 10032



! La coloration est stable, héritable et reflète une accumulation de protéines plus qu'une activité transcriptionnelle. Elle peut être présente dans des cellules qui n'exprime plus le gène/enhancer en question.

35



**\*Visualisation de l'activité des enhanceurs chez les mammifères**  
Développement du gène 'reporter' LacZ

**Avantages:**

- \*Système extrêmement sensible
- \*Détection *in toto* mais également en sections histologiques (résolution cellulaire)
- \*Coloration très stable

**Inconvénients:**

- \*Système statique (besoin d'une fixation)
- \*Pénétration de la fixation...
- \*Coloration très stable...(avantage mais...inconvénient...)
- \*Une seule couleur...(X fluorescences..)

Les approches en fluorescence pallient ces inconvénients mais en ajoutent d'autres (ainsi que d'autres avantages tels que le tri cellulaire etc).

Ces mêmes systèmes de 'reporter' peuvent être utilisés par insertion dans un gène particulier, si l'on souhaite analyser la fonction des enhanceurs *in situ* (au vrai locus). Par exemple dans le cas d'une délétion d'enhancers..

36

*\*Des vues différentes de l'activité du même gène*

Cell. Vol. 106, 207-217, July 27, 2001, Copyright ©2001 by Cell Press

**Localized and Transient Transcription of *Hox* Genes  
Suggests a Link between Patterning  
and the Segmentation Clock**

József Zákány,<sup>1</sup> Marie Kmita,<sup>1</sup> Pilar Alarcon,<sup>1,2</sup>  
José-Luis de la Pompa,<sup>1,2,3</sup> and Denis Duboule<sup>1,4</sup>

