



HAL
open science

L'hétérochromatine comme marqueur de l'état de pluripotence : comparaison de modèles in vivo (embryons de mammifères) et in vitro (cellules souches)

Mélanie Pailles

► To cite this version:

Mélanie Pailles. L'hétérochromatine comme marqueur de l'état de pluripotence : comparaison de modèles in vivo (embryons de mammifères) et in vitro (cellules souches). Biologie de la reproduction. AgroParisTech, 2022. Français. NNT : 2022AGPT0008 . tel-03943082

HAL Id: tel-03943082

<https://pastel.hal.science/tel-03943082v1>

Submitted on 17 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de

Docteur d'AgroParisTech

Spécialité : Biologie de la Reproduction

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Mélanie PAILLES

L'hétérochromatine comme marqueur de l'état de pluripotence :

comparaison de modèles *in vivo* (embryons de mammifères) et *in vitro* (cellules souches)

Directrice de thèse : **Amélie BONNET-GARNIER**

Co-encadrante de thèse : **Alice JOUINEAU**

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 4 juillet 2022

Composition du jury :

Sébastien BLOYER, Professeur, Université Paris-Saclay

Michel COHEN-TANNOUDJI, Directeur de Recherche, CNRS (Sorbonne Université)

Jérôme DEJARDIN, Directeur de Recherche, INSERM (Montpellier)

Véronique AZUARA, Maîtresse de Conférences, Imperial College London

Clémence KRESS, Chargée de Recherche, INRAE (Université Lyon I)

Amélie BONNET-GARNIER, Chargée de Recherche (HDR), INRAE (Université Paris-Saclay)

Président

Rapporteur & Examineur

Rapporteur & Examineur

Examinatrice

Examinatrice

Directrice de thèse

Alice JOUINEAU, Chargée de Recherche, INRAE (Université Paris-Saclay)

Invitée

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, merci à mes deux super encadrantes, Amélie et Alice. Merci 1000 fois pour votre patience, pour m'avoir laissé la place de grandir en tant que « baby » chercheuse. Merci pour la liberté que vous m'avez laissé dans la gestion de ce projet, pour avoir eu confiance en moi et pour avoir su me recadrer quand il le fallait. Merci Alice de m'avoir pardonné d'avoir contaminé tes cultures alors que j'en prenais plus soin que mes propres cellules... Merci à vous deux pour nos échanges de science, merci d'avantage pour nos échanges de non-science. Merci de m'avoir soutenue et comprise quand ça allait moyen, merci pour tout mon stage de Master et toute cette aventure qu'a été ma thèse ! Merci à vous deux pour avoir répondu à mes nombreuses questions, parfois stupides, toujours avec le sourire. Merci d'avoir supporté que je finisse mes diapos de comité de thèse le jour même.

Merci aux membres du jury d'accepter d'évaluer mes travaux de thèse. Merci également aux membres de mon comité de thèse pour m'avoir suivie et conseillée pendant ces 3 ans+.

Mercis spéciaux à Sensei, Vincent et Martine. Merci d'avoir partagé votre connaissance, votre expérience et vos petits « trucs » avec moi. Merci Vincent de m'avoir autorisée à garder ta chaise ultra confort jusqu'à la fin de ma thèse (l'heure approche !). Merci à tous les 3 pour l'aide précieuse que vous m'avez donnée tout au long de ce parcours (et merci d'y avoir enlevé quelques embûches !).

Merci également à tous les membres de l'équipe EPEE qui m'avez accueillie pour ces quelques années. Merci Bernadette pour tes mots réconfortants, merci pour les danses de Noël de Thierry et Laurent, merci Cathy, Fafa, Olivier, Emilie, Sophie pour votre bonne humeur. Merci à tou.te.s ceux qui ont participé de près ou de loin à ce projet !

Merci à ma famille d'avoir toujours été présente tout au long de ces années (ainsi que celles qui ont précédées...). Merci d'avoir respecté mes choix et de m'avoir soutenue dans cette entreprise complexe. Vivement la prochaine !

Bien évidemment, 1000 gracias a mi amiga de la cueva !¹ Merci spécial à ma comparse de bureau, ma partner in (lab) crime, ma péruvienne/argentine favorite : Romina ! On s'est rencontré en toute timidité en décembre 2017 et que d'aventures vécues depuis. Merci pour notre amitié et pour ton soutien et ton écoute sans faille, merci pour tous les gros mots espagnols que j'ai eu l'occasion d'apprendre en ces quelques années ! Je n'aurai pu avoir meilleure voisine de bureau ni meilleure compagnon d'aventure. Vivement la suite !

Plus que tout, merci à mon Loutre pour m'avoir soutenue, aidée, réconfortée, nourrie ! Merci pour avoir géré les moments délicats, merci d'avoir été un pilier pendant ces presque 4 ans.

Enfin, merci à vous tou.te.s qui lisez ces mots, merci de me consacrer un peu de votre temps.

¹ traduit avec DeepL, je décline toute responsabilité en cas de traduction incorrecte

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	7
I. Génome et épigénome eucaryote	7
1. Structuration du génome dans l'espace nucléaire	8
2. Les quatre piliers de l'épigénétique.....	11
3. Le génome eucaryote et ses différents compartiments chromatinien associés .	18
II. Développement embryonnaire et pluripotence	24
1. Les principales étapes du développement précoce euthérien.....	24
2. La pluripotence : comparaison des modèles <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	32
III. Remodelage épigénétique au cours du développement précoce murin.....	36
1. Caractéristiques épigénétiques héritées de la gamétogénèse.....	36
2. Les remaniements épigénétiques : de la fécondation à la gastrulation.....	37
3. Etablissement des TADs et compaction de la chromatine au cours du développement précoce	43
4. L'hétérochromatine péricentromérique : formation des chromocentres et caractéristiques épigénétiques <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	44
OBJECTIFS	49
MATERIEL ET METHODES	50
1. Production, Collecte et Fixation des embryons	50
2. Expérimentations siRNA, culture en présence d'inhibiteurs & embryons chimères	51
3. Culture cellulaire	52

4.	Immunomarquages indirects	54
5.	Acquisition et analyses des images.....	57
RESULTATS.....		59
I.	H3K27me3 marque l'hétérochromatine péricentromérique de l'embryon murin pré-implantation et exhibe une dynamique particulière dans les cellules du lignage pluripotent	59
1.	Dynamique de H3K27me3 et de la transcription des séquences satellites majeures au cours du développement péri-implantation	59
2.	EZH2 et BEND3 s'accumulent aux chromocentres au cours du développement pré-implantation	63
3.	Les cellules souches dérivées de l'embryon sont un modèle imparfait pour l'étude des régulations épigénétiques de l'hétérochromatine péricentromérique	64
II.	Résultats complémentaires : perturber la dynamique de H3K27me3 dans le blastocyste murin	67
1.	Le Knock-Down de BEND3 au cours du développement précoce n'a pas permis de mettre en évidence l'éventuel participation de BEND3 dans le maintien de l'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres et/ou son influence sur l'expression des séquences satellites majeures	67
2.	Perturber la ségrégation spatiale des cellules de l'EPI et du PrE ne semble pas influencer sur la dynamique de H3K27me3 dans l'embryon.....	68
3.	Le profil épigénétique des chromocentres caractéristique de l'embryon n'est pas restauré dans les cellules ES lors de leur intégration dans un embryon hôte.....	69
III.	H3K27me3 et chromocentres : quid du modèle bovin ?	70
1.	H3K27me3 est juxtaposée à H3K9me3 dans l'embryon bovin.....	70
2.	H3K27me3 dans les ESCs bovines	76
DISCUSSION		77
I.	H3K27me3 marque la périphérie des chromocentres de l'embryon bovin précoce ...	77

1.	L'hétérogénéité des séquences satellites bovines est-elle à l'origine du découplage des signaux H3K9me3 et H3K27me3 aux chromocentres ?	77
2.	L'affinité de BEND3 pour l'hétérochromatine péri-centromérique n'est pas conservée dans le modèle bovin.....	79
II.	H3K27me3 et BEND3 : deux partenaires de l'hétérochromatine péri-centromérique dans l'embryon murin péri-implantation.....	79
1.	Quelle est l'importance de la localisation de H3K27me3 aux chromocentres au cours du développement murin précoce ?	79
2.	H3K27me3 est stable à l'hétérochromatine péri-centromérique	81
3.	Quel(s) rôle(s) pour H3K27me3 aux chromocentres ?	83
4.	BEND3, le couteau suisse de l'hétérochromatine péri-centromérique ?.....	84
5.	La triade BEND3, séquences satellites majeures et rDNA	86
III.	Conclusion	88
	ANNEXES.....	90
	BIBLIOGRAPHIE.....	94

LISTE DES ABREVIATIONS

cHC	Hétérochromatine constitutive
DNMT	DNA Methyl Transferase
EGA	Embryonic Genome Activation
EPI	Epiblaste
EpiSC	Cellules Souches Epiblastiques
ESC	Cellules Souches Embryonnaires
ExE	Ectoderme Extra-embryonnaire
fHC	Hétérochromatine facultative
H/KAT	Histone/Lysine Acetyl Transferase
H/KDAC	Histone/Lysine DesAcetylase
H/KDM	Histone/Lysine DeMethylase
H/KMT	Histone/Lysine Methyl Transferase
ICM	Masse Cellulaire Interne
NuRD	Nucleosome Remodelling Deacetylase
PCH	Hétérochromatine Péricentromérique
PRC1/2	Polycomb Repressive Complex 1/2
PrE	Endoderme Primitif
PTM	Modification Post-Traductionnelle
TAD	Topology Associated Domain
TE	Trophectoderme
TET	Ten Eleven Translocation
TSC	Cellules Souches Trophoblastiques
TSS	Transcription Start Site
VE	Endoderme Viscéral

INTRODUCTION

I. Génome et épigénome eucaryote

Des acaryotes aux eucaryotes, le génome d'un organisme se présente sous la forme d'une (ou plusieurs) molécule(s) d'Acide (Désoxy)RiboNucléique (ADN ou ARN) constituée d'une succession de 4 nucléotides (A, T/U, C et G). L'ADN (ou l'ARN) existe sous une grande variété de structure - simple ou double brin, circulaire ou linéaire - selon le génome et l'organisme considéré. La taille des génomes connus varie de quelques centaines de bases (859 bases pour MPCLV-SFBeef (Zhang et al., 2014), un membre de la famille des circovirus, à plusieurs dizaines de giga paires de bases (43 Gb pour *N. forsteri* (Meyer et al., 2021) - un dipneuste d'Australie - et 149 Gb pour *P. japonica* (PELLICER et al., 2010) - une plante rare du Japon -). Selon sa longueur, le génome peut être présent sous la forme d'une ou plusieurs molécules d'ADN que l'on définit alors comme chromosome. Chez les eucaryotes, le génome est contenu dans un volume restreint : celui du noyau. Chez les organismes eucaryotes pluricellulaires, un même génome est à l'origine d'une grande variété de cellules aux phénotypes et fonctions variées.

Etant contenu dans un espace délimité, la complexité et la longueur du génome des eucaryotes induisent des contraintes d'encombrement et nécessitent donc une structuration dans l'espace. En plus de cette contrainte liée à ce volume défini, le génome doit faire face à une variété d'autres contraintes allant du maintien de son intégrité à la régulation spatio-temporelle de sa transcription. Ainsi il a été démontré que le génome est organisé de façon fonctionnelle dans le noyau, selon des régions définies (Cremer and Cremer, 2001). Ceci permet les interactions entre différents éléments du génome qui peuvent être linéairement éloignés les uns des autres mais qui se retrouvent physiquement proches ou en contact dans le volume nucléaire. L'organisation fonctionnelle du génome en 3D est notamment permise par les éléments épigénétiques, qui sont un support physique d'organisation, de compaction et de régulation de la transcription du génome dans le temps et l'espace et que nous allons décrire plus avant au cours de la première partie de cette introduction.

1. Structuration du génome dans l'espace nucléaire

1) Nucléosome et chromatine

Chez les eucaryotes, l'ADN n'est pas nu dans le noyau mais présent sous la forme d'un complexe nucléoprotéique appelé chromatine dont l'unité de base est le nucléosome. La structure du nucléosome a été finement décrite par (Luger et al., 1997) : celui-ci est composé d'un octamère de protéines histones (H2A, H2B, H3 et H4) autour duquel est enroulé 147pb d'ADN (Figure 1). Plus précisément, la structure du nucléosome suit l'organisation suivante : un tétramère 2(H3+H4) est entouré de deux hétérodimères H2A+H2B (Arents et al., 1991; Klug et al., 1980) (Figure 1A).

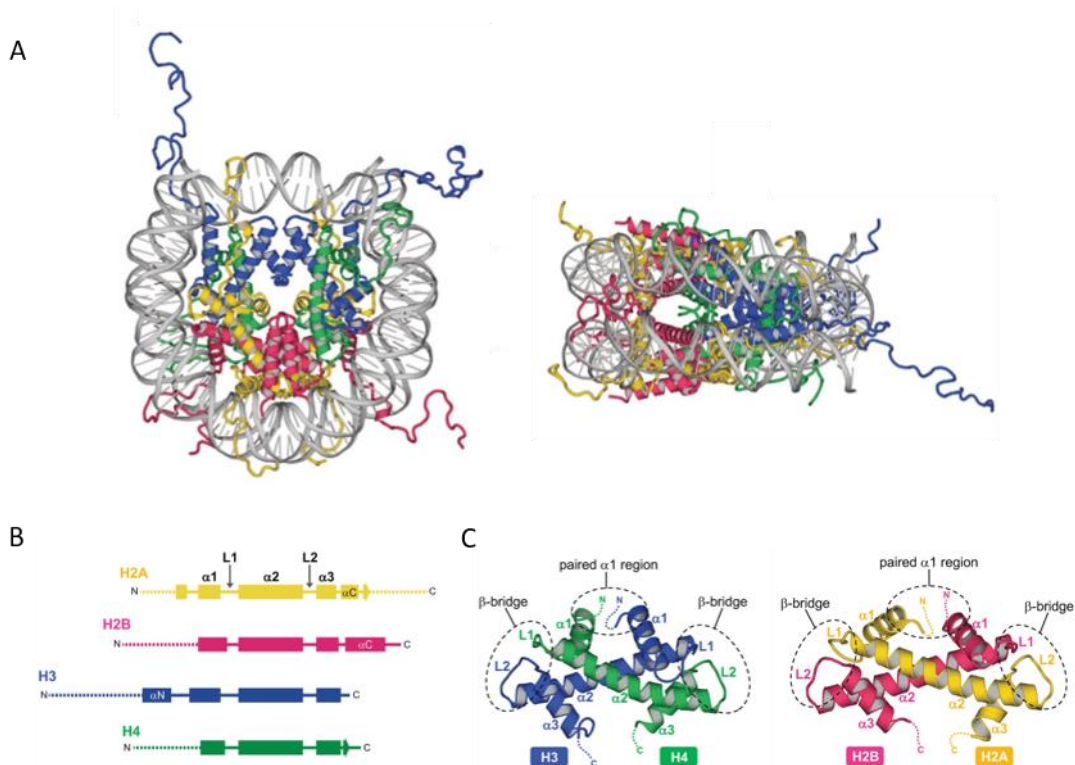


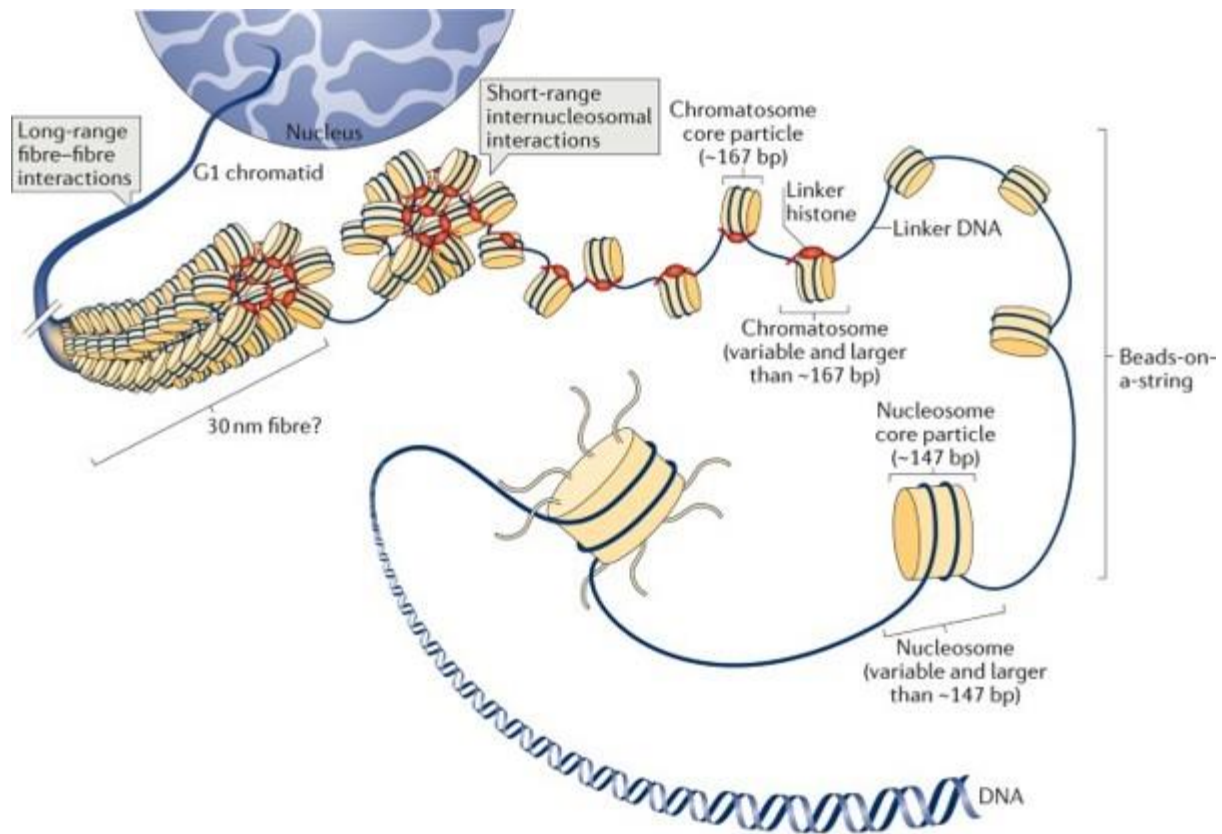
Figure 1 : Structure du nucléosome (Adapté de (Koyama and Kurumizaka, 2018)). (A) : Structure du nucléosome en 3D. (B) : Représentation schématique des gènes des histones canoniques. Les trois hélices α forment l'« histone fold domain ». (C) : Agencement des dimères H3/H4 et H2A/H2B. Les régions entourées constituent les points de contact avec la molécule d'ADN.

Le cœur de la séquence protéique des histones (core histone) est constitué de trois hélices α qui forment l'« histone fold domain » (Arents et al., 1991), communes à toutes les histones (Figure 1B). Cette région permet la formation des hétérodimères et leurs interactions (Harp

et al., 2000) (Figure 1C). Les histones interagissent directement avec l'ADN en différents points de contact (Arents and Moudrianakis, 1993) (Figure 1C). L'ensemble des queues N-ter des histones forment des extrémités flexibles à l'extérieur du nucléosome et peuvent subir des modifications post-traductionnelles - de même que l'extrémité C-ter de l'histone H2A -. Les extrémités N-ter des histones H3 et H4 participent également aux interactions entre nucléosomes adjacents (Dorigo et al., 2003; Leuba et al., 1998b, 1998a) et donc à l'organisation en 3D de la chromatine. A noter que les protéines histones ont une structure extrêmement conservée au cours de l'évolution, soulignant leur rôle prédominant dans l'organisation de l'ADN (Malik and Henikoff, 2003). En plus des quatre histones participant à la formation du nucléosome, il existe une 5^{ème} histone, H1 (ou H5 selon l'organisme considéré). H1 est une histone-linker, c.-à-d. qu'elle permet les interactions entre nucléosomes et induit leur rapprochement (Leuba et al., 1998b, 1998b). Le complexe nucléoprotéique formé par le nucléosome et H1 et les extrémités DNA-linker forment le chromatosome et couvre 167pb (Simpson, 1978).

2) Les différents niveaux d'organisation de la chromatine

L'enchaînement régulier de nucléosomes forme une sorte de collier de perle, (Kornberg, 1974) qui avait été observé avant l'élucidation de la structure du nucléosome. Ce premier niveau d'organisation de la chromatine est communément appelée fibre de 10nm (Figure 2). A partir de l'étude *in vitro* de la structuration de la chromatine en présence d'une concentration croissante de sels, il a été proposé que la fibre de 10nm se condense en fibre de 30nm, via la compaction des nucléosomes en hélice (Finch and Klug, 1976; Williams et al., 1986). Cependant, des données plus récentes *in vivo* questionnent l'existence de la fibre de 30nm comme une structure commune de la chromatine. Au sein des cellules eucaryotes, la fibre chromatinienne serait formée à partir de rassemblements irréguliers de nucléosomes (les « nucleosome clutches - (Ricci et al., 2015)). La chromatine a donc été plus largement décrite comme formant une fibre de 5 à 24nm (Ou et al., 2017).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 2 : Les différents niveaux de d'organisation de la chromatine (Fyodorov et al., 2018). Représentation schématique des différents niveaux d'organisation et de compaction de la chromatine.

A plus haut niveau, la chromatine s'organise en boucles contenues dans des domaines d'interactions préférentiels - c.-à-d. que la probabilité de contact entre séquences d'un domaine considéré sera supérieure à la probabilité de contact avec d'autres séquences du génomes - que l'on nomme TADs pour Topology Associated Domains (Dixon et al., 2012). Ces domaines sont délimités entre autres par le complexe Cohésin/CTCF (Sanborn et al., 2015), CTCF étant préférentiellement enrichi au niveau de motifs spécifiques qui participent à l'isolation des TADs (Chang et al., 2021). Enfin, les différents chromosomes du génome ne sont pas disposés aléatoirement dans le noyau mais occupent des volumes définis appelés territoires chromosomiques (tel que décrit par (Cremer and Cremer, 2001)).

2. Les quatre piliers de l'épigénétique

Les modifications ou mécanismes épigénétiques participent à la modulation de la compaction de la chromatine et par extension, à la régulation de la transcription. Au nombre de quatre, les piliers de l'épigénétique sont la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles (PTMs) des histones, les variants d'histones et les ARNs non codant. Ils influent, via l'action des remodeleurs de la chromatine, sur l'accessibilité de l'ADN à la machinerie transcriptionnelle.

1) La méthylation de l'ADN

a. Apposition et maintien

La méthylation de l'ADN est l'ajout par liaison covalente d'un groupement méthyl sur le carbone n°5 d'une cytosine (généralement contenue dans un motif CpG) - dénommée alors 5meC - (Figure 3). Les sites CpG ne sont pas distribués aléatoirement dans le génome puisqu'il est observé des régions où la fréquence des CpG est plus élevée qu'ailleurs - ce qui est le cas pour certains promoteurs - (Deaton and Bird, 2011). Ces régions sont nommées îlots CpG et leurs niveaux de méthylation participent à la régulation de la transcription (Kass et al., 1997).

La méthylation de l'ADN est médiée par les DNA Methyl Transferases ou DNMT. Les DNMT3A et DNMT3B, en partenariat avec leur cofacteur DNMT3L, sont les enzymes responsables de la méthylation *de novo* de l'ADN - qui est faite symétriquement sur les 2 brins - (Bourc'his et al., 2001; Okano et al., 1999). Au moment de la réplication de l'ADN, le maintien de la symétrie de 5meC est permis par l'action de DNMT1 - l'enzyme responsable du maintien de la méthylation de l'ADN (Cheng and Blumenthal, 2008) (Figure3).

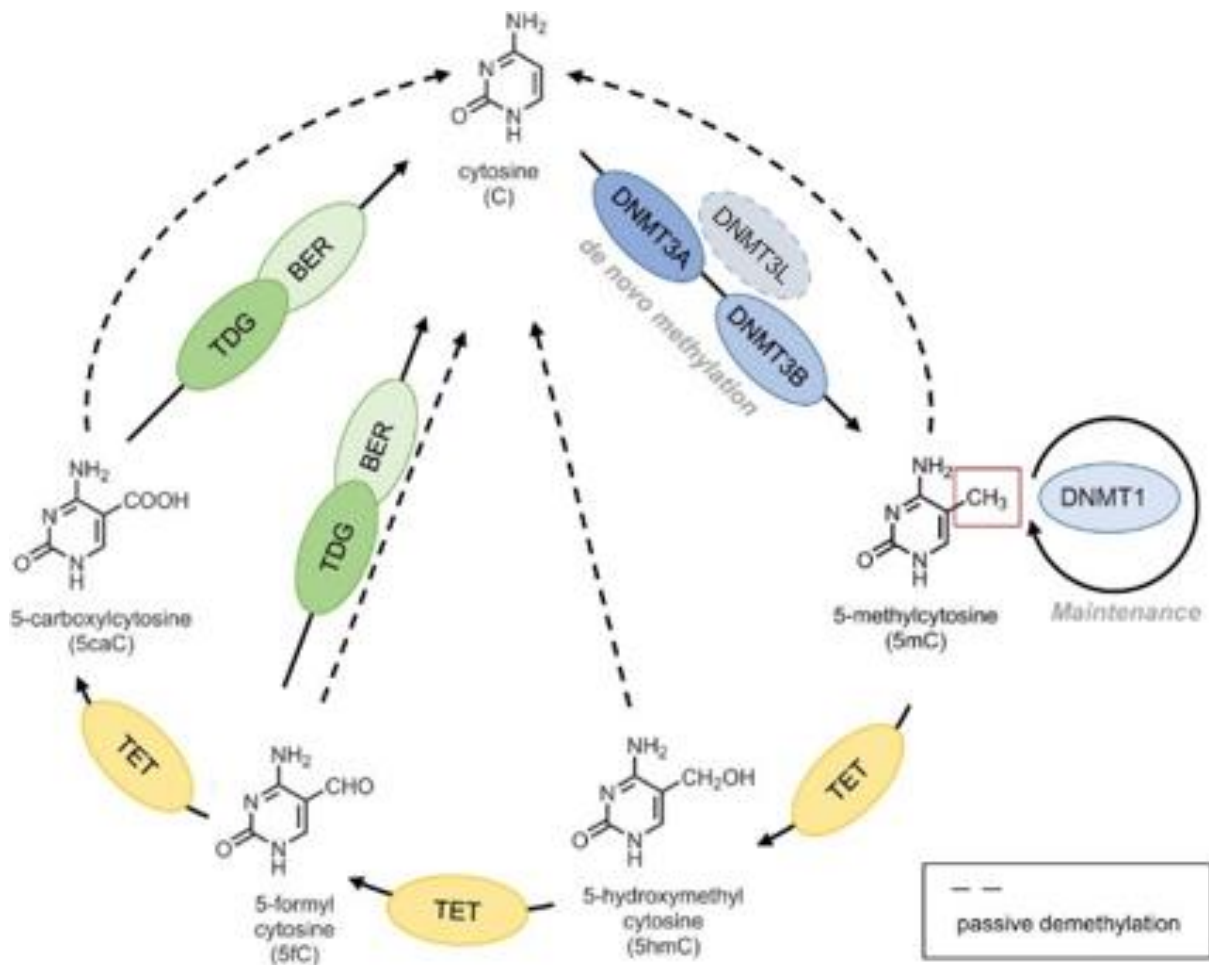


Figure 3 : Les différents acteurs de la (dé)méthylation de l'ADN (Adapté de (Zafon et al., 2019)).

En plus de la méthylation des CpG, d'autres motifs de nucléotides peuvent être soumis à la méthylation tels que les CpA et CpT. Chez les plantes, il existe une plus grande variété de motifs nucléotidiques pouvant être méthylés mais ceux-ci ne seront pas décrits ici.

b. Déméthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN, comme les autres mécanismes épigénétiques, est une modification réversible. La perte de 5meC peut se faire de deux façons : soit passivement via la dilution de cytosines marquées au cours de cycles de réplication successifs, soit activement via une action enzymatique. La déméthylation active de l'ADN est réalisée par une succession de réactions d'oxydation médiées par les enzymes TETs - pour Ten Eleven Translocation - (Tahiliani et al., 2009). La 5-methylcytosine sera alors oxydée en 5-hydroxymethylcytosine

(5hmeC), puis en 5-formylcytosine (5fC) et finalement en 5-carboxylcytosine (5caC) (Ito et al., 2011; Tahiliani et al., 2009) (Figure 3). Les derniers intermédiaires oxydés seront remplacés par une cytosine non modifiée via le mécanisme de réparation par excision de base (BER). De récentes données ont également mis en évidence que la 5hmeC ne serait pas uniquement un intermédiaire de déméthylation mais une modification épigénétique à part entière (Bachman et al., 2014).

2) Histones, variants d'histones et modifications post-traductionnelles

L'incorporation de variants d'histones et l'apposition de modifications post-traductionnelles (pouvant entraîner une modification des propriétés physico-chimiques des histones) influent sur l'affinité des histones pour l'ADN et entre elles, modulant ainsi la compaction de la chromatine.

a. Les variants d'histones

Nous avons précédemment décrit les histones H2A, H2B, H3 et H4 comme base protéique de la formation du nucléosome. Les histones canoniques sont les plus communément trouvées associées à la chromatine, mais il existe des variants à chaque histone qui sont associés préférentiellement à certaines régions du génome ou à certaines fonctions (revue dans (Martire and Banaszynski, 2020)).

Les histones H3 canoniques (H3.1 et H3.2) sont déposées au cours de la réplication de l'ADN par le complexe CAF-1 (Hoek and Stillman, 2003), contrairement aux variants décrits ci-dessous.

Le variant H3 CENP-A se localise spécifiquement aux centromères via un motif spécifique de recrutement - qui lui confère également une rigidité supérieure à celle de l'histone H3 canonique - (Black et al., 2007). L'incorporation de CENP-A se fait en phase G1, indépendamment de la réplication de l'ADN (Schuh et al., 2007), par l'action de la chaperonne HJURP (Holliday Junction Recognition Protein, (Andronov et al., 2019)). CENP-A est nécessaire à l'assemblage du kinétochore et à la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose (Sullivan and Karpen, 2001). A noter que la déplétion ou la surabondance de CENP-A engendre un défaut de localisation des kinétochores (Régnier et al., 2005), faisant que CENP-A est

considéré comme le déterminant épigénétique des centromères - tant via sa fonction que sa localisation - (Müller et al., 2014).

Lié à la modulation de la transcription, le variant H3.3 est déposé en deux régions distinctes au sein de la chromatine. Incorporé par la chaperonne HIRA en lien avec la transcription (Schwartz and Ahmad, 2005; Tagami et al., 2004), ce variant est lié à la transcription et localisé au niveau des promoteurs ou régions codantes actives (Ahmad and Henikoff, 2002; Daury et al., 2006). A contrario, lorsque H3.3 est pris en charge et incorporé par le complexe DAXX/ATRX, ce variant se localise au niveau des séquences télomériques et péri-centromériques et intervient comme modulateur de la transcription (Drané et al., 2010; Goldberg et al., 2010)

Lié à un mécanisme de signalisation, le variant H2AX est notamment retrouvé préférentiellement au niveau des TSS actifs et des compartiments sub-télomériques (Seo et al., 2012). Notamment, la forme phosphorylée (Serine 39) de H2AX - ou gH2AX - a depuis longtemps été décrite comme un marqueur des cassures de l'ADN où elle tend à être accumulée (Paull et al., 2000). L'apposition *de novo* de H2AX aux lieux de cassures se fait notamment par la chaperonne FACT (FAcilitates Chromatin Transcription) - tout comme son équivalent canonique H2A - (Piquet et al., 2018).

b. Les modifications post-traductionnelles (PTMs) des histones

Les extrémités flexibles N-ter (et C-ter pour H2A) des histones, enrichies en résidus Lysine et Arginine notamment, sont le siège d'une grande variété de modifications post-traductionnelles (PTMs) (Figure 4A). Les PTMs les plus connues (et décrites) concernent l'ajout de groupement méthyls ou acétyls au niveau de différentes lysines de l'histone H3 (Bannister and Kouzarides, 2011). L'ajout de ces groupements est médié par différents « writers » - comme les Histone/Lysine Methyl Transferase (H/KMTs) ou les Histone/Lysine Acétyl Transferase (H/KATs) -. Le retrait de ces modifications se fait via l'action des « erasers » - tels que les Histone/Lysine DeMethylase (H/KDM) ou les Histone/Lysine DeAcetylase (H/KDAC) - (Figure 4B).

L'apposition des PTMs - ainsi que l'incorporation des variants d'histones - peut modifier les propriétés physico-chimiques des nucléosomes et moduler l'affinité de ceux-ci pour l'ADN ou

entre nucléosomes (D. Bascom and Schlick, 2018). La combinaison de différentes PTMs d’histone participe à la définition de différents compartiments chromatiniens, plus ou moins compactés (Bannister and Kouzarides, 2011) - et par extension, plus ou moins permissifs à la transcription - qui seront décrit dans la partie 1.3 de cette introduction.

La reconnaissance des PTMs d’histone se fait par différents groupes de « readers ». Selon le groupement considéré, la « lecture » des différentes PTMs d’histone est médiée par les protéines à ChromoDomain (CD) pour la méthylation des histones et les protéines à BRomoDomain (BRD) dans le cas des histones acétylées (Yun et al., 2011).

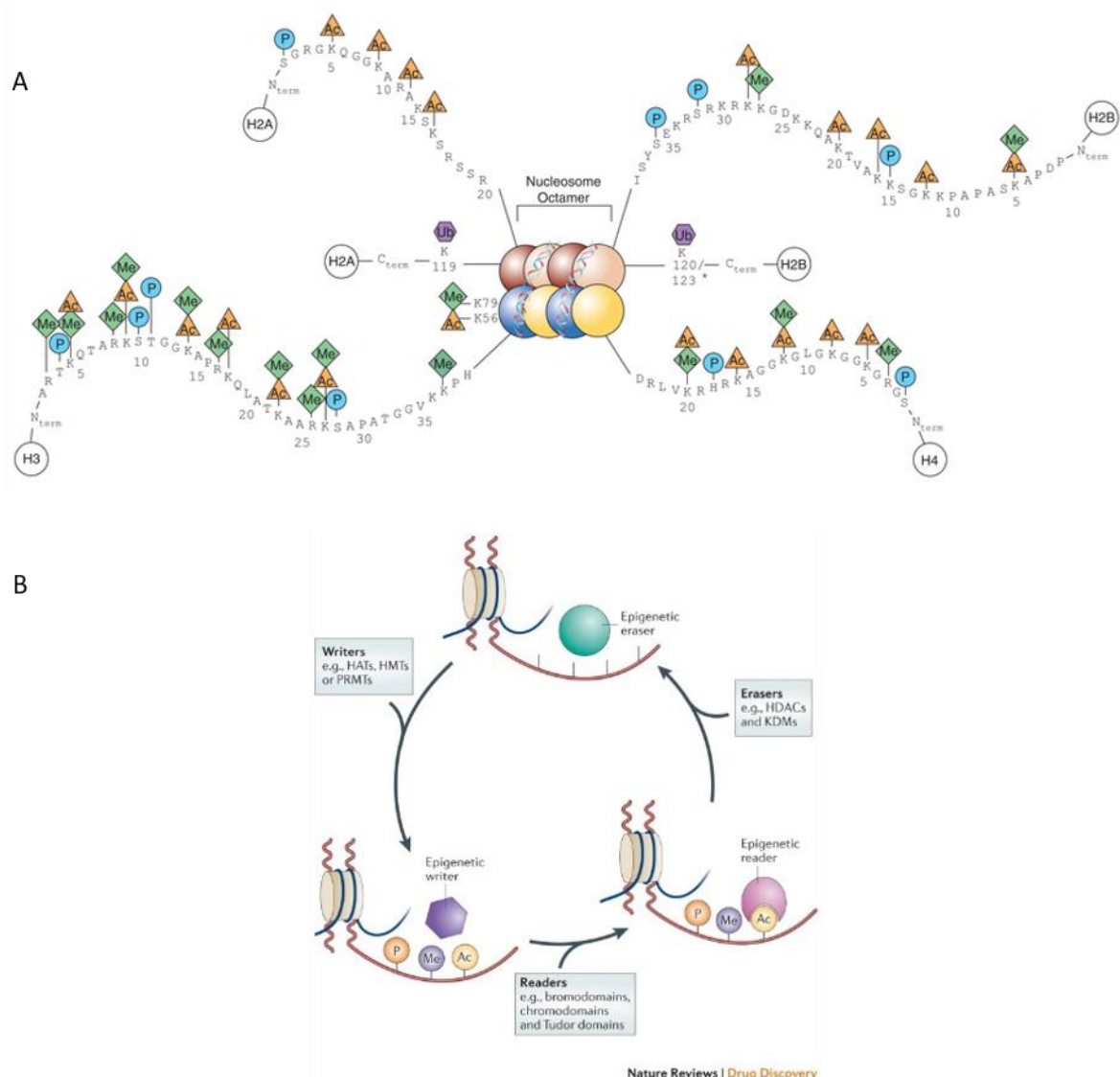


Figure 4 : Les protéines histones et leurs modifications post-traductionnelles (Adapté de (Falkenberg and Johnstone, 2014; Keppler and Archer, 2008)). (A) : Les différentes modifications post-traductionnelles (PTMs) des histones. (B) : Les acteurs de l’apposition (« writers »), de la reconnaissance (« readers ») et du retrait (« erasers ») des PTMs d’histone.

3) Les remodeleurs de la chromatine

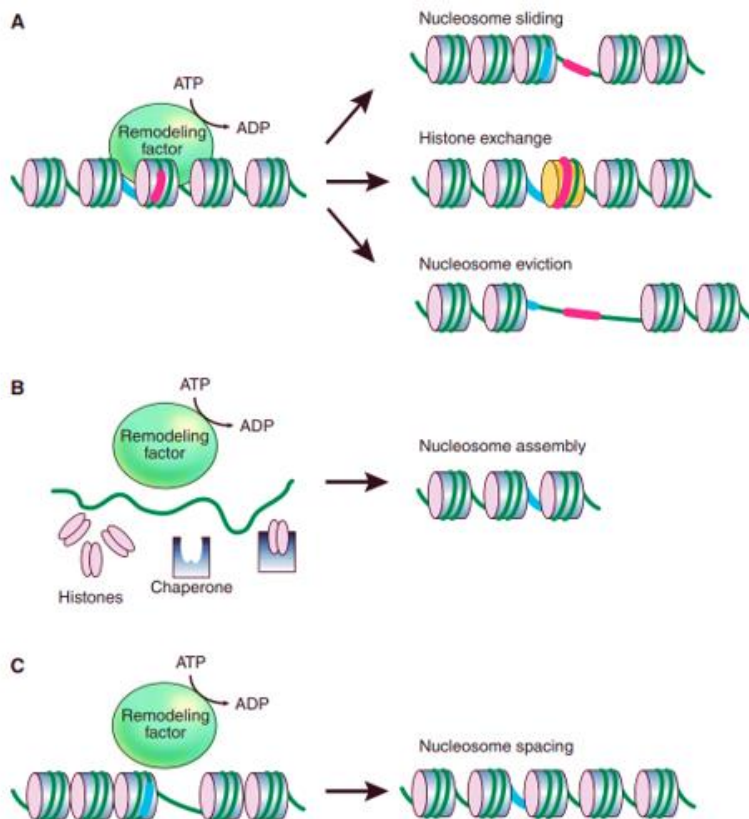


Figure 5 : Action des complexes remodeleurs de la chromatine (Becker and Workman, 2013).

(A) : Déplacement, échange ou éviction des nucléosomes par les complexes remodeleurs ATP-dépendants. (B) : Association des complexes remodeleurs avec les chaperonnes des histones pour l'assemblage des nucléosomes. (C) : Influence des complexes remodeleurs sur la densité des nucléosomes.

Les complexes remodeleurs de la chromatine - dépendants de l'ATP - sont d'une importance centrale dans la régulation de la chromatine. L'ADN étant liée aux nucléosomes par différentes liaisons faibles, le nucléosome est un complexe nucléoprotéique stable qui nécessite l'action des remodeleurs pour sa dissociation. Les différentes actions des complexes remodeleurs sont présentées en Figure 5 et décrites dans (Clapier et al., 2017).

4) Les ARN non codants (ncRNAs)

Les ARN non codants se classent en deux catégories selon leurs tailles. Les courts ncRNAs (sncRNAs) regroupent les si- (small interfering), mi- (micro) et piRNAs (piwi RNAs), dont la taille varie de 19 à 24bp pour les si- et miRNA et de 26 à 31pb pour les piRNAs. Après maturation, les différents sncRNAs sont pris en charge par la famille des protéines Argonautes (AGO) (Meister, 2013). Les sncRNAs couplés aux protéines AGO sont notamment impliqués dans des mécanismes de répression transcriptionnelle, soit par action sur les transcrits eux-

mêmes, soit en promouvant un environnement épigénétique répressif à la transcription au niveau des séquences cibles (Djupedal and Ekwall, 2009; Meister, 2013; Wei et al., 2017).

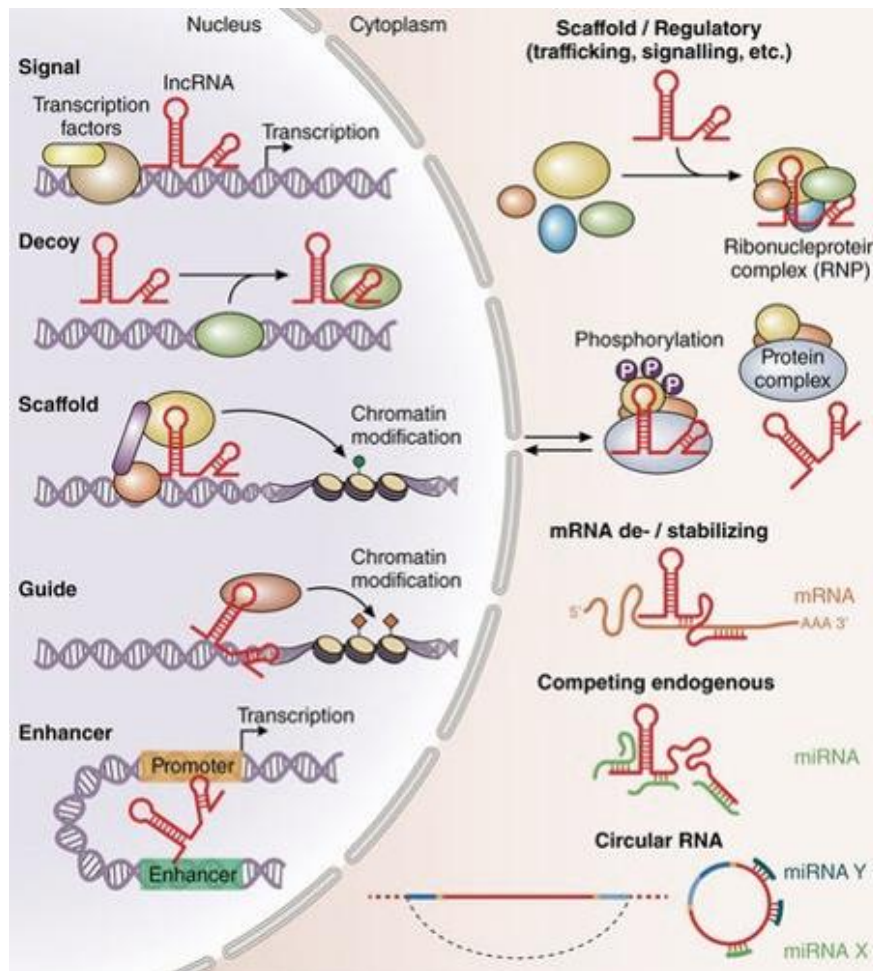


Figure 6 : Les différents modes d'action des ARN non codant impliqués dans les régulations épigénétiques et transcriptionnelles (Bär et al., 2016).

De nombreuses études ont décrit le rôle des longs ARNs non codants (lncRNAs) dans la médiation des mécanismes épigénétiques (Figure 6). Notamment, les lncRNA peuvent participer au ciblage de certaines régions du génome nécessitant d'être transcriptionnellement réprimées et entrainer avec eux différents writers ou readers de PTMs d'histones (Wei et al., 2017). Certains lncRNAs ont également été plus récemment décrits comme impliqués dans la formation de contacts entre différents loci de la chromatine (Arnold et al., 2019).

3. Le génome eucaryote et ses différents compartiments chromatinien associés

Selon le niveau de compaction, l'activité transcriptionnelle et les modifications épigénétiques associées, 3 sous-compartiments peuvent être définis : l'euchromatine et l'hétérochromatine (facultative et constitutive).

1) L'euchromatine et ses marques épigénétiques associées

L'euchromatine est le compartiment chromatinien qui apparaît peu dense aux électrons en microscopie électronique dans le noyau interphasique. Ce marquage différentiel est imputable à sa structure dispersée et diffuse, liée à l'espacement plus important entre les nucléosomes la constituant. L'euchromatine, qui se réplique en début de phase S, est majoritairement composée des régions riches en gènes et de leurs séquences régulatrices associées (promoteurs et enhanceurs). Les modifications épigénétiques associées à l'euchromatine sont l'hyperacétylation des histones en lien avec un faible niveau de méthylation de l'ADN et en coopération avec quelques histones méthylées (notamment H3K4 et H3K36). Le caractère décondensé de l'euchromatine et l'espacement important des nucléosomes favorisent l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN, faisant de l'euchromatine le compartiment nucléaire activement transcrit (figure 7).

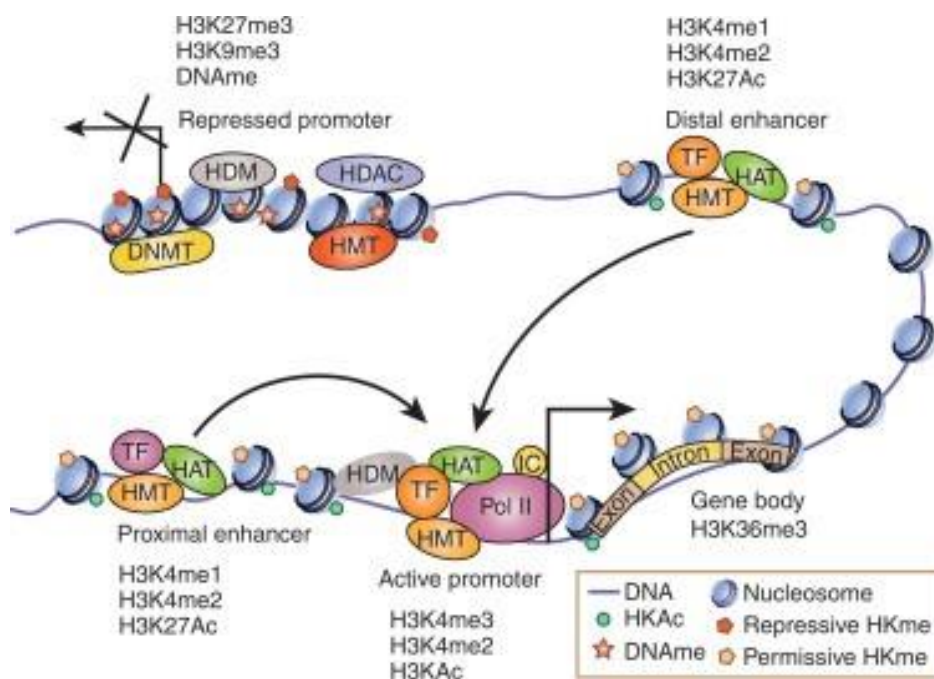


Figure 7 : Les différentes PTMs d'histones associées à l'euchromatine. (Reddy and Natarajan, 2015).

Les différentes modifications épigénétiques associées à l'euchromatine se combinent différemment selon qu'elles marquent les gènes, les promoteurs ou les enhancers. Les enhancers actifs sont notamment marqués par H3K4me1, en partenariat avec H3K27ac - dont l'apposition est médiée par p300 et CBP - (Beacon et al., 2021; Creighton et al., 2010). H3K4me3 est majoritairement retrouvée au niveau des promoteurs actifs et forme un pic d'enrichissement caractéristique à proximité du site d'initiation de la transcription (TSS) (Howe et al., 2017). La présence de H3K4me3 sert notamment de support à la formation du Complexe Pré Initiateur de la transcription, médiée par un de ses readers - TAF3 - (Beacon et al., 2021). La méthylation de H3K4 est médiée par des enzymes à domaine SET - SET1A/B et MLL1-4 - contenues dans 6 complexes non redondants (Beacon et al., 2021). La présence de H3K4me3 au niveau du TSS favorise l'apposition de H3K9Ac par GCN5 et PCAF (Bian et al., 2011). L'acétylation de H3K9 aurait un effet favorable sur la progression de l'ARN polymérase II et favoriserait l'élongation (Gates et al., 2017), tout comme la présence de méthylation de l'ADN au niveau du corps des gènes (Jones, 2012). Similaire à la méthylation de l'ADN, H3K36me2/3 - apposée par NSD1 - est retrouvée au niveau du corps des gènes activement transcrits (Bannister et al., 2005).

A noter que l'activité des gènes, promoteurs et des enhancers est modulée par l'ajout d'autres marques épigénétiques, généralement associées à l'hétérochromatine. Ainsi, la combinaison de H3K4me3 avec H3K27me3 (au niveau des promoteurs) engendre la définition d'un état dit « poised » c.-à-d. non permissif à l'élongation de la transcription mais dont la chromatine demeure relaxée (Beacon et al., 2021).

2) L'hétérochromatine et ses marques épigénétiques associées

Contrairement à l'euchromatine, l'hétérochromatine apparaît dense aux électrons dans le noyau en interphase. L'hétérochromatine est souvent trouvée en périphérie de noyau - associée aux lamines nucléaires - ou forme des patchs associés ou non au nucléole. L'hétérochromatine est sous-divisée en deux compartiments selon son origine (développementale ou non), la nature des séquences considérées et les modifications épigénétiques associées. Sont définies l'hétérochromatine constitutive, commune à toutes les cellules d'un organisme, et l'hétérochromatine facultative - établie lors de la différenciation,

son contenu génomique varie en fonction de la cellule considérée et dépend du sexe de l'organisme -.

a. L'hétérochromatine facultative (fHC)

Le compartiment d'hétérochromatine facultative le plus facilement identifiable est celui du X inactif chez les individus femelles. Les autres séquences concernées par leur localisation au sein du compartiment de fHC sont des régions riches en gènes dont la transcription est réprimée dans un type cellulaire donné. Les modifications d'histones les plus communément associées à la fHC sont H3K27me3 et H2AK119Ub, apposées par les « Polycomb Repressive Complex » (PRC) (figure 8).

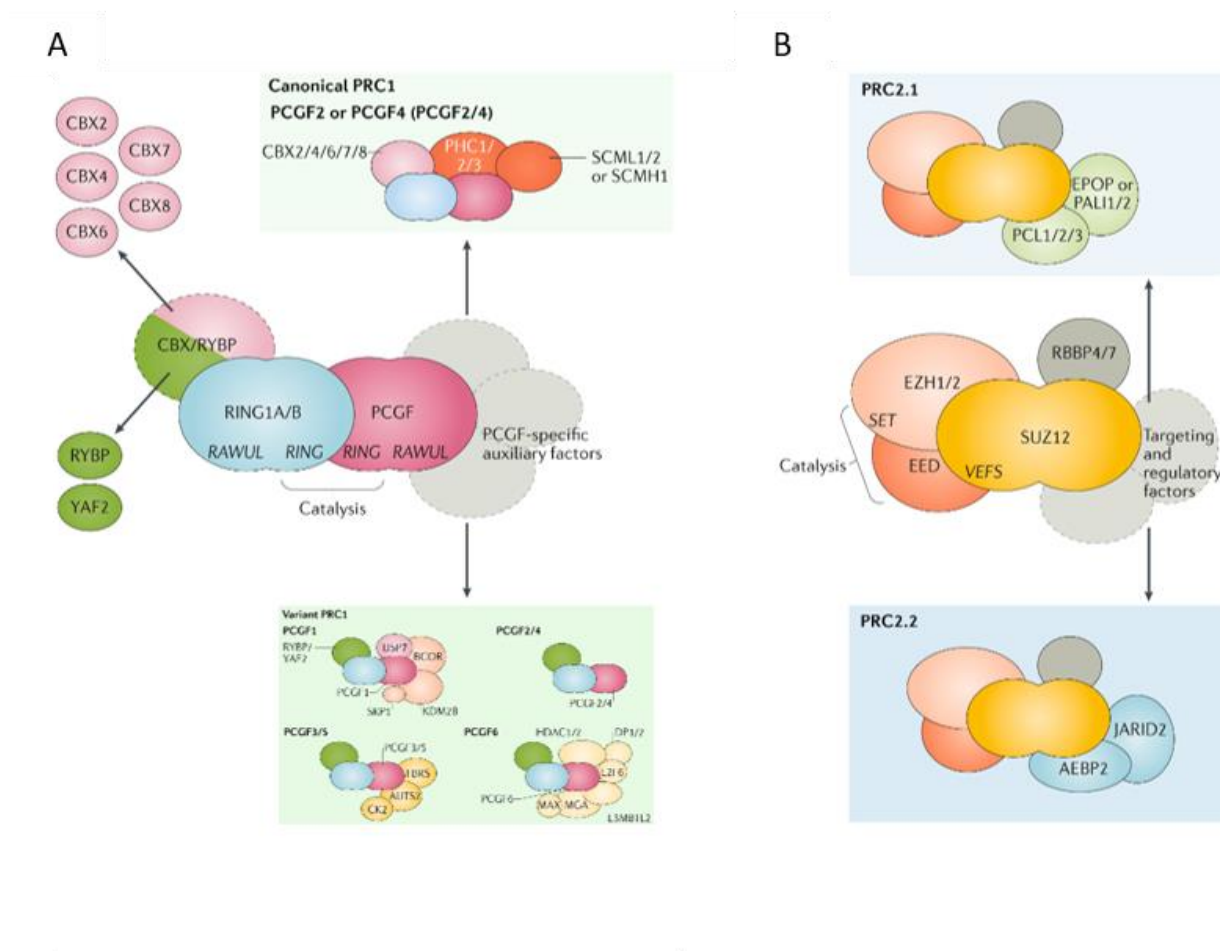


Figure 8 : Composition des « Polycomb Repressive Complex » PRC1 et PRC2 (canoniques et variants) (Adapté de (Blackledge and Klose, 2021)). (A) : Composition des complexes PRC1 (responsables de l'ubiquitination de H2AK119). (B) : Composition des complexes PRC2 (catalysant la méthylation (mono-, di- ou tri-) de H3K27).

PRC1 et H2AK119Ub

Les protéines de base du complexe PRC1 sont RING1A/B associée à l'une des 6 PGCF (Polycomb Group RING Finger), qui en forment la sous-unité catalytique, responsable de l'apposition de H2AK119Ub via l'activité E3 Ubiquitine ligase de RING1A/B (Wang et al., 2004) (Figure 8A). Le complexe canonique complet de PRC1 contient aussi une protéine à chromodomaine (CBX) parmi CBX2/4/6/7/8 qui permet la reconnaissance d'une lysine méthylée (H3K27meX). Le remplacement de la protéine CBX par RYBP ou YAF2 en plus de l'association avec d'autres protéines détermine les variants PRC1 (Blackledge and Klose, 2021).

PRC2 et H3K27me3

Le cœur catalytique du complexe PRC2 repose sur 3 protéines : Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) ou son homologue EZH1, Embryonic Ectoderm Development (EED) et SUppressor of Zeste 12 (SUZ12) (Cao et al., 2014; Cao and Zhang, 2004), auquel s'ajoute RBBP4/7 ; EZH2 étant la sous-unité de PRC2 qui catalyse principalement la mono-, di- et triméthylation de H3K27me3 (Figure 8B). SUZ12 médie la formation des complexes non canoniques de PRC2 (PRC2.1 et PRC2.2) via son association avec PCL1/2/3 et EPOP//PAL1/2 ou avec AEBP2 et JARID2, respectivement (Blackledge and Klose, 2021). EED reconnaît H3K27me3 et potentialise l'action de EZH2. Les erasers responsables du retrait de H3K27me3 sont KDM6A (UTX) et KDM6B (JMJD3) (Agger et al., 2007).

La reconnaissance mutuelle des modifications d'histones apposées par l'un ou l'autre des complexes est médiée par différents partenaires des complexes centraux de PRC1 et PRC2 (Figure 8). Notamment, le cofacteur JARID2 permet la lecture de l'ubiquitination de H2AK119 et la liaison de PRC2 aux régions enrichies en H2AK119Ub (Cooper et al., 2016). Pour PRC1, la reconnaissance de H3K27me3 se fait par l'intermédiaire des protéines CBX (Cao et al., 2002).

b. L'hétérochromatine constitutive (cHC)

L'hétérochromatine constitutive concerne les séquences répétées d'un génome eucaryote. Ces séquences se subdivisent en deux catégories : les séquences répétées en tandem – c.-à-d. les séquences télomériques et les séquences satellites centromériques et péricentromériques - et les séquences répétées dispersées. Ces dernières représentent environ un quart du

génomique murin (Martens et al., 2005) et presque la moitié du génome humain (Lander et al., 2001) et incluent les LTR, LINEs, SINEs... qui ne seront pas décrits ici. Les séquences télomériques se situent à l'extrémité des chromosomes. Elles assurent la protection des extrémités chromosomiques au cours de la réplication et les protègent des mécanismes de reconnaissance des cassures de l'ADN (Lu et al., 2013). Les séquences péri-centromériques sont quant à elles impliquées dans le processus de mitose (Saksouk et al., 2015).

i. Organisation des séquences satellites péri-centromériques murines

Les régions péri-centromériques murines sont composées de séquences répétées de 234pb : les séquences satellites majeures, pouvant représenter jusqu'à 3% du génome murin (Martens et al., 2005) (Figure 9A). Ces séquences, de par leur nature A-T riche, sont visibles par une contre-coloration au DAPI dans le noyau interphasique (Guenatri et al., 2004). Elles ont notamment la particularité d'être organisées en amas dans le noyau interphasique (Figure 9B).

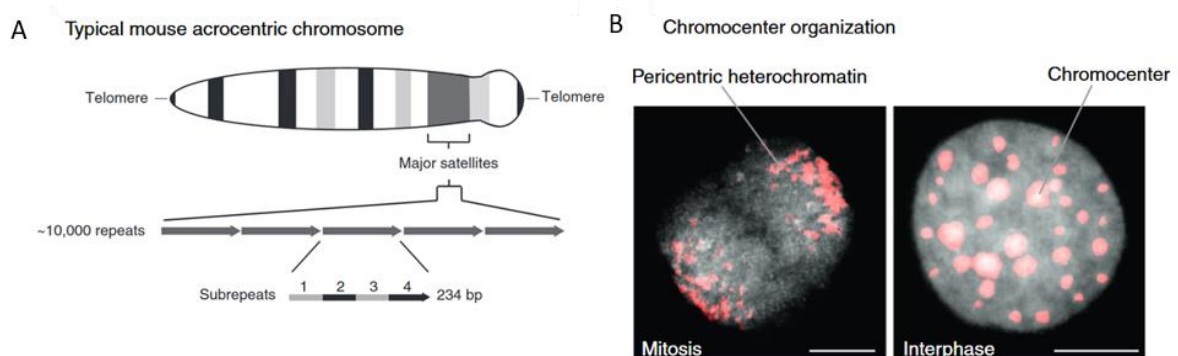


Figure 9 : Les séquences satellites majeures murines (adapté de (Bulut-Karslioglu et al., 2012; Probst and Almouzni, 2011)). (A) : Détails de la localisation et de la composition d'une région péri-centromérique sur un chromosome acrocentrique murin. (B) : Localisation (en rouge) des séquences satellites majeures dans le noyau en mitose et des clusters d'hétérochromatine péri-centromérique (chromocentres) dans le noyau en interphase.

ii. H3K9me3, le marqueur de l'hétérochromatine constitutive

H3K9me3 est considérée comme la modification épigénétique la plus spécifique de l'hétérochromatine constitutive. La triméthylation de H3K9 se fait à l'aide de trois groupes d'enzymes à SET domaines : G9a ou GLP catalysent la mono- et diméthylation de H3K9 tandis que SETDB1 ou SUV39H1/2 catalysent l'ajout du 3^{ème} groupement méthyl (Mozzetta et al.,

2015). L'apposition de H3K9me3 par SUV39H1/2 est spécifique des séquences télo-, centro- et péricentromériques tandis que SETDB1 catalyse H3K9me3 dans les autres régions du génome (Schultz et al., 2002). L'apposition de H3K9me3 aux compartiments d'hétérochromatine constitutive est indispensable au maintien de l'intégrité du génome (Janssen et al., 2018), la compaction empêchant des évènements de recombinaison entre ces séquences répétées homologues.

L'enrichissement en H3K9me3 au niveau de l'cHC est reconnu par l'Heterochromatin Protein 1 (HP1, variants a et b) (Lachner et al., 2001). L'accumulation de HP1 au niveau de l'cHC induit en cascade la méthylation de l'ADN et l'apposition de H4K20me3 médiée par KMT5A et SUV4-20H2 (Schotta et al., 2004), renforçant la compaction de l'hétérochromatine.

c. Les ncRNA associés à l'établissement de l'hétérochromatine

La formation des domaines d'hétérochromatine (fHC ou cHC) repose dans la plupart des cas sur des mécanismes médiés par des lncRNAs. Dans le cas de l'inactivation du X, le coating du chromosome X par le lncRNA *Xist* entraîne le recrutement de PRC1 et l'apposition de H2AK119Ub. S'ensuit alors un mécanisme de propagation de l'environnement épigénétique répressif médié par PRC1/H2AK119Ub et PRC2/H3K27me3 auxquels s'ajoutent l'action d'enzymes déacétylases (revue dans (Żylicz and Heard, 2020)).

Pour ce qui est des séquences péricentromériques, la formation et le maintien de celles-ci sous forme de chromocentres - notamment l'enrichissement et la structuration 3D des séquences marquées par H3K9me3 et HP1 - nécessitent l'intervention d'un composant ARN (Maison et al., 2002). Au niveau des télomères également, l'ARNnc TERRA - transcrit à partir des régions subtélomériques - est considéré comme un composant à part entière de l'cHC (Luke and Lingner, 2009).

La plupart des caractéristiques épigénétiques décrites ci-dessus l'ont été à partir d'observations sur cellules somatiques. Cependant, des différences importantes dans le profil de répartition de nombreuses marques épigénétiques sont observées au cours des premières étapes du développement embryonnaire (caractéristiques qui peuvent être acquises dans des modèles de cellules cancéreuses également), ce qui renforce la nécessité de comprendre

comment les différents compartiments chromatinien sont régulés au cours des premières étapes du développement. Alors que la description du compartiment « euchromatine » en association avec l'initiation de la transcription, le processus de différenciation et la régulation de l'expression génique est fortement étudiées, moins d'intérêt est porté à la description de la dynamique de régulation et à la description des profils épigénétiques non canoniques qui pourraient concerner l'hétérochromatine constitutive au cours du développement précoce murin, que nous allons décrire ci-après.

II. Développement embryonnaire et pluripotence

Pour la suite de cette introduction, nous nous focaliserons sur le développement embryonnaire des mammifères euthériens c.-à-d. dont le développement se fait intégralement *in utero* et repose sur la présence d'un placenta qui assure les échanges entre mère et fœtus.

1. Les principales étapes du développement précoce euthérien

1) Fécondation, Activation du génome embryonnaire et Totipotence

Le début du développement est marqué par la fusion de deux gamètes hautement différenciés : l'ovocyte et le spermatozoïde. A la suite de la fécondation, les génomes parentaux vont subir une phase importante de remaniement, avant le premier clivage. En effet, l'hémi-génome paternel va traverser une phase de décondensation au cours de laquelle ses protamines seront remplacées par des histones (Adenot et al., 1991; McLay and Clarke, 2003). Au cours des premiers clivages, différents remaniements épigénétiques vont avoir lieu, permettant notamment l'activation du génome embryonnaire (ces aspects seront décrits plus en détails dans la 3^{ème} partie de cette introduction).

L'activation du génome embryonnaire se fait en deux temps : lors de la phase dite « mineure », l'activité transcriptionnelle est faible et les transcrits décelés sont majoritairement d'origine paternelle ; s'ensuit la phase dite « majeure » qui correspond à l'activation du génome zygotique. En parallèle les transcrits maternels hérités de l'ovocyte sont dégradés. Dans le modèle murin, l'activation du génome embryonnaire se fait

rapidement après la fécondation puisque les premiers signes de transcription sont visibles dès le stade zygote (McLay and Clarke, 2003) ; l'activation majeure du génome ayant lieu à la fin du stade 2-cellules (Tadros and Lipshitz, 2009). Chez l'humain, l'initiation de la transcription est détectée à partir du stade 1-cellule et se poursuit jusqu'à la phase d'activation majeure observée dans l'embryon 8-cellules (Dobson et al., 2004). Concernant le modèle bovin, celui-ci est plus proche de ce qui est observé chez l'humain puisque des transcrits paternels sont également détectés au stade 1-cellule (Graf et al., 2014), alors que la phase majeure de transcription du génome zygotique est observée au stade 8-/16-cellules (Memili and First, 2000) (Figure 10).

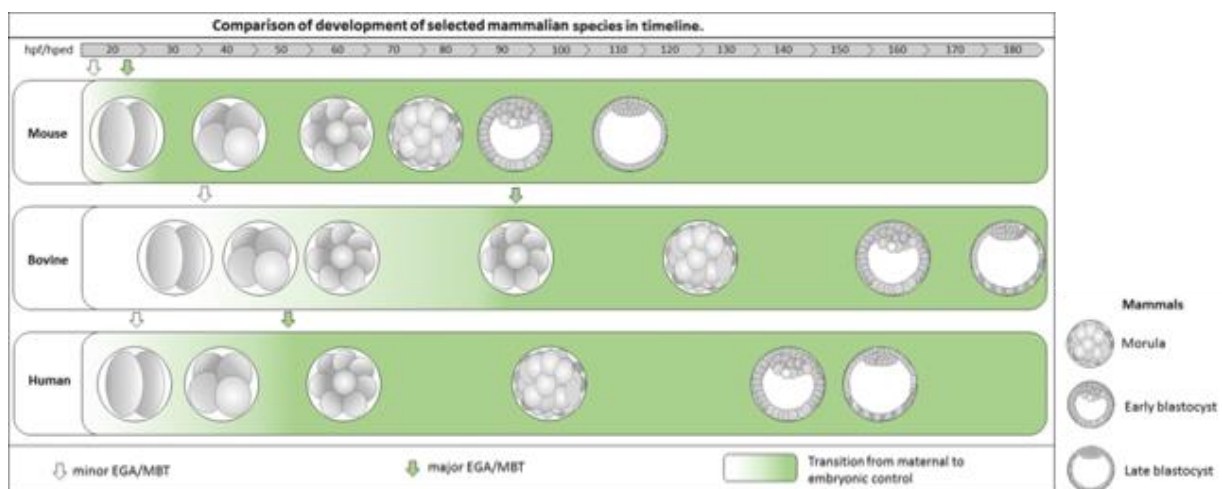


Figure 10 : Développement précoce des mammifères – comparaison entre espèce (Adapté de (Torralova et al., 2020)). Est illustré ici les similitudes entre développement humain et bovin concernant les premières étapes du développement. A noter que le développement murin précoce se distingue par sa rapidité en comparaison aux deux autres espèces. Les flèches blanches indiquent la mise en route mineure du génome et les flèches vertes la mise en route majeure du génome embryonnaire.

A la suite de la fécondation, le zygote et l'embryon précoce sont définis comme totipotents c.-à-d. qu'ils portent la capacité de générer toutes les cellules d'un organisme, en plus des tissus extra-embryonnaires indispensables au développement *in utero* (Condic, 2014). Selon cette définition, la totipotence est restreinte au zygote et à l'embryon 2-cellules (voir à quelques blastomères de l'embryon 4-cellules) dans le modèle murin (Maemura et al., 2021). Chez le bovin, la totipotence s'étend jusqu'au stade 4-cellules au moins, puisque les quatre blastomères sont en capacités de se développer *in utero* à terme (Johnson et al., 1995). Chez l'humain, la notion stricte de totipotence existe jusque dans l'embryon 2-cellules (Herranz, 2015) et pourrait être étendue jusque dans l'embryon 4-cellules (Veiga et al., 1987).

2) Spécification des lignages et émergence de la pluripotence

Durant les premiers jours de développement, de nombreux facteurs de transcription (FTs) tels que OCT4, NANOG, CDX2 et GATA6 sont exprimés dans toutes les cellules de l'embryon (Piliszek et al., 2016; Saiz and Plusa, 2013). Ces différents FTs seront plus tard spécifiques de chacun des lignages au fur et à mesure de leur spécification.

a. Compaction, Spécification Trophectoderme/Masse Cellulaire Interne et Cavitation

i. Compaction, polarisation et voie HIPPO

La 1^{ère} spécification de lignage est initiée au stade 8-cellules (vers E2.5 jours de développement), au moment de la compaction de l'embryon - 1^{er} changement morphologique visible du développement précoce -. Concomitant à la compaction, les cellules de l'embryon exposées à l'extérieur de celui-ci se polarisent tandis que les cellules internes demeurent non polarisées, ce qui aura une influence sur la 1^{ère} spécification de lignage (White et al., 2016) (Figure 11A).

L'initiation de la spécification des lignages du trophoctoderme (TE) et de la Masse Cellulaire Interne (ICM) repose sur l'activation différentielle de la voie de signalisation Hippo - une voie de signalisation à Sérine/Thréonine kinases -. Dans les cellules externes et polarisées de l'embryon, la voie Hippo est inactive, à l'inverse des cellules internes non polarisées. L'activation de la voie Hippo dans les cellules apolaires entraîne la séquestration dans le cytoplasme d'un de ses effecteurs (YAP, phosphorylé). A l'inverse, la non-activation de la voie Hippo dans les cellules polarisées permet la translocation de YAP (non phosphorylé) au sein du noyau. La translocation de YAP dans le noyau permet son association avec TEAD4, facteur de transcription, et l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles, dont Cdx2 (Nishioka et al., 2008) (Figure 11B).

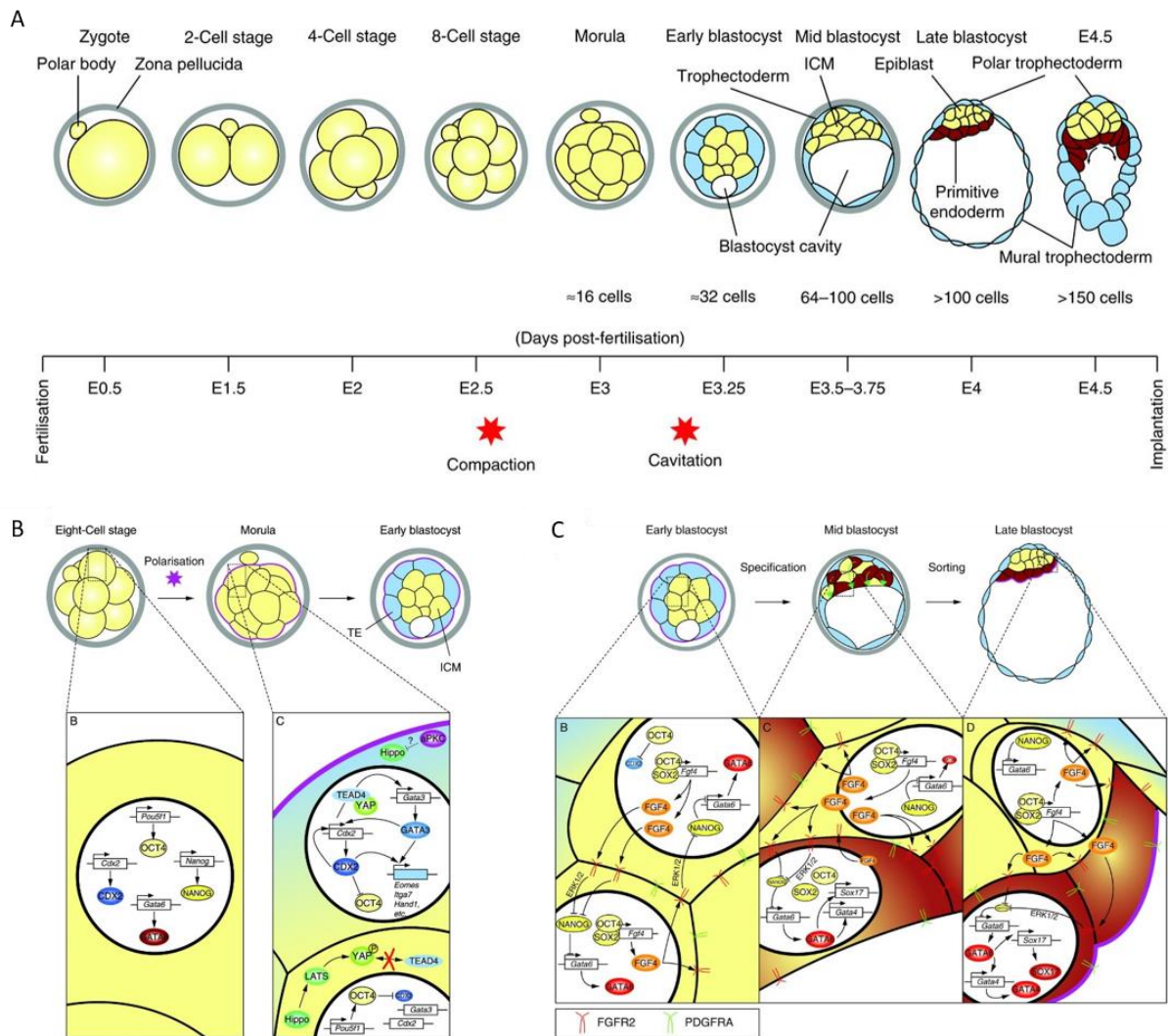


Figure 11 : Les premières spécifications des lignages de l'embryon murin (Adapté de (Saiz and Plusa, 2013)). (A) : Représentation schématique des différentes étapes du développement murin pré-implantation. (B) : La voie HIPPO participe à la spécification des lignages du trophoblaste (TE) et de la Masse Cellulaire Interne (ICM). (C) : Spécification des lignages de l'épiblaste (EPI) et de l'endoderme primitif (PrE – en rouge sur la figure) et influence de la voie FGF4.

ii. OCT4 et CDX2 : spécification ICM/TE et pluripotence

Vers E3.25 jours de développement, la cavité blastocélique apparaît dans l'embryon, alors renommé « blastocyste ». Cette cavité apparaît à la jonction entre cellules de l'ICM et cellules du TE (Herrera-Delgado and Maître, 2021), faisant que l'ICM sera restreinte à un pôle de l'embryon, en contact avec le blastocœle et entourée des cellules du TE (Figure 11A).

Plus qu'un facteur de transcription, CDX2 est le gardien de l'identité cellulaire du TE, puisqu'il est nécessaire et suffisant au maintien de ce lignage (Strumpf et al., 2005). Chez la souris, l'expression de *Cdx2* dans les précurseurs du TE va entraîner la répression de la transcription

des autres facteurs de transcription présents dans ces cellules, dont *Oct4*, *Sox2* et *Nanog* (Saiz and Plusa, 2013). En parallèle, dans les cellules internes apolaires, l'expression de *Cdx2* n'est pas maintenue, au contraire de l'expression de *Oct4*, *Sox2* et *Nanog* : ces cellules participeront à la formation de l'ICM. Ainsi, dans le jeune blastocyste murin, OCT4 (ainsi que SOX2 et NANOG) et CDX2 sont alors restreints chacun aux lignages de l'ICM et du TE, respectivement (Piliszek et al., 2016).

Chez le modèle humain, la spécification des lignages ICM/TE se fait plus tardivement au cours du développement embryonnaire (De Paepe et al., 2013). Alors que l'expression d'*Oct4* est détectée dès le stade 8-cellules, ce FT sera exprimé dans l'ensemble du blastocyste jusqu'à 5 jours de développement et spécifiquement restreint à l'ICM vers 6 jours de développement - soit au stade blastocyste tardif - (Niakan and Eggan, 2013). Similairement, OCT4 est détecté dès le stade 8-cellules dans l'embryon bovin mais, n'étant pas réprimé par CDX2, un co-marquage CDX2/OCT4 sera observé jusqu'à 11 jours de développement (Berg et al., 2011). Également, OCT4 est le dernier marqueur de l'ICM à être restreint à ce lignage, contrairement à SOX2 et NANOG (Khan et al., 2012).

La spécification des lignages TE et ICM entraîne une baisse générale du potentiel de développement des cellules. Alors que le TE ne pourra produire que des dérivés aboutissant à la formation du placenta, les cellules de l'ICM gardent un haut potentiel de développement associé à leur capacité à produire le futur organisme. Ce potentiel, succédant à la totipotence, est défini comme l'état de pluripotence. OCT4 et SOX2 en sont notamment des marqueurs spécifiques. Bien que OCT4 ne soit pas indispensable à la spécification précoce de l'ICM au cours du développement murin, il est indispensable au maintien de l'identité ICM ainsi qu'au développement et au maintien du lignage pluripotent (Nichols et al., 1998). En revanche, la déplétion d'*Oct4* compromet le développement général du blastocyste humain (Fogarty et al., 2017) et induit la perte de l'expression de *Nanog* dans l'ICM de l'embryon bovin (Simmet et al., 2018).

b. Spécification Epiblaste/Endoderme Primitif (ou Hypoblaste) au sein de l'ICM

i. Spécification asynchrone des lignages EPI et PrE

Au stade de jeune blastocyste, l'ICM - lignage embryonnaire pluripotent - va se spécifier plus avant et produire les lignages Epiblaste (EPI) et Endoderme Primitif (PrE) (Saiz and Plusa,

2013). La spécification de ses deux lignages se fait de manière asynchrone et commence d'abord par la spécification de l'EPI (Saiz et al., 2016).

L'ICM non spécifiée est marquée spécifiquement par les FTs NANOG et GATA6. L'initiation de la spécification des lignages aboutit à un marquage hétérogène des cellules de l'ICM : les cellules précurseurs de l'EPI sont notamment identifiables via l'expression de *Nanog* alors que celles précurseurs du PrE expriment *Gata6* et l'expression de *Nanog* contribue à l'inhibition de l'expression de *Gata6*. A E3.5, les cellules de l'ICM présentent un marquage caractéristique en « sel et poivre » selon le niveau d'expression de ces deux FTs (Chazaud and Yamanaka, 2016). Ces deux FTs sont essentiels à la définition des identités EPI et PrE puisque l'ICM des embryons KO pour NANOG adopte un lignage PrE exclusivement, à l'averse des embryons KO pour GATA6 dont l'ICM adopte un destin EPI (Bessonard et al., 2014; Frankenberg et al., 2011).

Alors que les mécanismes qui initient la spécification de ces lignages - et notamment de l'EPI - ne sont pas totalement élucidés, la poursuite de la spécification de l'EPI et du PrE repose entre autres sur la voie FGF/ERK (la voie des MAP kinases). Notamment, les cellules précurseurs de l'EPI vont exprimer le ligand FGF4 qui, par sa liaison aux récepteurs FGFR2, va inhiber l'action de NANOG sur le contrôle de l'expression de GATA6 (Tosenberger et al., 2017). Ainsi, l'expression de GATA6 sera renforcée dans les cellules sensibles à l'action du FGF4 (Saiz and Plusa, 2013). A terme, l'action du FGF4 participe au maintien de l'identité du PrE et à sa maturation (Kang et al., 2017) (Figure 11C).

Concomitant à la spécification moléculaire EPI/PrE, les cellules de chacun de ces lignages vont également se ségréger dans l'espace de l'ICM, vers E3.75 jours de développement. Au terme du tri cellulaire, les cellules du PrE seront restreintes à la périphérie de l'épiblaste, en contact avec la cavité blastocélique (Plusa et al., 2008). A l'origine des annexes vitellines, elles sont marquées spécifiquement par GATA6. Enfin, les cellules pluripotentes de l'Epiblaste se localisent entre le TE et le PrE et expriment spécifiquement NANOG. Le facteur de transcription OCT4, d'abord commun à ces deux lignages, sera restreint à l'épiblaste seul vers E4.5 jours de développement, peu avant l'implantation.

Alors que la spécification et le maintien de l'identité PrE implique l'action du FGF4 chez le modèle murin, ceci n'est pas observé dans le cas des développements humain et bovin (Kuijk

et al., 2012; Roode et al., 2012). Également, dans l'embryon humain, GATA6 n'est pas le marqueur pionner des cellules du PrE (Roode et al., 2012).

Ainsi, la comparaison des mécanismes de spécification des premiers lignages dans l'embryon murin vs les embryons humain et bovin semble indiquer que le modèle bovin est plus pertinent dans la modélisation du développement embryonnaire humain.

ii. Blastocyste, pluripotence et implantation.

Vers 4 jours de développement, le blastocyste murin contient trois lignages spécifiés que sont le TE, le PrE et l'EPI. L'EPI (précédemment l'ICM) est le lignage pluripotent de l'embryon, c.-à-d. celui à l'origine de la formation du futur organisme. Les trois lignages du blastocyste expriment différents marqueurs qui leurs sont propre : le TE est caractérisé par l'abondance de CDX2 et GATA3, le PrE par celle de GATA6, SOX17 et GATA4, l'EPI est spécifiquement marqué par NANOG, SOX2 et OCT4 (Saiz and Plusa, 2013). L'implantation de l'embryon murin se fait vers E4.5. Chez l'humain, l'implantation se fait aux alentours de 7 jours de développement, alors que les trois lignages ne sont pas encore tout à fait spécifiés. En comparaison, l'embryon bovin s'implante beaucoup plus tardivement, vers 21 jours de développement.

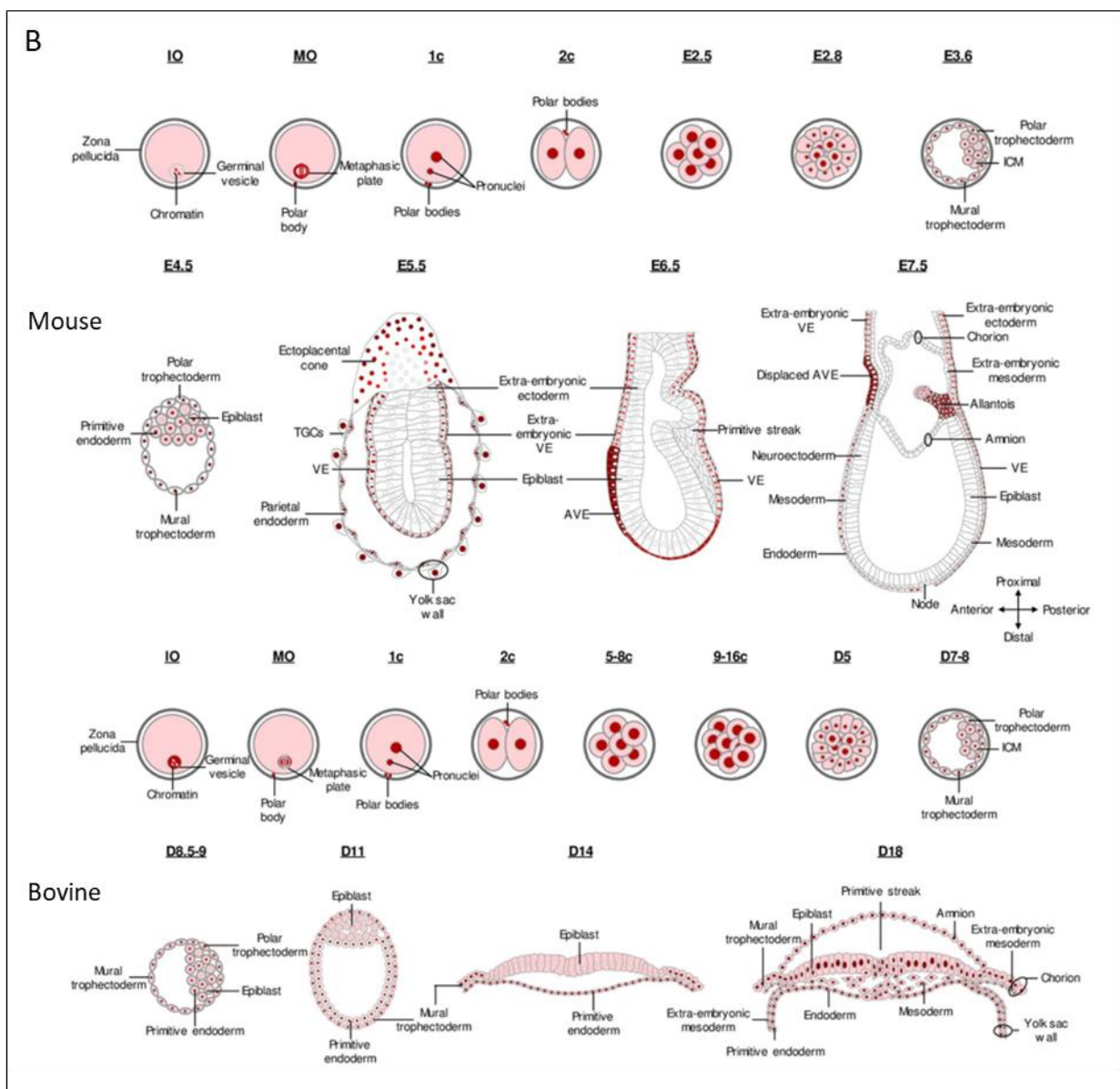
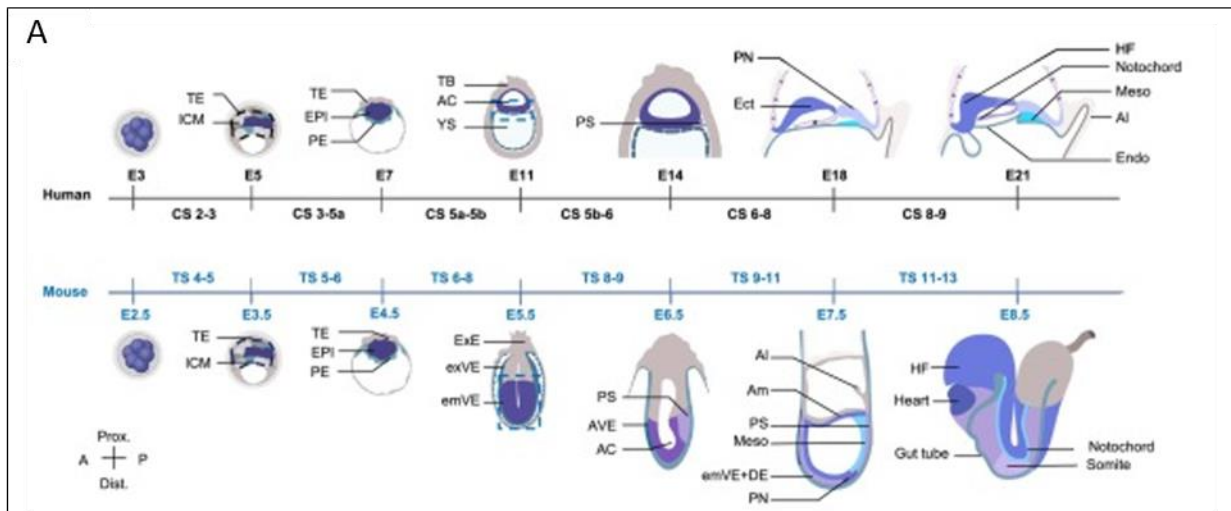


Figure 12 : Comparatifs des temps de développement entre espèces. (A) Comparatif humain et murin (Zhai et al., 2022). (B) Comparatif murin et bovin (Sauvegarde et al., 2016).

3) La gastrulation marque la fin de la pluripotence dans l'embryon péri-implantation

Au cours de l'implantation, la morphologie de l'embryon murin change pour acquérir une forme de cylindre vers E5.0. L'Endoderme Viscéral (VE, issu du PrE) entoure l'embryon qui contient l'Ectoderme Extra-Embryonnaire (ExE, issu du TE) et l'EPI post-implantation, localisé au pôle basal. La gastrulation commence vers E6.5, avec l'apparition de la ligne primitive. La progression de la ligne primitive marque la fin de l'état de pluripotence dans l'embryon murin, vers E7.5, alors que les cellules de l'EPI se spécifient pour produire les trois feuillets embryonnaires : l'endo-, le méso- et l'ectoderme, marquant le début de la différenciation (Morgani et al., 2017). L'équivalent du stade E7.5 murin se retrouve vers 18 jours de développement chez les modèles humain et bovin (Sauvegarde et al., 2016; Zhai et al., 2022) (Figure 12). Depuis l'implantation et jusqu'à E7.5, le potentiel des cellules de l'EPI diminue, à mesure que celles-ci expriment davantage de marqueurs de différenciation vers l'un des feuillets embryonnaires.

2. La pluripotence : comparaison des modèles *in vivo* et *in vitro*

1) Le spectre de la pluripotence : de l'état naïf à l'état amorcé

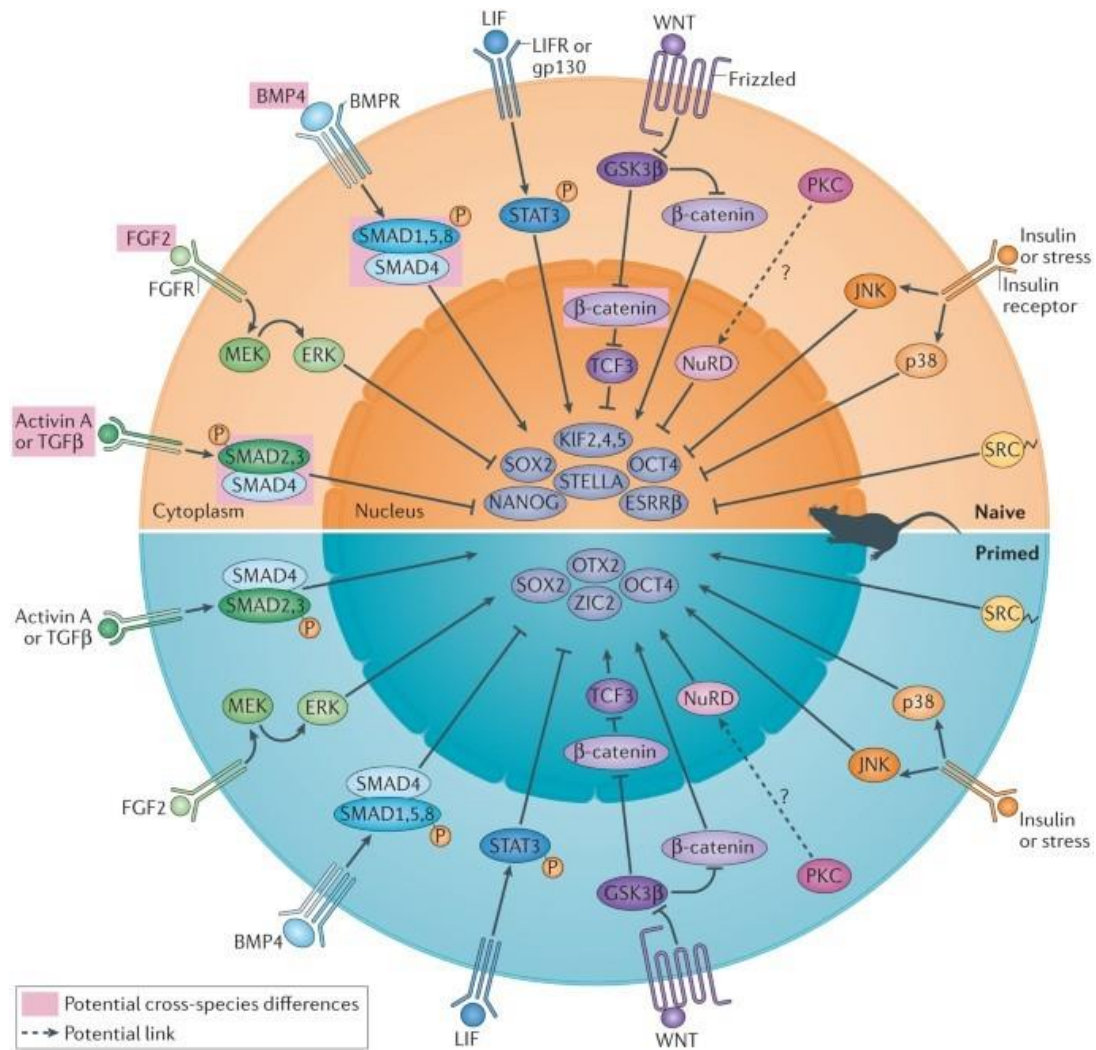
Comme définit par (Morgani et al., 2017), la pluripotence murine est un continuum qui s'étend de 3.5 à 7.5 jours de développement. Les caractéristiques générales des différentes populations de cellules pluripotentes ont d'abord été décrites à partir de modèles *in vitro*. Notamment, les cellules pluripotentes sont capables d'auto-renouvellement et à même de participer à la production des trois feuillets embryonnaires. Néanmoins, les caractéristiques des cellules pluripotentes diffèrent selon qu'on se situe à une extrémité ou l'autre du spectre de la pluripotence. Au cours du développement péri-implantation murin, les caractéristiques morphologiques, transcriptomiques et épigénétiques des cellules pluripotentes évoluent, de sorte qu'au moins deux états de pluripotence peuvent être décrits : l'état de pluripotence naïf, définit à partir des cellules souches embryonnaires (ESCs) - qui correspond aux cellules de l'ICM/EPI pré-implantation - et l'état de pluripotence amorcé, définit à partir des cellules souches épiblastiques (EpiSCs) - qui correspond aux cellules de l'épiblaste vers E7.5 -. Durant l'évolution de la pluripotence, le

potentiel développemental des cellules de l'épiblaste diminue avec le temps. Notamment, les cellules pluripotentes naïves peuvent participer à la production de la lignée germinale ou s'intégrer dans un blastocyste hôte, ce qui n'est pas le cas des cellules pluripotentes amorcées (Rossant, 2008). De plus, les cellules pluripotentes amorcées présentent des caractéristiques communes avec des cellules différenciées tel qu'un haut niveau de méthylation de l'ADN, des compartiments chromatinien bien définis avec une hétérochromatine globalement compacte (Ahmed et al., 2010; Veillard et al., 2014). Ces cellules expriment également des marqueurs précoces de différenciation (Nichols and Smith, 2009) et le réseau des facteurs de pluripotence est différentiellement régulé entre l'état naïf et l'état amorcé (Ding et al., 2015). En plus de ces deux états principaux, deux autres états intermédiaires de pluripotence ont été décrit : la pluripotence « rosette » - qui correspond aux caractéristiques des cellules de l'épiblaste péri-implantation - (Neagu et al., 2020) et la pluripotence « formative » qui est trouvée dans l'embryon vers E5.5 - E6.5 et qui précède l'état de pluripotence amorcée (Wang et al., 2021).

2) La pluripotence *in vitro*

a. Les ESCs murines, référence de la pluripotence naïve

Les cellules souches embryonnaires dérivent de l'ICM du blastocyste (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). La culture des ESCs en présence de LIF et des inhibiteurs des voies MEK et GSK3 (PD et CHIR respectivement) aboutit à une meilleure homogénéité des cellules en culture et une expression homogène du FT NANOG (Singer et al., 2014; Wray et al., 2010) (Figure 13). Ces cellules sont transcriptionnellement proches de l'EPI à E4.5 (Boroviak et al., 2014) et ont la capacité de produire des dérivés des trois feuillets embryonnaires ainsi que de participer à la lignée germinale. Comparées aux cellules ESCs cultivées en présence de sérum, le transcriptome et l'épigénome des ESCs 2i/LIF est caractéristique des cellules pluripotentes naïves (Marks et al., 2012): elles définissent donc l'état de base de la pluripotence naïve (Tosolini and Jouneau, 2016a).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 13 : Comparatif des différentes voies de signalisation participant à la régulation de la pluripotence naïve vs amorcée (Weinberger et al., 2016). Notamment, il est illustré ici qu’une même voie de signalisation agit différemment sur le maintien du réseau de pluripotence - selon que l’on considère des cellules pluripotentes naïves ou amorcées -.

b. A l’autre bout du spectre : les EpiSCs murines

Les cellules souches épiblastiques dérivent de l’épiblaste post-implantation et sont maintenues dans un milieu supplémenté en FGF/Activine A (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007) (Figure 13). Apparentées à l’EPI post-implantation à E7.5, ces cellules ne peuvent participer à la formation de souris chimères à moins d’être injectées dans un embryon post-implantation (Huang, 2012). Néanmoins, elles ne peuvent participer à la lignée germinale alors qu’elles participent - comme les ESCs - à la production des dérivés des trois feuilletts embryonnaires et sont définies comme représentatives de l’état de pluripotence amorcée (Morgani et al., 2017).

c. ESCs chez l'humain et le bovin

Des cellules souches pluripotentes existent pour d'autres espèces que l'espèce murine. Notamment chez l'humain, la plupart des lignées de hESCs présentent des caractéristiques proches de celles des cellules EpiS murines et leur potentiel de différenciation est biaisé (Harkness et al., 2019). Des lignées de cellules hESCs ont plus récemment été obtenues mais les milieux de culture nécessaires à la conservation des caractéristiques de la pluripotence naïve sont plus complexes que ce qui est décrit pour les mESCs (Dong et al., 2019).

Pour le modèle bovin, il existe des bESCs mais celles-ci n'existent qu'à un état équivalent à l'état de pluripotence amorcée (Bogliotti et al., 2018; Soto et al., 2021).

3) Les cellules souches dérivées de l'embryon

En plus des cellules pluripotentes dérivées de l'EPI péri-implantation, des modèles cellulaires souches dérivés des lignages extra-embryonnaires existent pour les modèles murin, humain et bovin. Ainsi, les Trophoblast Stem Cells (TSCs) sont dérivées à partir du TE (ou ExE) et les extraembryonic Endoderm cells (XEN) sont dérivées à partir du lignage PrE.

Les TSCs murines peuvent être dérivées à partir du TE ou de l'ExE (Tanaka et al., 1998). La culture de ces cellules repose sur une supplémentation en FGF4 et héparine (Tanaka et al., 1998). Comme pour les ESCs, l'utilisation d'un milieu sans sérum semble favoriser la dérivation des TSCs depuis le blastocyste (Ohinata and Tsukiyama, 2014).

Comparé au modèle murin, la dérivation de TSCs des modèles humain et bovin est plus récente (Okoe et al., 2018; Wang et al., 2019). Similairement à la souris, la dérivation de TSCs peut se faire depuis le blastocyste ou depuis des cellules du placenta humain. Néanmoins, la composition du milieu de culture à même de soutenir leur auto-renouvellement est différent de ce qui est utilisé pour les TSCs murines (Okoe et al., 2018).

La dérivation d'une lignée stable de TSCs bovine date de 2014. Le maintien en culture des TSCs repose sur l'utilisation des inhibiteurs PD et CHIR, correspondant à ce qui est utilisé pour le maintien des mESCs (Huang et al., 2014).

Pour ce qui est des XEN, leur première caractérisation chez la souris date de 2005 (Kunath et al., 2005). Néanmoins, ces cellules présentent un potentiel de développement restreint et sont similaires à de l'Endoderme Pariétal post-implantation plus qu'au lignage PrE (Sozen et al., 2018). Plus récemment, il a été montré que l'obtention de XEN plus « naïves », davantage similaires au lignage PrE pré-implantation, pouvait se faire à partir de la « conversion » d'ESCs murines (Anderson et al., 2017). Chez l'humain, l'obtention de cellules XEN s'est faite par l'induction de l'expression du FT SOX17 dans des hESCs (Séguin et al., 2008). A ma connaissance, il n'existe pas de modèle XEN pour l'espèce bovine.

L'enchaînement des différents « programmes » de développement liés à l'activation du génome embryonnaire, à la formation des lignages et à la progression de l'état de pluripotence vers la différenciation se fait également selon un important remodelage du paysage épigénétique de l'embryon et des cellules pluripotentes. Nous allons donc nous intéresser pour la suite de cette introduction à la nature des remaniements épigénétiques qui ont lieu au cours du développement précoce.

III. Remodelage épigénétique au cours du développement précoce murin

1. Caractéristiques épigénétiques héritées de la gamétogénèse

Tout au long de l'ovo- et de la spermatogénèse, les gamètes parentaux ont acquis des caractéristiques épigénétiques qui leurs sont spécifiques.

Au cours de la spermatogénèse, l'essentiel des histones a été remplacé par des protamines, permettant une condensation du génome paternel six fois supérieure à la compaction d'un chromosome en métaphase (McLay and Clarke, 2003). Néanmoins, il existe une faible proportion d'histones maintenues à la chromatine du génome paternel - 1 à 10% pour le modèle murin, 10 à 15% pour l'humain - (Torres-Flores and Hernández-Hernández, 2020). Cette rétention concerne notamment des variants d'histones - comme H3.3 - et des modifications d'histones - comme H3K4me3/H3K27me3 et H3K9me3 - qui demeurent aux régions promotrices riches en CG non méthylées ou aux séquences répétées (Erkek et al., 2013; Jung et al., 2017; Yamaguchi et al., 2018). Dans le spermatozoïde ainsi que dans l'ovocyte, les îlots CpG sont globalement déméthylés à l'issue de la gamétogénèse. Également,

le niveau de méthylation globale du gamète paternel est supérieur à celui de l'ovocyte (Wang et al., 2014). Le profil de méthylation de l'ADN dans l'ovocyte est établi par DNMT3A/L et est globalement antagoniste des distributions de H3K4me3 et H3K27me3 (Sendžikaitė and Kelsey, 2019). A noter que les distributions non canoniques observées pour ces deux modifications d'histones dans l'ovocyte murin n'ont pas été observées chez l'humain (Xia and Xie, 2020).

Pour ce qui est de l'architecture des héli-génomés parentaux, ceux-ci sont différentiellement organisés à l'issue de la formation des gamètes. Le génome des cellules somatiques est organisé en deux compartiments principaux (A et B), eux-mêmes sous structurés en TADs (Dixon et al., 2012; Lieberman-Aiden et al., 2009). Le génome du spermatozoïde présente également cette organisation en TADs, similaire à ce qui est observé en cellules ES (Jung et al., 2017). A l'inverse, le génome maternel, qui est bloqué en métaphase II, ne présente pas cette organisation (Du et al., 2020; Ke et al., 2017).

2. Les remaniements épigénétiques : de la fécondation à la gastrulation

A la suite de la fécondation, le génome paternel passe par une phase de décondensation importante et les protamines sont remplacées par des histones d'origines maternelles, stockées dans le cytoplasme ou nouvellement traduites (McLay and Clarke, 2003). Cette incorporation d'histones, ainsi que les remaniements épigénétiques qui suivent la fécondation, aboutissent à un enrichissement asymétrique des génomes parentaux en diverses modifications épigénétiques (Xu and Xie, 2018). L'épigénome paternel est davantage remanié que le maternel, notamment pour ce qui est de la méthylation de l'ADN et des modifications épigénétiques H3K4me et H3K27me3 ; l'épigénome zygotique post-fécondation partageant de plus grandes similitudes avec l'épigénome maternel (Wang et al., 2014; Zheng et al., 2016) (résumé en Figure 14).

1) Méthylation de l'ADN

Le pro-noyau paternel est activement déméthylé (Oswald et al., 2000) et protégé de l'apposition *de novo* de méthylation de l'ADN (Amouroux et al., 2016), aboutissant à un fort enrichissement en 5hmC en amont de la réplication (Iqbal et al., 2011). La déméthylation des deux génomes parentaux se poursuit par dilution au cours des premiers clivages, pour

atteindre un minimum au stade blastocyste (Smith et al., 2012). La dynamique de baisse de méthylation de l'ADN concerne l'ensemble du génome, dont les séquences satellites (Wang et al., 2014). Les niveaux de méthylation restent bas jusqu'à l'implantation (Smith, 2012). Au moment de l'implantation, une vague de méthylation *de novo* de l'ADN se fait dans l'embryon pour aboutir à un génome hyperméthylé dans l'embryon post-implantation (Smith et al., 2012; Wang et al., 2014). L'augmentation des niveaux de méthylation de l'ADN se fait sur l'ensemble du génome, à l'exception des promoteurs des gènes de différenciation qui demeurent hypométhylés (Wang et al., 2014).

Gènes soumis à empreinte

Les « régions de contrôle de l'empreinte » (ICRs) sont des séquences différenciellement méthylées selon leur origine (maternelle ou paternelle) et dont l'expression est mono-allélique. Certaines ICRs sont établies au cours de la gamétogénèse et réprimées tout au long du développement (Reik and Walter, 2001), tandis que d'autres sont établies au cours du développement et leur maintien est tissu-spécifique (Wei Xie et al., 2012).

Également, il a récemment été montré qu'il existe des ICRs majoritairement transitoires et dont la régulation transcriptionnelle est indépendante de la méthylation de l'ADN. Ces régions dépendent de l'apposition de H3K27me3 hérité du génome maternel (Inoue et al., 2017). La plupart de ces ICRs perdure jusqu'au stade blastocyste et est perdue dans l'épiblaste post-implantation. Seules quelques ICRs dépendantes de H3K27me3 perdurent dans les lignages extra-embryonnaires (Inoue et al., 2017). A noter que le KO maternel d'EED entraîne une dérégulation des ICRs dépendantes de H3K27me3 (Inoue et al., 2018).

2) H3K4me3, H3K27me3 et les domaines bivalents

a. H3K4me3

La distribution de H3K4me3 dans l'ovocyte est considérée comme « non canonique », c.-à-d. que, contrairement à la distribution communément observée en cellules somatiques, H3K4me3 dans l'ovocyte est présente sous la forme de domaines étendus qui couvrent 22% de l'hémi-génome maternel (Dahl et al., 2016). Certains domaines pourvus de H3K4me3 contiennent également de faible niveau de méthylation de l'ADN (à hauteur de 20%) et

H3K4me3 est exclu des régions hautement méthylées (Dahl et al., 2016). La distribution de H3K4me3 en larges domaines situés au niveau des TSS concerne 80% des gènes développementaux transcrits lors de l'EGA (Dahl et al., 2016). Par ailleurs, l'EGA est nécessaire à la redéfinition des domaines H3K4me3 (Zhang et al., 2017). Au cours de l'EGA, les domaines H3K4me3 vont se restreindre en pic au niveau des TSS (Liu et al., 2016) et conjointement gagner en H3K27ac aux stades 2-/8-cellules (Dahl et al., 2016). La redistribution et l'enrichissement en H3K4me3 aux TSS des gènes développementaux perdure jusqu'au stade blastocyste (Liu et al., 2016). Les autres domaines étendus de H3K4me3, situés à distance des gènes ou au niveau de séquences répétées (type ERL) transitoirement exprimées au moment de l'EGA, disparaissent peu après le stade 2-cellules (Liu et al., 2016). Également, l'égalisation de la distribution de H3K4me3 entre les deux génomes parentaux se fait par le gain de domaines H3K4me3 au génome paternel (Zhang et al., 2016).

b. H3K27me3

Les domaines H3K27me3 du génome paternel, similaires à ceux postérieurs à l'implantation, ne perdurent pas après la fécondation (Zheng et al., 2016). L'acquisition de H3K27me3 au génome paternel est postérieure à la fécondation et son remaniement ne dépend pas de l'EGA - contrairement à H3K4me3 - (Burton and Torres-Padilla, 2010; Zheng et al., 2016). Les domaines H3K27me3 non canoniques hérités du génome maternel sont maintenus au niveau des gènes de différenciation alors que les domaines concernant les gènes développementaux et différents facteurs de transcription sont perdus au cours des premiers clivages (Zheng et al., 2016). L'établissement de H3K27me3 à la suite de la fécondation repose sur l'action des stocks maternels d'EZH2 (Meng et al., 2020). L'asymétrie parentale pour H3K27me3 perdure jusqu'au stade 8-cellules (Collombet et al., 2020).

L'enrichissement globale du génome en H3K27me3 augmente au cours du développement péri-implantation (Liu et al., 2016). Notamment, H3K27me3 est apposée aux séquences cibles des complexes Polycomb à partir du stade blastocyste, puis aux promoteurs des gènes du développement après l'implantation (Zheng et al., 2016).

c. Les domaines bivalents H3K4me3/H3K27me3

Les domaines bivalents ont premièrement été identifiés au sein des cellules ES (Azuara et al., 2006; Bernstein et al., 2006). Ce sont des régions du génome qui sont conjointement enrichies en H3K4me3 et H3K27me3. Les promoteurs bivalents sont dans un état intermédiaire : la présence de H3K4me3 entraîne le recrutement de l'ARN pol II mais la progression de celle-ci est stoppée par la présence de H3K27me3 (Azuara et al., 2006; Bernstein et al., 2006). Les régions bivalentes, « poised » ou « gelées » pour la transcription, sont ainsi réprimées mais présentent des caractéristiques d'une chromatine accessible (Azuara et al., 2006). Au cours du développement précoce, la plupart des domaines bivalents ne perdurent pas au cours des divisions (Liu et al., 2016), et la labilité des domaines bivalents précoces dépend de la dynamique de H3K27me3 à ces loci. L'apparition de domaines bivalents est remarquée lors de la spécification des premiers lignages (Liu et al., 2016) puis le nombre de domaines bivalents augmente au moment de l'implantation et est plus important dans l'épiblaste post-implantation (Zheng et al., 2016). A noter que les promoteurs bivalents sont protégés de l'action des DNMT - évitant tout risque d'établissement d'un environnement répressif stable - (Greenberg, 2021).

Au cours de l'établissement des ESCs en sérum, 70% des domaines bivalents identifiés dans l'ICM sont conservés. Cependant, les domaines bivalents sont plus abondants en cellules ES que dans l'embryon pré-implantation (Liu et al., 2016). Également, 20% des domaines bivalents issus de l'embryon sont convertis en domaines enrichis en H3K4me3 et concernent des gènes développementaux. Les domaines bivalents *in vitro* sont enrichis en séquences tissus-spécifiques et/ou qui étaient principalement enrichies en H3K27me3 dans l'ICM. Par contraste, les domaines bivalents perdus représentent les séquences plutôt enrichies en H3K4me3 et fortement exprimées au cours du développement précoce (Liu et al., 2016). Néanmoins, la proportion de domaines bivalents est plus faible dans les ESCs cultivées en 2i/LIF (Marks et al., 2012). Au cours de la transition de l'état naïf à l'état amorcé *in vitro*, la quantité de domaines bivalents est multipliée par trois dans les cellules formatives et la plupart de ces domaines sont conservés dans les EpiSCs amorcées (Kinoshita et al., 2021).

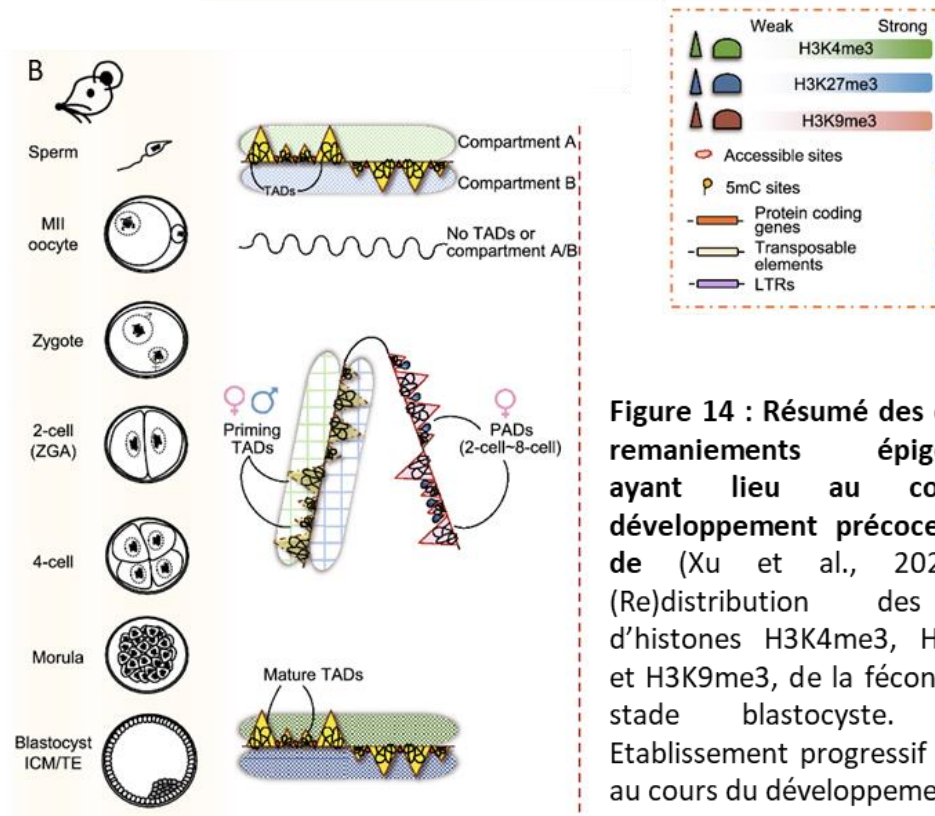
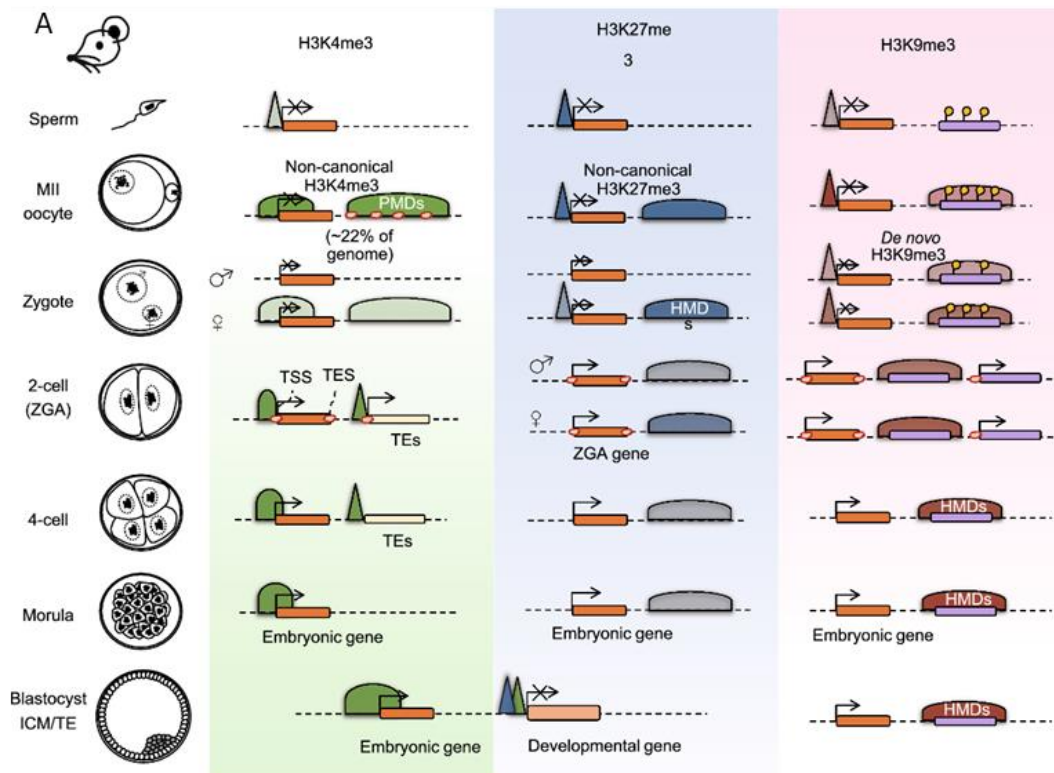


Figure 14 : Résumé des différents remaniements épigénétiques ayant lieu au cours du développement précoce (Adapté de (Xu et al., 2021)). (A) (Re)distribution des PTMs d’histones H3K4me3, H3K27me3 et H3K9me3, de la fécondation au stade blastocyste. (B) : Etablissement progressif des TADs au cours du développement murin.

3) H3K9me3

A l’issue de la fécondation, le génome paternel est dépourvu de nucléosome contenant H3K9me3 et les domaines H3K9me3 qui constituent l’hétérochromatine constitutive sont

hérités du génome maternel (Wang et al., 2018). L'apposition *de novo* de H3K9me3 au génome paternel se fait après la fécondation, induisant une asymétrie des régions enrichies par H3K9me3 entre les deux génomes parentaux ; asymétrie qui sera résolue au stade blastocyste par la perte de domaines marqués par H3K9me3 dans le génome maternel (Wang et al., 2018). L'apposition de H3K9me3 au pro-noyau paternel repose notamment sur l'action de l'enzyme SUV39H2 (Burton et al., 2020).

Au cours du développement précoce, les régions marquées par H3K9me3 sont hautement dynamiques et peuvent être classées en trois groupes selon leur origine, le moment de leur établissement et les caractéristiques épigénétiques associées. Tout d'abord, les régions spécifiques à l'ovocyte concernent entre autres les promoteurs des gènes du développement, activés au cours de l'EGA. Faibles en méthylation de l'ADN, non associés à H3K27me3, le marquage de ces domaines par H3K9me3 sera perdu peu après la fécondation (Wang et al., 2018). Ensuite, les domaines spécifiques au développement précoce : ces domaines sont formés après la fécondation, en association avec H3K27me3, et disparaissent au stade morula (Wang et al., 2018). Enfin, les domaines spécifiques au blastocyste, formés après le stade 4-cellules et dont l'enrichissement en H3K9me3 est renforcé tout au long du développement pré-implantation. Ces domaines concernent notamment les séquences répétées du génome - dont certaines (type MERVL) sont exprimées transitoirement au moment de l'EGA - et sont associés à une présence abondante de CpG méthylées (Wang et al., 2018).

Au cours des premiers clivages, la chromatine issue du génome paternel et marquée par H3K9me3 demeure globalement relaxée. Également, la présence de H3K9me3 au début du développement n'est pas associée au phénomène de répression transcriptionnelle. Ce n'est qu'à partir du stade 8-cellules que l'enrichissement en H3K9me3 aura pour effet de réprimer la transcription, notamment des séquences répétées (LTR, SINE...) (Burton et al., 2020). A noter que la surexpression de SUV39H1 à la suite de la fécondation induit une forte compaction de la chromatine marquée par H3K9me3, couplée à l'apposition de H4K20me3, ce qui aboutit à un défaut dans la spécification des premiers lignages, de l'émergence de la pluripotence et globalement, entraîne l'arrêt du développement avant le stade blastocyste (Burton et al., 2020).

3. Etablissement des TADs et compaction de la chromatine au cours du développement précoce

A l'issue de la fécondation, les pro-noyaux parentaux présentent une organisation différentielle de leurs génomes.

L'organisation globale du génome zygotique est transitoirement perdue à la suite de la fécondation, du fait de l'échange protamine-histone au génome paternel. L'établissement des contacts chromatiniens, la formation des TADs et la définition des compartiments A/B se fait progressivement au cours des premiers clivages (Du et al., 2017). Il a également été mis en évidence que la réplication (et non la transcription) est nécessaire à l'établissement des TADs primitifs dans le zygote (Ke et al., 2017). Également, les génomes parentaux sont spatialement ségrégués dans l'espace nucléaire embryonnaire jusqu'au stade 8-cellules. La stabilité des interactions au sein des TADs augmente au cours du développement pour aboutir à la formation de TADs « matures » dans le blastocyste, tout comme ils le sont dans les mESCs (Du et al., 2017).

L'accessibilité globale de la chromatine (mesurée via sa sensibilité au traitement MNase) augmente globalement au cours du développement précoce. Notamment, les sites présentant une hypersensibilité à la DNase apparaissent en deux vagues, au stade 2-cellules puis au stade 8-cellules (Lu et al., 2016). Dans la morula, les sites sensibles concernent notamment les promoteurs des gènes liés à la spécification des premiers lignages ICM/TE (Du et al., 2017). Au sein du blastocyste, les cellules présentent une chromatine globalement relaxée, au contraire des cellules des lignages extra-embryonnaires (Ahmed et al., 2010). Aux stades post-implantation, les compartiments A et B sont bien définis et l'hétérochromatine compacte. La différence de compaction de la chromatine entre cellules pluripotentes naïves et cellules pluripotentes amorcées observées *in vivo* est reflétée dans leur équivalent *in vitro* (Ahmed et al., 2010).

4. L'hétérochromatine péricentromérique : formation des chromocentres et caractéristiques épigénétiques *in vivo* et *in vitro*

1) L'hétérochromatine péricentromérique est asymétriquement marquée selon son origine - maternelle ou paternelle

Dans le zygote, les séquences satellites majeures de l'hétérochromatine péricentromérique se localisent majoritairement autour des Nucleolar Precursors Bodies (NPBs) (Aguirre-Lavin et al., 2012; Probst et al., 2010). Concomitamment aux remaniements épigénétiques globaux du génome, l'hétérochromatine péricentromérique exhibe une asymétrie épigénétique dans l'embryon 1-cellule. Les séquences satellites majeures d'origine maternelle sont enrichies en H3K9me3 (et HP1b), à l'inverse du génome paternel à l'issue de la fécondation. Au cours du stade 1-cellule, l'hétérochromatine péricentromérique d'origine paternelle est enrichie en H3K27me3 (Puschendorf et al., 2008; Tardat et al., 2015) (Figure 15). L'apposition de H3K27me3 se fait au cours de la réplication du génome paternel et dépend de la localisation du complexe PRC1 à l'hétérochromatine péricentromérique, localisation médiée par CBX2 (Tardat et al., 2015). Notamment, RNF2, la sous-unité catalytique de PRC1, est localisée aux séquences satellites majeures au cours des premiers clivages (jusqu'au stade 8-cellules) (Puschendorf, 2008).

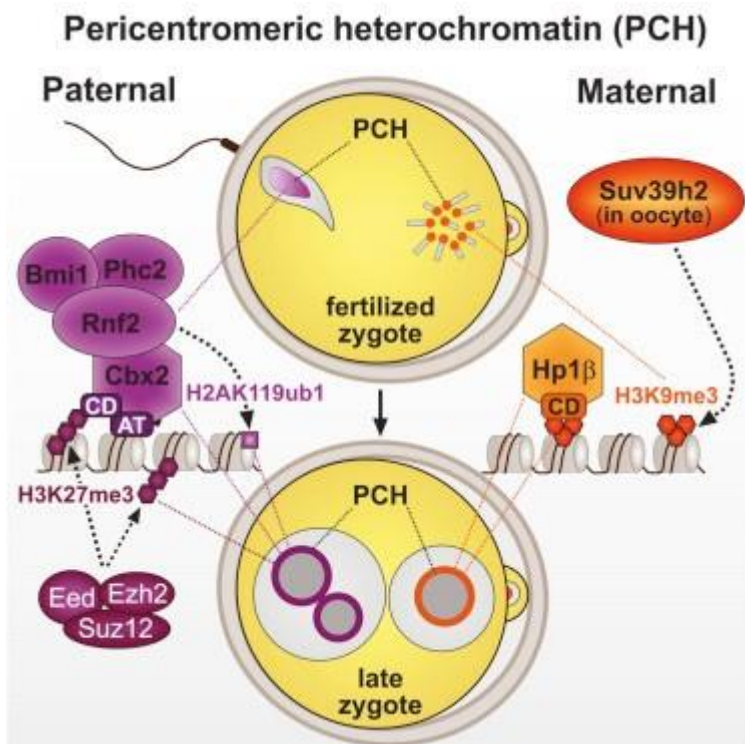


Figure 15 : Représentation schématique de l'asymétrie épigénétique des séquences péricentromériques dans le zygote, à la suite de la fécondation (Tardat et al., 2015).

L'activation majeure du génome embryonnaire au stade 2-cellules marque le changement d'organisation de l'hétérochromatine péricentromérique qui commence à former des amas au sein du noyau : les chromocentres (Aguirre-Lavin et al., 2012; Probst et al., 2010). La formation des chromocentres au stade 2-cellules se fait conjointement à la transcription des séquences satellites majeures, initiée au stade 1-cellule à partir du génome paternel (Probst et al., 2010). La suppression des transcrits issus des séquences satellites majeures entraîne un défaut de formation des chromocentres ainsi que l'arrêt ultérieur du développement (Casanova et al., 2013).

La présence de H3K27me3 visible à l'hétérochromatine péricentromérique au stade 1-cellule se maintient au cours de la formation des chromocentres et perdure jusqu'au stade 8-/16-cellules (Puschendorf et al., 2008).

2) ESCs mutantes : ce qu'elles nous apprennent sur la régulation épigénétique de l'hétérochromatine péricentromérique

Originellement utilisées comme modèle de l'ICM/EPI pré-implantation, les ESCs cultivées en milieu sérum présentent un génome hautement méthylé et des chromocentres marqués par H3K9me3, H4K20me3 et HP1 (Lehnertz et al., 2003). Des lignées ESCs mutantes pour les enzymes responsables de l'apposition de H3K9me3 à l'hétérochromatine péricentromérique (ESCs *suv39hdn*, (Peters et al., 2001)) ou pour l'apposition et/ou le maintien de la méthylation de l'ADN (ESCs *Dnmt1*^{-/-}, *Dnmt3a*^{-/-}, *Dnmt3b*^{-/-} : *Dnmt*-TKO, (Tsumura et al., 2006)) ont donné des pistes intéressantes concernant la régulation (et la plasticité) du profil épigénétique de l'hétérochromatine péricentromérique.

Dans les ESCs *suv39hdn*, l'enrichissement en H3K9me3 est fortement diminué aux séquences satellites majeures (et mineures) et les foci H3K9me3 sont absents des chromocentres (Lehnertz et al., 2003; Martens et al., 2005). Cette forte diminution entraîne une diminution de l'enrichissement en H4K20me3, conjointement à la perte des foci HP1 et à une baisse de la méthylation de l'ADN aux séquences satellites majeures (Lehnertz et al., 2003; Martens et al., 2005). Dans ces cellules, la diminution des marques de l'hétérochromatine constitutive aboutit à la l'apposition marquée de H3K27me3, une modification épigénétiques associée à l'hétérochromatine facultative (Lehnertz et al., 2003; Martens et al., 2005; Peters et al., 2003).

Dans les ESCs Dnmt-TKO, l'abolition de la méthylation des séquences satellites majeures n'influe pas sur la distribution en foci de H3K9me3 et HP1a aux chromocentres (Cooper et al., 2014). En plus de H3K27me3 qui est enrichie aux chromocentres des cellules ES Dnmt-TKO - similairement à ce qui est observé dans les cellules ES *suv39hdn*^{-/-}, H2AK119UB (apposée par le complexe PRC1) est également enrichie aux clusters d'hétérochromatine péricentromérique (Cooper et al., 2014).

Plus récemment, Saksouk et collaborateurs ont mis en évidence que H3K27me3 est plus fréquemment enrichie à l'hétérochromatine péricentromérique des ES Dnmt-TKO. Couplée au fort enrichissement en H3K27me3, RNF2 - une sous-unité catalytique du complexe PRC1 - est également retrouvée aux chromocentres des cellules Dnmt-TKO (Saksouk et al., 2014). Le criblage des partenaires différentiellement associés à l'hétérochromatine péricentromérique entre cellules WT et cellules ES *suv39hdn* ou ES Dnmt-TKO a mis en évidence que la protéine BEND3 est associée aux séquences péricentromériques dans les cellules mutantes. Également, certaines sous-unités des complexes PRC2, PRC1 et NuRD se retrouvent associées aux séquences péricentromériques des cellules mutantes pour les enzymes d'apposition de H3K9me3 et/ou de la méthylation de l'ADN (Saksouk et al., 2014). Dans cette étude, il est proposé un modèle de régulation des caractéristiques épigénétiques de l'hétérochromatine péricentromérique, dépendante entre autres du niveau de méthylation de ces séquences. L'acquisition de marques de l'hétérochromatine facultative via le recrutement de PRC2 aux séquences péricentromériques serait médiée par BEND3, en partenariat avec le complexe NuRD/MBD3 (Figure 16).

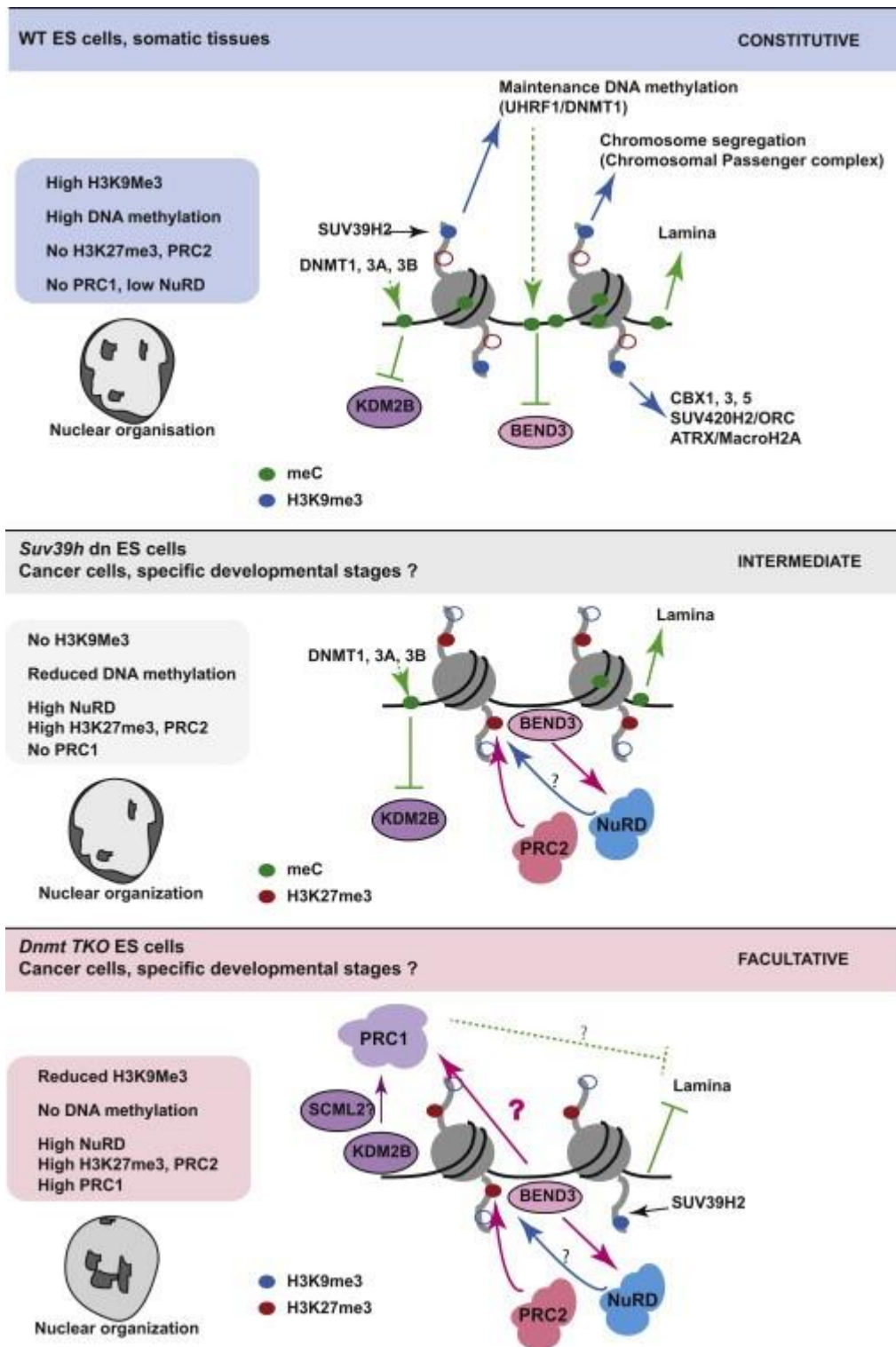


Figure 16 : Modèles d'interactions des différents acteurs épigénétiques de l'hétérochromatine péricentromérique selon le contexte cellulaire (Saksouk et al., 2014).

3) ESCs vs EpiSCs : H3K27me3 discrimine les cellules pluripotentes naïves et amorcées

Les travaux de thèses de Matteo Tosolini (résumés dans (Tosolini et al., 2018) ont notamment décrit les caractéristiques épigénétiques des ESCs en 2i/LIF versus les EpiSCs. Au cours de sa thèse, il a notamment montré que les cellules ESCs en 2i présentent un enrichissement en H3K27me3 visible aux chromocentres (pour 69% des cellules). En revanche, les EpiSCs amorcées ne présentent pas un tel enrichissement mais des chromocentres marqués de façon homogène par H3K9me3. Ces deux états diffèrent notamment par le niveau de méthylation de leurs génomes (plus faible en 2i/LIF). Également, les ESCs en 2i/LIF présentent une transcription des séquences satellites majeures supérieure à celles des EpiSCs. De façon intéressante, l'étude des mutants *suv39hdn* et *Dnmt-TKO* a montré que ces cellules ne présentaient qu'une faible augmentation de la transcription des séquences satellites majeures lorsqu'elles sont maintenues en milieu 2i/LIF ; en revanche, la transcription de ces mêmes séquences est dérégulée dans cEpiSCs *suv39hdn*. Enfin, il a également été mis en évidence que la perte de H3K27me3 aux chromocentres (via l'inhibition de la sous-unité catalytique EZH2 par un inhibiteur chimique EPZ-6438) entraîne une légère diminution de la transcription des séquences satellites majeures (Tosolini et al., 2018).

OBJECTIFS

Le développement embryonnaire est une période intense de remaniements au cours duquel la distribution de la plupart des modifications épigénétiques diffèrent de la situation en cellules différenciées. Les premiers clivages sont marqués par l'établissement d'un environnement structurel et épigénétique de la chromatine à même de supporter l'activation du génome embryonnaire et le développement ultérieur du zygote. Notamment, la chromatine des cellules de l'embryon est globalement relaxée au cours des premières divisions et cet environnement globalement permissif à la transcription est une caractéristique des cellules pluripotentes naïves. Néanmoins, les séquences répétées doivent être maintenues sous contrôle transcriptionnel afin d'assurer la stabilité du génome embryonnaire. De plus, le maintien de la structure et du contrôle transcriptionnel de l'hétérochromatine se fait selon un équilibre fragile entre nécessité de limiter la transcription de ces séquences tout en permettant une transcription basale indispensable à son organisation première.

De précédents travaux menés en ESCs et en EpiSCs avaient mis en évidence que le profil épigénétique de l'hétérochromatine péricentromérique discrimine ces populations cellulaires selon leur état de pluripotence (naïf ou amorcé). Alors que beaucoup de leçons sont tirées des modèles cellulaires pluripotents, les observations faites *in vitro* ne sauraient être un parfait reflet de la situation *in vivo*. Cette étude présente donc ce comparatif entre modèle cellulaire et embryon. Le premier objectif de ce projet était de décrire de façon la plus exhaustive possible le profil épigénétique des chromocentres au cours du développement péri-implantation murin, notamment de l'émergence de l'état de pluripotence naïve à l'avènement de la pluripotence amorcée. Le second objectif a été d'identifier les acteurs responsables de la possible apposition d'une marque associée à l'hétérochromatine facultative – H3K27me3 – au niveau du compartiment d'hétérochromatine constitutive qu'est l'hétérochromatine péricentromérique, dans le but d'en identifier le rôle dans le contrôle des séquences satellites majeures et de leur organisation dans l'espace. Enfin, nous avons eu pour objectif de comparer entre elles deux espèces aux rythmes développementaux différents – le modèle murin vs le modèle bovin – afin de déterminer si la présence de H3K27me3 aux chromocentres était une caractéristique de l'hétérochromatine péricentromérique propre au développement mammifère précoce.

MATERIEL ET METHODES

1. Production, Collecte et Fixation des embryons

1) Murin

a. Embryons péri-implantations

Les embryons utilisés pour la description de la dynamique de H3K27me3, H3K9me3 ainsi que BEND3 et EZH2 au cours du développement péri-implantation ont été obtenus après accouplement naturel de souris CD1/CD1. Les blastocystes ont été collectés par lavage des cornes utérines à l'aide de milieu M2 (Sigma) préchauffé, entre 3 et 5 jours post-accouplement. La détermination du stade se faisait en premier lieu selon l'heure de récupération des embryons et selon deux critères morphologiques : taille du blastocœle et forme de l'ICM. Les embryons post-implantations à E5.5 et E6.5 jours de développement ont été prélevés de leurs déciduas et disséqués dans du FHM (Flushing Handling Medium).

Stade	Heure post-accouplement (hpc)	Nombre de cellules	Blastocœle	Forme de l'ICM	Ségrégation EPI/PrE
<i>E2.75/16C</i>	~78h	16	Non		
<i>E3.25</i>	~90h	30-45	Oui, $V < V_{ICM}$	ronde	Non
<i>E3.5</i>	95-97h	60-75	Oui, $V = V_{ICM}$	ronde	“sel et poivre”
<i>E3.75</i>	~98h	90-100	Oui, $V > V_{ICM}$	ovale	en cours
<i>E4.0</i>	100-102h	100+	Oui, $V > V_{ICM}$	conique	complète
<i>E4.25</i>	107-109h	100+	collapsé	+/- conique	complète

Tableau 1 : Caractéristiques discriminantes des différents stades de développement du blastocyste.

b. Embryons précoces

Les embryons utilisés pour la description de la dynamique précoce de H3K27me3, H3K9me3 ainsi que BEND3 et EZH2 ont été obtenus à partir de femelles C57/CBAF1 super-

ovulées (injection de 0.1ml de PMSG 48h pré-accouplement suivi d'une injection de 0.1ml d'hCG avant la mise en accouplement). Les embryons ont été prélevés au stade 1-cellule (24h phCG), dans du milieu M2 (Sigma), par dissection des oviductes et après une courte incubation en Hyaluronidase/M2 (Sigma) - quelques minutes à 37°C - et rinçages successifs en M2 (Sigma). Les embryons ont ensuite été mis en culture en gouttes (20µl) de milieu M16 (Sigma) sous huile minérale, dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂. Les embryons ont ensuite été fixés aux stades 2-cellules (48h phCG), 4-cellules (58h phCG), 8-cellules (68h phCG) et 16-cellules (75h phCG).

2) Bovin

Les blastocystes bovins ont été obtenus après fécondation *in vitro* (FIV) d'ovocytes prélevés sur des ovaires d'abattoir, puis maturés 24h et mis en présence de spermatozoïdes issus de paillettes décongelées. Après l'arrêt du processus de FIV, les embryons ont été mis en culture en gouttes (50µl) de milieu SOF (Minitüb) sous huile minérale, dans un incubateur à 39°C, 5% CO₂ et 5% O₂. Les blastocystes ont été fixés aux stades J6, J7 et J8 à compter de J1 le jour de mise en FIV.

L'ensemble des embryons, tous stades et espèces confondus, a été fixé 20min à TA dans une solution PFA/PBS 2% (Electron Microscopy Science).

2. Expérimentations siRNA, culture en présence d'inhibiteurs & embryons chimères

1) siRNA et culture en présence d'inhibiteurs de la machinerie épigénétique

Les embryons utilisés pour ces études ont été obtenus à partir de femelles C57/CBAF1 super-ovulées (injection de 0.1ml de PMSG 48h pré-accouplement suivi d'une injection de 0.1ml d'hCG avant la mise en accouplement). Les embryons ont été prélevés au stade 1-cellule (24h phCG) puis électroporés à l'aide d'un électroporateur NEPA21 de type II (NEPA Gene Co. Ltd., Japon) en suivant les paramètres précédemment publiés (Teixeira et al., 2018), à raison de 25 embryons électroporés dans une solution de OptiMEM (Sigma) contenant 5µg de siRNA. Les embryons ainsi électroporés ont ensuite été cultivés en gouttes de 20µl de KSOM (Sigma), sous huile minérale, dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂ et fixés à 96h phCG, après 72h de culture *in vitro*.

Pour les expérimentations impliquant l'utilisation de siRNA ciblant les transcrits maternels *Ezh2*, le milieu de culture des embryons a été supplémenté en EPZ6835 (un inhibiteur de EZH2, MedChemExpress), à 5µM, afin de compléter l'effet des siRNA en inhibant l'activité enzymatique d'EZH2 sur H3K27me3.

Également, selon les mêmes formalités de récupérations des embryons, des zygotes ont été cultivés 72h en présence d'inhibiteur de EZH2 (EPZ6835, dilué en DMSO à 5µM) ou d'inhibiteur de KDM6B (GSK J4 - Sigma, dilué en DMSO à 15mM).

Les milieux de culture contenant les inhibiteurs ont été renouvelés tous les jours, et les autres boîtes de culture *in vitro* ont été soumises aux mêmes variations de température.

2) Culture en présence d'un inhibiteur de l'aPKC

Les embryons utilisés ont été obtenus après accouplement naturel CD1/CD1 et prélevés aux stades E3.0/E3.25. Ces embryons ont ensuite été mis en culture cultivés en goutte de 20µl de KSOM (Sigma) - contenant du DMSO au 1/200^{ème} ou l'inhibiteur Gö (5µM, (Saiz et al., 2013)) - sous huile minérale, dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂ et fixés 24h après la mise en culture.

3) Chimères

Des embryons issus d'accouplements naturels CD1/CD1 et prélevés 3 jours après accouplement (stade 4/8-cellules non compacté) ont été dépellucidés vivants par incubation rapide en solution de Tyrode acide (Sigma), quelques secondes à TA, puis rincés dans du M2 (Sigma) maintenu à 37°C. Chaque embryon a ensuite été mis en culture dans une goutte de KSOM (10µl) contenant une vingtaine de cellules ES préalablement cultivées en milieu 2i/LIF. La culture des embryons s'est faite en goutte « suspendues » au couvercle d'une boîte de culture afin de favoriser l'intégration des ESCs FUCCI (don de P. Savatier) et la formation d'embryons chimères.

3. Culture cellulaire

1) Murin

a. Dérivation et culture des ESCs

Les ESCs ont été dérivées à partir de blastocystes CD1/CD1 issus d'accouplements naturels et récupérés à E3.5 jours de développement. Ces blastocystes ont été individuellement mis en

culture en milieu 2i/LIF, en présence de feeders, dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂. Une fois les blastocystes adhérents aux feeders, le milieu a été renouvelé et l'ICM laissé à proliférer pendant 48h supplémentaires. La masse de cellules dérivée de l'ICM a ensuite été isolée et dissociée par une courte incubation en TrypLE 1X (Gibco) - 10min à TA -. Chaque suspension cellulaire a été remise en culture individuellement en milieu 2i/LIF, en présence de feeders. Le milieu a été renouvelé chaque jour jusqu'à apparition des premières colonies. Chaque lignée d'ESCs dérivées de blastocyste CD1/CD1 a été amplifiée sur feeders pendant 2 autres passages espacés chacun de 48h. Une fois les lignées établies, les ESCs ont été mises en culture sur laminine et cultivées comme décrit précédemment (Tosolini and Jouneau, 2016a), passées tous les 3 jours après incubation en Trypsine-EDTA 0,25%, 3min, 37°C (Gibco).

b. Conversion des ESCs en cEpiSCs

La conversion des ESCs en cEpiSCs a été faite à partir d'ESCs CD1 cultivées sur laminine en milieu 2i/LIF pendant au moins 5 passages. La conversion a été initiée par le transfert des ESCs en milieu FGF2 (12ng/ml ; Cell Guidance Systems) et Activine A (20ng/ml ; Cell Guidance Systems) (Tosolini and Jouneau, 2016b). La conversion est considérée comme complète après au moins 7 jours de culture en milieu FGF2/Activine A. Les cEpiSCs sont ensuite maintenues en boîtes Falcon® coatées avec du sérum. Le milieu FGF2/Activine A est renouvelé tous les jours et les cellules passées après incubation en collagénase (3.5mg/ml, Sigma), 4min à TA, tous les 3 à 4 jours.

c. Culture des TSCs

Les TSCs ont été cultivées en boîtes Falcon® coatées par du sérum dans un milieu sans sérum (CDM) supplémenté en FGF2 (12ng/ml), Activine A (20ng/ml), XAV939 (10nM, Sigma) et Y27632 (5nM, Cell Guidance Systems) – appelé milieu FAXY (Ohinata and Tsukiyama, 2014)–, dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂ et passées tous les 3 jours après incubation en Trypsine EDTA 0.25%, 4min, 37°C (Gibco).

2) Bovin

Les bESCs ont été cultivées en boîtes Facon® coatées par de la Vitronectine (Gibco) dans un milieu sans sérum N2B27 supplémenté en BSA 1% (réduit en lipides), FGF2 (20ng/ml), Activine A (20ng/ml), IWR1 (2.5µM, Sigma). Les cellules sont passées tous les 2-3 jours après incubation en TrypLE, 5min à 37°C.

4. Immunomarquages indirects

1) Embryons bovins

Après fixation, les embryons ont été perméabilisés 2h à 37°C dans une solution de Triton X-100/PBS 1%. Pour faciliter la pénétration des anticorps, la zone pellucide a été fragilisée mécaniquement à l'aide d'une pointe de scalpel. L'étape de saturation a été faite dans une solution de BSA/PBS 2%, 30min à TA. S'en est suivit l'incubation en présence des anticorps (dilution variable en fonction de l'anticorps - cf Tableau 2), au moins 15h à 4°C, en solution de BSA/PBS 2%. Après 3 rinçages successifs de 10min à TA en PVP/PBS 1%, les embryons ont été incubés dans une solution de BSA/PBS 2% contenant les anticorps secondaires, 1h à TA. Après 3 nouveaux rinçages de 10min à TA en PVP/PBS 1%, l'ADN des embryons a été contre-coloré lors d'une incubation en PVP/PBS 1% additionnée de DAPI au 1/500, 15min à 37°C. Enfin, les embryons ont été montés entre lame et lamelle dans une solution de Vectashield® (Vector Laboratories) additionnée de DAPI au 1/300.

2) Embryons murins

a. Immunomarquage simple

A la suite de la fixation, les embryons ont été conservés 2h à 4°C pour faciliter l'étape de dépellucidation. Selon l'anticorps utilisé, les embryons ont été dépellucidés en présence de HCl 0.1N à TA puis rincés 2 fois en PVP/PBS 1%. Les embryons ont ensuite été perméabilisés 1h à 37°C dans une solution de Triton X-100/PBS 0.5% (embryons de 2 à 16-cellules) ou 1% (blastocystes et embryons post-implantation). Les embryons ont ensuite été incubés dans une solution de BSA/PBS 2%, 30min à TA ; au préalable de l'étape d'incubation avec les anticorps primaires dilués en BSA/PBS 2%, au moins 15h à 4°C. A la fin de l'incubation, les embryons ont été rincés 3 fois en PVP/PBS, 10min à TA avant l'étape d'incubation en présence des anticorps secondaires. Pour les embryons pré-implantation, la phase d'incubation a duré 1h à TA, dans une solution de BSA/PBS 2% ; les embryons post-implantations ont été incubés 3h à TA. A la suite de l'incubation, les embryons ont été rincés au moins 4 fois en PVP/PBS 1%, 10min à TA. L'ADN des embryons post-implantation a été contre-coloré lors d'une incubation en PVP/PBS 1% additionnée de DAPI au 1/500, 15min à 37°C. Enfin, les embryons ont été montés entre

lame et lamelle dans une solution de Vectashield® (Vector Laboratories) additionnée de DAPI au 1/300.

b. Immunomarquage séquentiel

L'immunomarquage séquentiel concerne le marquage de deux antigènes à l'aide de deux anticorps produits chez la même espèce (dans ce cas-ci, BEND3 et H3K27me3 dont les anticorps sont produits chez le lapin). Pour le co-marquage de BEND3 et H3K27me3 en embryons de souris, un premier immunomarquage a été fait comme décrit en 4.2).a. – en utilisant l'anticorps BEND3 –. A la suite du dernier rinçage après incubation en présence des anticorps secondaires, les embryons sont fixés à nouveau en solution de PFA/PBS 2%, 10min à TA. Après un rinçage en PVP/PBS 1%, 10min à TA, les embryons sont incubés dans le second mélange d'anticorps primaires (H3K27me3 +/- NANOG), au moins 15h à 4°C. La fin de cette seconde étape d'immunomarquage suit le même procédé que ce qui est décrit en 4.2).a.

c. Immuno-RNA-FISH

Préalablement à la fixation, les embryons présentant une zone pellucide ont été incubés succinctement dans une solution de Tyrode Acide (Sigma), 15s à 37°C. Les embryons ont ensuite été fixés dans une solution PVP/PBS 0.5% complétée par du PFA à 4% et du Triton X-100 à 0.5%, pendant 15min à 37°C. Pour les embryons présentant toujours une zone pellucide intacte, une phase de dépellucidation en HCl 0.1N a été faite, avant la première étape de perméabilisation en Triton X-100/PBS 0.5%, 30min à 37°C. S'en est suivit l'étape d'immunomarquage simple tel que décrit en 4.2).a. A la suite du dernier rinçage, les embryons ont été post-fixés en PFA/PBS 2%, 10min à TA ; puis rincés en PVP/PBS 1%, 10min à TA. Après une nouvelle phase de perméabilisation en Triton X-100/PBS 0.5%, 30min à 37°C ; les embryons ont été pré-hybridés dans une solution composée de Formamide 50%, Tampon d'hybridation 1X, tRNA (Sigma) en excès et inhibiteur de RNases (Promega), 30min à 50°C. Les embryons ont ensuite été mis en présence de sonde LNA (Locked Nucleic Acid – 5,6µg/µl – de séquence 5' → 3' : cAcAcTtTaGgAcGtGaA, Eurogentec] dans une solution de Formamide 50%, Tampon d'hybridation 1X, tRNA en excès et RNasei (Promega), toute la nuit (au moins 17h) à 37°C. Après lavage dans du SSC (Saline Sodium Citrate) 2X, Triton X-100 0.1% et PVP 0.5% : 20min à 42°C, les embryons ont été déposés entre lame et lamelle dans une solution de VectaShield® (Vector Laboratories) contenant du DAPI au 1/100.

3) Cellules (m/bESCs, cEpiSCs, mTSCs)

a. Immunomarquage simple

Préalablement à la fixation, les cellules ont été cultivées sur lamelle de verre pendant 48h, coatées selon la lignée considérée. Les cellules ont été fixées dans une solution de PFA/PBS 2%, 20min à RT et rincées en PBS. Les cellules ont ensuite été perméabilisées 30min à RT, dans une solution de Triton X-100/PBS 0.5%. Puis mis en présence d'une solution de BSA/PBS 2% pour la phase de saturation (30min à TA) ainsi que pour l'incubation avec les anticorps primaires, au moins 15h à 4°C. Les cellules ont par la suite été rincées en PBS, 3 fois 10min à TA puis incubées en présence de l'anticorps secondaire dilué en BSA/PBS 2%, 1h à TA. Après 3 nouveaux rinçages en PBS, les cellules ont été incubées avec une solution de DAPI au 1/500 /PBS pendant 15min à 37°C ; avant montage en Vectashield® supplémenté de DAPI au 1/300.

b. Immuno-RNA-FISH

Après culture sur lamelle de verre pendant 48h, coatées selon la lignée considérée, les cellules ont été fixées dans une solution de PFA/PBS 2%, 10min à TA. S'en est suivi une première étape d'immunomarquage tel que décrit en 4.3).a, conclu par une phase de fixation en PFA/PBS 2%, 10min à TA. Les cellules ont ensuite été mise en présence de sonde LNA (Locked Nucleic Acid – 5,6µg/µl – de séquence 5'→ 3' : cAcAcTtTaGgAcGtGaA) dans une solution de Formamide 50%, Tampon d'hybridation 1X, tRNA en excès et RNasei, toute la nuit à 37°C. Enfin, les cellules ont été rincées 3 fois dans une solution SSC 2X pH 6.3/eau, 5min à 42°C ; incubées avec une solution de DAPI au 1/500 /PBS pendant 15min à 37°C et montées entre lame et lamelle en Vectashield® supplémenté de DAPI au 1/300.

Antigène	Dilution	Référence	Utilisation
<i>H3K9me3</i>	1/100	Active Motif 61013	embryons/cellules
<i>H3K9me3</i>	1/500	Active Motif 39161	embryons/cellules
<i>H3K27me3</i>	1/200	Millipore 07-449	embryons
<i>H3K27me3</i>	1/300	Diagénod C15200181	cellules
<i>BEND3</i>	1/100	Invitrogen PA5-84529	embryons/cellules
<i>EZH2</i>	1/100	Novocastra NCL-L-EZH2	embryons
<i>CDX2</i>	1/200	Abcam ab157524	embryons/cellules
<i>GATA6</i>	1/50	R&D Systems 1F1700	embryons

<i>NANOG</i>	1/200	Invitrogen 14-5761-80	embryons/cellules
<i>OCT4</i>	1/200	Abcam ab27985	embryons/cellules
<i>α-rabbit-CY3</i>	1/200	Jackson ImmunoResearch	embryons/cellules
<i>α-rabbit-FITC</i>	1/200	Jackson ImmunoResearch	embryons/cellules
<i>α-mouse-FITC</i>	1/200	Jackson ImmunoResearch	embryons/cellules
<i>α-rat-CY5</i>	1/200	Jackson ImmunoResearch	embryons/cellules
<i>α-goat-CY5</i>	1/200	Jackson ImmunoResearch	embryons/cellules

Tableau 2 : Récapitulatif des anticorps utilisés.

5. Acquisition et analyses des images

1) Acquisition

Les embryons et cellules ont été observé.e.s soit au microscope confocale (Zeiss LSM 700) soit sur un microscope équipé de la technologie Apotome (Zeiss Axiovert Apotome). Les embryons et cellules ont été observé.e.s à l'objectif à immersion x63 (Plan Aplanachromat N.A.1.4) ou à l'objectif à immersion x40 (Plan Neofluar N.A.1.3). Les piles d'images (z-stacks) ont été acquises avec un pas de 0.5µm (en z) et une profondeur de pixels de 16 bits (Zeiss Axiovert Apotome) ou de 8 bits (Zeiss LSM 700). Les LEDs du microscope Zeiss Axiovert Apotome permettent de visualiser le DAPI (365nm), la fluorescence dans le rouge (555nm), le vert (470nm) et le rouge lointain (625nm). De même pour les lasers du microscope Zeiss LSM 700 (405, 555, 470 et 639nm). Les images ainsi obtenues ont été traitées avec le logiciel Fiji (<https://fiji.sc/>).

2) Quantification fluorescence

Les quantifications de signal ont été réalisées comme suit : la somme des intensités des canaux DAPI, BEND3, EZH2 ou H3K27me3 a été mesurée dans l'intégralité du volume nucléaire. L'intensité totale par noyau pour chaque canal a été normalisée par la soustraction du bruit de fond et proportionnée par le gain master ou temps d'acquisition. Enfin, les mesures d'intensités normalisées pour BEND3, EZH2 et H3K27me3 ont été normalisées par celle du DAPI. Pour les mesures au niveau du X inactif, le même processus a été suivi et le marquage par EZH2 (ainsi que le profil du DAPI) a été utilisé pour délimiter le X inactif.

3) Analyse PCC

Les profils d'intensité de fluorescence des signaux DAPI, H3K9me3 et H3K27me3 ont été mesurés le long d'une ligne traversant le centre du chromocentre. La délimitation du chromocentre a été faite sur la base du profil d'intensité de fluorescence du canal DAPI. Le profil d'intensité d'un chromocentre correspond à une courbe en cloche dont les valeurs sont supérieures à la valeur de fluorescence moyenne. Le coefficient de corrélation de Pearson (PCC) a été calculé entre les valeurs d'intensité du DAPI et celles de H3K27me3 ou de H3K9me3, centrées sur le chromocentre. Plus le profil d'intensité de fluorescence de H3K27me3 ou H3K9me3 est similaire au profil du DAPI, plus le PCC est proche de 1. Ces mesures ont pour objectif la formalisation de l'accumulation des signaux H3K27me3 ou H3K9me3 aux niveaux des foci DAPI-dense et rendent compte de l'enrichissement relatif de H3K27me3 ou H3K9me3 aux chromocentres.

4) Figures, plots et tests statistiques

L'ensemble des analyses d'images et des mesures d'intensité de fluorescence a été mené grâce au logiciel FIJI. Les panels de figures d'imagerie ont été faites à l'aide du plugin FigureJ de FIJI. Les graphiques ont été construits à l'aide du plugin ggplot2, sous R.

RESULTATS

Au cours de cette partie, je vais d'abord vous présenter l'ensemble des résultats que j'ai obtenu sur le modèle murin. Ces résultats sont découpés en deux parties : la première concerne les résultats qui ont fait l'objet d'un premier article soumis en décembre 2021 et qui résume l'ensemble des résultats aboutis que j'ai obtenu pour le modèle murin. La seconde partie concerne l'ensemble des données complémentaires que j'ai obtenu au cours de cette thèse. La troisième partie de ces résultats regroupent les observations qui ont été faites dans l'embryon bovin.

- I. H3K27me3 marque l'hétérochromatine péricentromérique de l'embryon murin pré-implantation et exhibe une dynamique particulière dans les cellules du lignage pluripotent

La première partie de ces résultats est présentée sous la forme d'un article publié chez Scientific Reports (Pailles et al., 2022). Cet article couvre les deux premiers objectifs de cette thèse à savoir :

- la description exhaustive du profil épigénétique (H3K27me3 et H3K9me3) de l'hétérochromatine péricentromérique au cours du développement péri-implantation.
- l'identification de EZH2 et BEND3 comme acteurs possibles de l'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres et leurs effets sur le contrôle de l'expression des séquences satellites majeures.

1. Dynamique de H3K27me3 et de la transcription des séquences satellites majeures au cours du développement péri-implantation

Dans cette première partie, le but a été de décrire, via une approche par immunomarquage, le profil d'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres. Les chromocentres sont les amas de séquences péricentromériques qui apparaissent densément marqués par le DAPI - un contre-colorant de l'ADN qui présente une affinité pour les séquences A-T riches - (Guenatri

et al., 2004). L'objet d'étude principal est le profil de H déchets3K27me3. H3K9me3 a également été étudié comme le marqueur principal de l'hétérochromatine constitutive et par extension, des chromocentres. Notamment, pour quantifier l'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres, nous avons utilisé une analyse par corrélation (PCC - voir Matériel et Méthode 5.3)). L'élément contrôle de cette approche était la correspondance des marquages entre DAPI-dense et H3K9me3 - qui sont maintenus stables tout au long du développement pré-implantation-. Nous nous sommes donc servis du DAPI seul pour délimiter les chromocentres, puisque les co-marquages H3K27me3/H3K9me3 ne pouvaient pas être fait à tous les stades.

1) H3K27me3 s'accumule progressivement au cœur des chromocentres du stade 2-cellules au stade 16-cellules

Nous avons étudié comment H3K27me3 s'organisait au niveau des chromocentres, à partir de leur formation au stade 2-cellules et jusqu'au stade 16-cellules qui précède les changements morphologiques de l'embryon en blastocyste. Nous avons trouvé que H3K27me3 est d'abord présent en périphérie des chromocentres au stade 2-cellules, alors que H3K9me3 marque les foci DAPI-dense de façon uniforme avec un PCC élevé. H3K27me3 s'accumule progressivement au cœur des chromocentres jusqu'à présenter un profil PCC similaire à celui de H3K9me3, avec un PCC médian proche de 0.9 (Figure 1 et Supp_fig 1). Également, après remarque des reviewers, il nous a été demandé de quantifier l'enrichissement en H3K27me3 à l'aide de CHIP. Pour cela, nous avons extrait de données CHIP publiées ces informations pour les séquences satellites majeures. Cette analyse a été faite par Hendrik Marks. Les données extraites vont dans le sens de nos résultats c.-à-d. en faveur d'un enrichissement progressif de H3K27me3 jusqu'au stade blastocyste (Supp_fig 1).

2) Le marquage H3K27me3 présente trois motifs nucléaires différents dans l'embryon péri-implantation dépendant du stade et du lignage considéré

- a. H3K27me3 est présent au cœur des chromocentres du jeune blastocyste et absent des chromocentres dans l'embryon post-implantation

Ensuite, nous nous sommes concentrées sur la dynamique d'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres au cours de la transition pluripotence naïve - pluripotence amorcée. Cette

dynamique s'étend du stade E3.25 au stade E6.5. Les résultats étant comparables entre embryons aux stades E6.5 et E5.5, le profil des embryons E6.5 n'a pas été présenté dans cet article. Au cours de cette transition, H3K27me3 présente 3 profils différents dans l'embryon : Jusqu'à E3.5 (et depuis le stade 16-cellules), H3K27me3 est accumulé au cœur des chromocentres dans toutes les cellules de l'embryon, indépendamment du stade et du lignage.

À E4.0, les cellules NANOG positives présentent, jusqu'à l'implantation, un marquage H3K27me3 granuleux, homogène dans l'ensemble du noyau. L'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres n'est plus observable dans ces cellules. H3K27me3 reste inchangée dans les cellules des lignages extra-embryonnaires c.-à-d. accumulée aux chromocentres dans le TE et le PrE, jusqu'à l'implantation vers E4.5.

Dans l'embryon post-implantation (E5.5), H3K27me3 est diffus et faible dans l'ensemble des cellules constituant l'embryon. Il n'y a pas de différence entre lignage et pas d'accumulation de cette PTM aux chromocentres.

À l'inverse de H3K27me3, le marquage H3K9me3 reste constant et accumulé aux chromocentres, indépendamment du lignage et du stade (Figure 2 et Supp_fig 2).

b. La spécification spatiale de l'épiblaste est concomitante à la perte de H3K27me3 aux chromocentres

À partir de E3.75, les cellules de l'EPI et du PrE s'organisent dans l'ICM, comme le montre le co-marquage NANOG/GATA6. En parallèle du tri des cellules EPI/PrE, le profil de H3K27me3 s'uniformise dans le noyau des cellules de l'EPI. Le changement de profil du marquage H3K27me3 est visible dans l'analyse PCC : la corrélation médiane entre signaux DAPI et H3K27me3 baisse de façon importante à partir de E3.75 et cela se poursuit jusqu'à l'implantation. Cela indique que H3K27me3 ne s'accumule plus spécifiquement aux chromocentres, contrairement à ce qui est présenté pour le TE. Le PrE présente, au moment de l'implantation, une chute de son profil PCC, indiquant que le profil de H3K27me3 change à des moments différents selon le lignage considéré. H3K9me3 reste stable durant le changement de distribution de H3K27me3 (Figure 3 et Supp_fig 3).

3) La transcription des séquences satellites majeures baisse au cours du développement péri-implantation, indépendamment du profil de H3K27me3 aux chromocentres

Par Immuno-RNA-FISH, nous avons marqué les cellules pluripotentes NANOG positives et comparé le statut d'expression des séquences satellites majeures au cours du changement d'accumulation de H3K27me3 (des stades E3.25 au stade E4.25). Nous voyons que le nombre de foci par noyaux ainsi que le nombre de noyaux positifs en RNA-FISH baissent au cours du stade blastocyste, sans corrélation avec le profil de H3K27me3. Ceci indique que H3K27me3 ne participerait pas à la régulation de l'expression des séquences satellites majeures, comme ce qui avait été indiqué en modèles cellules ESCs (Tosolini et al., 2018). Egalement, les analyses de méthylation de l'ADN au stade blastocyste vs embryon post-implantation suggèrent que la répression des séquences satellites majeures dans l'EPI pré-implantation dépend d'un autre acteur que la méthylation de ces séquences (Figure 4 et Supp_fig 4).

A partir de données récentes (de Cut&Run et ChiP) décrivant le dialogue entre PRC1/H2AK119Ub et PRC2/H3K27me3 au cours du développement murin précoce (Chen et al., 2021; Mei et al., 2021), nous avons pu extraire les enrichissements de H2AK119Ub et H3K27me3 aux séquences satellites majeures (Annexe 2). Ces données mettent en évidence que l'enrichissement de H2AK119Ub à la PCH diminue du stade 1-cellule au stade 2-cellules, puis l'enrichissement de cette marque augmente du stade 4-cellules au stade morula, pour être fortement présente aux séquences satellites majeures dans l'ICM du blastocyste tardif. Egalement, les données récoltées dans différents KO/KD des complexes PRC1/2 semblent indiquer une éventuelle compensation entre les marques apposées par ces complexes Polycomb (Annexe 2).

2. EZH2 et BEND3 s'accumulent aux chromocentres au cours du développement pré-implantation

1) EZH2 s'accumule aux chromocentres au cours du développement précoce

a. La dynamique d'accumulation de EZH2 aux chromocentres précède celle de H3K27me3

Par des expériences d'immunomarquage, nous avons regardé le profil de EZH2 - la sous unité catalytique de PRC2 qui appose la tri-méthylation de H3 sur sa lysine 27 - des stades 2-cellules au stade 16-cellules et aux stades E3.5, E4.0 et E5.5 pour savoir si celui-ci présentait le même profil d'accumulation aux chromocentres. Aux stades précoces, EZH2 est présent au niveau des chromocentres, conjointement avec l'accumulation progressive de H3K27me3. Au stade E3.5, l'accumulation de EZH2 aux chromocentres est partiellement perdue dans tous les lignages et la perte d'accumulation de EZH2 aux chromocentres à E3.5 précède celle observée pour H3K27me3 à partir de E3.75 dans l'épiblaste.

Au stade E5.5, le signal EZH2 est faible dans l'ensemble de l'embryon, ce qui est cohérent avec le profil de H3K27me3 à ce stade qui est diffus dans le noyau (Figure 5 et Supp_fig 5).

b. Le Knock-Down d'EZH2 au cours du développement précoce n'influence ni l'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres, ni l'expression des séquences satellites majeures

Dans le but de restreindre fortement l'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres pour en observer les effets sur le développement, nous avons utilisé une approche d'électroporation avec siRNA dirigés contre les transcrits Ezh2. Les premières analyses n'étant pas concluantes, nous avons couplés l'utilisation des siRNA avec un inhibiteur spécifique de EZH2 (EPZ-6438). Cette approche ne nous a pas permis d'altérer l'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres. Également, cela n'a pas eu d'impact significatif sur l'expression des séquences satellites majeures (Figure 6 et Supp_fig 5).

2) BEND3

- a. La dynamique d'accumulation de BEND3 aux chromocentres est différente de celles décrites pour EZH2 et H3K27me3

En utilisant la même approche décrite précédemment pour EZH2, nous avons mis en évidence par le biais d'immunomarquages que le signal BEND3 apparaît au niveau des chromocentres seulement à partir du stade 8-cellules. Également, BEND3 est maintenu au niveau des chromocentres jusqu'à l'implantation et de façon plus hétérogène dans le jeune embryon post-implantation (vers E5.0). BEND3 est ensuite perdu à E5.5. Ces résultats suggèrent que BEND3 n'est pas impliqué dans l'apposition initiale de H3K27me3 au stade précoce (2-/4-cellules). Nous montrons également que la présence de BEND3 n'est pas corrélée à une accumulation de H3K27me3 aux chromocentres (notamment dans les cellules de l'EPI après E4.0) (Figure 5).

L'affinité de BEND3 pour la PCH pouvant en partie s'expliquer par la présence d'un motif tronqué reconnu par BEND3 (Zhang et al., 2022) au sein des séquences satellites majeures (Annexe 3). Le KD fait pour BEND3 n'ayant pas satisfait les reviewers au cours de la seconde révision, ces résultats sont présentés dans les résultats complémentaires (II. 1). Également, l'analyse de données transcriptomiques publiées (Wang et al., 2014) sont en accord avec nos résultats suggérant que BEND3 ne participe pas au recrutement de PRC2 à l'hétérochromatine péricentromérique de l'embryon murin précoce (Annexe 1).

3. Les cellules souches dérivées de l'embryon sont un modèle imparfait pour l'étude des régulations épigénétiques de l'hétérochromatine péricentromérique

L'ensemble des résultats qui concernent l'étude du profil de H3K27me3 dans les cellules ESCs, cEpiSCs et TSCs a été obtenu au cours d'un stage de M1 pour lequel j'ai proposé le sujet de stage, encadré l'étudiante et supervisé la rédaction du rapport.

1) Le profil épigénétique des chromocentres est altéré dans les cellules souches pluripotentes

- a. Les caractéristiques épigénétiques des chromocentres de l'épiblaste pré-implantation sont perdues au cours de la dérivation des cellules ES

A partir des observations faites par Tosolini et al., 2018 qui décrivaient que le profil épigénétique des chromocentres n'était pas homogène dans l'ensemble de la culture de cellules ES, nous nous sommes interrogées sur l'impact de la dérivation sur le profil de l'hétérochromatine péricentromérique. Nous avons donc eu pour objectif de dériver des cellules ES à partir d'embryons CD1/CD1. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que H3K27me3 et H3K9me3 étaient perdues des chromocentres durant les premières 72h de la dérivation (Figure 7).

- b. Les EpiSCs sont plus représentatives de leur équivalent *in vivo* que les ESCs concernant l'accumulation de H3K27me3 et BEND3 aux chromocentres

Par immunomarquage, il est mis en évidence dans cette partie que l'accumulation de H3K27me3 et BEND3 aux chromocentres est hétérogène dans les ESCs cultivées en 2i/LIF. De plus, l'accumulation de BEND3 n'est pas systématiquement couplée à l'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres. Ces résultats semblent suggérer que la situation en cellules non mutantes est sensiblement différente que ce qui a été précédemment décrit en cellules Suv39hdn ou Dnmt-TKO. Également, le pourcentage de cellules ES exprimant les séquences satellites majeures (RNA-FISH) se rapproche des valeurs observées pour l'ICM du jeune blastocyste. Bien que théoriquement transcriptionnellement proches de l'EPI à E4.5, les ESCs semblent être dans un état intermédiaire ICM/EPI.

Pour ce qui est des cellules cEpiS, celles-ci sont plus proches de l'EPI post-implantation que leurs consœurs naïves ne le sont de l'ICM/EPI pré-implantation. Comme l'EPI amorcé, elles présentent une faible transcription des séquences satellites majeures et leurs chromocentres sont dépourvus de marquage H3K27me3 et BEND3 (Figure 7, Supp_Figure 6).

2) Les TSCs présentent des caractéristiques du TE pré-implantation et de l'ExE post-implantation

Nous montrons ici, grâce aux données d'immunomarquage et de RNA-FISH, que les TSCs cultivées en milieu sans sérum présentent des caractéristiques correspondant à la fois à du TE et à de l'ExE. Alors que le profil de H3K27me3 est similaire à celui de l'embryon post-implantation (absence d'accumulation aux chromocentres), les profils de BEND3 et l'expression des séquences satellites majeures se rapprochent davantage des caractéristiques du TE pré-implantation (Supp_Figure 6).

H3K27me3 at pericentromeric heterochromatin is a defining feature of the early mouse blastocyst

Mélanie Pailles^{1,2}, Mélanie Hirlemann^{1,2}, Vincent Brochard^{1,2}, Martine Chebrouit^{1,2}, Jean-François Oudin^{1,2}, Hendrik Marks³, Alice Jouneau^{1,2*}, and Amélie Bonnet-Garnier^{1,2*}

¹Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, 78350, Jouy-en-Josas, France

²Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, 94700, Maisons-Alfort, France

³ Department of Molecular Biology, Faculty of Science, Radboud University, Radboud Institute for Molecular Life Sciences (RIMLS), 6525GA Nijmegen, the Netherlands

*alice.jouneau@inrae.fr

*amelie.bonnet-garnier@inrae.fr

Abstract

Early mouse development is characterized by structural and epigenetic changes while cells progress towards differentiation. At blastocyst stage, the segregation of the three primordial lineages is accompanied by establishment of differential patterns of DNA methylation and post-translational modifications of histones, such as H3K27me3. Here, we analysed the dynamics of H3K27me3 at pericentromeric heterochromatin (PCH) during early development. We also followed the localization of EZH2 and BEND3, previously shown in ESCs to drive PRC2 to hypomethylated PCH. We show that the location of H3K27me3 at PCH, in addition to H3K9me3, is a defining feature of embryonic cells *in vivo*. Moreover, it may play an important role in structuring PCH and preserving genomic integrity at a time of globally relaxed chromatin. At peri-implantation stages, while DNA methylation is still low, EZH2 and then H3K27me3, leave PCH in epiblast progenitors at the time of their spatial segregation from primitive endoderm cells, while BEND3 remains there up to implantation. The comparison with stem cells (ESCs and TSCs) reveals that the epigenetic marks (i.e. H3K9me3 and H3K27me3) of PCH are reset during *in vitro* derivation and only partially restored thereafter. This highlights possible divergences between *in vitro* and "in embryo" epigenetic regulation regarding constitutive heterochromatin.

Introduction

After fertilization, the newly formed diploid genome of the zygote has to be reprogrammed to erase the gametic epigenetic features and allow the initiation of transcription (reviewed in¹). Early development is marked by the progressive relocalization

of various histones post-translational modifications as well as the establishment of DNA methylation²⁻⁴. Along with this epigenomic reorganization, the first lineage commitment takes place a few days after fertilization when embryonic cells within the Inner Cell Mass (ICM) segregate from the surrounding extra-embryonic Trophoblast (TE). The ICM will later divide into the pluripotent Epiblast (EPI) and the Primitive Endoderm (PrE)⁵. In the mouse embryo, pluripotency is not a steady state but rather an “*in vivo* continuum” from early blastocyst (E3.0) to gastrulation stages (E7.5)⁶. Based on the differential characteristics of pluripotent cells observed along with embryonic development, previous studies defined different states of pluripotency from naive to primed⁷. Naive pluripotency is reached in the ICM or in the pre-implantation epiblast while primed pluripotency characterizes the post-implantation pluripotent states that exist *in vivo*. They both can be caught up and maintained *in vitro* in specific culture media⁷. Embryonic Stem Cells (ESCs) are representative of the naive pre-implantation ICM/epiblast while Epiblast Stem Cells (EpiSCs) are equivalent to the post-implantation epiblast. Similarly, Trophoblast Stem Cells (TSCs) can be obtained from pre-implantation trophoblast or post-implantation Extraembryonic Ectoderm⁸. Naive and primed pluripotent states differ from each other as they respond to distinct signalling pathways, express different pluripotency markers, and exhibit different epigenetic features and chromatin structure^{6,9}. The chromatin is more relaxed in the pre-implantation pluripotent cells than in the post-implantation ones or in other extraembryonic lineages, these specificities are conserved in their *in vitro* counterparts⁹. Recent studies have shown distinctive chromatin-associated proteome in ESCs according to their culture medium, notably at pericentromeric heterochromatin^{10,11}.

In differentiated cells, pericentromeric sequences (called major satellites in mice) are part of the heterochromatin compartment and maintained under transcriptional repression¹². Epigenetic features such as strong DNA methylation and specific enrichment of H3K9me3 support the transcriptional control of major satellites in somatic cells¹³. These sequences are packed in clusters of condensed chromatin called chromocenters, forming foci heavily stained by the nuclear dye DAPI¹⁴. During mouse development, the formation of chromocenters at the late 2-cell stage requires a mandatory transcription burst of major satellite sequences, which are then maintained at a low level of transcriptional activity^{15,16}. Two studies have shown that chromocenters of ESCs are partially marked by H3K27me3, even though H3K27me3 is normally found at facultative heterochromatin^{10,11}. Such uncommon localization of H3K27me3 at pericentromeric heterochromatin (PCH) only occurs when ESCs are cultured under the naïve ground state condition, i.e. with MEK and Gsk3

inhibitors (2i/LIF). When ESCs are cultured in serum/LIF-based medium, enrichment of H3K27me3 at PCH was reported only upon the absence of H3K9me3 or DNA methylation in mutant cells^{17,18}. In such mutant cells, a cross-talk between a methyl-sensible DNA binding protein BEND3, PRC1 and PRC2 is at play to establish H3K27me3 at PCH.

As H3K27me3 exhibit differential enrichment at chromocenters between naïve and primed pluripotent states (ESCs in 2i/LIF vs EpiSCs), we wondered whether the presence of H3K27me3 at chromocenters was also dynamically regulated during mouse early development. We provide a precise overview of the localization of H3K27me3 at chromocenters during the transition from pre- to post-implantation stages in each lineage, and we show that H3K27me3 is differently regulated in the pluripotent cells in comparison to extra-embryonic lineages. We also examined the presence of BEND3 and of EZH2, the enzyme in PRC2 responsible for the tri-methylation of H3K27, at chromocenters. In addition, we show that major satellite sequences are transcribed at early blastocyst stages and then repressed in the post-implantation embryo. We highlight that the non-canonical H3K27me3 enrichment is a physiological feature of chromocenters during pre-implantation development. However, the presence of H3K27me3 at chromocenters seems not to be involved in the transcriptional regulation of major satellite sequences. We also demonstrate that the epigenetic dynamics of PCH differ *in vivo* from what is observed *in vitro*, suggesting that current cell culture conditions fail to preserve the native epigenetic characteristic of embryonic chromocenters.

Results

H3K27me3 progressively accumulates at chromocenters up to the 16-cell stage

As non-classical labelling of chromocenters by H3K27me3 at chromocenters was observed among a fraction of naïve pluripotent cells *in vitro*¹¹, we aimed at investigating its presence *in vivo* in the corresponding cells of embryos by immunostaining. Embryos from the 2-cell stage onwards were used to trace back this mark as early as the formation of chromocenters. H3K9me3 was also stained as the hallmark of heterochromatin. DAPI counterstaining was used to delimit chromocenters as they are mostly composed of clustered pericentromeric heterochromatin which, based on their A-T rich composition, are visible as DAPI-dense foci in the interphase nucleus¹⁹.

Embryos, with co- immunostaining of both H3K27me3 and H3K9me3, from 2-cell to 16-cell stages were first analysed (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1a). H3K9me3 was enriched at all

chromocenters and overlaid with DAPI, in all blastomeres, and at all stages (Supplementary Fig. 1a) while H3K27me3 displayed a more dynamic pattern (Fig. 1a). In the 2-cell stage embryo, H3K27me3 was already located at most chromocenters (about 80%, data not shown) and formed cloudy staining encompassing DAPI-dense foci (arrow in Fig. 1a). A representative cross-sectional view of H3K27me3 intensity profile (red line in Fig. 1b) showed that the signal is accumulated in and around the DAPI intensity peak corresponding to the chromocenter (green line in Fig. 1b).

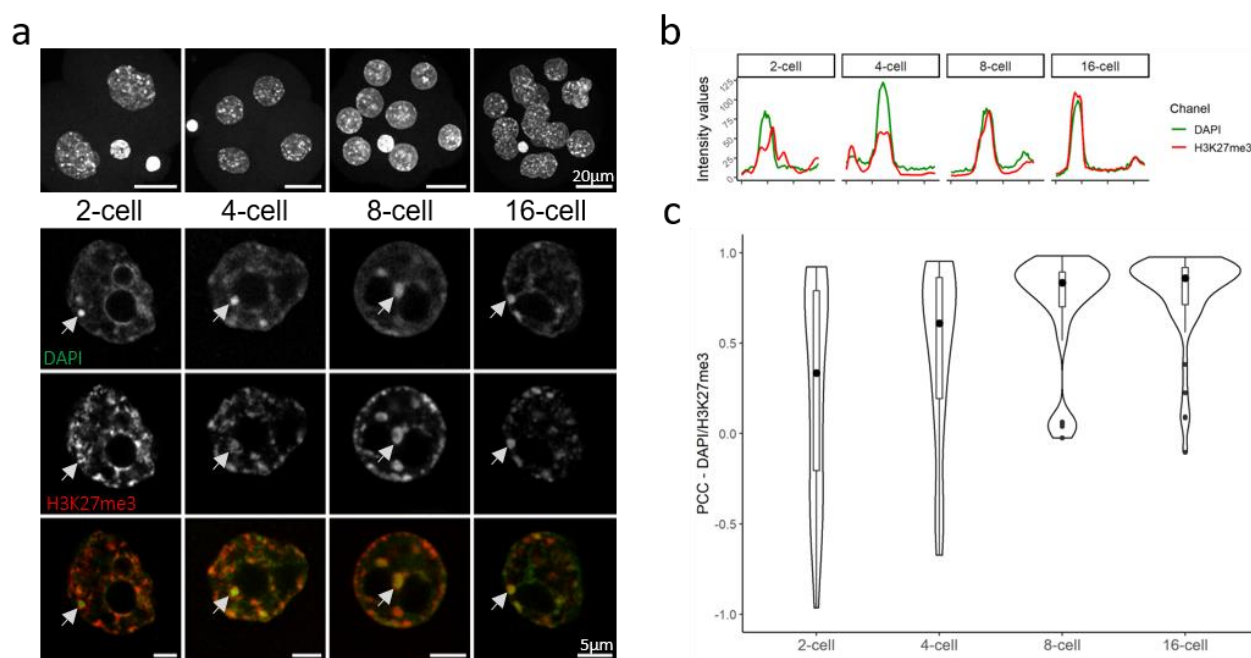


Fig. 1: Pattern of H3K27me3 in 2-cell to 16-cell embryos.

(a) Upper panel row shows the Z-projection of a whole embryo, counterstained with DAPI. Scale bar represents 20µm. Bottom panels show a single section of a representative nucleus for each stage after staining with DAPI (green) and H3K27me3 (red). Last row is the merge of the two signals. Scale bar represents 5µm for zoomed-in nuclei. **(b)** The graphs show the intensity profiles of DAPI (green) and H3K27me3 (red) signals across a single chromocenter highlighted by an arrowhead in **(a)**. **(c)** Violin plots show the distribution of the Pearson's Correlation Coefficients (PCC) between DAPI (green) and H3K27me3 (red) profiles at chromocenters for each stage (149 chromocenters analysed). Graphs were generated using ggplot2⁵⁶ (v3.3.5) in R and figures were arranged with FigureJ⁵⁵ in Fiji⁵⁴ (v1.53c).

At later cleavage stages, H3K27me3 progressively accumulated at chromocenters as shown by the progressive overlay of both H3K27me3 and DAPI staining at DAPI-dense foci in the 4-cell and then the 8-cell stage embryos (Fig. 1a). Similarly, the shape of H3K27me3 fluorescent intensity profile increasingly resembled that of DAPI (Fig. 1b). In the 16-cell stage embryos, chromocenters were fully enriched with H3K27me3 (Fig. 1a), as they are with H3K9me3 – which fluorescent intensity profile matches that of DAPI at all stages – (Supplementary Fig. 1b).

The increasing similarity of the fluorescent intensity profiles of DAPI and H3K27me3 across stages reflected the progressive accumulation of this histone modification at chromocenters. We extended this analysis by measuring the similarity between DAPI and H3K27me3 (Fig. 1c) or H3K9me3 (Supplementary Fig. 1c) intensity profiles across chromocenters and computed the Pearson's Correlation Coefficients (PCC) between pairs of profiles (see Methods for further details). As expected, the PCC corresponding to the accumulation of H3K9me3 fluorescent signal at DAPI-dense foci were stable and close to 1 (Supplementary Fig. 1c; median 0.90), while regarding H3K27me3, they were more variable and increased progressively (0.33 to 0.89) up to the 16-cell stage (Fig. 1c). This dynamic and non-canonical localization of H3K27me3 at chromocenters observed by immunostaining was confirmed using published H3K27me3 ChIP-Seq data from Liu and colleagues²⁰, showing that major satellites sequences were indeed increasingly enriched by H3K27me3 during pre-implantation development (Supplementary Fig. 1d). Hence, by the 16-cell stage, H3K27me3 and H3K9me3 similarly accumulate at all chromocenters.

H3K27me3 exhibits three different patterns in the peri-implantation embryo

Next, we analysed the enrichment of H3K27me3 at chromocenters at further stages from young cavitating blastocyst (E3.25) to post-implantation embryo (E5.5), to cover the transition from the emergence of naïve pluripotency to the onset of primed pluripotency (Supplementary Fig. 2a). At peri-implantation stages, three distinct patterns of H3K27me3 can be observed, depending on the lineage (embryonic or extra-embryonic) and the implantation status. We choose to highlight the three stages that are the more representative of the various patterns of H3K27me3 i.e. at E3.5, E4.0, and E5.5 days of development (Fig. 2).

The accumulation of H3K27me3 at chromocenters described at the 16-cell stage was maintained during the first lineage specification in conjunction with the onset of cavitation in the mouse embryo, from E3.25 to E3.5 stages (Fig. 2a and Supplementary Fig. 2b). At E3.5, NANOG positive epiblast precursors within the Inner Cell Mass (ICM, NANOG positive cells) were mixed with primitive endoderm (PrE) precursors in a "salt and pepper" pattern⁵ while being surrounded by trophectoderm cells (TE) identified by CDX2 (Fig. 2a, upper right panels). No noticeable differences between lineages were observed (Fig. 2a, lower panel, and b).

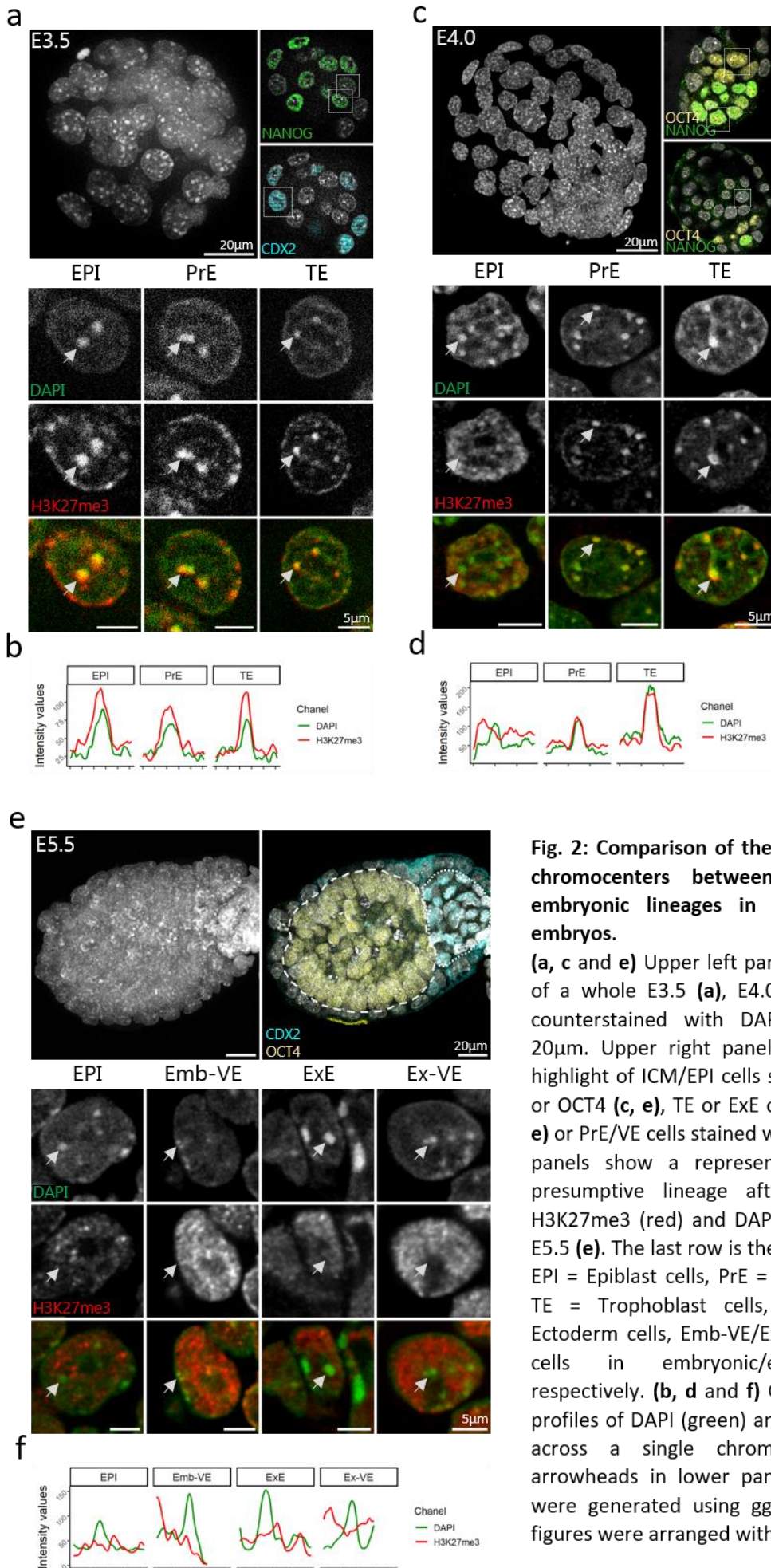


Fig. 2: Comparison of the pattern of H3K27me3 at chromocenters between embryonic to extra-embryonic lineages in peri-implantation stages embryos.

(a, c and e) Upper left panel shows the Z-projection of a whole E3.5 (a), E4.0 (c) or E5.5 (e) embryo, counterstained with DAPI. Scale bar represents 20µm. Upper right panels show a section with a highlight of ICM/EPI cells stained with NANOG (a, c) or OCT4 (c, e), TE or ExE cells stained with CDX2 (a, e) or PrE/VE cells stained with OCT4 only (c). Bottom panels show a representative nucleus for each presumptive lineage after immunostaining with H3K27me3 (red) and DAPI at E3.5 (a), E4.0 (c) and E5.5 (e). The last row is the merge of the two signals. EPI = Epiblast cells, PrE = Primitive Endoderm cells, TE = Trophoblast cells, ExE = Extra-embryonic Ectoderm cells, Emb-VE/Ex-VE = Visceral Endoderm cells in embryonic/extra-embryonic region respectively. (b, d and f) Graphs show the intensity profiles of DAPI (green) and H3K27me3 (red) signals across a single chromocenter highlighted by arrowheads in lower panels (a, c and e). Graphs were generated using ggplot2⁵⁶ (v3.3.5) in R and figures were arranged with FigureJ⁵⁵ in Fiji⁵⁴ (v1.53c).

At the 3.75 stage, the fluorescent intensity profile of H3K27me3 seems to become more uniform in EPI cells compared to extra-embryonic cells, concomitantly with the spatial segregation of EPI and PrE cells within the ICM (Supplementary Fig. 2e).

At E4.0, OCT4 is found in both PrE and EPI cells while NANOG is restricted to the pluripotent epiblast (Fig. 2c). Remarkably, the most dramatic change in the pattern of H3K27me3 was observed in EPI cells. While H3K27me3 remained accumulated at chromocenters in both TE and PrE cells, it converted into a diffuse and granulated signal in EPI cells (Fig. 2c), with less specific accumulation at DAPI-dense foci compared to that observed at TE and PrE chromocenters (Fig. 2d). At post-implantation stages (E5.5), H3K27me3 was no more found at chromocenters, in all cells of the embryo (Fig. 2e, f). At all these stages, the staining profile of H3K9me3 remained unchanged i.e. being still enriched at chromocenters and overlapping with H3K27me3 where this mark was still present (Supplementary Fig. 2b-j).

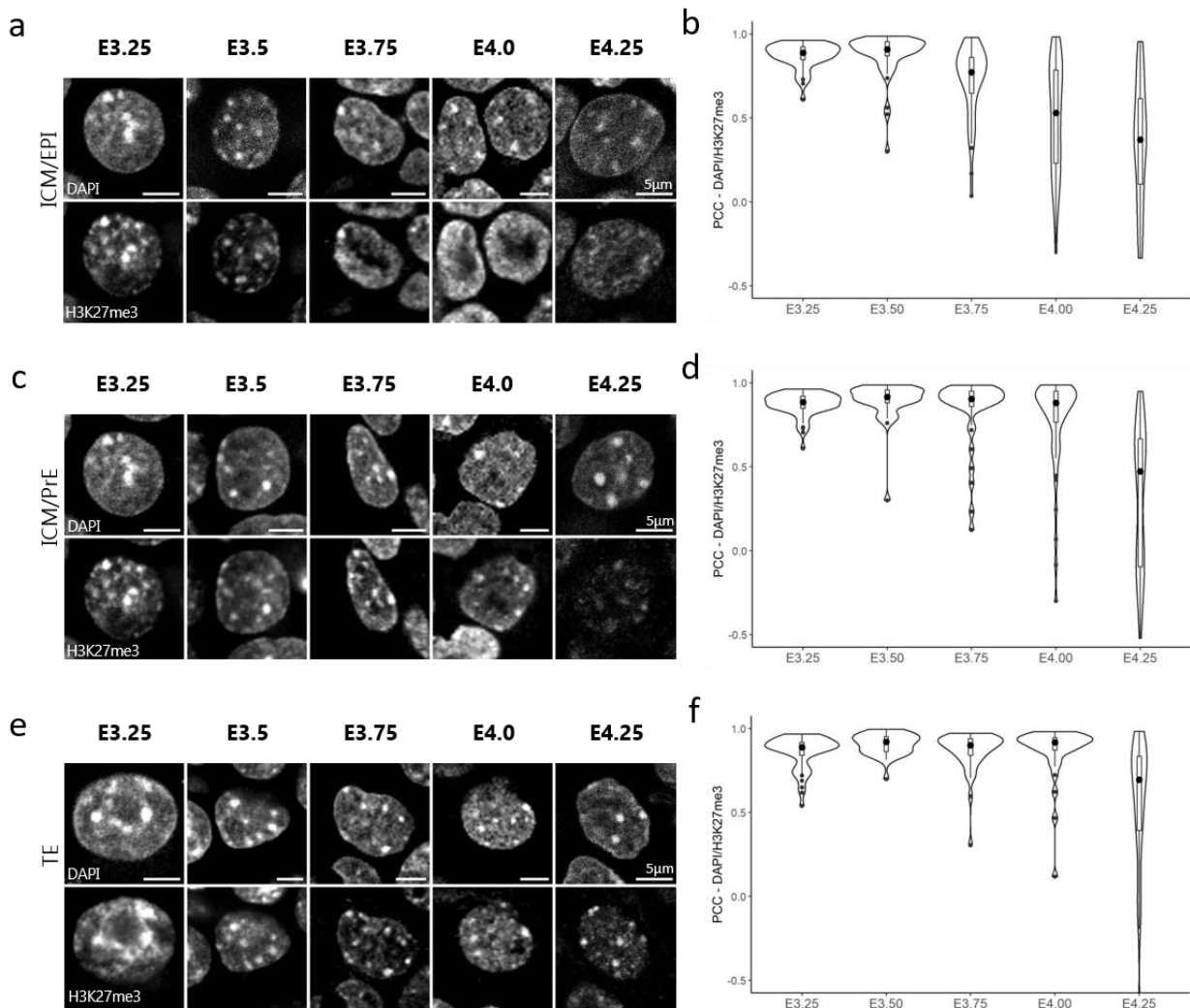


Fig. 3: Correlation dynamics between DAPI and H3K27me3 signals at chromocenters at blastocyst stages.

(a, c and e) Pattern of H3K27me3 in a representative nucleus of EPI (a), PrE (c) and TE (e) cells at different blastocyst stages (from E3.25 to E4.25). DNA is stained with DAPI. Scale bar represents 5µm. (b, d and f) Violin plots show the distribution dynamics of the Pearson's Correlation Coefficients (PCC) between DAPI and H3K27me3 profiles at chromocenters in EPI (b), PrE (d) and TE (f) cells at various stages (262, 223 and 196 chromocenters analysed respectively). Graphs were generated using ggplot2⁵⁶ (v3.3.5) in R and figures were arranged with FigureJ⁵⁵ in Fiji⁵⁴ (v1.53c).

The decrease of H3K27me3 accumulation at chromocenters – noticeable in staining experiments – during the regionalization of the pluripotent epiblast was corroborated by the decrease in the PCC between DAPI and H3K27me3 intensity plots at chromocenters in EPI cells (Fig. 3a, b). Only at E4.25, PrE and TE cells started to exhibit heterogeneity regarding the accumulation of H3K27me3 at chromocenters, with some cells resembling EPI cells while others maintain the H3K27me3 enrichment at chromocenters (Fig. 3c, d and 3e, f). At the time of embryo implantation (E4.5 and beyond), H3K27me3 became diffuse in all cells of the three lineages, similar to that observed in post-implantation embryos (Fig. 2e). In the course of the changes in H3K27me3 pattern, the persistence of stable accumulation of H3K9me3 at all DAPI-dense foci ruled out the disappearance of chromocenters, corroborated by stable PCC (Supplementary Fig. 3).

The profile of major satellite transcription is variable during peri-implantation development

Because H3K27me3 exhibits differential enrichment at chromocenters depending on either the stage or the lineage, we asked whether the transcription status of major satellites was modulated according to the presence of H3K27me3 at chromocenters. To this aim, we performed immuno-RNA-FISH to detect simultaneously the NANOG positive pluripotent cells and the accumulation of major satellite transcripts. After the well-known initial burst of transcription at 2-cell stage^{21,22}, a low level of transcription of major satellite was maintained until the blastocyst stage as 96% of cells from 4-cell to 16-cell stages exhibited no more than 2 foci (Supplementary Fig. 4a, b).

At blastocyst stages (E3.25 to E4.25), both embryonic and extra-embryonic lineages showed higher heterogeneity regarding the number of foci per nucleus and the proportion of cells transcribing major satellite (Fig. 4a-c). Initially, extra-embryonic cells displayed more cells with active foci (83%) than epiblast cells but prior to implantation at E4.25, the proportion of transcribing cells decreased to less than 20% in both lineages (Fig. 4c). At post-implantation stages, very few cells still exhibited transcription foci (Fig. 4d). Of note, the sharp decrease in the extra-embryonic cells takes place while H3K27me3 is still well enriched at PCH, suggesting a limited role of this mark on the control of satellite transcription.

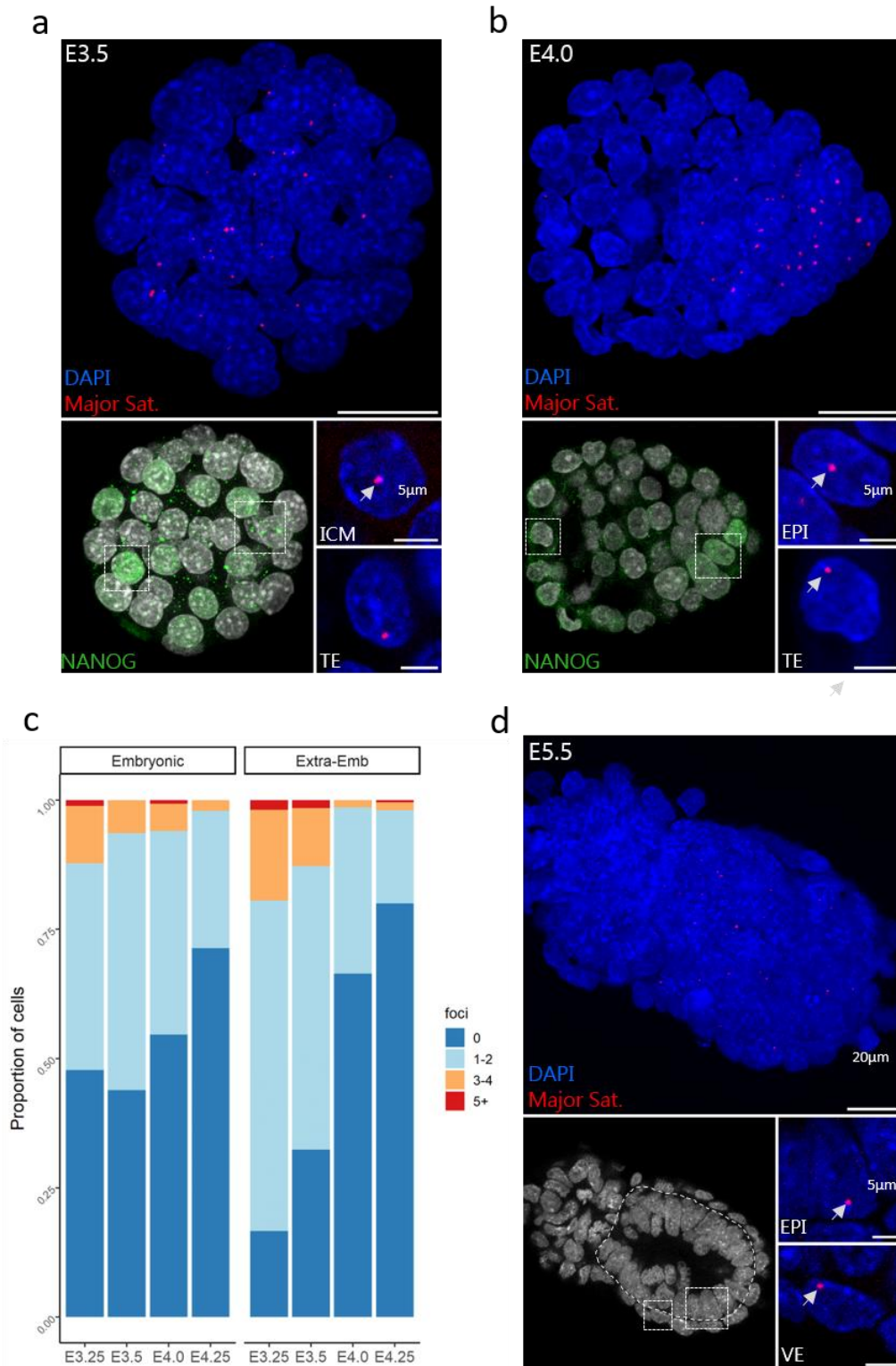


Fig. 4: Transcription dynamics of major satellites in peri-implantation embryos assessed by RNA-FISH. (a, b) left panels show the Z-projection of whole embryos processed for immuno-RNA-FISH at E3.5 (a) and E4.0 (b). Scale bar represents 20 μ m. EPI cells are either identified with NANOG staining (lower left panels, a and b) or morphologically (c). Lower right panels show zoomed-in nuclei of both embryonic or extra-embryonic lineages, with DAPI (blue) and major satellite (red) signals. Scale bar is 5 μ m. (d) Proportion of cells in EPI or Extra-embryonic lineages exhibiting 0, 1-2, 3-4 and 5 or more (5+) RNA-FISH foci per cell at the different indicated blastocyst stages (3400 nuclei analysed). Graphs were generated using ggplot2⁵⁶ (v3.3.5) in R and figures were arranged with FigureJ⁵⁵ in Fiji⁵⁴ (v1.53c).

We then ask whether the reduction of major satellite transcripts could be better correlated with the onset of *de novo* DNA methylation. Using published dataset from Zhang and colleagues²³, we reanalysed the 5meC level on major satellite sequences in the ICM, TE and EPI cells at blastocyst and early post-implantation stages (Supplementary Fig. 4c). This shows that *de novo* DNA methylation starts after E4.0, while the decrease of satellite transcription has already started in both lineages, ruling out a strict correlation of 5meC level and PCH transcriptional activity at blastocyst stages.

H3K27me3 is stably apposite at PCH and early EZH2 recruitment is not dependent on BEND3

To further explore the dynamics of H3K27me3 at PCH, we asked whether the writer of this mark, EZH2, followed a similar pattern. We found that EZH2 localized around chromocenters from 2-cell up to 16-cell stage (Fig 5a, b), concomitantly with chromocenter clustering and H3K27me3 enrichment (Fig. 1). At E3.5, whereas H3K27me3 was still localized at PCH (Fig. 2a), EZH2 became less specifically localized around chromocenters in all cells of the blastocyst (Fig. 5c, d and Supplementary Fig. 5a) and remained diffuse afterwards (Supplementary Fig. 5b, c). Hence, the writer leaves the vicinity of PCH prior to the removal of the histone modification, which will be effective at E4.0 in the epiblast cells (Fig. 3).

We also intended to assess BEND3 location since this protein is critical for the recruitment of PRC2 at PCH in ESCs depleted in DNA methylation¹⁸. BEND3 is a conserved DNA binding protein that plays a role in heterochromatinization and transcription inhibition²⁴. We therefore examined the pattern of BEND3 (Fig. 5e-h). BEND3 started to be enriched at PCH only at 8-cell stage (Fig. 5e, f), so after the recruitment of both EZH2 and H3K27me3 that occur at 2-cell stage (Fig. 5 and Fig. 1). The BEND3 enrichment at PCH was conserved up to E5.0 in all cells, and lost at E5.5 (Fig. 5g, h and Supplementary Fig. 5a-c). In EPI cells, the dynamic of BEND3 at PCH follows quite closely the *de novo* acquisition of DNA methylation (Supplementary Fig. 4c) but is disconnected from the presence of EZH2, which appears and disappears earlier.

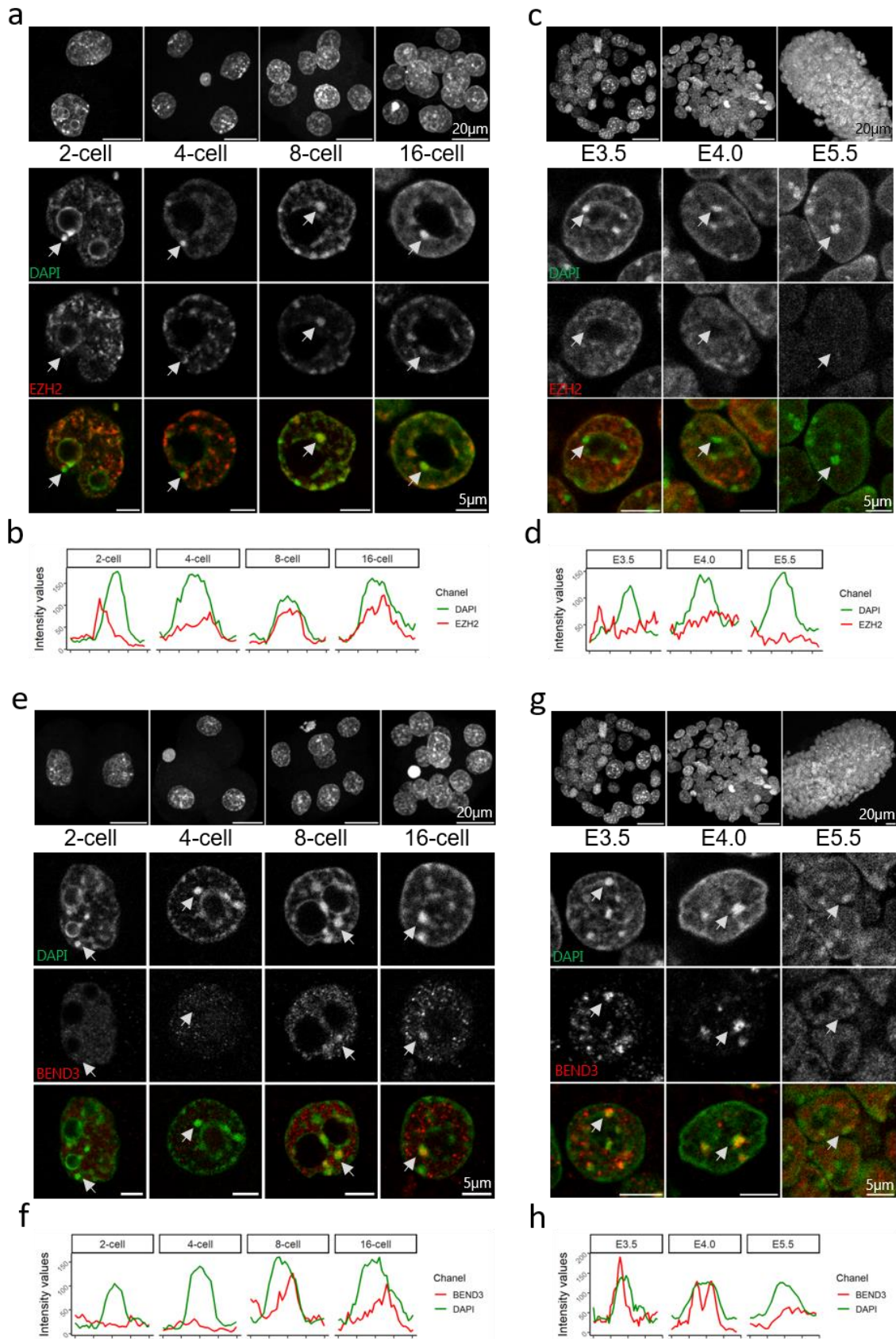


Fig. 5: Pattern of EZH2 during peri-implantation development and its knock-down.

(a, c) Upper panels show the Z-projection of a whole embryo at 2-, 4-, 8- and 16-cell (a) and at E3.5, E4.0 and E5.5 (c). Lower panels show a representative nucleus at each stage after staining with DAPI (green) and EZH2 (red). Arrows point to a chromocenter using to draw the intensity profile shown in (b) and (d). (e, g) Upper panels show the Z-projection of a whole embryo at 2-, 4-, 8- and 16-cell (e) and at E3.5, E4.0 and E5.5 (g). Lower panels show a representative nucleus at each stage after staining with DAPI (green) and BEND3 (red). Arrows point to a chromocenter using to draw the intensity profile shown in (f) and (h). Graphs were generated using ggplot2⁵⁶ (v3.3.5) in R and figures were arranged with FigureJ⁵⁵ in Fiji⁵⁴ (v1.53c).

We then aimed at interfering with H3K27me3 apposition at chromocenters and as BEND3 does not seem to initiate the early recruitment of EZH2 at PCH, we focused on targeting EZH2 transcripts using RNA interference. Zygotes were electroporated with either siRNA against *Ezh2* (siEzh2) or scramble and the pattern of H3K27me3 and EZH2 was assessed with immunostaining after 72h of *in vitro* culture. Furthermore, embryos were cultured in the presence of EPZ-6438 (EPZ), an inhibitor of EZH2 enzymatic activity²⁵. EPZ was previously used to remove H3K27me3 in 2i-ESCs¹⁰ and was used here as a mean to get rid of maternal EZH2 activity²⁶. EZH2 was dramatically reduced in siEzh2 treated embryos compared to control (76% reduction of fluorescence intensity, Fig. 6a-e). However, quantification of the total fluorescence signal revealed only a partial reduction of H3K27me3 in siEzh2 (10%) and siEZH2+EPZ (40%) treated embryos (Fig. 6e). Furthermore, PCH remained enriched for H3K27me3, with no obvious difference between scramble and siEzh2+EPZ treated embryos (Fig. 6a-d). No difference in major satellite transcription was also observed (Supplementary Fig. 5d).

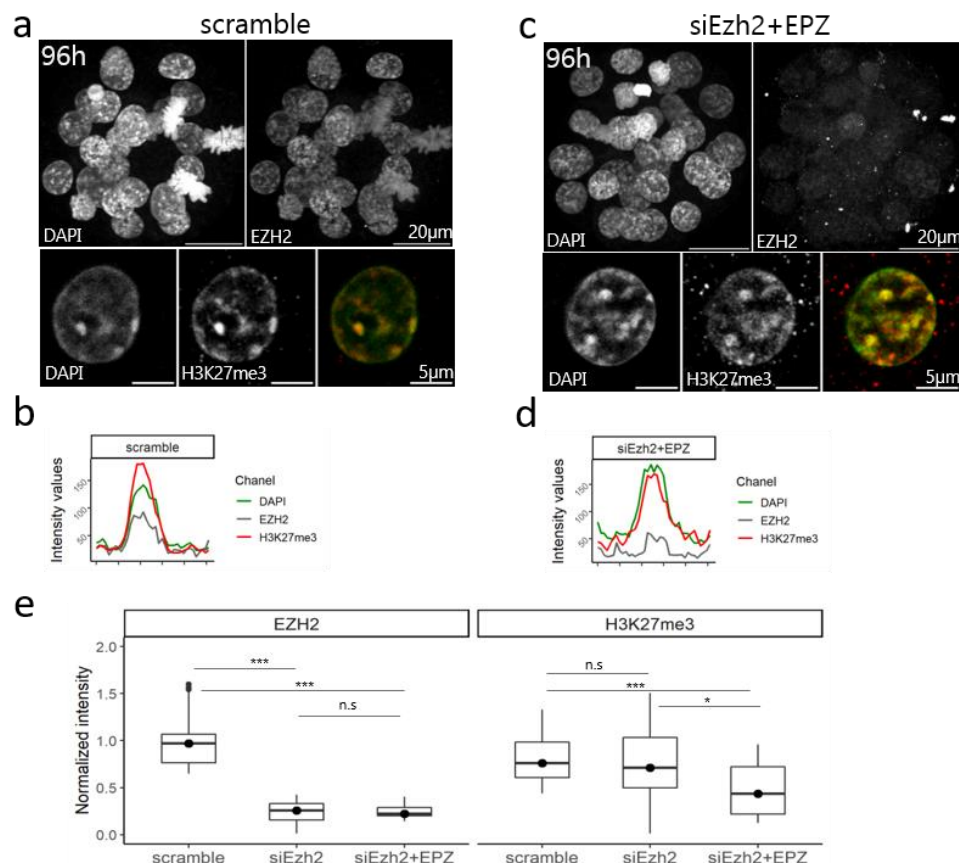


Fig. 6: Knock-down of EZH2 and its effects on H3K27me3 accumulation at PCH.

(a, c) Early blastocysts at 96h of culture after electroporation with scramble (a) or siEzh2 (c) and stained for EZH2 (grey), DAPI (green) and H3K27me3 (red). Upper panels show a z-projection of a whole embryo, while lower panels show a representative nucleus. (b, d) The graphs show the intensity profiles of DAPI, H3K27me3 and EZH2 signals across a single chromocenter. (e) Quantification of total signal intensity of EZH2 and H3K27me3 in nuclei (n=20) of scramble, siEzh2 and siEzh2+EPZ treated embryos. *** Pvalue<10⁻³; ns=non significant; Mann-Whitney test. Graphs were generated using ggplot2⁵⁶ (v3.3.5) in R and figures were arranged with FigureJ⁵⁵ in Fiji⁵⁴ (v1.53c).

In female embryos, the imprinted inactive paternal X chromosome accumulates a large amount of H3K27me3 and EZH2 at all pre-implantation stages^{27,28}. In siEzh2+EPZ treated embryos, although the inactive X was still recognizable by a faint patch of EZH2 combined with a slight accumulation of DAPI, H3K27me3 was dramatically reduced at this locus (65% reduction of fluorescence intensity, Supplementary Fig. 5e-i). This further indicates that global depletion of EZH2 and impairment of its activity in the embryo affects the constitutive heterochromatin domains in a different manner than the facultative ones.

Altogether, these results show that in the embryo, BEND3 is not involved in PRC2 recruitment at PCH. Moreover, knock-down of EZH2 indicates that H3K27me3 is stably apposite at PCH during the first 24h following fertilization.

Resetting the PCH epigenetic structure during establishment of embryonic stem cells

Our results show that epigenetic structure at PCH is highly dynamic at blastocyst stage prior to implantation. The abrupt loss of H3K27me3 between E3.5 and E4.0 and the constant presence of H3K9me3 *in vivo* are not faithfully mirrored in ESCs, even if maintained in the ground state condition where they are transcriptionally close to the early epiblast^{10,29}. We therefore asked if PCH was remodelled during ESC derivation.

E3.5 blastocysts were cultured in 2i/LIF medium until outgrowth was formed. After 3 days of culture, the initially spotted pattern of H3K27me3 was lost in all cells (NANOG positive and NANOG negative) of the outgrowth, and then reappeared after the first dissociation (day 6), but remained heterogeneous in the colonies (Fig. 7a). At the same time, both H3K9me3 and BEND3 were lost at PCH in 72h outgrowth, but only in NANOG positive cells (Fig. 7b and Supplementary Fig. 6a). Once established, ESCs maintained an heterogeneous but stable pattern for H3K27me3, with a third of the population exhibiting accumulation of H3K27me3 at PCH (Fig. 7c, d), in agreement with previous results¹⁰. When cells were converted to primed cEpiSCs in the presence of FGF2 and Activin, they exhibited a diffuse pattern for H3K27me3, as expected (Fig. 7e, f). On the other hand, BEND3 was reacquired at PCH in about half the ESC population (Supplementary Fig. 6b and Fig. 7d) and then lost in converted EpiSCs (Supplementary Fig. 6c and Fig. 7f). The pattern of H3K27me3 was also examined at the intermediate EpiLC stage, after 3 days of conversion (Supplementary Fig. 6h). Intriguingly, cells retaining H3K27me3 at chromocenters were still present in the culture (Fig.

7g), meaning the kinetic of H3K27me3 loss at chromocenters was much slower and heterogeneous *in vitro* than *in vivo*.

To further compare pluripotent cells *in vitro* and *in vivo*, major satellite transcription was also assessed by RNA-FISH. Interestingly, the proportion of ESCs exhibiting RNA-FISH foci (66%) was close to that observed in the ICM of the young blastocyst (E3.25/E3.5 – approx. 50%), while most EpiSCs did not transcribe major satellite, as in primed epiblast (Supplementary Fig. 6d).

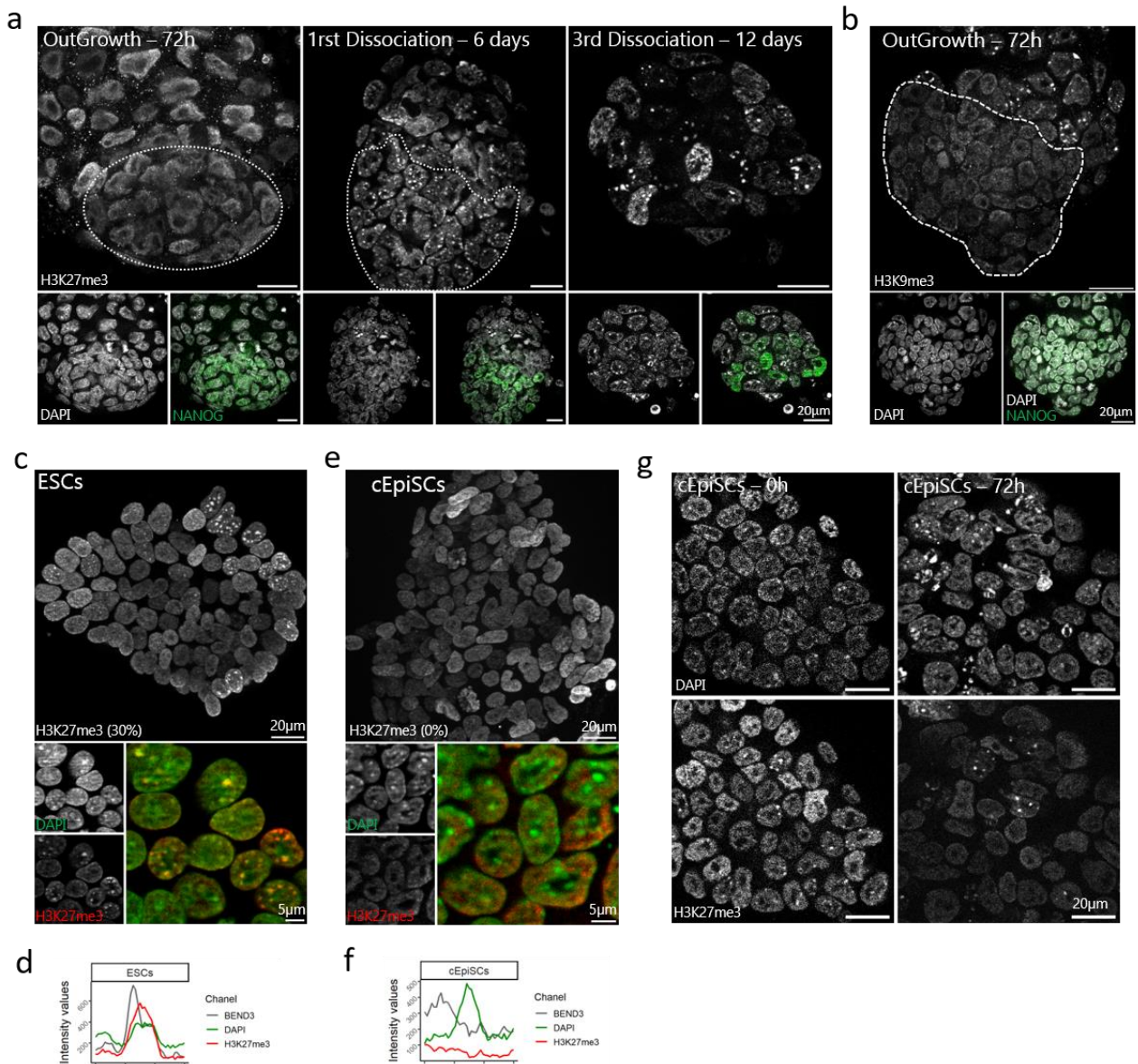


Fig. 7: Comparative H3K27me3 enrichment at chromocenters during ESCs derivation and cEpiSCs conversion.

(a) From left to right: H3K27me3 staining profile at different time points of ESC derivation from blastocysts cultured in 2i/LIF medium. **(b)** H3K9me3 staining in 72h outgrowth. For **(a)** and **(b)**, DAPI and NANOG staining are presented in the lower panels. The pluripotent cell population is delineated by a white dashed line. **(c, e)** ESCs and 10 days converted EpiSCs **(e)** colony stained for H3K27me3 (red), DAPI (green) and merge signals. **(d, f)** The graphs show the intensity profiles of DAPI, H3K27me3 and BEND3 signals across a single chromocenter for ESCs **(d)** and cEpiSCs **(f)**. **(g)** Dynamics of H3K27me3 disappearance at 0 and 3 days post-medium switching from 2i/LIF to FGF2/Activin. Graphs were generated using ggplot2⁵⁶ (v3.3.5) in R and figures were arranged with FigureJ⁵⁵ in Fiji⁵⁴ (v1.53c).

At last, H3K27me3, BEND3 and major satellite expression were assessed in TSCs as an *in vitro* surrogate of TE. TSCs were cultured in the defined serum-free medium (FAXY³⁰), which reduces the propensity of serum-cultured TSCs to spontaneously differentiate. No accumulation of H3K27me3 was observed at chromocenters, which were enriched in BEND3 in 41% of the cells, suggesting these TSCs were representative of an intermediate state between TE and ExE (Supplementary Fig. 6e-g). However, the proportion of cells that exhibit foci of major satellite transcripts (44%) was more in line with the transcription status of pre-implantation TE than post-implantation ExE (Supplementary Fig. 6d).

Altogether, our results show that *in vitro* derivation of stem cells from pre-implantation blastocyst (ESCs and TSCs) does not faithfully preserve the epigenetic features at PCH in embryo, which questions their use to study epigenetic regulation at these heterochromatin regions.

Discussion

In the present study, we describe the dynamics of the epigenetic profile of the chromocenters in the mouse embryo, from the compaction of pericentromeric heterochromatin (PCH) at the 2-cell stage, through the establishment of the first lineages, up to the primed pluripotency state in early post-implantation embryo (supplementary Fig. 7). We highlight here that the location of H3K27me3 at PCH, in addition to the hallmark of heterochromatin H3K9me3, is in fact a defining feature of embryonic cells *in vivo*, regardless of the lineage (embryonic or extra-embryonic). The writer EZH2 and H3K27me3 are both enriched around chromocenters already at 2/4-cell stage, then within chromocenters at 8-cell stage. At this stage, BEND3 is also present around this region. At peri-implantation stages, our results unravel a finely orchestrated choreography of H3K27me3, EZH2 and BEND3 that takes place at PCH between E3.0 and E4.0, while DNA methylation is still low (supplementary Fig. 7). EZH2 leaves PCH just before the histone modification, while BEND3 remains up to the rise of *de novo* methylation. Interestingly, H3K27me3 loss at PCH happens concomitantly to the spatial segregation of epiblast from PrE, making it a reliable marker of the onset of epiblast maturation.

In addition to H3K9me3, strong DNA methylation is involved in the maintenance of a repressive epigenetic environment at PCH in differentiated cells¹³. However, global genome demethylation is one of the many rearrangements that accompany fertilization and early

development³¹. In our study, we show that the progressive colonization of chromocenters by H3K27me3 coincides with the progressive demethylation of the genome, including major satellite sequences^{32–34}. In ESCs as well, upon depletion of DNA methylation, H3K27me3 progressively accumulate at PCH¹⁷. This is also the case when ESCs are cultured in 2i/LIF medium that maintains them in a state closer to the pre-implantation ICM^{10,11}, but H3K27me3 staining remains heterogeneous¹⁰. Hence, the homogeneous coexistence of H3K27me3 with H3K9me3 and reduced DNA methylation is a feature of pre-implantation embryo (this study).

PCH is asymmetrically marked by H3K9me3 (maternal) or H2AK119Ub/H3K27me3 (paternal) following fertilization^{35,36}, suggesting that the presence of H3K27me3 at chromocenters in the 2-cell embryo is partly inherited from parental genomes. Recent data reporting crosstalk between PRC1 and PRC2 complexes and their associated histone modifications (H2AK119Ub and H3K27me3, respectively)^{37,38} suggest that the presence of H2AK119Ub or the action of a variant PRC1 complex would be necessary for the apposition of H3K27me3 during mouse early cleavage stages. At 8-cell stage, the lower level of DNA methylation appears sufficient to allow binding of BEND3 around chromocenters. EZH2 being already present, BEND3 does not drive EZH2 at PCH, as it does *in vitro* in *Suv39hdn* or *DnmtTKO* ESC¹⁸. However, it may help to maintain and/or stabilize H3K27me3. In the context of embryonic development, we thus hypothesized that PRC1/H2AK119Ub and BEND3 are successively involved in maintaining H3K27me3 at chromocenters.

We observed that the depletion of EZH2 (and inhibition of its activity) do not significantly affected H3K27me3 at PCH. It is possible that a low level of enzyme is sufficient to maintain the modification over cell division. These results highlight the stability of H3K27me3 apposition. Specifically in light of recent data indicating that *matEZH2* is the only known enzyme responsible for H3K27me3 apposition (EZH1 compensating EZH2 action only for H3K27me2 apposition) following fertilization³⁹. Such a robust and resilient system is in favour of an important role in the preservation of heterochromatin integrity. During preimplantation development, the chromatin is immature and largely decondensed. The progressive loss of DNA methylation also requires other mechanisms to preserve genomic integrity at repeat regions such as PCH. Although the variations in transcriptional activity at major satellites appears uncoupled to the presence of H3K27me3, especially at late blastocyst stage, it is still possible that H3K27me3 together with H3K9me3 could play a role in structuring PCH and preserving genomic integrity in a context of globally relaxed chromatin. A growing body of studies shows that a certain level of transcriptional activity is

important for the patterning and maintenance of the integrity of heterochromatin^{40,41}. This is supported by the existence of motifs recognized by transcription factors within PCH⁴². On one hand, recent data suggest that H3K9me3 in early mouse embryos may not be as repressive as it is in differentiated cells, as embryonic knock-down of its writer *Suv39h1* exhibits no drastic increase in major satellite transcription⁴³. On the other hand, H3K27me3 may exert a milder repression of repeat elements than H3K9me3, thus compatible with maintenance of a low transcription rate^{44,45}. Such low level of transcripts seems to be important as loss of PCH transcripts at 2-cell stage impairs chromocenters clustering and further development²¹, and, in ESCs, loss of PCH transcription induces the condensation of heterochromatin that generates genomic instability and mitotic defects⁴⁶.

At peri-implantation stages, EZH2 then H3K27me3 leave PCH upon spatial segregation of epiblast cells. As this happens in less than one cell division, we assume that H3K27me3 withdrawal is an active phenomenon, independent of the restoration of DNA methylation that has not yet started. BEND3 remains for another day at chromocenters (E5.0). A very recent study has highlighted a role for BEND3 during early gastrulation as a gatekeeper of bivalent gene silencing⁴⁷. We propose that the accumulation of BEND3 at PCH up to the early post-implantation stage could serve as reservoir for future usage elsewhere in the genome, at a period of extensive relocalization of H3K27me3, especially at bivalent promoters¹.

We show that in E3.5 embryos explanted *in vitro* in 2i/LIF medium, both H3K27me3 and H3K9me3 disappear from chromocenters during the early steps of derivation before being heterogeneously re-established during stabilization of ESCs. In addition, EZH2 is not re-established at PCH¹⁰ whereas BEND3 heterogeneously is. Furthermore, the presence of BEND3 at PCH is not related to H3K27me3-marked chromocenters, both in ESCs and in TSCs, insinuating BEND3 has a role other than inducing PRC2 recruitment to PCH. This transient loss and re-establishment of both H3K27me3 and H3K9me3 at the chromocenters suggests a "reset" of the epigenetic profile of PCH in ESCs. Indeed, it has been described that the transcriptome of ES-derived epiblast was partially altered during this process⁴⁸. Intriguingly, the reset is incomplete as the H3K27me3 and H3K9me3 pattern at PCH is not re-established in all cells (this study and ¹⁰). In addition, the removal of H3K27me3 from PCH during the *in vitro* conversion of ESC to the primed state takes more than 72 h to happen (this study and ⁴⁹) which is in sharp contrast with the fast remodelling of H3K27me3 observed *in vivo* upon epiblast progression toward the primed state. This suggests a passive erasure *in vitro* in contrast to an active one *in vivo*. During differentiation of ESCs, the pattern of H3K27me3 is

reshuffled and this is in agreement with passive erasure⁵⁰ because it happens even after depletion of the two known H3K27me3 erasers, KDM6A/B.

Altogether, these results suggest that a different regulatory epigenetic network acts at chromocenters and maybe elsewhere in the genome as well, in naive pluripotent cells *in vitro* compared to their *in vivo* counterparts. Importantly, our study highlights possible divergences between *in vitro* and "in embryo" epigenetic regulation, at least concerning constitutive heterochromatin.

Methods

Ethics statement

Animal procedures were carried out according to French national rules on Ethics and Animal Welfare in the Animal Facility. This work was approved by the French Ministry of Higher Education, Research, and Innovation (n°15-55 & 21-01) and the local Ethical Committee (INRAE Jouy-en-Josas Centre). The study was carried out in compliance with the ARRIVE guidelines.

Embryos collection and pre-treatment

Embryos were obtained at various stages by natural mating of CD1/CD1 mice. Pre-implantation blastocysts were collected by uteri flushing with pre-heated M2 medium (Sigma) at 90h (E3.25), 95-97h (E3.5/E3.75), 100-102h (E3.75/E4.0) and at 107-109h (E4.25/E4.5) post-natural mating. Post-implantation embryos were collected six days (E5.5) or seven days (E6.5) post-natural mating by dissection and cleaning in homemade Flushing Handling Medium. For further treatment, zona-pellucida from pre-implantation blastocysts were fragilized by 15s incubation in acidic tyrode (Sigma) to perform immuno-RNA-FISH experiments. For immunostaining experiments, all embryos were fixed with 2% PFA in PBS (Electron Microscopy Sciences) for 20 minutes at room temperature. For FISH experiments, embryos were fixed with a solution containing 4% PFA and 0.5% Triton X-100 (Sigma) in PBS at 37°C for 15min.

siRNA experiments

1-cell embryos were collected 24h after hCG injection from superovulated F1 (C57xCBA) mice. They were electroporated on a NEPA21 type II electroporator (NEPA GENE Co. Ltd., Japan) following published parameters⁵¹. Twenty to twenty-five 1-cell embryos were electroporated with 5µg pre-designed siRNA (Ambion™ Invitrogen) diluted in OptiMEM (Sigma). Impedance was maintained between 0.20 to 0.35 kΩ. Treated embryos were then cultured in KSOM medium (Sigma) and fixed at young blastocyst stage (96h-phCG) before further treatment (Immunostaining or RNA-FISH experiments). siRNA targeting *Ezh2* (Ambion™ Silencer™ EZH2 – ref : AM16708, ID 157427) or *Bend3* (Ambion™ Silencer™ BEND3 – ref : 1M16708, ID 169214) transcripts were used. Control to both siRNA experiments was performed using Ambion™ Silencer™ Negative Control – ref : AM4621 (defined as “scramble” in the study). To reinforce the effect of loss of *EZH2* transcripts, embryos electroporated with siEzh2 were cultured in KSOM supplemented with *EZH2* inhibitor EPZ-6438 (HY-13803, MedChem Express) at 5µM, renewed daily until embryo fixation.

Immunostaining

After a short rinse in PBS, embryos were permeabilized at 37°C in 1% Triton X-100 (Sigma) in PBS for 1h for blastocysts or 1h30 for post-implantation embryos. All embryos were incubated in blocking solution containing 2% BSA in PBS for at least 30min at room temperature before incubation in primary antibodies diluted in 2% BSA in PBS at 4°C overnight. After three rinses in PBS, embryos were incubated with secondary antibodies diluted in 2% BSA in PBS for at least 1h at room temperature. The antibody solution was then rinsed with PBS at least three times before DAPI-counterstaining performed for post-implantation embryos. Embryos were shortly post-fixed in a 2% PFA in PBS solution for 10min at room temperature. All embryos were finally mounted in Vectashield (Vector Laboratories) containing 1/300 DAPI. The antibodies used are specified in Supplementary Table S2.

Immuno RNA-FISH

Zona-pellucida of early blastocysts was removed using a 0.1N HCl solution. The immunostaining part was performed for pre-implantation embryos as previously described, except for the permeabilization step who was reduced to 30min in 0.5% Triton X-100 in PBS. After a short rinse step in PBS, embryos were permeabilized in 0.5% Triton X-100 in PBS for 45min for blastocysts or 1h in 1% Triton X-100 for post-implantation embryos. After two rinses in PBS, embryos were incubated in the pre-hybridization solution containing 50% formamide and hybridization buffer for 30min at 50°C. Embryos were then put in hybridization solution (containing 50% formamide, 1X hybridization buffer, and LNA probes targeting major satellite RNA - previously denatured at 85°C for 10min) at 38°C overnight. At the end of the hybridization step, embryos were rinsed twice in 2X Saline-Sodium Citrate in water solution before a short DAPI-counterstaining step at 37°C for 15min. All embryos were finally mounted in Vectashield (Vector Laboratories) containing 1/300 DAPI.

ESC derivation from CD1 embryos

CD1 blastocysts were individually cultured on feeders in a 2i/LIF medium until attachment at 37°C, 5% CO₂. Once blastocysts properly attached to the plate, the medium was renewed and the inner cell mass was let to proliferate at least 48h. The pluripotent cell mass was then isolated and dissociated by a short incubation in TrypLE for 10min at room temperature. Dissociated cells from each cell mass were then cultured on feeders in the 2i/LIF medium, which was renewed until the first colonies appeared. Grown cell colonies were then dissociated by a short incubation in trypsin 10min at 37°C followed by vigorous pipetting. Individualized cells were seeded back on feeders in a 2i/LIF medium for 48h. Colonies were dissociated a second time with trypsin and put back in culture on feeders before the last dissociation step. ES cells were finally seeded on laminin in Falcon® plates and cultured as previously described⁵².

Cell culture

ESCs were maintained on laminin in Falcon® plates and cultured in Chemically Defined Medium (CDM) supplemented with 0.7µM PD0325901 (AxonMedChem), 2.5µM CHIR99201 (AxonMedChem), and 700U/ml LIF (Cell Guidance Systems). Passage of ESCs is performed every 3 days after Trypsin treatment. The conversion of ESCs into cEpiSCs was performed by switching medium to CDM supplemented with 20ng/ml Activin A (Cell Guidance Systems) and 12ng/ml FGF2 (Cell Guidance Systems)⁵³. cEpiSCs were seeded on serum-coated Falcon® plates and passed every 3 or 4 days after collagenase treatment. TSCs were cultured on serum-coated Falcon® plates according to Ohinata and Tsukiyama³⁰ with some modifications: We used a serum-free medium i.e. CDM supplemented with 12ng/ml FGF2, 20ng/ml Activin A, 10nM XAV939 (Sigma) and 5nM Y27632 (Cell Guidance Systems) called FAXY medium and passed every 3 days. Immunostaining and RNA-FISH experiments were performed on cells cultured at least for 14 days or 10 days for cEpiSCs.

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted using RNeasy mini kit (Qiagen) including a DNase treatment. 500 ng of RNA was used for reverse transcription using Random primers (Invitrogen) and Superscript III (Invitrogen). Quantitative PCR was carried out in triplicates using Kapa Sybr fast mix (Sigma) on a StepOne Plus thermal cycler (Applied Biosystem). Data were normalized using the geometric mean of Sdha and Pbgd using Qbase software (Biogazelle). The primers are described in Supplementary Table S1.

Acquisition and image analysis

Embryos were observed with a Zeiss LSM 700 confocal microscope (8 bits pixel depth) or a Zeiss Axiovert Apotome microscope (16 bits pixel depth). Early blastocysts were scanned with an x63 oil-immersed lens (N.A.1.4) and older embryos with an x40 oil-immersed lens (N.A.1.3). Stack images

were acquired with a z-step of 0.5 μ m and a frame size of 512x512 for small embryos to 2048x2048 for the biggest embryos. Cells were observed with a Zeiss Axiovert Apotome microscope (16 bits pixel depth) through an x63 oil-immersed lens (N.A.1.4). LED wavelengths of 365nm, 470nm, 555nm, and 625nm (Zeiss Apotome microscope) or LASER wavelengths of 405nm, 470nm, 555nm, and 639nm (Zeiss confocal microscope) were used for DAPI, Alexa488 or FITC, Cy3, and Cy5 fluorescent staining, respectively.

Images were analysed with the Fiji software⁵⁴. The profiles of fluorescence intensity for DAPI, H3K9me3, and H3K27me3 signals were measured across a chromocenter midline. Chromocenter delineation was done based on the fluorescence intensity profile of DAPI. The intensity profile of a chromocenter corresponds to a bell-shaped curve with values higher than the average fluorescence value of the plot. At the delineated chromocenter, the Pearson's Correlation Coefficient (PCC) was calculated between the DAPI intensity values and those of H3K27me3 or H3K9me3. The more the fluorescence intensity profile of H3K27me3 or H3K9me3 is similar to the DAPI intensity profile, the closer PCC is to 1. These measures formalize the accumulation of H3K27me3 or H3K9me3 signals at DAPI-dense foci and thus assess the enrichment of H3K27me3 or H3K9me3 at chromocenters.

The signal intensity measurement was performed as follows: for at least 20 nuclei per condition, the total intensity of DAPI, BEND3, EZH2 or H3K27me3 was measured in the entire nuclear volume, including background subtraction. The intensity measurements for BEND3, EZH2 and H3K27me3 were normalized to that of DAPI. For measurements at the inactive X, same process was followed and EZH2 staining was used to delineate the inactive X.

Statistical analysis were performed with R software (v4.1.0, <https://www.R-project.org/>). Figures were made with Fiji software⁵⁴ (v1.53c) using FigureJ plugin⁵⁵, except for graphs generated with R software using ggplot2 plugin⁵⁶ (v3.3.5, <https://ggplot2.tidyverse.org/>).

In silico assessment of H3K27me3, H2K119Ub and 5mC enrichment at major satellites

To avoid any biases from technical procedures such as mapping of sequence tags, satellites as analysed from ChIP-seq were assayed by counting satellite-containing sequence tags directly from FASTQ sequencing files, and plotting it as percentage from the total number of reads in the FASTQ file^{11,57}. The following satellite-specific sequences were used to select for satellite tags: GACGACTTGAAAAATGACGAAATC, CATATTCCAGGTCCTTCAGTGTGC, GAAAAAGGTGGAAAATTTAGA, AGAAAATGAAAATCATGGAAAAT,GATTCGTGATTTTTCAAGTCGTC, GCACACTGAAGGACCTGGAATATG, TCTAAATTTCCACCTTTTTC and ATTTTCCATGATTTTCAGTTTTCT. DNA methylation on satellite repeats was similarly assayed directly from the FASTQ files by determining the percentage bisulfite conversion on C residues within the satellite sequences as listed above. The following datasets were used: GSE73952²⁰ for H3K27me3; and GSE76505²³ for DNA methylation.

1. Xu, Q. & Xie, W. Epigenome in Early Mammalian Development: Inheritance, Reprogramming and Establishment. *Trends Cell Biol.* **28**, 237–253 (2018).
2. Lee, H. J., Hore, T. A. & Reik, W. Reprogramming the Methylome: Erasing Memory and Creating Diversity. *Cell Stem Cell* **14**, 710–719 (2014).
3. Zheng, H. *et al.* Resetting Epigenetic Memory by Reprogramming of Histone Modifications in Mammals. *Mol. Cell* **63**, 1066–1079 (2016).
4. Zheng, H. & Xie, W. The role of 3D genome organization in development and cell differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 535–550 (2019).
5. Chazaud, C. & Yamanaka, Y. Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development* **143**, 1063–1074 (2016).
6. Morgani, S., Nichols, J. & Hadjantonakis, A.-K. The many faces of Pluripotency: in vitro adaptations of a continuum of in vivo states. *BMC Dev. Biol.* **17**, (2017).
7. Nichols, J. & Smith, A. Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell* **4**, 487–492 (2009).
8. Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A. K., Nagy, A. & Rossant, J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* **282**, 2072–2075 (1998).
9. Ahmed, K. *et al.* Global Chromatin Architecture Reflects Pluripotency and Lineage Commitment in the Early Mouse Embryo. *PLoS ONE* **5**, e10531 (2010).
10. Tosolini, M. *et al.* Contrasting epigenetic states of heterochromatin in the different types of mouse pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* **8**, 5776 (2018).
11. van Mierlo, G. *et al.* Integrative Proteomic Profiling Reveals PRC2-Dependent Epigenetic Crosstalk Maintains Ground-State Pluripotency. *Cell Stem Cell* **24**, 123–137.e8 (2019).
12. Martens, J. H. A. *et al.* The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J.* **24**, 800–812 (2005).
13. Lehnertz, B. *et al.* Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. *Curr. Biol.* **13**, 1192–1200 (2003).
14. Dambacher, S., Hahn, M. & Schotta, G. The compact view on heterochromatin. *Cell Cycle* **12**, 2925–2926 (2013).
15. Probst, A. V. *et al.* A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev. Cell* **19**, 625–638 (2010).
16. Chebrou, M. *et al.* Transcription of rRNA in early mouse embryos promotes chromatin reorganization and expression of major satellite repeats. *J. Cell Sci.* **135**, jcs258798 (2022).
17. Cooper, S. *et al.* Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Rep.* **7**, 1456–1470 (2014).
18. Saksouk, N. *et al.* Redundant mechanisms to form silent chromatin at pericentromeric regions rely on BEND3 and DNA methylation. *Mol. Cell* **56**, 580–594 (2014).
19. Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C. & Almouzni, G. Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J. Cell Biol.* **166**, 493–505 (2004).
20. Liu, X. *et al.* Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. *Nature* **537**, 558–562 (2016).
21. Probst, A. V. & Almouzni, G. Heterochromatin establishment in the context of genome-wide epigenetic reprogramming. *Trends Genet.* **27**, 177–185 (2011).
22. Casanova, M. *et al.* Heterochromatin reorganization during early mouse development requires a single-stranded noncoding transcript. *Cell Rep.* **4**, 1156–1167 (2013).
23. Zhang, Y. *et al.* Dynamic epigenomic landscapes during early lineage specification in mouse embryos. *Nat. Genet.* (2017) doi:10.1038/s41588-017-0003-x.
24. Sathyan, K. M., Shen, Z., Tripathi, V., Prasanth, K. V. & Prasanth, S. G. A BEN-domain-containing protein associates with heterochromatin and represses transcription. *J. Cell Sci.* **124**, 3149–3163 (2011).

25. Knutson, S. K. *et al.* Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7922–7927 (2013).
26. Erhardt, S. *et al.* Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. *Development* **130**, 4235–4248 (2003).
27. Okamoto, I., Otte, A. P., Allis, C. D., Reinberg, D. & Heard, E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* **303**, 644–649 (2004).
28. Borensztein, M. *et al.* Contribution of epigenetic landscapes and transcription factors to X-chromosome reactivation in the inner cell mass. *Nat. Commun.* **8**, 1297 (2017).
29. Boroviak, T., Loos, R., Bertone, P., Smith, A. & Nichols, J. The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat. Cell Biol.* **16**, 513–525 (2014).
30. Ohinata, Y. & Tsukiyama, T. Establishment of Trophoblast Stem Cells under Defined Culture Conditions in Mice. *PLOS ONE* **9**, e107308 (2014).
31. Oswald, J. *et al.* Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr. Biol. CB* **10**, 475–478 (2000).
32. Smith, Z. D. *et al.* A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* **484**, 339–344 (2012).
33. Wang, L. *et al.* Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell* **157**, 979–991 (2014).
34. Li, C. *et al.* DNA methylation reprogramming of functional elements during mammalian embryonic development. *Cell Discov.* **4**, 1–12 (2018).
35. Puschendorf, M. *et al.* PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. *Nat. Genet.* **40**, 411–420 (2008).
36. Tardat, M. *et al.* Cbx2 Targets PRC1 to Constitutive Heterochromatin in Mouse Zygotes in a Parent-of-Origin-Dependent Manner. *Mol. Cell* **58**, 157–171 (2015).
37. Chen, Z., Djekidel, M. N. & Zhang, Y. Distinct dynamics and functions of H2AK119ub1 and H3K27me3 in mouse preimplantation embryos. *Nat. Genet.* **53**, 551–563 (2021).
38. Mei, H. *et al.* H2AK119ub1 guides maternal inheritance and zygotic deposition of H3K27me3 in mouse embryos. *Nat. Genet.* **53**, 539–550 (2021).
39. Zhao, Y. *et al.* Maternal Ezh1/2 deficiency in oocyte delays H3K27me2/3 restoration and impairs epiblast development responsible for embryonic sub-lethality in mouse. 2021.10.28.466222 (2021).
40. Maison, C. *et al.* Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat. Genet.* **30**, 329–334 (2002).
41. Saksouk, N., Simboeck, E. & Déjardin, J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* **8**, 3 (2015).
42. Bulut-Karslioglu, A. *et al.* A transcription factor-based mechanism for mouse heterochromatin formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1023–1030 (2012).
43. Burton, A. *et al.* Heterochromatin establishment during early mammalian development is regulated by pericentromeric RNA and characterized by non-repressive H3K9me3. *Nat. Cell Biol.* **22**, 767–778 (2020).
44. Walter, M., Teissandier, A., Pérez-Palacios, R. & Bourc'his, D. An epigenetic switch ensures transposon repression upon dynamic loss of DNA methylation in embryonic stem cells. *eLife* **5**, e11418 (2016).
45. Délérís, A., Berger, F. & Duharcourt, S. Role of Polycomb in the control of transposable elements. *Trends Genet.* **37**, 882–889 (2021).
46. Novo, C. L. *et al.* Satellite repeat transcripts modulate heterochromatin condensates and safeguard chromosome stability in mouse embryonic stem cells. *bioRxiv* 2020.06.08.139642 (2020) doi:10.1101/2020.06.08.139642.

47. Zhang, J. *et al.* Highly enriched BEND3 prevents the premature activation of bivalent genes during differentiation. *Science* **375**, 1053–1058 (2022).
48. Tang, F. *et al.* Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. *Cell Stem Cell* **6**, 468–478 (2010).
49. Neagu, A. *et al.* In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states. *Nat. Cell Biol.* **22**, 534–545 (2020).
50. Shpargel, K. B., Starmer, J., Yee, D., Pohlers, M. & Magnuson, T. KDM6 demethylase independent loss of histone H3 lysine 27 trimethylation during early embryonic development. *PLoS Genet.* **10**, e1004507 (2014).
51. Teixeira, M. *et al.* Electroporation of mice zygotes with dual guide RNA/Cas9 complexes for simple and efficient cloning-free genome editing. *Sci. Rep.* **8**, 474 (2018).
52. Tosolini, M. & Jouneau, A. Acquiring Ground State Pluripotency: Switching Mouse Embryonic Stem Cells from Serum/LIF Medium to 2i/LIF Medium. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1341**, 41–48 (2016).
53. Tosolini, M. & Jouneau, A. From Naive to Primed Pluripotency: In Vitro Conversion of Mouse Embryonic Stem Cells in Epiblast Stem Cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1341**, 209–216 (2016).
54. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
55. Mutterer, J. & Zinck, E. Quick-and-clean article figures with FigureJ. *J. Microsc.* **252**, 89–91 (2013).
56. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-24277-4.
57. Dirks, R. A. M. *et al.* A plug and play microfluidic platform for standardized sensitive low-input chromatin immunoprecipitation. *Genome Res.* **31**, 919–933 (2021).

Acknowledgements

We would like to thank Catherine Archilla for laboratory facilities and also Clemence Kress and Pierre Therizols for their critical reading of the manuscript. We thank the ISC MIMA2 (Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods, doi: 10.15454/1.5572348210007727E12) and particularly Pierre Adenot for advice in acquisition of images. We acknowledge the staff of the INRAE Infectiology of Fishes and Rodents Facility (IERP-UE907, Jouy-en-Josas Research Center, France) in which animal experiments have been performed. IERP Facility belongs to the National Distributed Research Infrastructure for the Control of Animal and Zoonotic Emerging Infectious Diseases through In Vivo Investigation (EMERG'IN DOI: 10.15454/1.5572352821559333E12). This project was funded by the REVIVE Labex (Investissement d'Avenir, ANR-10-LABX-73) and supported by the PHASE Department of the French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE). M.P is the recipient of a PhD fellowship from AgroParisTech (Ministry of Agriculture) and the Department PHASE of INRAE (France).

Author contributions statement

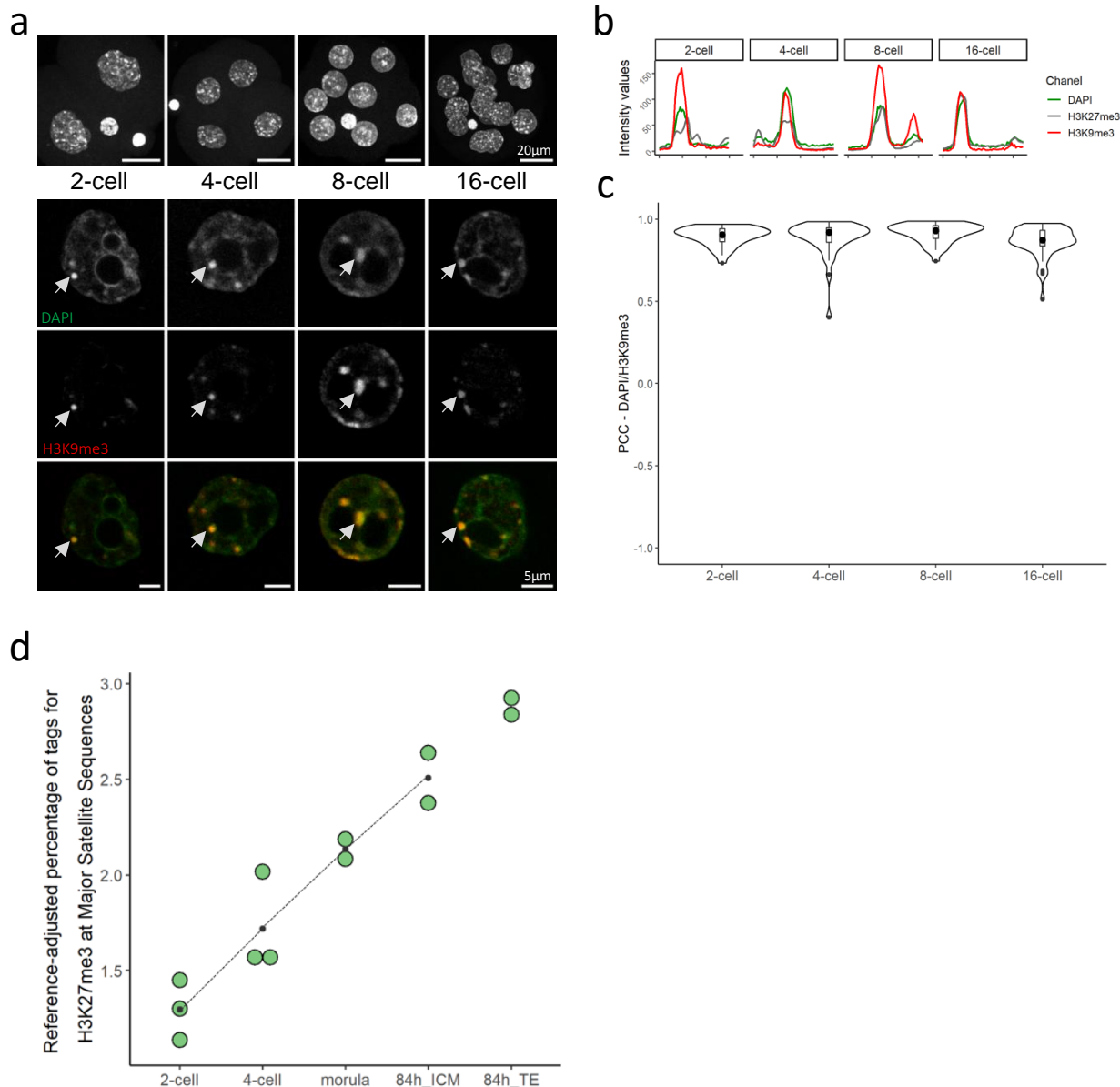
MP, AJ and ABG designed and analysed the experiments and wrote the manuscript. MP performed most of the experiments, with some help from VB, MC, JFO and MH. HM did the in silico analyses of 5meC and H3K27me3. All authors reviewed the manuscript.

Additional information

Competing financial interests

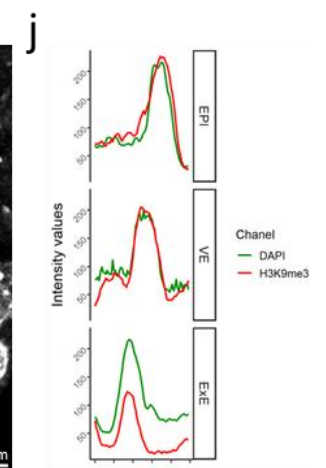
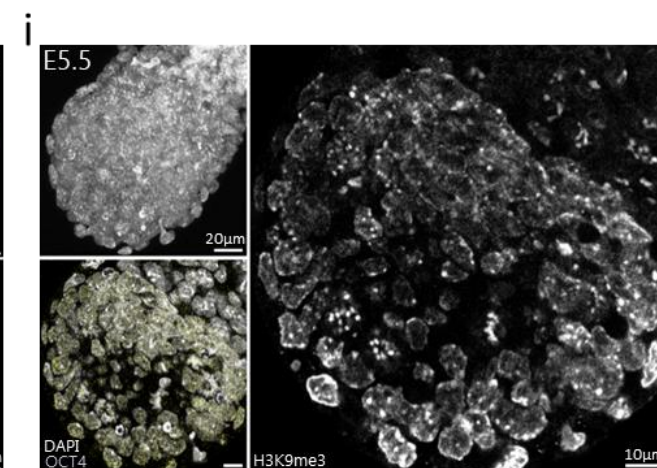
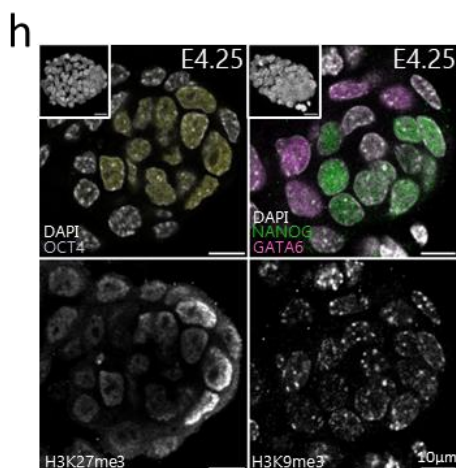
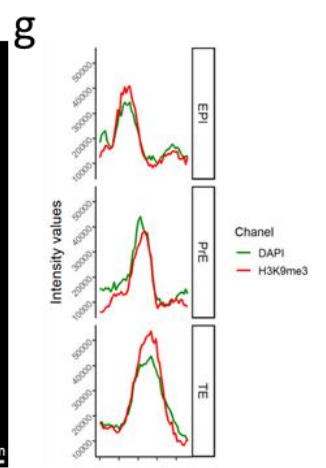
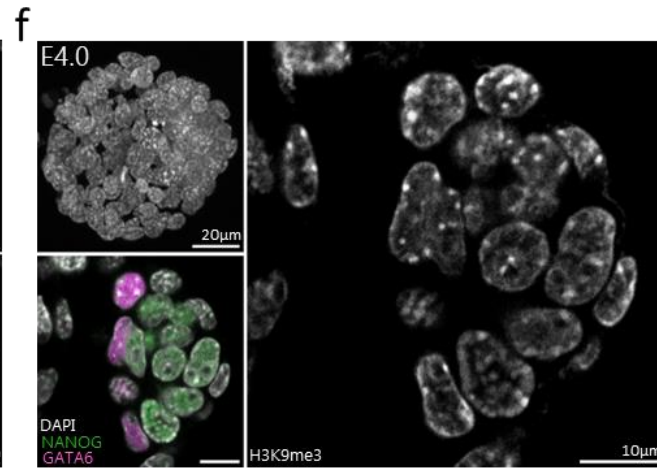
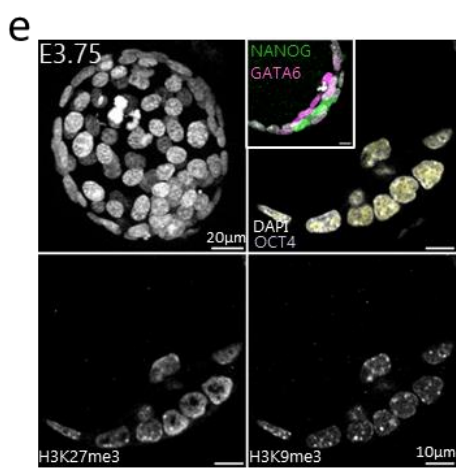
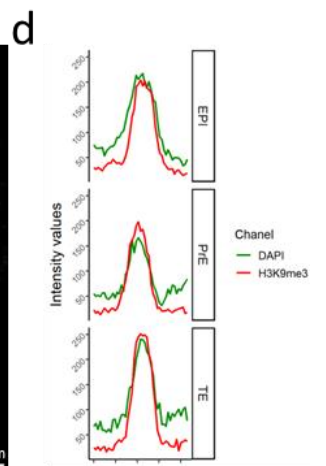
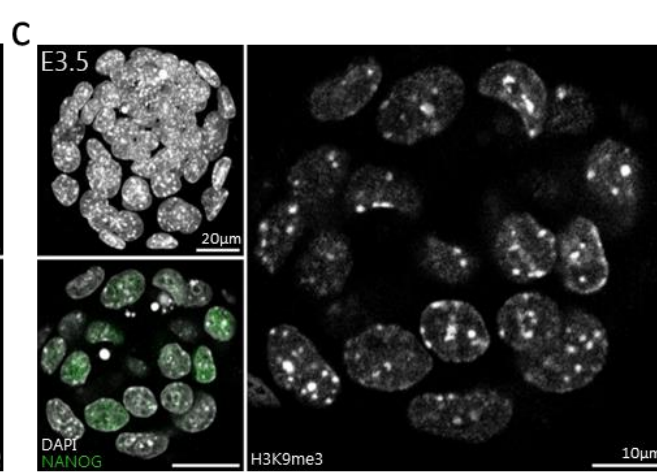
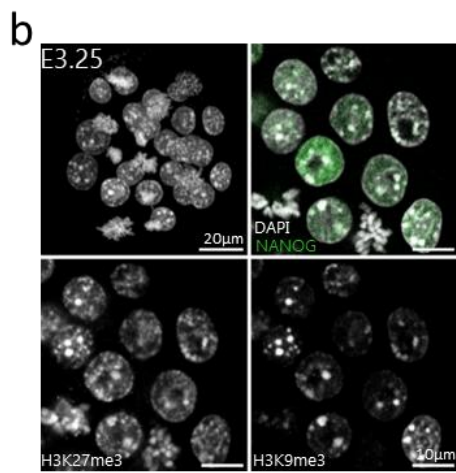
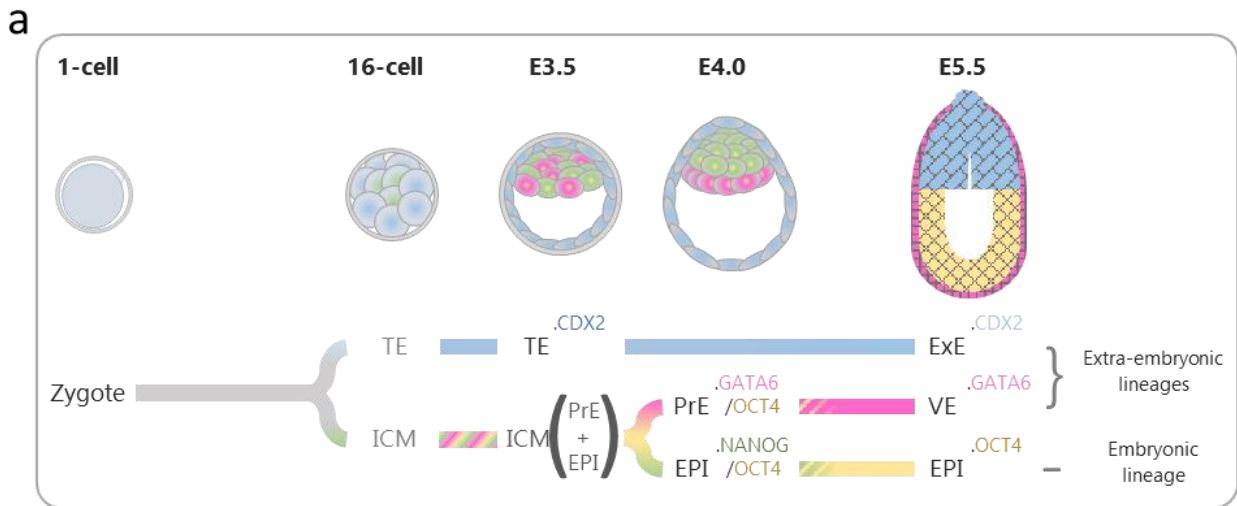
The authors declare no competing financial interests.

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.



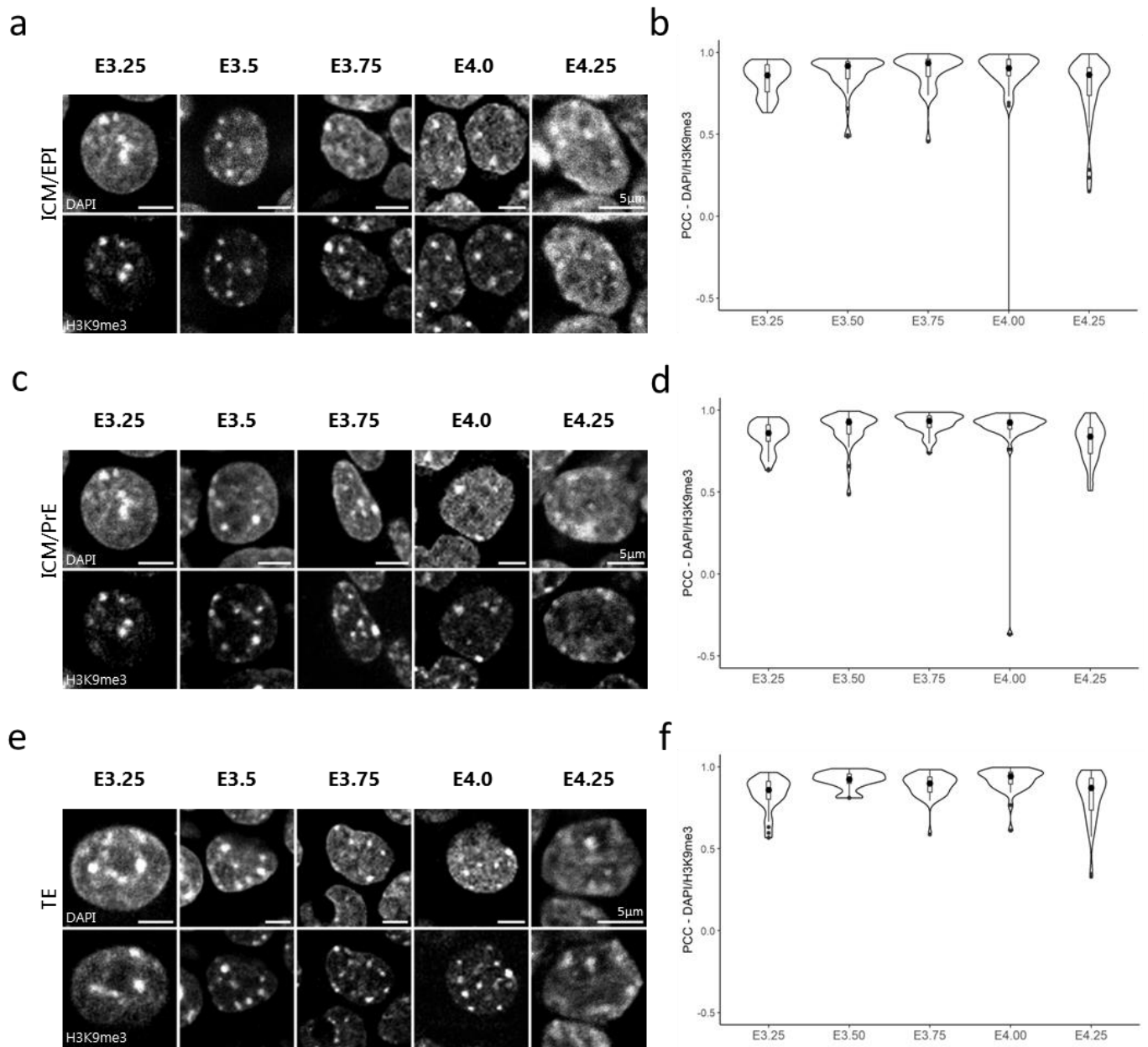
Supplementary Fig. 1: H3K9me3 at chromocenters in 2-cell to 16-cell stage embryos.

(a) Upper panel row shows the Z-projection of a whole embryo, counterstained with DAPI. Scale bar represents 20 μ m. Bottom panels show a single section of a representative nucleus highlighted in Figure 1 after staining with DAPI (green) and H3K9me3 (red). Last row is the merge of the two signals. Scale bar represents 5 μ m for zoomed-in nuclei. **(b)** The graphs show the intensity profiles of DAPI (green), H3K9me3 (red) and H3K27me3 (grey) signals across a single chromocenter highlighted by an arrowhead in **(a)**. **(c)** Violin plots show the distribution of the Pearson's Correlation Coefficients (PCC) between DAPI and H3K9me3 profiles at chromocenters for each stage (149 chromocenters analysed). **(d)** Proportion of tags for H3K27me3 at major satellite sequences during preimplantation stages as assessed from published ChIP-Seq (GSE73952²⁰). Graphs were generated using ggplot2⁵⁶ (v3.3.5) in R and figures were arranged with FigureJ⁵⁵ in Fiji⁵⁴ (v1.53c).



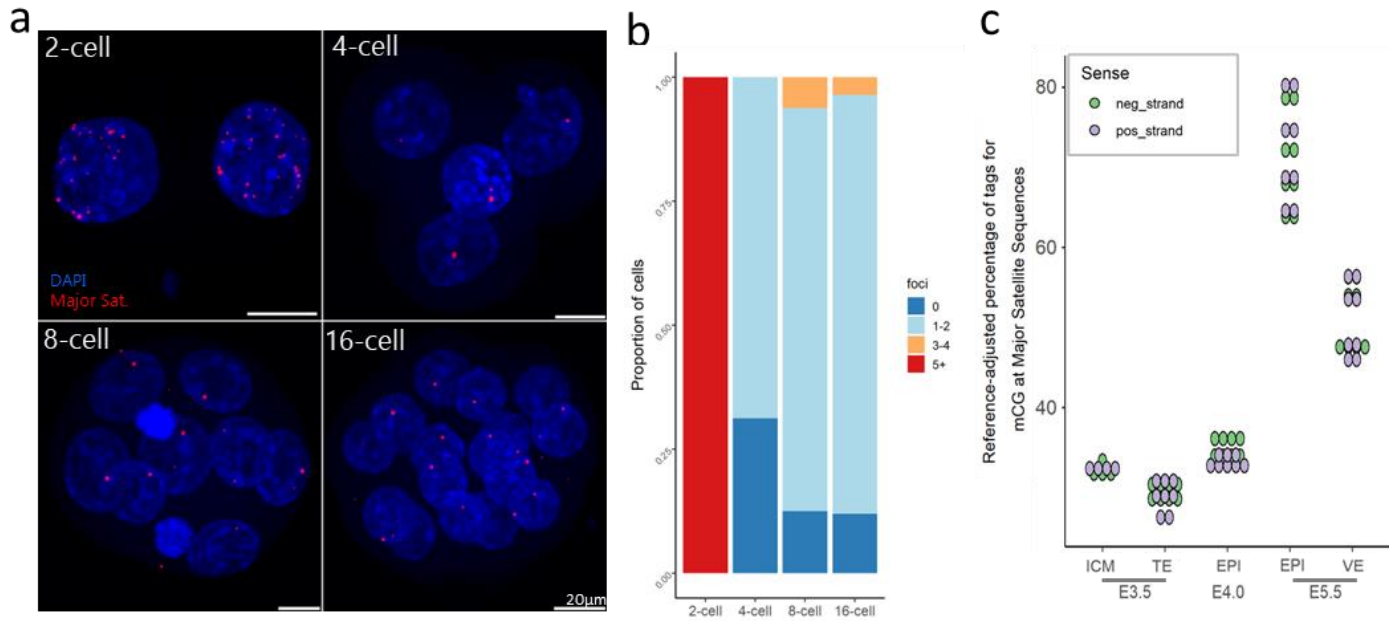
Supplementary Fig. 2: H3K9me3 at chromocenters in the peri-implantation embryo, in embryonic compared to extra-embryonic lineages.

(a) Schematic representation of mouse peri-implantation development, lineages specification and their associated markers. **(b, e and h)** Embryos at E3.25 **(b)**, E3.75 **(e)**, and E4.25 **(h)** stained for the indicated markers. Upper left panel is a z-projection of the whole embryo showing DAPI counterstaining while other panels are a section encompassing the ICM/EPI region. **(c, f and i)** Embryos at E3.5 **(c)**, E4.0 **(f)**, and E5.5 **(i)** stained with H3K9me3. **(d, g and j)** Graphs show the representative intensity profiles of DAPI (green) and H3K9me3 (red) signals across a single chromocenter in a nucleus of each lineage at E3.5 **(d)**, E4.0 **(g)** and E5.5 **(j)**. Graphs were generated using ggplot2⁵⁶ (v3.3.5) in R and figures were arranged with FigureJ⁵⁵ in Fiji⁵⁴ (v1.53c).



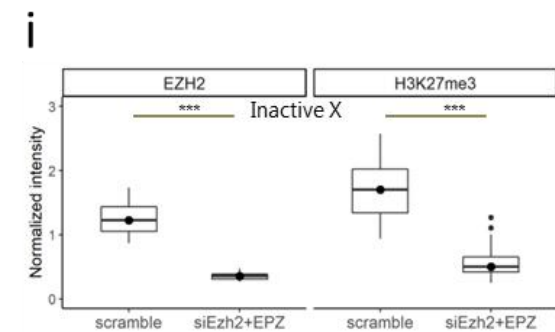
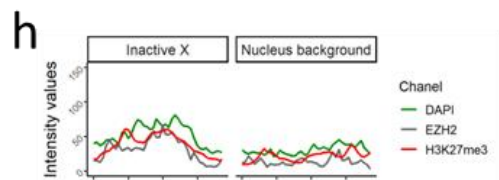
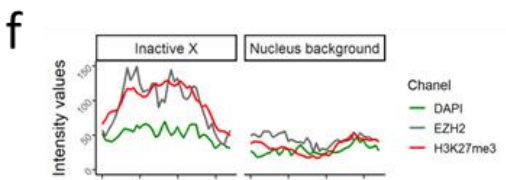
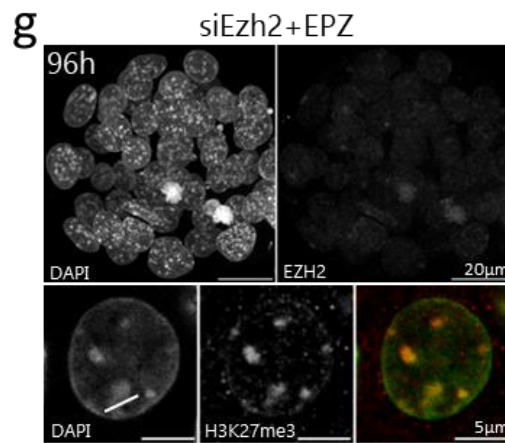
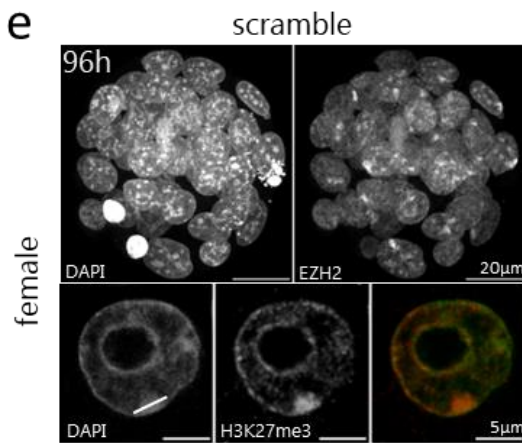
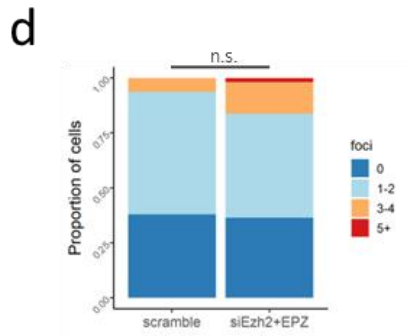
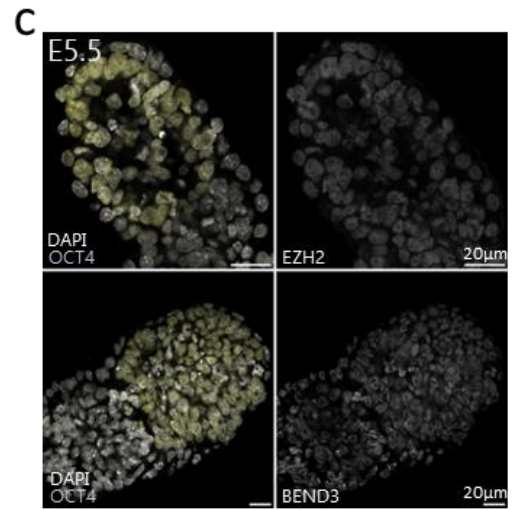
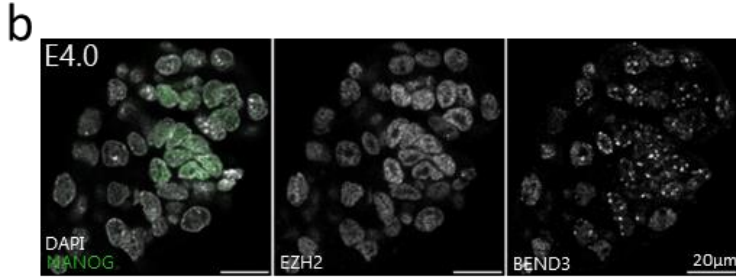
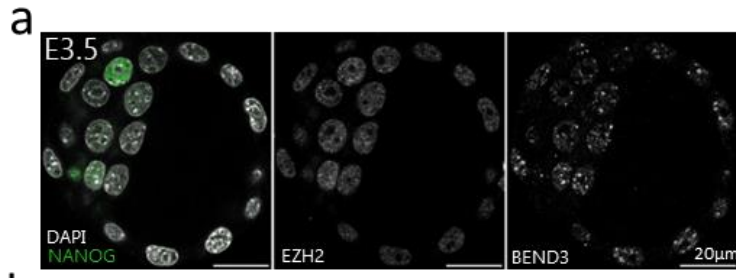
Supplementary Fig. 3: Correlation dynamics between DAPI and H3K9me3 signals at chromocenters at peri-implantation stages.

(a, c and e) Pattern of H3K9me3 in a representative nucleus of EPI (a), PrE (c) and TE (e) cells at different blastocyst stages (from E3.25 to E4.25). DNA is stained with DAPI. Scale bar represents 5 μ m. (b, d and f) Violin plots show the distribution dynamics of the Pearson's Correlation Coefficients (PCC) between DAPI and H3K9me3 profiles at chromocenters in EPI (b), PrE (d) and TE (f) cells at various stages (196, 192 and 195 chromocenters analysed respectively). Graphs were generated using ggplot2⁵⁶ (v3.3.5) in R and figures were arranged with FigureJ⁵⁵ in Fiji⁵⁴ (v1.53c).



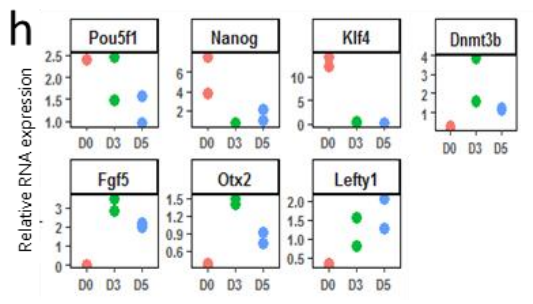
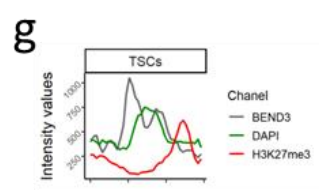
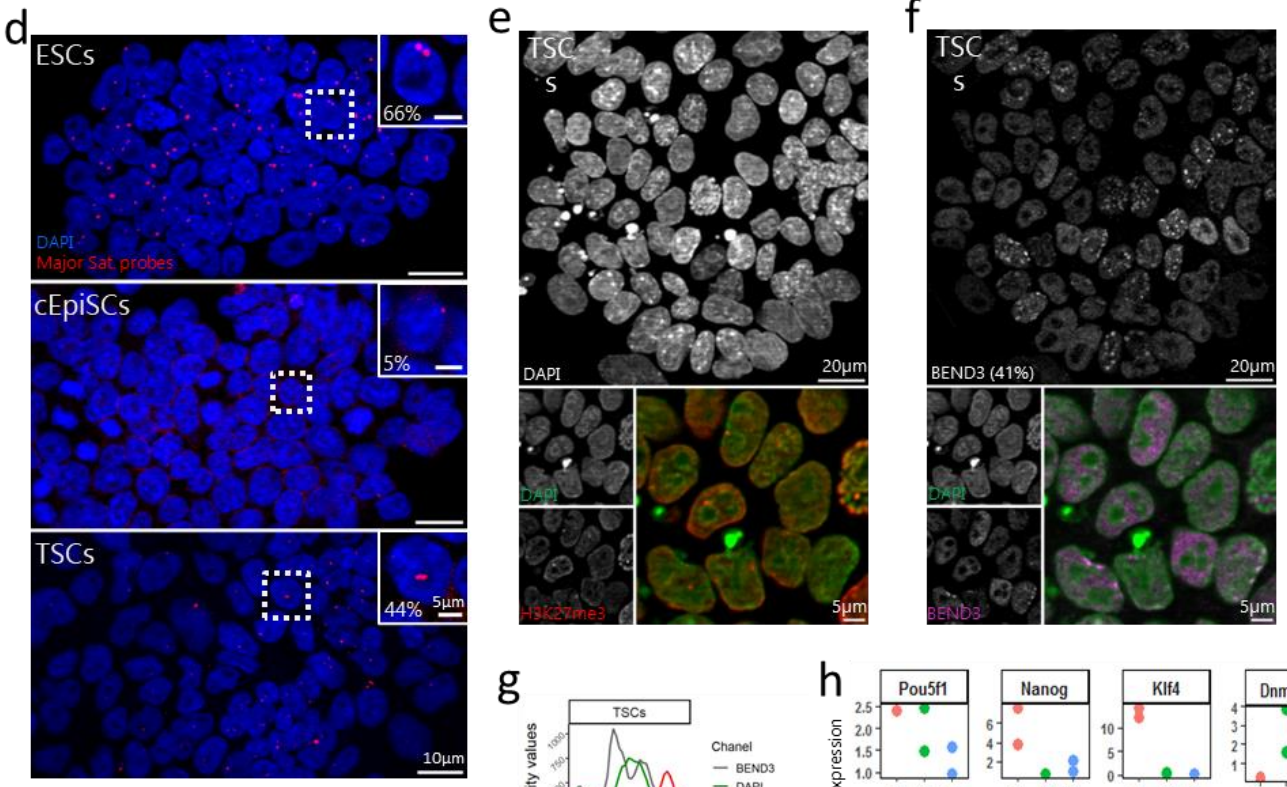
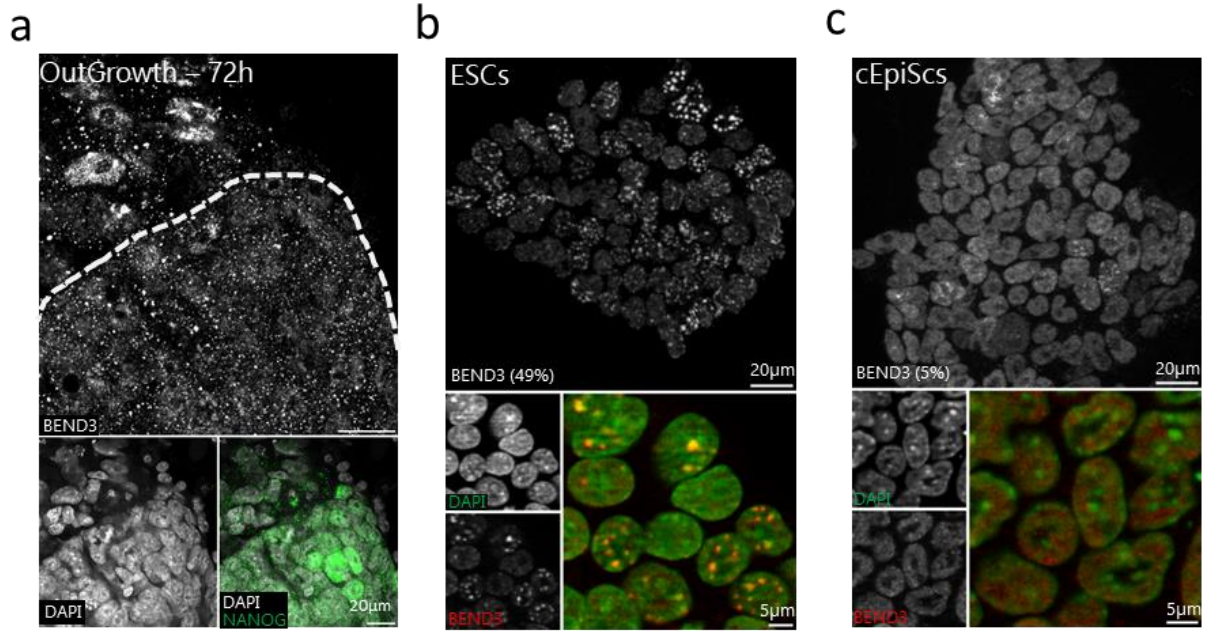
Supplementary Fig. 4: Transcription dynamics of major satellites in 2-cell to 16-cell embryos assessed by RNA-FISH and relative quantification of DNA methylation at major satellites.

(a) Z-projection of whole embryos processed for immuno-RNA-FISH, with DAPI (blue) and Major satellite foci (red) staining. Scale bar represents 10µm. **(b)** Proportion of cells exhibiting 0, 1-2, 3-4 and 5 or more (5+) RNA-FISH foci per cell at each indicated stage (215 nuclei analysed). **(c)** Proportion of tags for mCpG at major satellite sequences at blastocyst and post-implantation stages as assessed from published DNA methylome (GSE76505²³). Graphs were generated using ggplot2⁵⁶ (v3.3.5) in R and figures were arranged with FigureJ⁵⁵ in Fiji⁵⁴ (v1.53c).



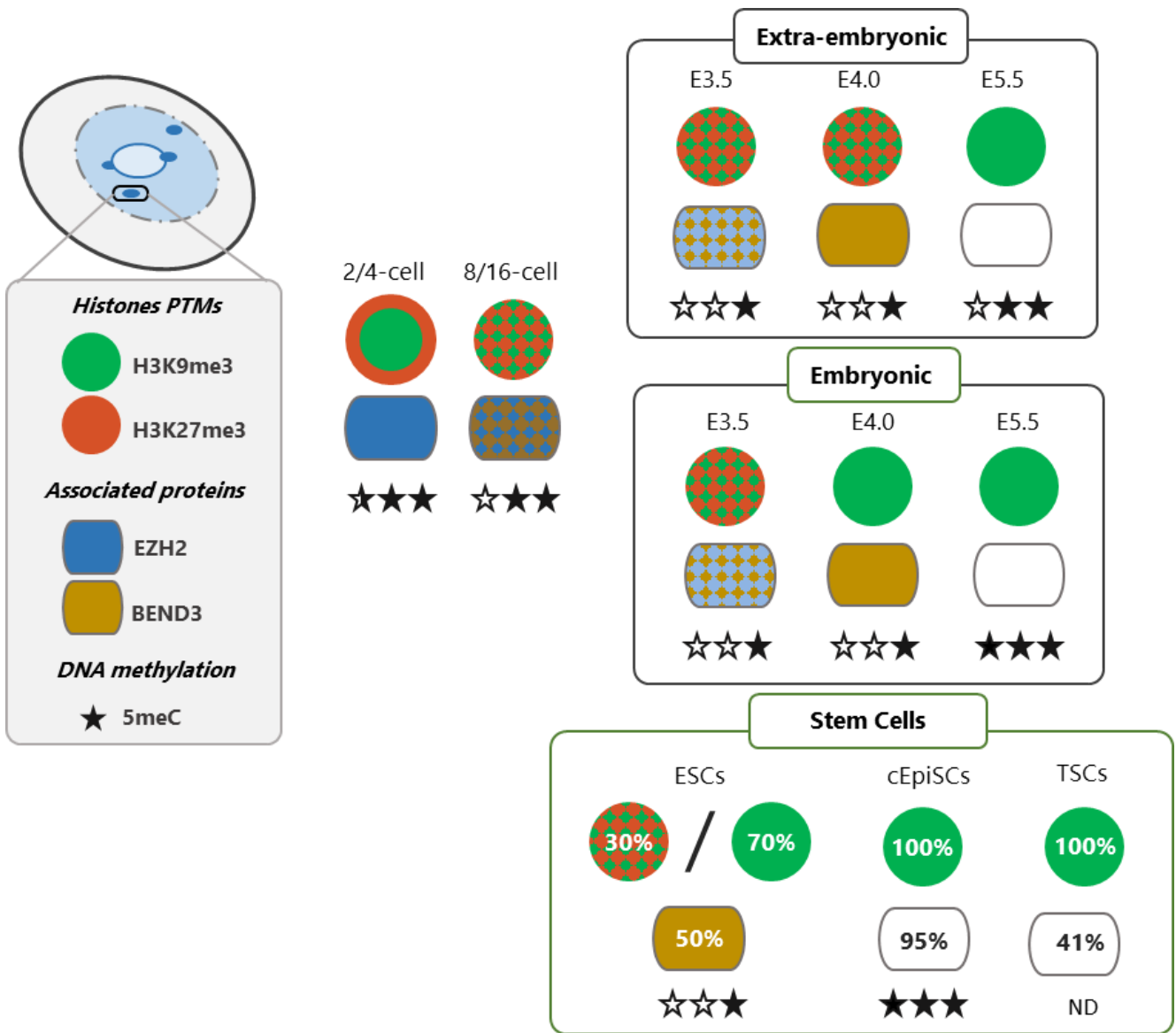
Supplementary Fig. 5: EZH2 and BEND3 patterns in whole peri-implantation embryos and effects of siEzh2+EPZ experiments on the inactive X.

(a-c) Z-projection of whole embryos at E3.5 **(a)**, E4.0 **(b)**, and E5.5 **(c)** after staining with DAPI, NANOG or OCT4, EZH2 and BEND3. **(d)** Proportion of cells showing 0 to 5 foci after RNA-FISH for Major satellites. **(e, g)** Z-projection of whole female 96h embryos, after electroporation with either scramble or siEzh2 and immuno-stained for DAPI, EZH2 and H3K27me3. EPZ was also added to the culture of siEzh2 treated embryos. The lower panels show a representative nucleus and the line is drawn across the inactive X cloud. **(f, h)** Graphs show the representative intensity profiles of DAPI (green), EZH2 (grey) and H3K27me3 (red) signals across the inactive X cloud of the nucleus shown in **(e)** and **(g)**. **(i)** Quantification of total signal intensity of EZH2 and H3K27me3 within the inactive X chromosome cloud (n=20) of scramble and siEzh2+EPZ treated embryos. *** Pvalue<10⁻⁹, Mann-Whitney test. Graphs were generated using ggplot2⁵⁶ (v3.3.5) in R and figures were arranged with FigureJ⁵⁵ in Fiji⁵⁴ (v1.53c).



Supplementary Fig. 6: BEND3 profile at chromocenters in stem cells and transcription dynamics of major satellites in each cell line assessed by RNA-FISH.

(a, b, c) BEND3 staining in 72h outgrowth **(a)**, ESCs **(b)** and cEpiSCs **(c)**. DAPI and NANOG staining are presented in the lower panels. The pluripotent cell population is delineated by a white dashed line in **a**. The proportion (%) of the cell population with BEND3 enriched chromocenters is indicated for each cell population. **(d)** Profile of major satellite transcription (red) assessed by RNA-FISH in 2i/LIF ESCs, cEpiSCs and FAXY TSCs. The proportion of cells exhibiting RNA-FISH foci is specified for each cell line in the zoomed-in nucleus panel (1297, 674 and 1286 nuclei analysed respectively). **(e, f)** FAXY-cultured TSCs colony stained for H3K27me3 **(e)** or BEND3 **(f)**, DAPI and merge signals. **(g)** A representative intensity profile graph of DAPI (green), BEND3 (grey) and H3K27me3 (red) signals across a single chromocenter in a nucleus of TSCs. **(h, f)** Relative expression of genes associated with primed (left) or naïve (right) pluripotency during the conversion of ESCs to EpiSCs presented in **Fig. 7g**. Graphs were generated using ggplot2⁵⁶ (v3.3.5) in R and figures were arranged with FigureJ⁵⁵ in Fiji⁵⁴ (v1.53c).



Supplementary Fig. 7: Representative dynamics of the epigenetic profile of chromocenters along peri-implantation development.

This scheme summarizes the main findings of the study: the epigenetic organization of a representative chromocenter at different stages and in embryonic and extra-embryonic lineages: the histone modifications (H3K27me3 and H3K9me3) are present either in the core region (circle) or at the periphery (ring). Associated proteins (EZH2 and BEND3) present at PCH are represented by coloured rectangles when present. DNA methylation at major satellites is represented by stars (white: unmethylated; black filling: methylated).

RT-QPCR	SEQUENCE (5'->3')
Fgf5	F TGTGTCTCAGGGGATTGTAGG R AGCTGTTTTCTTGAATCTCTCC
Klf4	F GCAGTCACAAGTCCCCTCTC R GACCTTCTTCCCCTCTTTGG
Nanog	F CTTTCACCTATTAAGGTGCTTGC R TGGCATCGGTTTCATCATGGTAC
Pou5f1	F CAGCCAGACCACCATCTGTC R GTCTCCGATTTGCATATC
Otx2	F TATCTAAAGCAACCGCCTTACG R GCCCTAGTAAATGTCTGTCCTCTC
Lefty1	F GCATCCTGGTCCCACAGAG R CTGCAGAACACGCCAAAGTG
Dnmt3b	F GAGCCTGTTCTCGATGTGG R CAAACCCACCTGAGGCTGTT
Sdha	F AACCTGGCTACTGTCATTGCTCCA R ATGTTCTGCTGGTCTCTGTGGGAA
Pbgd	F GCGGAGTGGAACTTTTGTC R CGGGAAGCGTACTTATCCTT
siRNA	SEQUENCE (5'->3')
siBend3	F GCGGAAGUUAGAGUCGCUGtt R CAGCGACUCUAACUCCGctt
siEzh2	F GCAAUUCUCGGUGUCAAAtt R UUUGACACCGAGAAUUUGctt

Supplementary Table S1: List of primers used for qRT-PCR and used siRNA.

Antigen	Working dilution	Reference
H3K9me3	1/100	Active Motif 61013
H3K9me3	1/500	Active Motif 39161
H3K27me3	1/200	Millipore 07-449
H3K27me3	1/300	Diagenode C15200181
BEND3	1/100	Invitrogen PA5-84529
EZH2	1/100	Novocastra NCL-L-EZH2
CDX2	1/200	Abcam ab157524
GATA6	1/50	R&D Systems 1F1700
NANOG	1/200	Invitrogen 14-5761-80
OCT4	1/200	Abcam ab27985
α -rabbit-CY3	1/200	Jackson ImmunoResearch
α -rabbit-FITC	1/200	Jackson ImmunoResearch
α -mouse-FITC	1/200	Jackson ImmunoResearch
α -rat-CY5	1/200	Jackson ImmunoResearch
α -goat-CY5	1/200	Jackson ImmunoResearch

Supplementary Table S2: List of antibodies used for immunostaining.

II. Résultats complémentaires : perturber la dynamique de H3K27me3 dans le blastocyste murin

1. Le Knock-Down de BEND3 au cours du développement précoce n'a pas permis de mettre en évidence l'éventuelle participation de BEND3 dans le maintien de l'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres et/ou son influence sur l'expression des séquences satellites majeures

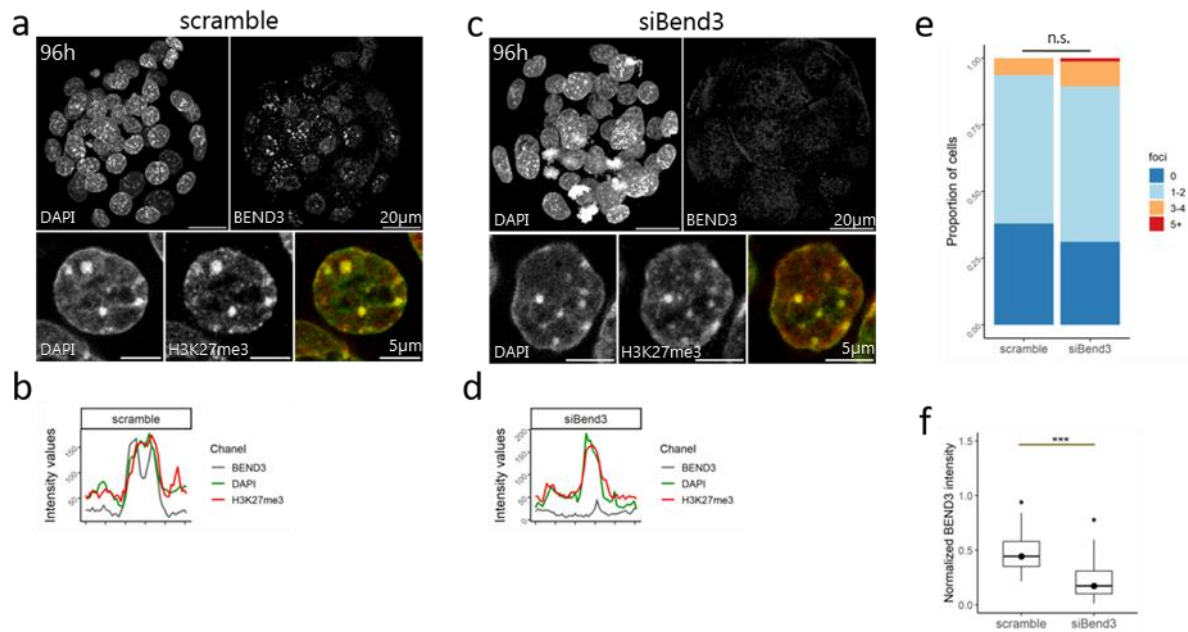


Figure 17 : Knock-Down de BEND3 et ses effets sur l'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres et l'expression des séquences satellites majeures dans l'embryon précoce.

(a, c) Jeunes blastocystes équivalents 96h après électroporation avec siRNA contrôle (scramble) (a) ou siBend3 (c) et signaux DAPI (vert) et BEND3 (rouge). Le panel du haut présente la projection en Z de l'embryon entier et les panels du bas, un noyau représentatif. (b, d) Les graphiques montrent les profils d'intensité de fluorescence des signaux DAPI et BEND3 aux chromocentres. (e) Proportion des cellules présentant 0, 1-2, 3-4 et 5 ou plus (5+) foci de RNA-FISH par noyau dans des embryons 96h contrôle ou traités siBEND3. (f) Quantification de l'intensité de signal total pour BEND3 dans les embryons contrôle vs traités siBEND3. Test de Mann-Whitney, pvalue < 0.001 (***) , n.s. pour non significatif.

La discordance observée entre l'accumulation de BEND3 et celle de H3K27me3 aux chromocentres, ainsi que les résultats du knock-down de BEND3, ne nous permettent pas de conclure sur l'éventuelle implication de BEND3 dans le maintien de EZH2/PRC2 aux chromocentres (Figure 17a-d). Par ailleurs, BEND3 est décrite dans la littérature comme impliquée dans les mécanismes de répression transcriptionnelle (Sathyan et al., 2011) ; nous

avons donc regardé par RNA-FISH le statut d'expression des séquences satellites majeures. De façon similaire aux résultats obtenus pour siEZH2+EPZ, la perte de BEND3 n'entraîne pas d'augmentation significative de la transcription des séquences satellites majeures (Figure 17e). Néanmoins, la diminution du signal BEND3 entre embryons contrôle et embryons électroporés avec un siRNA dirigé contre BEND3 n'étant que de 50%, nous ne pouvons formellement conclure sur l'implication de BEND3 dans le maintien transitoire de H3K27me3 aux chromocentres, ni sur son influence sur le contrôle de la transcription des séquences satellites majeures.

2. Perturber la ségrégation spatiale des cellules de l'EPI et du PrE ne semble pas influencer sur la dynamique de H3K27me3 dans l'embryon

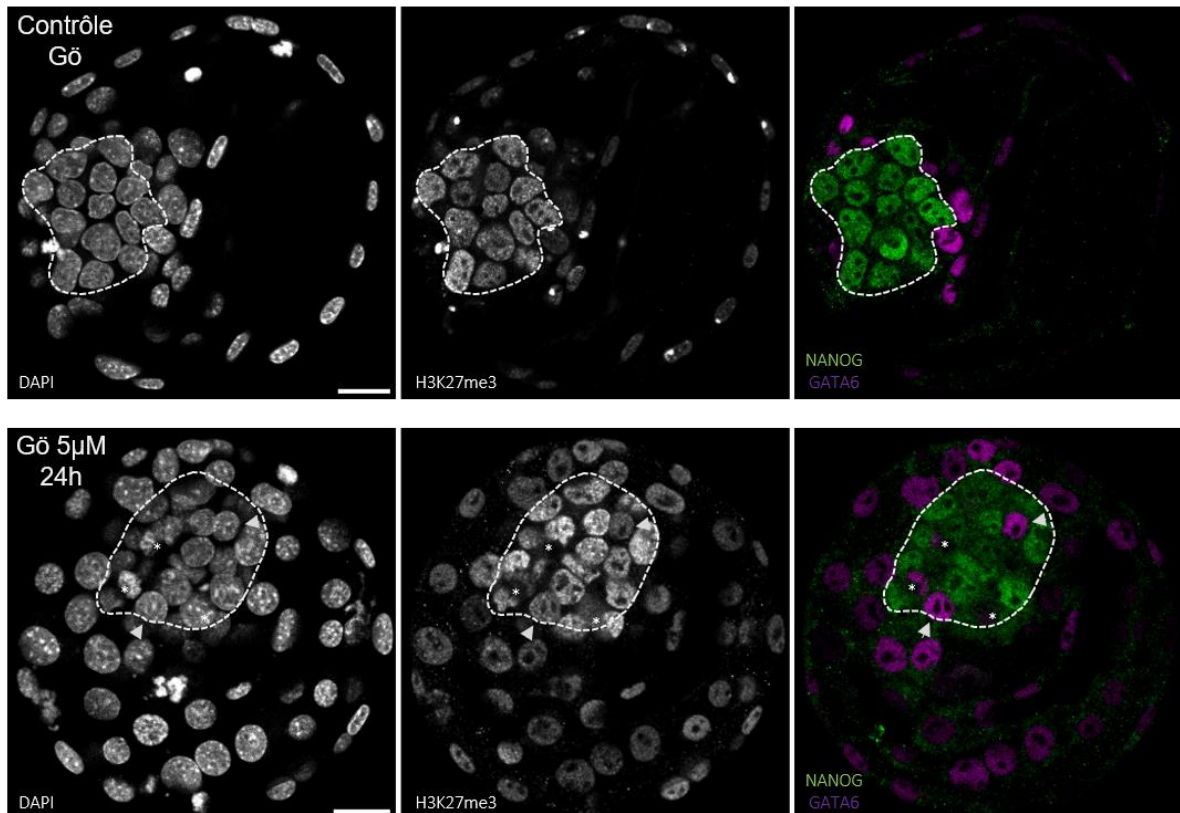


Figure 18 : Effets de la perturbation de la ségrégation EPI/PrE sur le profil de H3K27me3 aux chromocentres. Panel du haut, les embryons « contrôle » (exposés à 1/2000^{ème} de DMSO). Panel du bas, les embryons traités 24h avec l'inhibiteur de l'aPKC Gö (5µM). Les cellules du PrE non ségrégées des cellules de l'EPI sont identifiées par * ou par une pointe de flèche (échelle à 20µm).

Dans le but de comprendre quel était le lien apparent entre ségrégation spatiale des cellules de l'EPI et modification du marquage H3K27me3, nous avons entrepris de perturber cette ségrégation EPI/PrE à l'aide d'un inhibiteur de l'aPKC (Saiz et al., 2013).

L'inhibiteur Gö a été utilisé à une concentration de 5µM pendant 24h sur des embryons E3.25/E3.5. Les embryons ont par la suite été fixés puis la ségrégation des lignages a été évaluée à l'aide des marqueurs NANOG et GATA6. Bien que l'inhibiteur Gö ait perturbé le tri des cellules du PrE, nous n'avons pas pu observer d'effets sur le changement de distribution de H3K27me3 dans les noyaux des cellules pluripotentes (Figure 18).

3. Le profil épigénétique des chromocentres caractéristique de l'embryon n'est pas restauré dans les cellules ES lors de leur intégration dans un embryon hôte

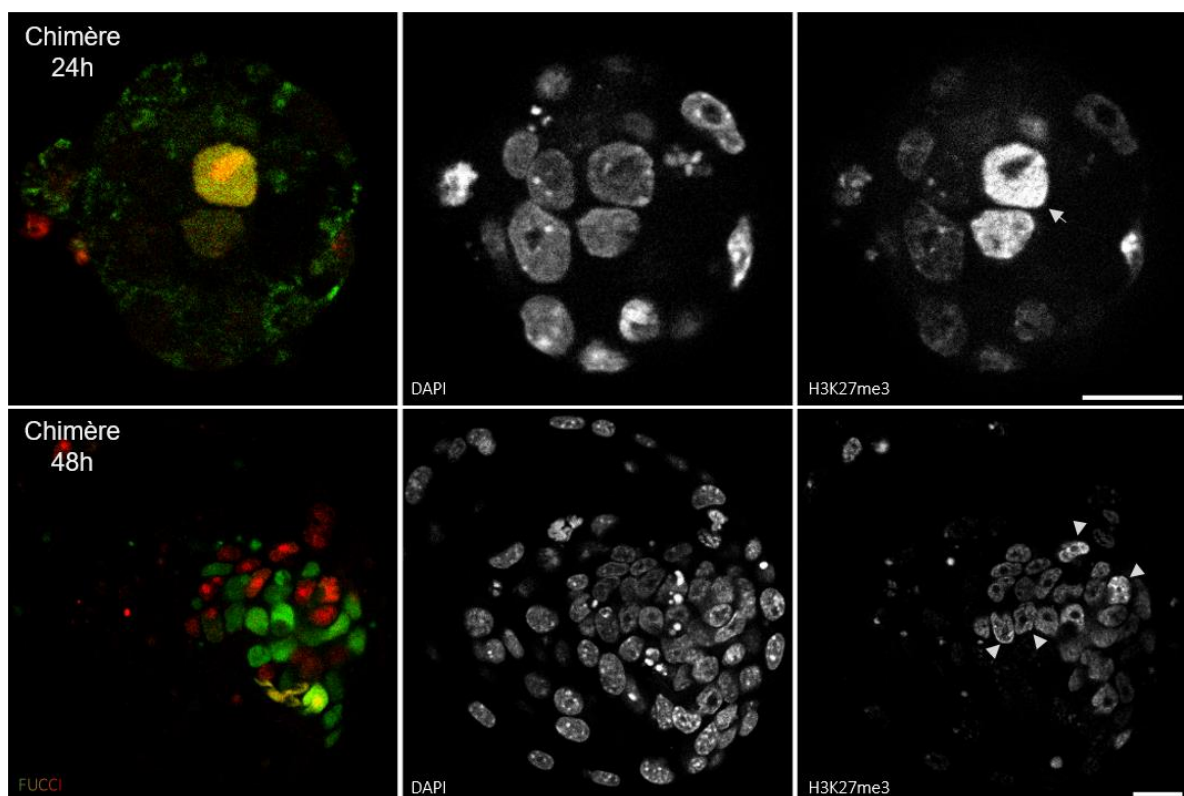


Figure 19 : Effets de l'environnement embryonnaire sur le profil épigénétique des cellules ESCs FUCCI. Blastocystes chimères CD1xFUCCI, formées à partir de l'agrégation d'embryons 4/8-cellules et de cellules FUCCI, pendant 24h (panel du haut) ou 48h (panel du bas). Les cellules identifiées par des pointes de flèches sont les cellules FUCCI qui présentent encore une accumulation de H3K27me3 aux chromocentres, au stade où l'EPI de l'embryon présente un signal globalement diffus pour H3K27me3 (échelle à 20µm).

L'un des objectifs initiaux de ce projet était d'étudier la dynamique de H3K27me3 en cas de modifications des outils épigénétiques disponibles à l'embryon pour la régulation des chromocentres. Pour cela, nous avons pour objectif de produire des embryons chimères via l'utilisation d'ESCs mutantes pour des enzymes de la machinerie épigénétique. Les premiers tests d'agrégation embryon/ESCs FUCCI (don de P. Savatier) ont ainsi mis en évidence que le profil épigénétique hétérogène des chromocentres des ESCs ne peut être reversé lorsque celles-ci sont intégrées à un environnement embryonnaire (Figure 19).

III. H3K27me3 et chromocentres : quid du modèle bovin ?

1. H3K27me3 est juxtaposée à H3K9me3 dans l'embryon bovin

1) H3K27me3 marque la périphérie des chromocentres H3K9me3 au moment de l'activation du génome embryonnaire

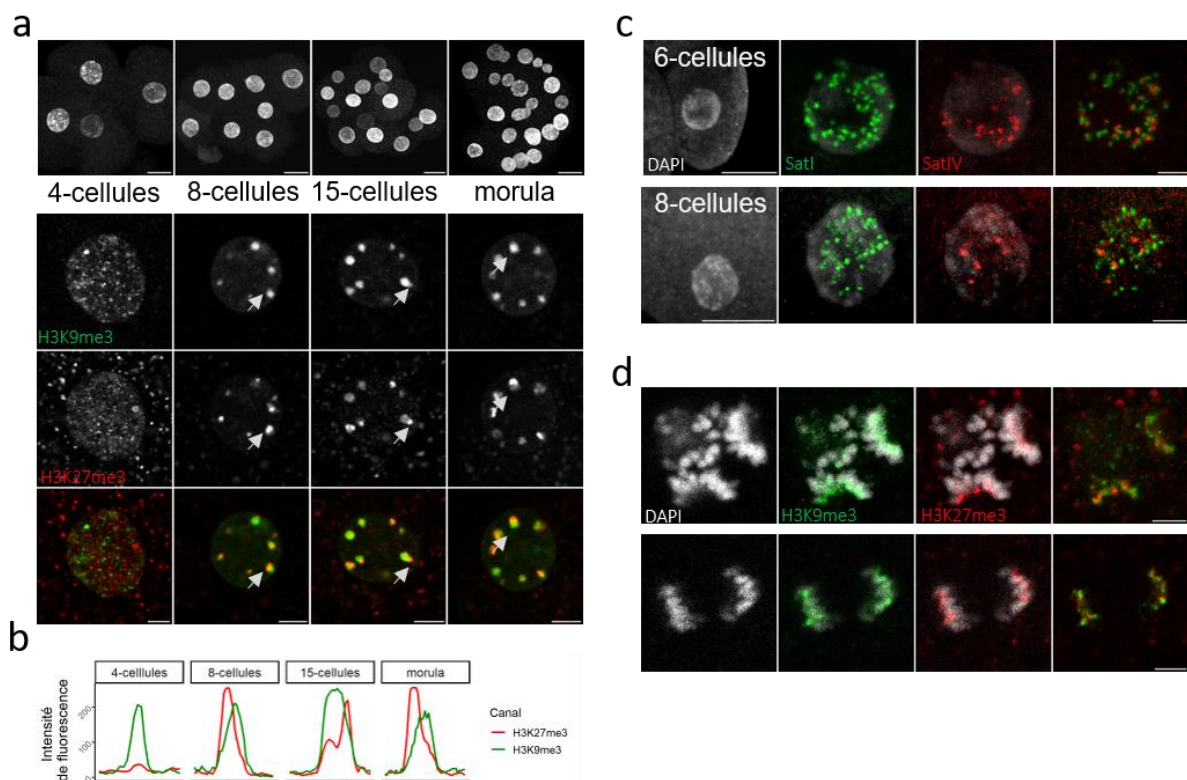


Figure 20 : Dynamique de H3K9me3 et H3K27me3 au cours du développement précoce bovin. (a) Le panel supérieur montre la projection en Z de l'embryon entier (échelle à 20µm). Les panels inférieurs montrent un plan de coupe représentatif de l'embryon entier, avec marquage H3K9me3 (vert) et H3K27me3 (rouge) (échelle à 5µm). (b) Profils d'intensité des signaux H3K9me3 et H3K27me3 au cœur du chromocentre identifié. (c) : Dynamique de

localisation des séquences satellites SatI et SatIV au moment de l'EGA. (d) : localisation des signaux H3K9me3 et H3K27me3 sur les chromosomes en mitose (échelle à 5µm).

Similairement au modèle murin, les chromocentres bovins se forment au moment de l'activation majeure du génome (Martin et al., 2006). Les séquences satellites bovines n'étant pas A-T riches (Pöschl and Streeck, 1980; Skowronski et al., 1984), celles-ci ne sont pas densément marquées par le DAPI (contrairement à ce qui est observé chez la souris). Ainsi, nous avons utilisé H3K9me3 comme marquage contrôle de la localisation des chromocentres bovins.

Au stade 4-cellules, précédant l'activation majeure du génome embryonnaire bovin, H3K9me3 et H3K27me3 sont présents de façon homogène dans le noyau (Fig. 20a). A 8-cellules, au moment de l'activation du génome embryonnaire, H3K9me3 forme des amas facilement identifiables dans le noyau et ces amas correspondent aux chromocentres bovins (Fig. 20a). De façon similaire, H3K27me3 forme des amas juxtaposés aux chromocentres identifiés par H3K9me3 (Fig. 20a). Ce profil de distribution atypique H3K9me3/H3K27me3 est maintenu ainsi jusqu'au stade morula (Fig. 20a). L'association des amas H3K27me3 avec les chromocentres H3K9me3 est nettement visible en profil de fluorescence (Fig. 20b).

Du fait de l'absence de superposition parfaite des marquages H3K9me3 et H3K27me3, nous nous sommes demandé si les amas H3K27me3 ne correspondaient pas à l'accumulation de séquences autres que les séquences satellites bovines qui seraient associées aux chromocentres au cours du développement précoce. Nous avons donc porté notre intérêt sur le marquage par H3K27me3 et H3K9me3 des chromosomes mitotiques (Fig. 20c). Nous pouvons voir que H3K9me3 s'accumule uniformément à l'extrémité des chromosomes au cours de la mitose (au niveau des régions péri-/centromériques). Étonnamment, H3K27me3 se localise à ces mêmes extrémités mais présente une répartition non homogène, contrairement à H3K9me3 (Fig. 20d). Ces observations suggèrent que H3K27me3 serait présente de façon hétérogène aux séquences péri-/centromériques bovines. Notamment, le profil de distribution de H3K27me3 autour des chromocentres H3K9me3 pourrait correspondre à celui des centromères.

Les séquences péri-/centromériques bovines étant constituées de 3 classes de séquences qui présentent une localisation non uniforme sur l'ensemble des chromosomes (Chaves et al.,

2003; Ana Escudeiro et al., 2019), nous nous sommes interrogées sur l'homogénéité de la composition des chromocentres bovins. A l'aide d'une approche par DNA-FISH (menée par A. Acquistapace) identifiant conjointement les séquences satellites SatI et SatIV bovines, nous avons voulu explorer la dynamique d'organisation de ces séquences autour de l'activation du génome. Des résultats préliminaires montrent que dans l'embryon 6- et 8-cellules, les séquences satellites SatI et SatIV semblent former des amas indépendants dans l'espace nucléaire (Fig. 20c).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que H3K27me3 pourrait marquer ou les centromères bovins, ou différenciellement les différentes familles de séquences satellites péri-centromériques bovines.

2) La distribution de H3K27me3 en périphérie des chromocentres n'est pas dynamique au cours du développement bovin

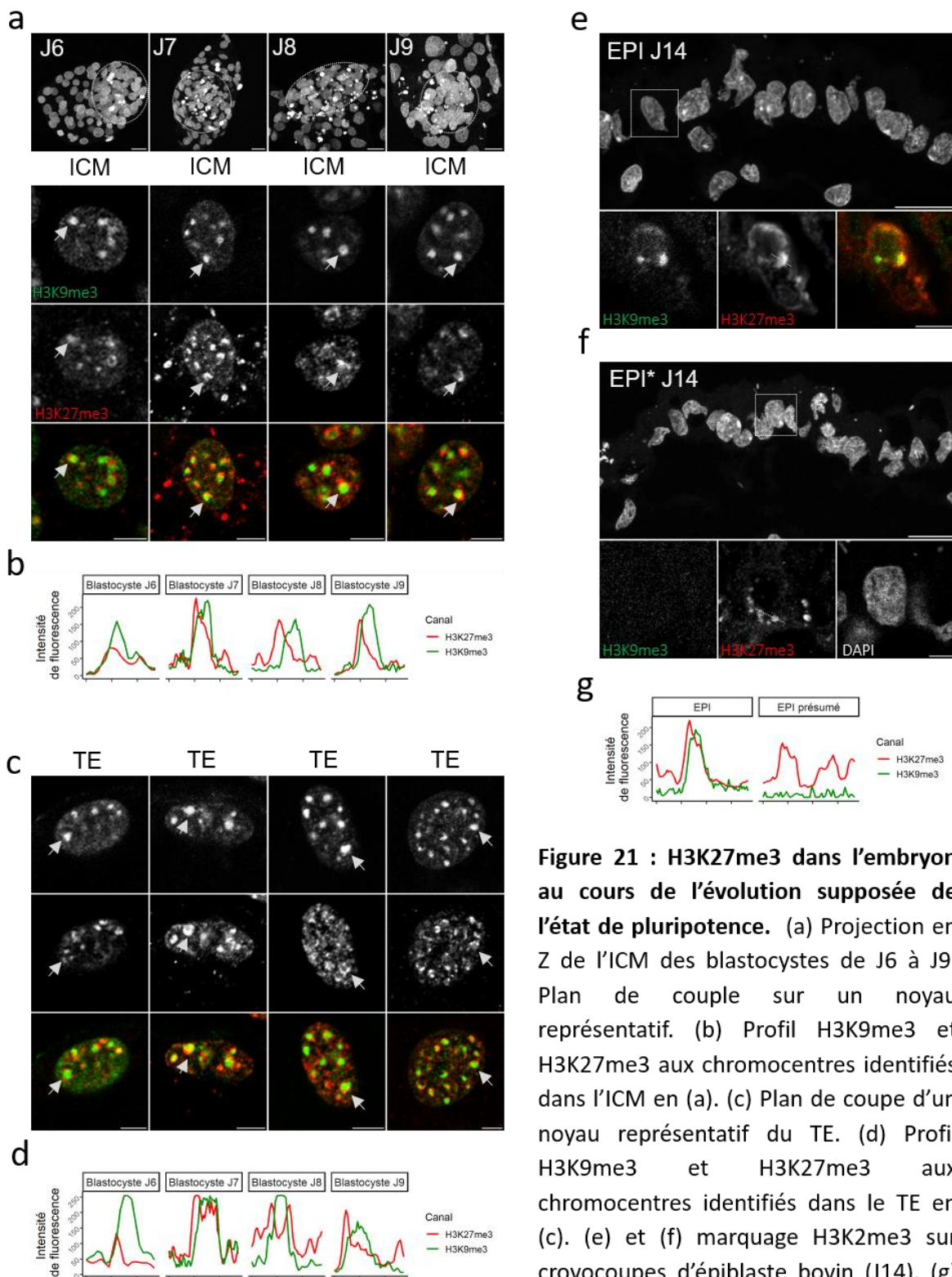


Figure 21 : H3K27me3 dans l'embryon au cours de l'évolution supposée de l'état de pluripotence. (a) Projection en Z de l'ICM des blastocystes de J6 à J9. Plan de couple sur un noyau représentatif. (b) Profil H3K9me3 et H3K27me3 aux chromocentres identifiés dans l'ICM en (a). (c) Plan de coupe d'un noyau représentatif du TE. (d) Profil H3K9me3 et H3K27me3 aux chromocentres identifiés dans le TE en (c). (e) et (f) marquage H3K2me3 sur cryocoupes d'épiblaste bovin (J14). (g) les graphiques correspondant au profil observé pour H3K27me3 à ce stade.

Ayant observé précédemment que H3K27me3 était différentiellement accumulée aux chromocentres murins en fonction du lignage et du stade considéré, nous avons entrepris de caractériser, par immunomarquage, le profil de H3K27me3 au cours du développement du blastocyste bovin. Les embryons bovins étudiés ayant été produits *in vitro*, la limite de culture de ces embryons est de 9 jours. Nous avons donc étudié le co-marquage H3K9me3/H3K27me3 au cours du développement du blastocyste (de 6 jours à 9 jours de développement - correspondant aux stades de la pluripotence naïve), en comparaison avec un stade équivalent à celui de la pluripotence amorcée dans le modèle bovin à 14 jours de développement.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le profil de juxtaposition des marquages H3K9me3/H3K27me3 n'évoluait pas au cours du développement du blastocyste (Fig. 21a). H3K27me3 présente de façon constante une localisation en bordure des chromocentres identifiés par les amas H3K9me3 (Fig. 21b). Également, le profil H3K9me3/H3K27me3 est similaire entre le lignage pluripotent (ICM) et le lignage extra-embryonnaire (TE) (Fig. 21a, c). De J6 à J9, le profil H3K27me3 n'évolue pas dans les cellules de l'ICM, contrairement à ce qui avait été décrit dans le modèle murin.

Enfin, des données préliminaires obtenues sur cryocoupes d'embryon bovin à 14 jours de développement laissent entendre que le profil de H3K27me3 demeure inchangé dans le lignage pluripotent à un stade présumé de la pluripotence amorcée bovine (Fig. 21e), en comparaison des profils observés dans l'ICM pluripotent naïf. Le profil H3K27me3 en fluorescence correspond, tout au long du développement bovin *in vitro* et à J14, à un pic asymétrique localisé à la périphérie des pics H3K9me3 marquant les chromocentres (Fig. 20b, 21b, g).

3) BEND3 n'est pas partenaire des chromocentres du blastocyste bovin à J8

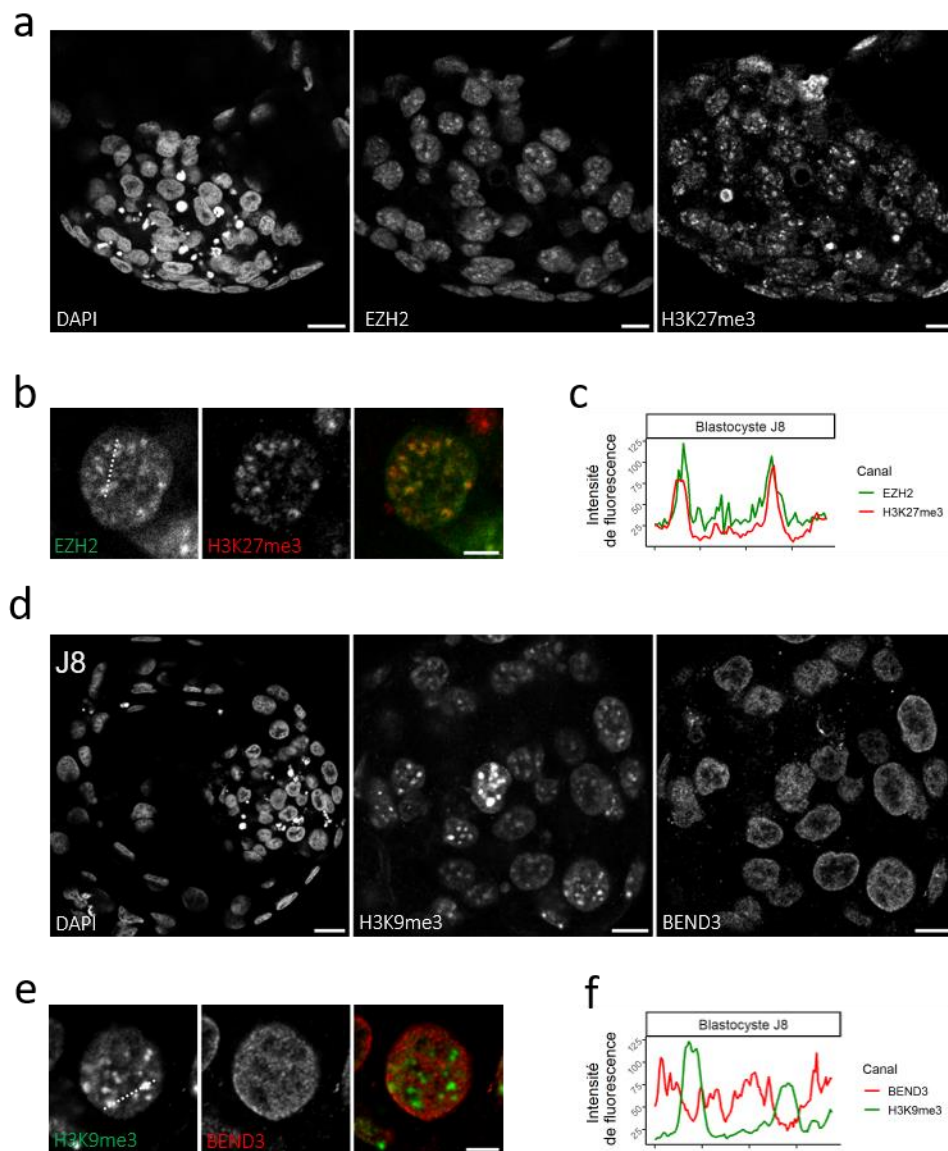


Figure 22 : EZH2 et BEND3 dans le blastocyste bovin à J8. (a, b, c) Visualisation à différentes échelles du profil de H3K27me3 et EZH2 dans l'ICM du blastocyste bovin. (d, e, f) Immunomarquage de la protéine BEND3, l'intérêt est porté sur une cellule de l'ICM.

Également, nous nous sommes demandé si l'accumulation de EZH2 et BEND3 aux chromocentres était conservée dans le modèle bovin. Nos résultats préliminaires obtenus sur des blastocystes J8 indiquent que - similairement à ce qui a été décrit dans l'embryon murin - EZH2 est retrouvée accumulée aux régions de fort marquage H3K27me3 (Fig. 22a). Les profils de fluorescence de ces deux marques indiquent une colocalisation des marquages H3K27me3 et EZH2, notamment au niveau des amas H3K27me3 (Fig. 22b/c).

L'analyse de données RNA-Seq publiées - obtenues au cours du développement précoce bovin (Graf et al., 2014) - par un de nos collaborateurs a mis en évidence que les transcrits BEND3 étaient présents en faible quantité jusqu'au stade 8-cellules et que ceux-ci sont plus abondant au stade blastocyste (Annexe 1). Nous nous sommes donc intéressées à la distribution de BEND3 dans l'embryon bovin. Nos résultats montrent que cette protéine présente une répartition diffuse dans l'ensemble du noyau, sans accumulation spécifique au niveau des chromocentres H3K9me3 (Fig. 22d). Les profils de fluorescence BEND3/H3K9me3 tendent même à montrer que ces deux signaux sont mutuellement exclusifs (Fig. 22e/f).

2. H3K27me3 dans les ESCs bovines

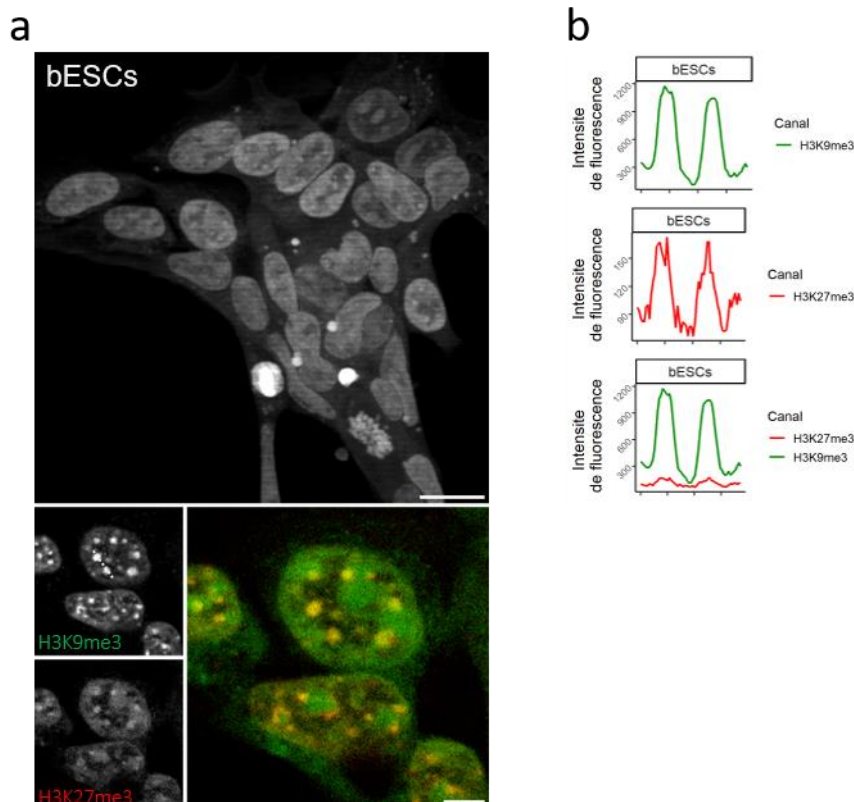


Figure 23 : H3K9me3 et H3K27me3 dans les ESCs bovines (bESCs). (a) Le panel supérieur montre une colonie de bESCs contre-colorée au DAPI, les panels inférieurs montrent un plan de coupe représentatif des marquages H3K9me3 (vert) et H3K27me3 (rouge). (b) Les graphiques correspondent aux profils de fluorescence des signaux H3K9me3 (vert) et H3K27me3 (rouge) au niveau des chromocentres identifiés par un pic d'intensité en H3K9me3.

Enfin, nous avons plus récemment complété ces observations avec des données d'immunomarquage sur cellules ES bovines (bESCs). Ces premières données indiquent que H3K27me3 est présent aux chromocentres H3K9me3 (Fig. 23a). Les images et les profils de fluorescence semblent également indiquer que le profil de H3K27me3 en cellules ES serait différent du profil H3K27me3 dans l'embryon. En effet, les signaux H3K27me3 et H3K9me3 semblent colocaliser aux chromocentres des bESCs. Néanmoins, le signal obtenu pour H3K27me3 étant globalement très faible par rapport à l'intensité de fluorescence pour H3K9me3 (Fig. 23b), ces données restent à confirmer.

DISCUSSION

I. H3K27me3 marque la périphérie des chromocentres de l'embryon bovin précoce

Nous avons montré que H3K27me3 se présente notamment sous forme d'amas juxtaposés aux chromocentres marqués par H3K9me3 au cours du développement précoce bovin. Le marquage observé aux extrémités péri-centromériques des chromosomes en mitose suggère que H3K27me3 est bien localisé au niveau des séquences satellites bovines. De plus, les données préliminaires obtenues dans l'épiblaste à J14 semblent indiquer que le profil de H3K27me3 ne varie pas au cours de la maturation de l'ICM/épiblaste et de l'évolution de la pluripotente. Enfin, nous avons mis en évidence que EZH2 présente un marquage plus intense aux régions fortement marquées par H3K27me3, à l'inverse de BEND3 qui présente un marquage diffus dans l'ensemble du noyau et ne s'accumule pas aux chromocentres.

1. L'hétérogénéité des séquences satellites bovines est-elle à l'origine du découplage des signaux H3K9me3 et H3K27me3 aux chromocentres ?

Comme nous l'avons présenté, les séquences satellites bovines se classent en quatre catégories principales (revue dans (A. Escudeiro et al., 2019)). Les données préliminaires de DNA-FISH marquant l'organisation des séquences SatI et SatIV dans l'embryon 8-cellules semblent indiquer que l'agrégation des séquences satellites bovines en chromocentre se fait entre membre d'une même classe de séquences. Chez *Bos taurus*, SatI est la classe de

séquences satellites retrouvée aux régions péri-centromériques de tous les autosomes, contrairement aux séquences SatIV qui marquent moins de la moitié de ces régions (Chaves et al., 2003). Ces données couplées à nos observations des marquages H3K9me3 et H3K27me3 - dans le noyau en interphase et au cours de la mitose - semblent indiquer que H3K9me3 serait enrichie au moins aux séquences SatI alors que H3K27me3 pourrait marquer d'autres familles de séquences comme SatIV. De précédentes données pour H3K27me3 dans l'embryon bovin confirme sa localisation aux extrémités péri-centromériques des chromosomes en mitose (Breton et al., 2010).

Également, il a été mis en évidence par un co-marquage CREST (CENP-A)/HP1 que les séquences centromériques (contenant CENP-A) s'organisent en périphérie des séquences péri-centromériques densément marquées par HP1 (Martin et al., 2006; Pichugin et al., 2010). D'après le profil de H3K27me3 aux chromocentres (en périphérie du signal H3K9me3), nos résultats pourraient suggérer que H3K27me3 marque les séquences centromériques bovines plutôt que les séquences péri-centromériques. Il a récemment été mis en évidence par Escudeiro et al., (2019) que les séquences Sat1.723 étaient impliquées dans la fonction des centromères puisqu'elles contiennent notamment le motif de liaison de CENP-B et interagissent préférentiellement avec CENP-A, à l'inverse des autres classes de satellites. Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude en ciblant par immunomarquage H3K27me3 et CENP-A et de quantifier leur colocalisation au cours du développement précoce bovin. Également, une approche par Cut&Run.salt (protocole de Cut&Run adapté à l'étude de la chromatine péri-centromérique, (Thakur and Henikoff, 2018)) couplée à de la qPCR nous permettrait de caractériser plus finement le profil épigénétique de chaque classe de séquences satellites bovines.

Il serait également pertinent de comparer ces futures données avec d'autres obtenues dans les bESCs, pour lesquelles nos résultats préliminaires montrent que H3K27me3 colocalise avec les chromocentres H3K9me3. Néanmoins, l'intensité du signal H3K27me3 étant très faible dans les bESCs, il serait pertinent de questionner l'efficacité de l'anticorps utilisé et de répéter ces observations avec un autre anticorps dirigé contre H3K27me3. Si la colocalisation entre les signaux H3K27me3 et H3K9me3 venait à se confirmer dans les cellules bES, il serait intéressant d'explorer par une approche DNA-FISH l'organisation 3D des différentes classes de séquences satellites bovines ainsi que leur profil d'enrichissement en H3K27me3.

2. L'affinité de BEND3 pour l'hétérochromatine péricentromérique n'est pas conservée dans le modèle bovin

De la même manière à ce qui a été observé au cours du développement précoce murin, les marquages pour EZH2 et H3K27me3 sont similaires dans le blastocyste bovin. En revanche, alors que BEND3 s'accumule aux chromocentres du blastocyste murin, le marquage de cette protéine dans le blastocyste bovin est diffus et exclu des chromocentres H3K9me3. La transcription tardive de Bend3 au cours du développement bovin (Graf et al., 2014), en regard de récentes données décrivant BEND3 comme étant impliquée dans le contrôle transcriptionnel des gènes au cours de la différenciation des mESCs (Zhang et al., 2022), ainsi que dans le maintien de l'état de pluripotence des cellules NTERA2 humaines (Kurniawan et al., 2022), suggèrent que - même si BEND3 ne semble pas impliquée dans le contrôle de l'environnement épigénétique des chromocentres bovin - cette protéine pourrait être impliquée dans le maintien de la pluripotence bovine.

II. H3K27me3 et BEND3 : deux partenaires de l'hétérochromatine péricentromérique dans l'embryon murin péri-implantation

1. Quelle est l'importance de la localisation de H3K27me3 aux chromocentres au cours du développement murin précoce ?

Nos résultats ont mis en évidence que H3K27me3 est localisée aux chromocentres dès leur formation au stade 2-cellules. Cette accumulation y est maintenue jusqu'à l'implantation dans les lignages extra-embryonnaires. En revanche, le profil de H3K27me3 présente une dynamique unique dans les cellules de l'épiblaste pluripotent puisque H3K27me3 est perdue aux chromocentres concomitamment à la ségrégation de l'Epiblaste dans l'ICM.

De précédentes données de la littérature avaient mis en évidence que H3K27me3 est retrouvée aux séquences péricentromériques du génome paternel dès le stade 1-cellule (Puschendorf et al., 2008) et que l'apposition de H3K27me3 par PRC2 à ces séquences dépendait de l'apposition préalable de H2AK119Ub par PRC1 (Tardat et al., 2015). L'apposition asymétrique de H2AK119Ub/H3K27me3 à l'hétérochromatine péricentromérique du génome paternel s'explique par le fait que celle du génome maternel est enrichie en H3K9me3/HP1 -

enrichissement qui inhibe l'action des complexes Polycomb - (Puschendorf et al., 2008; Tardat et al., 2015). Néanmoins, il a plus récemment été montré que H3K9me3 était également apposée à l'hétérochromatine péricentromérique du génome paternel au stade zygote. L'apposition de H3K9me3 est négativement régulée par l'abondance des transcrits paternels des séquences satellites majeures (Burton et al., 2020). De plus, la répression de la transcription des séquences satellites majeures au stade zygote est médiée par le complexe maternel matPRC1 (Puschendorf et al., 2008). Ces données suggèrent qu'il existe un équilibre entre l'apposition de H3K27me3 et H3K9me3 aux séquences péricentromériques, médiée en partie par PRC1 (PRC1 promeut l'apposition de H3K27me3 et réprime l'expression des séquences satellites majeures, promouvant l'apposition de H3K9me3), renforçant l'hypothèse que H3K27me3 aux chromocentres joue un rôle non négligeable au cours du développement précoce.

Les données obtenues sur les différents KO des sous unités du complexe PRC2 indiquent que les KO zygotiques sont létaux au moment de la gastrulation ((O'Carroll et al., 2001) pour EZH2, (Schumacher et al., 1996) pour EED, (Pasini et al., 2004) pour SUZ12), et les KO RING1A/B le sont au cours de l'ovogénèse (Posfai et al., 2012). Cela pourrait suggérer que la présence de H3K27me3 aux chromocentres n'est pas indispensable au développement murin précoce. Néanmoins, les données que nous avons obtenues dans les expériences de Knock-Down/inhibition de EZH2 au cours du développement pré-implantation suggèrent que l'apposition de H3K27me3 par le stock de protéines EZH2 maternelles au cours des premières 24h du développement est suffisante pour assurer la présence de H3K27me3 aux chromocentres jusqu'au stade blastocyste. Des données plus récentes ont mis en évidence que l'abolition des protéines maternelles matEZH1 et matEZH2 entraîne la perte du marquage H3K27me3 dans l'embryon jusqu'au stade blastocyste (Zhao et al., 2021) mais que la létalité de ce double KO n'est observée qu'au moment de l'implantation. Ces données posent donc question sur le rôle biologique de la présence de H3K27me3 aux chromocentres et l'existence d'un éventuel mécanisme de compensation.

Alors que nos résultats indiquent que ni H3K27me3, ni BEND3 ne seraient impliquées dans le contrôle transcriptionnel des séquences satellites majeures, la baisse d'expression de ces séquences au cours du développement du blastocyste pourrait être en partie médiée par PRC1/H2AK119Ub puisque cette modification épigénétique est enrichie aux séquences

satellites majeures, parallèlement à la baisse de leur transcription (Chen et al., 2021). Également, cela serait en accord avec de précédentes observations indiquant que matPRC1 inhibe la transcription des séquences péricentromériques dans le zygote (Puschendorf et al., 2008).

Également, nous voyons que chez les embryons matEED KO, l'enrichissement en H2AK119Ub est augmenté transitoirement aux séquences satellites majeures au moins jusqu'au stade 4-cellules. Lors de surexpression d'une déubiquitine de H2AK119Ub à la suite de la fécondation (Chen et al., 2021), seule une augmentation modérée de H3K27me3 est observée en parallèle de la baisse de l'enrichissement en H2AK119Ub aux séquences satellites majeures dans l'embryon 4-cellules. Chez les KO PCGF1/6 (KO PRC1 qui n'affecte pas l'ovogénèse, (Mei et al., 2021)), la baisse drastique de H2AK119Ub est couplée à une baisse générale de H3K27me3 jusqu'au stade 4-cellules, de même l'apposition de H3K27me3 à l'hétérochromatine péricentromérique du génome paternel semble altérée (Mei et al., 2021). Au stade morula en revanche, l'immunomarquage de H3K27me3 dans l'embryon semble être comparable entre embryons contrôles et embryons PCGF1/6 KO (Mei, 2021), bien que l'enrichissement de cette modification d'histone soit plus élevé aux séquences péricentromériques des embryons PCGF1/6 KO. L'ensemble de ces données suggèrent donc que, en absence de H3K27me3 chez les KO PRC2, PRC1/H2AK119Ub pourrait compenser cette perte aux séquences satellites majeures. Également, il semble que l'enrichissement en H2AK119Ub aux séquences péricentromériques soit essentiel pour initier le recrutement de PRC2 et l'apposition de H3K27me3 au cours des premiers clivages. Plus tardivement, dans l'épiblaste du blastocyste pré-implantation, H2AK119Ub pourrait réguler négativement l'expression des séquences satellites majeures, alors que les niveaux de méthylation de ces séquences demeurent faibles jusqu'à l'implantation (Wang et al., 2014).

2. H3K27me3 est stable à l'hétérochromatine péricentromérique

Au cours de ce projet, nous avons tenté de perturber l'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres, notamment en inhibant l'activité de EZH2 à l'aide d'un inhibiteur spécifique (EPZ-6438) combiné au knock-down de EZH2 dans le zygote (via l'utilisation de siRNA). Cependant, nous n'avons observé aucun changement quant à l'accumulation de H3K27me3 à

l'hétérochromatine péricentromérique et l'intensité totale de H3K27me3 dans les noyaux des embryons traités pendant 72h n'avait diminué que de 30%.

Ces observations semblent indiquer qu'il existe des mécanismes de préservation de l'environnement épigénétique de l'hétérochromatine péricentromérique dans l'embryon. Une étude récente met en évidence que, dans un environnement dépourvu de donneur de méthyl (SAM), la triméthylation de H3K9 aux séquences d'hétérochromatine est perdue au profit du maintien de H3K9me1 (Haws et al., 2020). Dans ce cas, H3K9me3 est déméthylée au profit de la mono-méthylation et H3K9me1 se situe préférentiellement aux séquences répétées du génome dont les séquences satellites (Haws et al., 2020). Cette réponse adaptative à la déplétion de SAM permet de limiter la dérégulation des séquences de l'hétérochromatine et est favorable au maintien de sa stabilité. Également, H3K9me1 sert de « mémoire » ou « persistance épigénétique » qui assure la réapposition ciblée de H3K9me3 lors de la restauration de la disponibilité en SAM (Haws et al., 2020). Un autre mécanisme mis en évidence en cas de stress métabolique concerne H3K4me3. Dans cette étude de 2018, Dai et collaborateurs ont mis en évidence qu'une modification du métabolisme de la méthionine induit un rétrécissement de la largeur des pics de H3K4me3 dans le génome, sans en perturber sa distribution (Dai et al., 2018). Ces deux études mettent en évidence les différences de stratégies permettant à une cellule de s'adapter en cas de stress métabolique. Également, un mécanisme similaire de sauvegarde de l'identité épigénétique pourrait exister dans les cellules ES Dnmt1-KO pour lesquelles il a été observé une réduction globale de la 5meC, à l'exception de quelques familles de séquences dont les séquences péricentromériques (Arand et al., 2012). Du fait, le maintien de H3K27me3 aux chromocentres pourrait être préférentiellement induit en cas d'inhibition de EZH2 au cours du développement précoce.

Également, il s'agit de considérer que les nucléosomes contiennent deux copies de l'histone H3. Notamment, nous ne savons pas comment évolue le statut de méthylation des deux H3K27 au cours du knock-down de EZH2. De plus, l'information portée par H3K27me3 ne nécessite pas la modification symétrique des deux H3 d'un même nucléosome (contrairement à H4K20me1 ; (Chen et al., 2011)). Enfin, une adaptation du temps de rétention des nucléosomes/histones marqué.e.s H3K27me3 pourrait favoriser la conservation de H3K27me3 à l'hétérochromatine péricentromérique. Notamment, il a été montré par Zee et collaborateurs que, pour une culture de cellule HeLa dont le temps de doublement est de 24h,

le $t_{1/2}$ pour H3K27me3 (soit le temps au bout duquel la moitié du « stock » initial de H3K27me3 aura été renouvelé à la chromatine) est de 3.1 jours - contre 1.3 pour H3 non modifiée et 1.3 jours pour H3K9me3 - (Zee et al., 2010). Ces données semblent indiquer que H3K27me3 est plus longuement retenue à la chromatine (et par extension, à la l'hétérochromatine péricentromérique) que H3K9me3 et pourrait en partie expliquer la faible diminution de l'intensité de H3K27me3 totale dans les embryons siEZH2 cultivés 72h en présence d'EPZ.

3. Quel(s) rôle(s) pour H3K27me3 aux chromocentres ?

Ainsi, il pourrait exister une grande variété de mécanismes permettant de maintenir l'effet de H3K27me3 et/ou H2AK119Ub à l'hétérochromatine péricentromérique au cours du développement précoce murin. Quel pourrait alors être la nécessité de maintenir des modifications épigénétiques associées à l'hétérochromatine facultative aux séquences satellites ?

Tout d'abord, une récente étude de Falk et collaborateurs (2019) a mis en évidence que l'hétérochromatine est le compartiment principal permettant l'organisation du génome dans l'espace nucléaire (Falk et al., 2019), ce qui inclut les chromocentres (Canat et al., 2020). Les chromocentres étant constitués principalement par l'agrégation des séquences satellites majeures murines, ceux-ci contiennent également d'autres séquences (LINES et ERV à hauteur de 20% environ ; (Ostromyshenskii et al., 2018)). Ensuite, il a été mis en évidence en cellules ES que les chromocentres interagissent avec d'autres régions du génome (Pericentromeric Associated Domains ou PADs), ce qui induit leur répression transcriptionnelle au cours de la différenciation (Wijchers et al., 2015). Ces PADs semblent être en partie tissu spécifique. Également, l'établissement des contacts chromatiniens semble être dépendant de leur profil épigénétique (Wijchers et al., 2016) c.-à-d. les séquences enrichies en H3K27me3 auront tendance à interagir entre elles - ce qui est observé pour les Polycomb bodies au cours du développement murin précoce (Du et al., 2020) -. Enfin, il a été montré que dans des ESCs cultivées en milieu 2i+VitC - ce qui entraîne une déméthylation importante du génome - certaines familles de séquences répétées dont les LINES et les MERVL acquièrent un enrichissement en H3K27me3 ou H3K27me3/H3K9me3 en cas de déficit de méthylation de

l'ADN, ce qui participe entre autres à leur relocalisation au niveau des chromocentres (Walter et al., 2016).

Ainsi, la présence de H3K27me3 aux chromocentres durant les stades précoces de développement pourrait favoriser la mise en place de l'organisation du génome dans l'espace nucléaire et servir d'ancre à l'établissement et au maintien de la répression transcriptionnelle pour certaines classes de séquences.

4. BEND3, le couteau suisse de l'hétérochromatine péricentromérique ?

BEND3 est une protéine méthyl-sensible qui avait précédemment été mise en évidence comme médiatrice du recrutement de PRC2 à l'hétérochromatine péricentromérique des cellules ES dépourvues de méthylation de l'ADN (Dnmt-TKO) ou de H3K9me3 (Suv39hdn) (Saksouk et al., 2014). Cependant, nos résultats montrent que la protéine BEND3 native n'est visible aux chromocentres qu'à partir du stade 8-cellules. BEND3 est ensuite maintenue aux chromocentres jusqu'à l'implantation, dans tous les lignages du blastocyste. L'apparition de signal BEND3 au stade 8-cellules est cohérent avec le profil d'expression des transcrits BEND3 qui montre que ces transcrits sont particulièrement abondants aux stades 2-/4-cellules alors que leur niveau est extrêmement faible avant la mise en route du génome (Annexe 1). Également, la dynamique de BEND3 est en accord avec la dynamique de déméthylation/re-méthylation de l'ADN observée au cours du développement précoce. En effet, BEND3 se trouve aux chromocentres à partir du stade 8-cellules, stade auquel la déméthylation active du génome paternel a été complétée par la déméthylation passive du génome maternel, aboutissant à un faible niveau de méthylation des séquences satellites majeures (Mayer et al., 2000; Oswald et al., 2000; Smith et al., 2012; Wang et al., 2014). Ces observations suggèrent donc que BEND3 n'est pas impliquée dans le recrutement initial de PRC2 pour l'apposition de H3K27me3 au stade zygote.

Également, BEND3 a été décrite comme participant à la répression transcriptionnelle (Sathyan et al., 2011), suggérant un rôle dans le contrôle de l'expression des séquences satellites majeures. Cependant, les expérimentations avec des siRNA dirigés contre les transcrits Bend3 n'ont permis de mettre en évidence ni un éventuel rôle dans le maintien de PRC2/H3K27me3 aux chromocentres, ni un rôle dans le contrôle de l'expression des séquences

péricentromériques au cours de la formation du jeune blastocyste. Il a notamment été reporté que la SUMOylation de BEND3 est importante dans l'induction de la répression transcriptionnelle. De plus, cette dernière serait médiée par l'induction de la condensation du locus cible. Chez les mutants BEND3 ne pouvant être SUMOylés (sur ses lysines 20 et 512), il n'est observé ni condensation du locus cible, ni répression de la transcription (Sathyan et al., 2011). L'anticorps que nous avons utilisé pour étudier la localisation de BEND3 au cours du développement précoce murin ne nous permet pas de discriminer BEND3 SUMOylée et BEND3 non modifiée. Ainsi, il serait intéressant d'explorer le statut de SUMOylation de BEND3, notamment dans le jeune blastocyste vs le blastocyste à E4.25. Puisqu'il n'existe pas (à ma connaissance) d'anticorps spécifique de la SUMOylation de BEND3, une approche par Western Blot permettrait de discriminer les formes SUMOylées et non modifiées de BEND3 - la masse moléculaire de BEND3 SUMOylée étant augmentée de +20% environ -. La non SUMOylation de BEND3 n'étant pas nécessaire à sa localisation, cette protéine non modifiée pourrait se localiser à l'hétérochromatine péricentromérique du jeune blastocyste sans induire la répression des séquences satellites majeures à ce stade, où l'expression de ces séquences concerne plus de 60% des cellules - ce qui serait cohérent avec les résultats obtenus pour les expériences de siRNA -. BEND3 pourrait ensuite être SUMOylée au fur et à mesure que l'embryon progresse vers l'implantation, induisant une forte diminution de l'expression des transcrits péricentromériques dans le blastocyste tardif.

Néanmoins, il est probable que BEND3 participe à d'autres fonctions nécessaires au développement précoce ainsi qu'au contrôle de l'état de pluripotence. Notamment, BEND3 interagit avec le complexe NuRD, complexe remodeleur de la chromatine et déacétylase qui participe à la régulation transcriptionnelle des domaines bivalents en cellules ES (Reynolds et al., 2012) et intervient positivement dans le maintien de l'état de pluripotence (Kaji et al., 2006; Zhu et al., 2009). Ces deux mêmes rôles ont été mis en évidence très récemment pour BEND3 (Kurniawan et al., 2022; Zhang et al., 2022). A souligner que dans ces études, le Knock-Down de BEND3 induit un défaut de recrutement de PRC2 à certains loci (Kurniawan et al., 2022), recrutement médié par NuRD/MBD3 (Zhang et al., 2022), induisant une baisse drastique de H3K27me3 aux séquences cibles. A noter que dans l'embryon, le KO de BEND3 est létal entre E3.5 et E6.5, confirmant son rôle essentiel dans les contrôles de la pluripotence et la répression des gènes de différenciation (Zhang et al., 2022).

Un autre rôle très peu décrit pour BEND3 serait son implication dans la bonne ségrégation des chromosomes en mitoses. En effet, il a été montré que BEND3 interagit avec PICH (Pitchai et al., 2017). PICH étant une protéine de la famille des remodeleurs de la chromatine SNF2 (SWI/SNF) qui est associée aux centromères et participant au contrôle de la bonne ségrégation des chromosomes au cours de la mitose (Baumann et al., 2007).

5. La triade BEND3, séquences satellites majeures et rDNA

BEND3 est une protéine à 4 BEN domaines, à même de médier des interactions ADN/protéine et protéine/protéine. Notamment, le domaine BD4 de BEND3 semble être responsable de sa liaison à l'ADN et plus précisément, aux compartiments d'hétérochromatine (Sathyan et al., 2011). La localisation de BEND3 se fait par la reconnaissance d'un motif de liaison qui a été identifié comme étant CCCACGCG (souligné, le motif cœur essentiel à sa reconnaissance par BEND3, (Zhang et al., 2022)). Il semblerait néanmoins qu'il existe une certaine flexibilité pour BEND3 à reconnaître des variations de ce motif (Zhang et al., 2022). Notamment, le motif CCACT est présent deux fois dans les séquences consensus des satellites majeures (Annexe 3), quatre fois si l'on considère les deux brins d'ADN. La reconnaissance possible par BEND3 de ce motif tronqué est cohérente avec l'apparente affinité de BEND3 pour les séquences péri-centromériques faiblement méthylées ((Saksouk et al., 2014) et nos résultats) - ce qui est le cas dès le stade PN2 pour le pro-noyau paternel où la 5hmcC est majoritaire (Iqbal et al., 2011) -. De façon intéressante, le motif reconnu par BEND3 est également présent au sein des séquences d'ADN ribosomique et la localisation de BEND3 avait déjà été montrée aux rDNA (Khan et al., 2015).

Bien que nous n'ayons pu mettre en évidence l'importance de BEND3 dans la répression des séquences satellites majeures dans le jeune blastocyste, un des rôles importants de BEND3 concerne l'organisation de l'hétérochromatine (Khan and Prasanth, 2015). L'organisation du génome dans l'espace nucléaire repose notamment sur la structuration des compartiments d'hétérochromatine. L'hétérochromatine se trouve majoritairement répartie entre deux localisations : soit associées aux lamines à la périphérie du noyau, soit sous la forme de clusters au sein des chromocentres (Canat et al., 2020). Un troisième compartiment semble également essentiel à l'organisation du génome : le nucléole (Guettg and Santoro, 2012). Notamment, les séquences de rDNA existent sous trois états principaux : activement transcrites et marquées

par des modifications épigénétiques associées à l'euchromatine, « poised » ou inactives et enrichies (entre autres) par H3K9me3 (Santoro et al., 2002). Par ailleurs, la présence d'une fraction des séquences de rDNA sous la forme d'hétérochromatine semble essentielle à l'organisation du nucléole (Peng and Karpen, 2007). De façon intéressante, la constitution de cette hétérochromatine à partir d'une fraction des rDNA repose sur l'action du complexe remodelleur NoRC et de sa sous unité Tip5 (Guete et al., 2010). En cellule différenciée, le Knock-Down de Tip5 entraîne une augmentation de l'acétylation des histones aux séquences promotrices des rDNA ; à l'inverse, sa surexpression y induit un enrichissement en H3K9me3 et H4K20me3 (Guete et al., 2010). La modulation du profil épigénétique des rDNA observée en fonction de l'abondance de Tip5 touche également les séquences péri-/centromériques (dans une moindre mesure), et en module leur transcription (Guete et al., 2010). Plus récemment, il a été montré que l'action de NoRC/Tip5 sur le profil épigénétique et la transcription des rDNA est médiée par BEND3 (Khan et al., 2015). Également, le complexe NoRC participe au maintien de la stabilité des télomères et centromères (Postepska-Igielska et al., 2013).

Dans les ESCs mutantes Dnmt-TKO ou Suv39hdn, NuRD - en association avec BEND3 - est responsable du recrutement de PRC2 aux séquences péri-centromériques hypométhylées (Saksouk et al., 2014). Également, le complexe remodelleur NuRD est impliqué dans l'établissement d'un état chromatinien intermédiaire : l'état « poised », qui est caractérisé par une chromatine ouverte enrichie conjointement en H3K4me3 et H3K27me3, ce qui a pour effet d'empêcher la transcription des séquences des rDNA (Wenbing Xie et al., 2012). Ces données suggèrent que BEND3 pourrait intervenir aux rDNA pour établir un domaine « poised » à ces séquences.

Enfin, le dernier partenaire de BEND3 évoqué ici, PICH, a récemment été mis en évidence comme impliqué dans la résolution de la ségrégation des rDNA au moment de la mitose (Nielsen and Hickson, 2016).

Ainsi, ces données suggèrent que BEND3 pourrait être responsable de la régulation conjointe des séquences satellites majeures et des rDNA.

A la suite de la fécondation, les nucléoles ne sont pas encore formés dans l'embryon mais existent sous une forme immature et non fonctionnelle, les NPBs - Nuclear Precursor Bodies - (Beaujean et al., 2010). A la fin du stade 1-cellules, la majorité des séquences

péricentromériques ainsi que des séquences rDNA sont retrouvées à la périphérie de ces NPBs (Aguirre-Lavin et al., 2012). Cette association entre séquences satellites majeures et rDNA est maintenue jusqu'au stade 2-cellules et la formation des chromocentres (Aguirre-Lavin et al., 2012; Probst et al., 2010). Plus récemment, il a été montré que la transcription des rDNA est nécessaire à leur organisation 3D et que perturber cette transcription (par inhibition de la RNA pol I) entraîne non seulement une désorganisation des rDNA mais également une altération de la morphologie des chromocentres et une baisse de la transcription des séquences satellites majeures dans les embryons 4-cellules (Chebrou et al., 2022). Ainsi, il semblerait que la régulation précoce des séquences satellites majeures soit couplée à celle des rDNA au cours des premiers clivages.

Enfin, BEND3 (Kurniawan et al., 2022) et l'organisation différentielle du nucléole en cellules ES (Gupta and Santoro, 2020) ont un rôle dans le maintien de l'état de pluripotence et le nucléole des cellules ES présente des caractéristiques proches de l'hétérochromatine péricentromérique à savoir une structure globalement relaxée (Novo et al., 2016). Également, nous avons montré que les cellules ES en 2i/LIF présentent un enrichissement en BEND3 - non couplé à l'accumulation de H3K27me3 aux chromocentres -.

On peut émettre l'hypothèse que BEND3 pourrait soit « orchestrer » le maintien de la pluripotence en co-régulant les rDNA et les séquences péricentromériques ; ou BEND3 s'accumule aux chromocentres de l'embryon précoce en prévision de l'avènement de la différenciation et la nécessité de réguler l'expression génique et la condensation d'une partie des rDNA et des clusters d'hétérochromatine péricentromérique.

III. Conclusion

Ce projet de thèse a principalement mis en évidence la plasticité et la robustesse des régulations épigénétiques qui marquent le développement précoce. Bien que la structure et la composition des domaines péri-/centromériques diffèrent entre espèces murine et bovine, nous avons mis en évidence des similitudes quant aux caractéristiques épigénétiques de ces séquences satellites au cours des premières étapes du développement embryonnaire (Annexe 4). Cette comparaison entre espèces est d'autant plus essentielle que certaines étapes du développement précoce murin lui sont spécifiques et ne reflètent pas nécessairement la

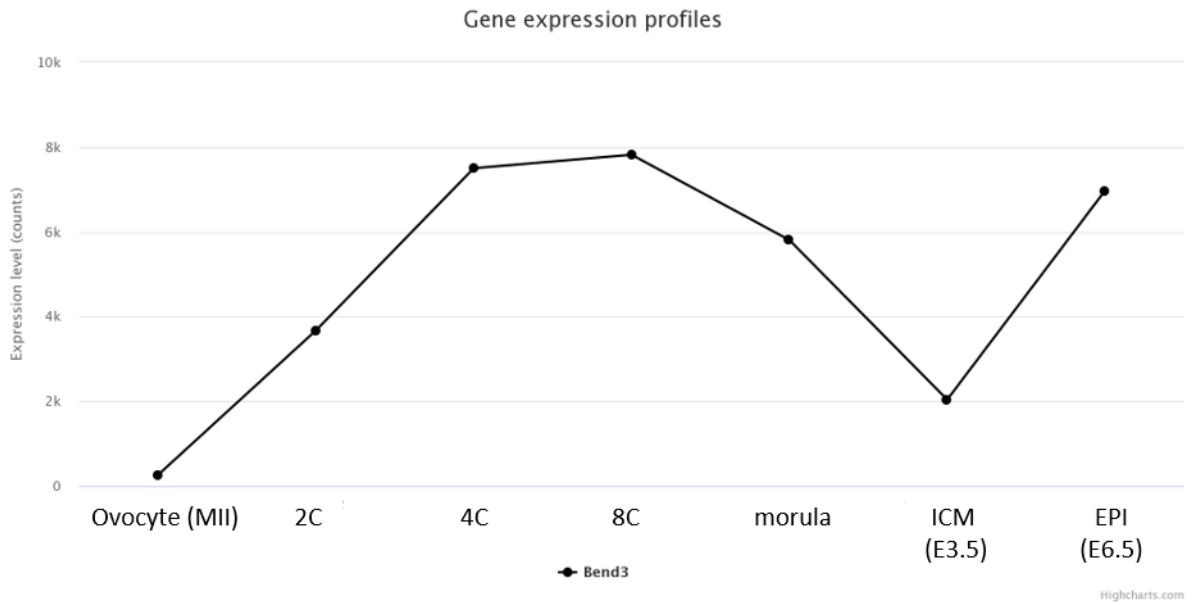
dynamique de développement des mammifères non rongeurs. Également, la comparaison entre l'embryon et ses dérivés *in vitro* a mis en évidence que certaines régulations épigénétiques peuvent être altérées au cours de la stabilisation de populations cellulaires qui n'existent que de façon transitoire au cours du développement.

Ce projet s'est principalement centré sur l'étude de la dynamique de H3K27me3 au cours du développement précoce. Néanmoins, un large panel d'autres modifications épigénétiques ont été mises en évidence à l'hétérochromatine péricentromérique (H4K20meX, H3K27me1, H3K36me3, H3K64me3...), révélant la complexité des interactions épigénétiques à même de réguler de telles séquences. Également, nous avons porté notre intérêt sur la protéine BEND3 quant à la régulation des séquences satellites majeures. Les études récentes du rôle de BEND3 ont mis en évidence que cette protéine est impliquée dans une grande variété de processus cellulaires (mitose, régulation de l'expression des rDNA) et développementaux (contrôle de la transcription lors de la différenciation, maintien de la pluripotence). Il serait donc intéressant d'étudier plus avant la dynamique de son interactome au cours du développement précoce murin, ainsi que le profil épigénétiques des chromocentres dans les embryons BEND3 KO.

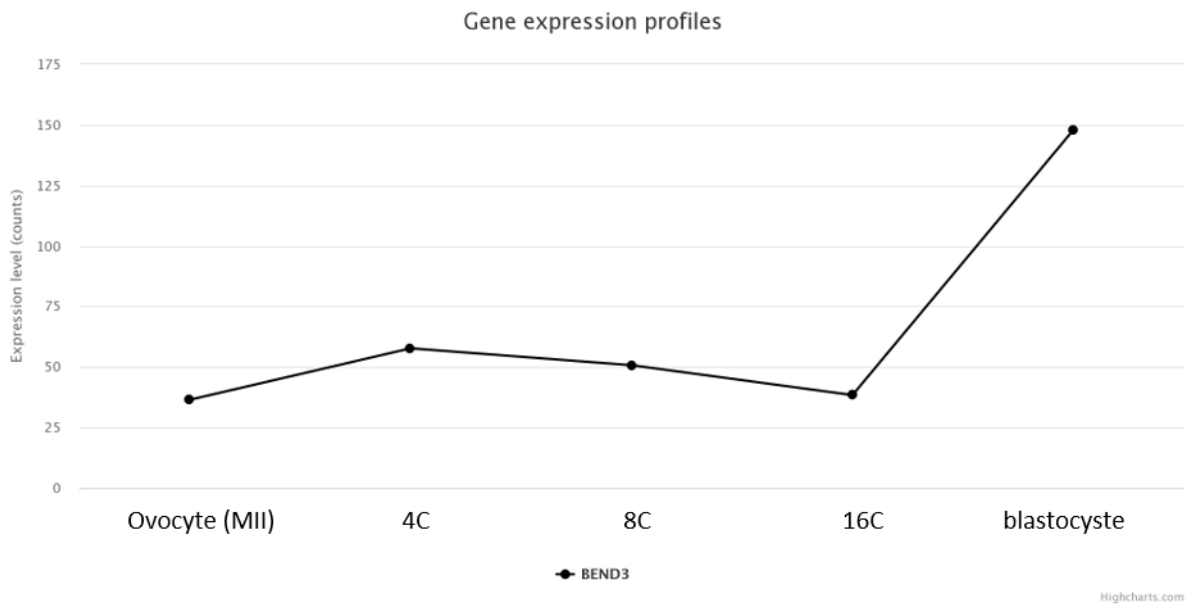
Enfin, il serait intéressant de poursuivre ce projet en caractérisant plus avant le niveau de compaction et la fluidité chromatinienne des chromocentres au cours du développement précoce, ainsi que le rôle éventuel des transcrits des séquences satellites majeures sur ces deux aspects. Enfin, l'utilisation d'outils d'édition de l'épigénome en cellules ES visant à moduler la composition des chromocentres en différentes PTMs d'histone pourrait donner quelques pistes pour élucider le rôle de H3K27me3 aux chromocentres.

ANNEXES

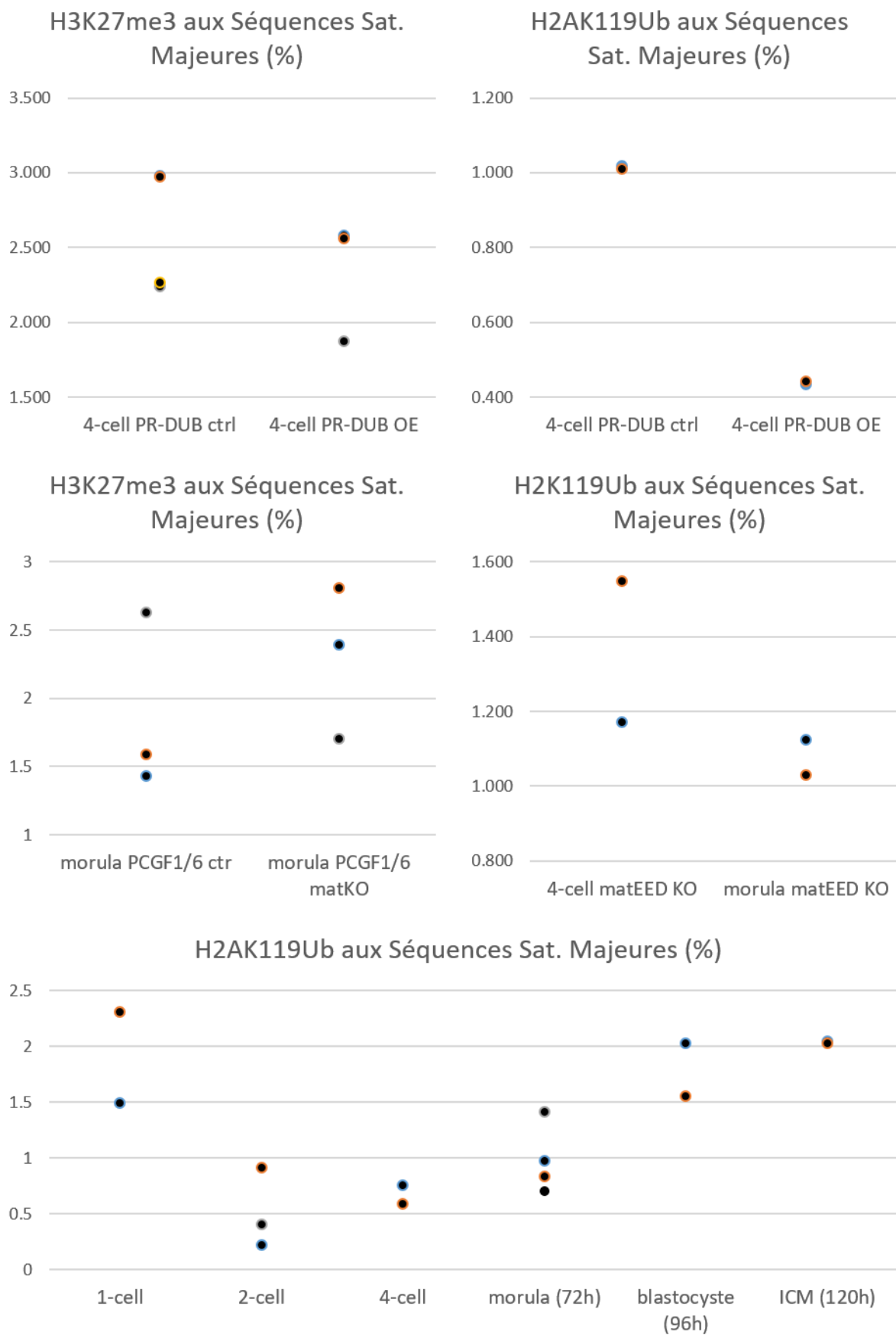
A



B



Annexe 1 : Profils d'expression de BEND3. (A) au cours du développement murin et (B) au cours du développement bovin. Analyses faites par Luc Jouneau à partir de données publiées ((Wang et al., 2014) pour le murin et (Graf et al., 2014) pour le bovin).



Annexe 2 : Enrichissement en H3K27me3 ou H2AK119Ub aux séquences satellites majeures. Analyses menées par Hendrik Marks à partir de données publiées dans (Mei et al., 2021 et Chen et al., 2021).

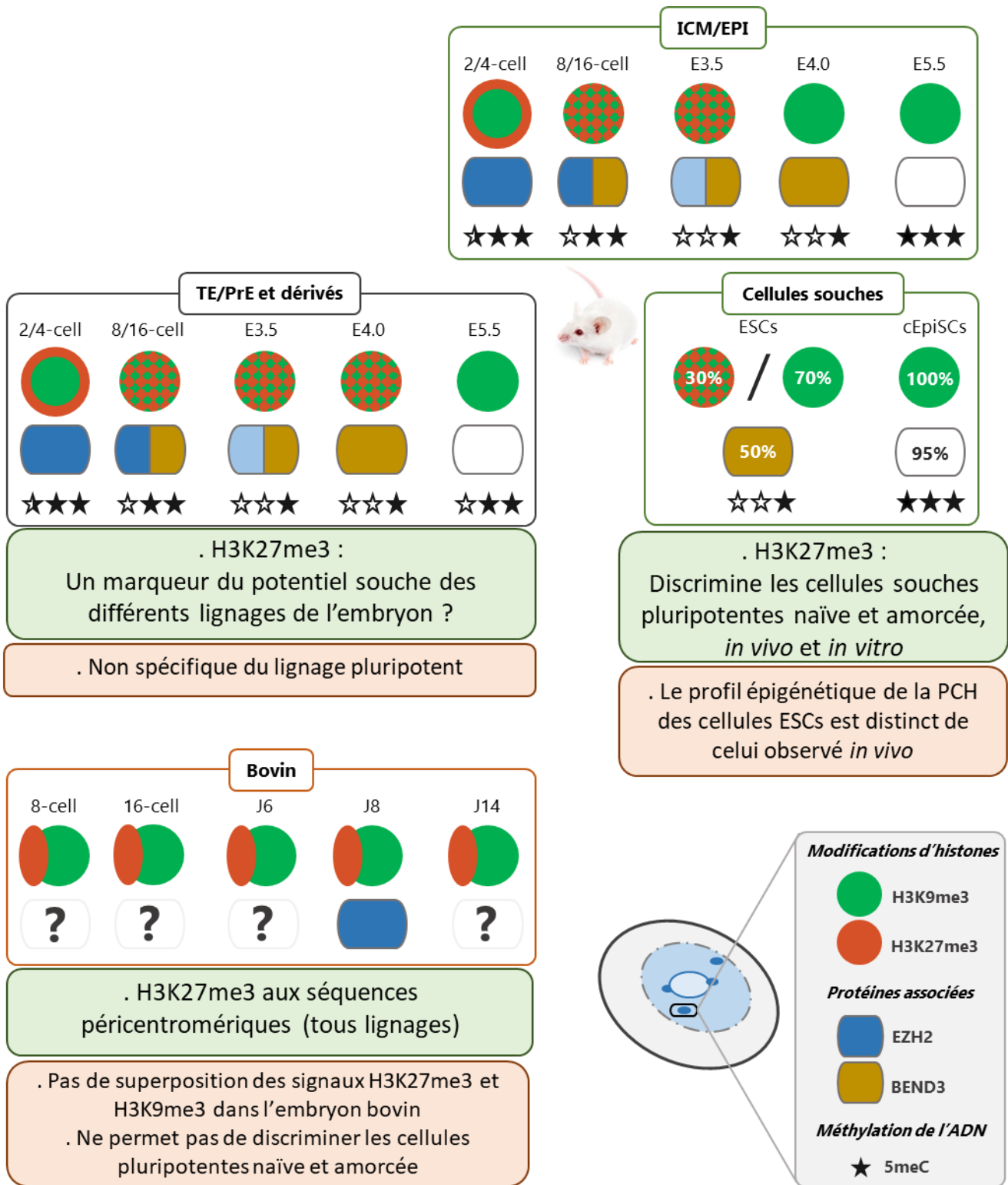
Séquence consensus des satellites majeures - 234pb - V00846.1

GGACCTGGAATATGG **CG**AGAAAAGTAAAATCAG **CG**GAAAATGAGAAATACACACTTTAGGAC **CG**TGA
AATATGG **CG**AGGAAAAGTAAAAG **GTGG**AAAATTAGAAATGT **CCAC**TGTAGGAC **CG****GTGG**AATATGG
CAAGAAAAGTAAAATCATGGAAAATGAGAAACAT **CCAC**TTGAC **CG**ACTGAAAATGAC **CG**AATCAC
TAAAAAC **CG**TGAAAGAATGAGAAATGCACACTGAA

Annexe 3 : Séquence consensus des séquences satellites majeures et motifs remarquables.

En vert : le motif tronqué potentiellement reconnu par BEND3 (en bleu la séquence complémentaire).

En rouge : les sites possibles de méthylation de l'ADN.



Annexe 4 : Résumé comparatif des caractéristiques épigénétiques des chromocentres (hétérochromatine péri-centromérique) au cours des développements précoces murins et bovins, et dans des modèles cellulaires des cellules pluripotentes murines (ESCs et EpiSCs). Cette représentation schématise les données précédemment connues et acquises au cours de ce projet concernant la présence des modifications d'histones H3K27me3 (rouge) et H3K9me3 (vert) aux chromocentres, la présence des protéines EZH2 (bleu) et BEND3 (jaune) ainsi que des niveaux de méthylation (étoiles noires) des séquences satellites majeures murines - données de la littérature -.

BIBLIOGRAPHIE

- Adenot, P.G., Szöllösi, M.S., Geze, M., Renard, J.P., Debey, P., 1991. Dynamics of paternal chromatin changes in live one-cell mouse embryo after natural fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 28, 23–34. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080280105>
- Agger, K., Cloos, P.A.C., Christensen, J., Pasini, D., Rose, S., Rappsilber, J., Issaeva, I., Canaani, E., Salcini, A.E., Helin, K., 2007. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* 449, 731–734. <https://doi.org/10.1038/nature06145>
- Aguirre-Lavin, T., Adenot, P., Bonnet-Garnier, A., Lehmann, G., Fleurot, R., Boulesteix, C., Debey, P., Beaujean, N., 2012. 3D-FISH analysis of embryonic nuclei in mouse highlights several abrupt changes of nuclear organization during preimplantation development. *BMC Dev. Biol.* 12, 30. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-12-30>
- Ahmad, K., Henikoff, S., 2002. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* 9, 1191–1200. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00542-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00542-7)
- Ahmed, K., Deghani, H., Rugg-Gunn, P., Fussner, E., Rossant, J., Bazett-Jones, D.P., 2010. Global Chromatin Architecture Reflects Pluripotency and Lineage Commitment in the Early Mouse Embryo. *PLoS ONE* 5, e10531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010531>
- Amouroux, R., Nashun, B., Shirane, K., Nakagawa, S., Hill, P.W., D'Souza, Z., Nakayama, M., Matsuda, M., Turp, A., Ndjetehe, E., Encheva, V., Kudo, N.R., Koseki, H., Sasaki, H., Hajkova, P., 2016. De novo DNA methylation drives 5hmC accumulation in mouse zygotes. *Nat. Cell Biol.* 18, 225–233. <https://doi.org/10.1038/ncb3296>
- Anderson, K.G.V., Hamilton, W.B., Roske, F.V., Azad, A., Knudsen, T.E., Canham, M.A., Forrester, L.M., Brickman, J.M., 2017. Insulin fine-tunes self-renewal pathways governing naive pluripotency and extra-embryonic endoderm. *Nat. Cell Biol.* 19, 1164–1177. <https://doi.org/10.1038/ncb3617>
- Andronov, L., Ouararhni, K., Stoll, I., Klaholz, B.P., Hamiche, A., 2019. CENP-A nucleosome clusters form rosette-like structures around HJURP during G1. *Nat. Commun.* 10, 4436. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12383-3>
- Arand, J., Spieler, D., Karius, T., Branco, M.R., Meilinger, D., Meissner, A., Jenuwein, T., Xu, G., Leonhardt, H., Wolf, V., Walter, J., 2012. In Vivo Control of CpG and Non-CpG DNA Methylation by DNA Methyltransferases. *PLOS Genet.* 8, e1002750. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002750>
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., Moudrianakis, E.N., 1991. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 10148–10152. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10148>

- Arents, G., Moudrianakis, E.N., 1993. Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10489–10493. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10489>
- Arnold, P.R., Wells, A.D., Li, X.C., 2019. Diversity and Emerging Roles of Enhancer RNA in Regulation of Gene Expression and Cell Fate. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 377. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00377>
- Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jørgensen, H.F., John, R.M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merckenschlager, M., Fisher, A.G., 2006. Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* 8, 532–538. <https://doi.org/10.1038/ncb1403>
- Bachman, M., Uribe-Lewis, S., Yang, X., Williams, M., Murrell, A., Balasubramanian, S., 2014. 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nat. Chem.* 6, 1049–1055. <https://doi.org/10.1038/nchem.2064>
- Bannister, A.J., Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Bannister, A.J., Schneider, R., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., Kouzarides, T., 2005. Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *J. Biol. Chem.* 280, 17732–17736. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500796200>
- Bär, C., Chatterjee, S., Thum, T., 2016. Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Pathology, Diagnosis, and Therapy. *Circulation* 134, 1484–1499. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023686>
- Baumann, C., Körner, R., Hofmann, K., Nigg, E.A., 2007. PICH, a Centromere-Associated SNF2 Family ATPase, Is Regulated by Plk1 and Required for the Spindle Checkpoint. *Cell* 128, 101–114. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.041>
- Beacon, T.H., Delcuve, G.P., López, C., Nardocci, G., Kovalchuk, I., van Wijnen, A.J., Davie, J.R., 2021. The dynamic broad epigenetic (H3K4me3, H3K27ac) domain as a mark of essential genes. *Clin. Epigenetics* 13, 138. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01126-1>
- Beaujean, N., Mason, K., Bonnet-Garnier, A., Salvaing, J., Debey, P., 2010. Organisation du génome embryonnaire après la fécondation chez les mammifères. *Biol. Aujourd'hui* 204, 205–213. <https://doi.org/10.1051/jbio/2010018>
- Becker, P.B., Workman, J.L., 2013. Nucleosome Remodeling and Epigenetics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a017905. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017905>
- Berg, D.K., Smith, C.S., Pearton, D.J., Wells, D.N., Broadhurst, R., Donnison, M., Pfeffer, P.L., 2011. Trophectoderm lineage determination in cattle. *Dev. Cell* 20, 244–255. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.003>
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L., Lander, E.S., 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>
- Bessonnard, S., De Mot, L., Gonze, D., Barriol, M., Dennis, C., Goldbeter, A., Dupont, G., Chazaud, C., 2014. Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell

- mass through a tristable regulatory network. *Development* 141, 3637–3648. <https://doi.org/10.1242/dev.109678>
- Bian, C., Xu, C., Ruan, J., Lee, K.K., Burke, T.L., Tempel, W., Barsyte, D., Li, J., Wu, M., Zhou, B.O., Fleharty, B.E., Paulson, A., Allali-Hassani, A., Zhou, J.-Q., Mer, G., Grant, P.A., Workman, J.L., Zang, J., Min, J., 2011. Sgf29 binds histone H3K4me2/3 and is required for SAGA complex recruitment and histone H3 acetylation. *EMBO J.* 30, 2829–2842. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.193>
- Black, B.E., Brock, M.A., Bédard, S., Woods, V.L., Cleveland, D.W., 2007. An epigenetic mark generated by the incorporation of CENP-A into centromeric nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5008–5013. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700390104>
- Blackledge, N.P., Klose, R.J., 2021. The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 815–833. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00398-y>
- Bogliotti, Y.S., Wu, J., Vilarino, M., Okamura, D., Soto, D.A., Zhong, C., Sakurai, M., Sampaio, R.V., Suzuki, K., Izpisua Belmonte, J.C., Ross, P.J., 2018. Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 2090–2095. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716161115>
- Boroviak, T., Loos, R., Bertone, P., Smith, A., Nichols, J., 2014. The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat. Cell Biol.* 16, 513–525. <https://doi.org/10.1038/ncb2965>
- Bourc'his, D., Le Bourhis, D., Patin, D., Niveleau, A., Comizzoli, P., Renard, J.-P., Viegas-Péquignot, E., 2001. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr. Biol.* 11, 1542–1546. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00480-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00480-8)
- Breton, A., LE Bourhis, D., Audouard, C., Vignon, X., Lelièvre, J.-M., 2010. Nuclear profiles of H3 histones trimethylated on Lys27 in bovine (*Bos taurus*) embryos obtained after in vitro fertilization or somatic cell nuclear transfer. *J. Reprod. Dev.* 56, 379–388. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-182a>
- Brons, I.G.M., Smithers, L.E., Trotter, M.W.B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., Vallier, L., 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448, 191–195. <https://doi.org/10.1038/nature05950>
- Bulut-Karslioglu, A., Perrera, V., Scaranaro, M., de la Rosa-Velazquez, I.A., van de Nobelen, S., Shukeir, N., Popow, J., Gerle, B., Opravil, S., Pagani, M., Meidhof, S., Brabletz, T., Manke, T., Lachner, M., Jenuwein, T., 2012. A transcription factor-based mechanism for mouse heterochromatin formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1023–1030. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2382>
- Burton, A., Brochard, V., Galan, C., Ruiz-Morales, E.R., Rovira, Q., Rodriguez-Terrones, D., Kruse, K., Le Gras, S., Udayakumar, V.S., Chin, H.G., Eid, A., Liu, X., Wang, C., Gao, S., Pradhan, S., Vaquerizas, J.M., Beaujean, N., Jenuwein, T., Torres-Padilla, M.-E., 2020. Heterochromatin establishment during early mammalian development is regulated by pericentromeric RNA and characterized by non-repressive H3K9me3. *Nat. Cell Biol.* 22, 767–778. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0536-6>

- Burton, A., Torres-Padilla, M.-E., 2010. Epigenetic reprogramming and development: a unique heterochromatin organization in the preimplantation mouse embryo. *Brief. Funct. Genomics* 9, 444–454. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elq027>
- Canat, A., Veillet, A., Bonnet, A., Therizols, P., 2020. Genome anchoring to nuclear landmarks drives functional compartmentalization of the nuclear space. *Brief. Funct. Genomics* 19, 101–110. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elz034>
- Cao, Q., Wang, X., Zhao, M., Yang, R., Malik, R., Qiao, Y., Poliakov, A., Yocum, A.K., Li, Y., Chen, W., Cao, X., Jiang, X., Dahiya, A., Harris, C., Feng, F.Y., Kalantry, S., Qin, Z.S., Dhanasekaran, S.M., Chinnaiyan, A.M., 2014. The central role of EED in the orchestration of polycomb group complexes. *Nat. Commun.* 5, 3127. <https://doi.org/10.1038/ncomms4127>
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., Zhang, Y., 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298, 1039–1043. <https://doi.org/10.1126/science.1076997>
- Cao, R., Zhang, Y., 2004. SUZ12 Is Required for Both the Histone Methyltransferase Activity and the Silencing Function of the EED-EZH2 Complex. *Mol. Cell* 15, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.020>
- Casanova, M., Pasternak, M., El Marjou, F., Le Baccon, P., Probst, A.V., Almouzni, G., 2013. Heterochromatin reorganization during early mouse development requires a single-stranded noncoding transcript. *Cell Rep.* 4, 1156–1167. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.015>
- Chang, L.-H., Ghosh, S., Papale, A., Miranda, M., Piras, V., Degrouard, J., Poncelet, M., Lecouivre, N., Bloyer, S., Leforestier, A., Holcman, D., Noordermeer, D., 2021. A complex CTCF binding code defines TAD boundary structure and function. <https://doi.org/10.1101/2021.04.15.440007>
- Chaves, R., Adegas, F., Heslop-Harrison, J.S., Guedes-Pinto, H., Wienberg, J., 2003. Complex satellite DNA reshuffling in the polymorphic t(1;29) Robertsonian translocation and evolutionarily derived chromosomes in cattle. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 11, 641–648. <https://doi.org/10.1023/a:1025952507959>
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., 2016. Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development* 143, 1063–1074. <https://doi.org/10.1242/dev.128314>
- Chebrou, M., Koné, M.C., Jan, H.U., Cournot, M., Letheule, M., Fleurot, R., Aguirre-Lavin, T., Peynot, N., Jouneau, A., Beaujean, N., Bonnet-Garnier, A., 2022. Transcription of rRNA in early mouse embryos promotes chromatin reorganization and expression of major satellite repeats. *J. Cell Sci.* 135, jcs258798. <https://doi.org/10.1242/jcs.258798>
- Chen, X., Xiong, J., Xu, M., Chen, S., Zhu, B., 2011. Symmetrical modification within a nucleosome is not required globally for histone lysine methylation. *EMBO Rep.* 12, 244–251. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.6>
- Chen, Z., Djekidel, M.N., Zhang, Y., 2021. Distinct dynamics and functions of H2AK119ub1 and H3K27me3 in mouse preimplantation embryos. *Nat. Genet.* 53, 551–563. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00821-2>

- Cheng, X., Blumenthal, R.M., 2008. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Struct. Lond. Engl.* 1993 16, 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.01.004>
- Clapier, C.R., Iwasa, J., Cairns, B.R., Peterson, C.L., 2017. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 407–422. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.26>
- Collombet, S., Ranisavljevic, N., Nagano, T., Varnai, C., Shisode, T., Leung, W., Piolot, T., Galupa, R., Borensztein, M., Servant, N., Fraser, P., Ancelin, K., Heard, E., 2020. Parental-to-embryo switch of chromosome organization in early embryogenesis. *Nature* 580, 142–146. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2125-z>
- Condic, M.L., 2014. Totipotency: What It Is and What It Is Not. *Stem Cells Dev.* 23, 796–812. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0364>
- Cooper, S., Dienstbier, M., Hassan, R., Schermelleh, L., Sharif, J., Blackledge, N.P., De Marco, V., Elderkin, S., Koseki, H., Klose, R., Heger, A., Brockdorff, N., 2014. Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Rep.* 7, 1456–1470. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.012>
- Cooper, S., Grijzenhout, A., Underwood, E., Ancelin, K., Zhang, T., Nesterova, T.B., Anil-Kirmizitas, B., Bassett, A., Kooistra, S.M., Agger, K., Helin, K., Heard, E., Brockdorff, N., 2016. Jarid2 binds mono-ubiquitylated H2A lysine 119 to mediate crosstalk between Polycomb complexes PRC1 and PRC2. *Nat. Commun.* 7, 13661. <https://doi.org/10.1038/ncomms13661>
- Cremer, T., Cremer, C., 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* 2, 292–301. <https://doi.org/10.1038/35066075>
- Creyghton, M.P., Cheng, A.W., Welstead, G.G., Kooistra, T., Carey, B.W., Steine, E.J., Hanna, J., Lodato, M.A., Frampton, G.M., Sharp, P.A., Boyer, L.A., Young, R.A., Jaenisch, R., 2010. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 21931–21936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016071107>
- D. Bascom, G., Schlick, T., 2018. 5 - Mesoscale Modeling of Chromatin Fibers, in: Lavelle, C., Victor, J.-M. (Eds.), *Nuclear Architecture and Dynamics, Translational Epigenetics*. Academic Press, Boston, pp. 123–147. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803480-4.00005-3>
- Dahl, J.A., Jung, I., Aanes, H., Greggains, G.D., Manaf, A., Lerdrup, M., Li, G., Kuan, S., Li, B., Lee, A.Y., Preissl, S., Jermstad, I., Haugen, M.H., Suganthan, R., Bjørås, M., Hansen, K., Dalen, K.T., Fedorcsak, P., Ren, B., Klungland, A., 2016. Broad histone H3K4me3 domains in mouse oocytes modulate maternal-to-zygotic transition. *Nature* 537, 548–552. <https://doi.org/10.1038/nature19360>
- Dai, Z., Mentch, S.J., Gao, X., Nichenametla, S.N., Locasale, J.W., 2018. Methionine metabolism influences genomic architecture and gene expression through H3K4me3 peak width. *Nat. Commun.* 9, 1955. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04426-y>

- Daury, L., Chailleux, C., Bonvallet, J., Trouche, D., 2006. Histone H3.3 deposition at E2F-regulated genes is linked to transcription. *EMBO Rep.* 7, 66–71. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400561>
- De Paepe, C., Cauffman, G., Verloes, A., Sterckx, J., Devroey, P., Tournaye, H., Liebaers, I., Van de Velde, H., 2013. Human trophectoderm cells are not yet committed. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 28, 740–749. <https://doi.org/10.1093/humrep/des432>
- Deaton, A.M., Bird, A., 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010–1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>
- Ding, L., Paszkowski-Rogacz, M., Winzi, M., Chakraborty, D., Theis, M., Singh, S., Ciotta, G., Poser, I., Roguev, A., Chu, W.K., Choudhary, C., Mann, M., Stewart, A.F., Krogan, N., Buchholz, F., 2015. Systems Analyses Reveal Shared and Diverse Attributes of Oct4 Regulation in Pluripotent Cells. *Cell Syst.* 1, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.08.002>
- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., Ren, B., 2012. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485, 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature11082>
- Djupedal, I., Ekwall, K., 2009. Epigenetics: heterochromatin meets RNAi. *Cell Res.* 19, 282–295. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.13>
- Dobson, A.T., Raja, R., Abeyta, M.J., Taylor, T., Shen, S., Haqq, C., Pera, R.A.R., 2004. The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1461–1470. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh157>
- Dong, C., Fischer, L.A., Theunissen, T.W., 2019. Recent insights into the naïve state of human pluripotency and its applications. *Exp. Cell Res.* 385, 111645. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111645>
- Dorigo, B., Schalch, T., Bystricky, K., Richmond, T.J., 2003. Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J. Mol. Biol.* 327, 85–96. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00025-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00025-1)
- Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., Hamiche, A., 2010. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev.* 24, 1253–1265. <https://doi.org/10.1101/gad.566910>
- Du, Z., Zheng, H., Huang, B., Ma, R., Wu, J., Zhang, Xianglin, He, J., Xiang, Y., Wang, Q., Li, Y., Ma, J., Zhang, Xu, Zhang, K., Wang, Y., Zhang, M.Q., Gao, J., Dixon, J.R., Wang, X., Zeng, J., Xie, W., 2017. Allelic reprogramming of 3D chromatin architecture during early mammalian development. *Nature* 547, 232–235. <https://doi.org/10.1038/nature23263>
- Du, Z., Zheng, H., Kawamura, Y.K., Zhang, K., Gassler, J., Powell, S., Xu, Q., Lin, Z., Xu, K., Zhou, Q., Ozonov, E.A., Véron, N., Huang, B., Li, L., Yu, G., Liu, L., Au Yeung, W.K., Wang, P., Chang, L., Wang, Q., He, A., Sun, Y., Na, J., Sun, Q., Sasaki, H., Tachibana, K., Peters, A.H.F.M., Xie, W., 2020. Polycomb Group Proteins Regulate Chromatin Architecture in Mouse Oocytes and Early Embryos. *Mol. Cell* 77, 825–839.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.11.011>

- Erkek, S., Hisano, M., Liang, C.-Y., Gill, M., Murr, R., Dieker, J., Schübeler, D., Vlag, J. van der, Stadler, M.B., Peters, A.H.F.M., 2013. Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 868–875. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2599>
- Escudeiro, Ana, Adegas, F., Robinson, T.J., Heslop-Harrison, J.S., Chaves, R., 2019. Conservation, Divergence, and Functions of Centromeric Satellite DNA Families in the Bovidae. *Genome Biol. Evol.* 11, 1152–1165. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz061>
- Escudeiro, A., Ferreira, D., Mendes-da-Silva, A., Heslop-Harrison, J.S., Adegas, F., Chaves, R., 2019. Bovine satellite DNAs – a history of the evolution of complexity and its impact in the Bovidae family. *Eur. Zool. J.* 86, 20–37. <https://doi.org/10.1080/24750263.2018.1558294>
- Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Falk, M., Feodorova, Y., Naumova, N., Imakaev, M., Lajoie, B.R., Leonhardt, H., Joffe, B., Dekker, J., Fudenberg, G., Solovei, I., Mirny, L.A., 2019. Heterochromatin drives compartmentalization of inverted and conventional nuclei. *Nature* 570, 395–399. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1275-3>
- Falkenberg, K.J., Johnstone, R.W., 2014. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 673–691. <https://doi.org/10.1038/nrd4360>
- Finch, J.T., Klug, A., 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 1897–1901. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.6.1897>
- Fogarty, N.M.E., McCarthy, A., Snijders, K.E., Powell, B.E., Kubikova, N., Blakeley, P., Lea, R., Elder, K., Wamaitha, S.E., Kim, D., Maciulyte, V., Kleinjung, J., Kim, J.-S., Wells, D., Vallier, L., Bertero, A., Turner, J.M.A., Niakan, K.K., 2017. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature* 550, 67–73. <https://doi.org/10.1038/nature24033>
- Frankenberg, S., Gerbe, F., Bessonard, S., Belville, C., Pouchin, P., Bardot, O., Chazaud, C., 2011. Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. *Dev. Cell* 21, 1005–1013. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.019>
- Fyodorov, D.V., Zhou, B.-R., Skoultchi, A.I., Bai, Y., 2018. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 192–206. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.94>
- Gates, L.A., Foulds, C.E., O'Malley, B.W., 2017. Histone Marks in the “Driver’s Seat”: Functional Roles in Steering the Transcription Cycle. *Trends Biochem. Sci.* 42, 977–989. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.10.004>
- Goldberg, A.D., Banaszynski, L.A., Noh, K.-M., Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., Wen, D., Chappier, A., DeKelver, R.C., Miller, J.C., Lee, Y.-L., Boydston, E.A., Holmes, M.C., Gregory, P.D., Grelly, J.M., Rafii, S., Yang, C., Scambler, P.J., Garrick, D., Gibbons, R.J., Higgs, D.R., Cristea, I.M., Urnov, F.D., Zheng, D., Allis, C.D., 2010. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* 140, 678–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.003>

- Graf, A., Krebs, S., Zakhartchenko, V., Schwalb, B., Blum, H., Wolf, E., 2014. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 4139–4144. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321569111>
- Greenberg, M.V.C., 2021. Get Out and Stay Out: New Insights Into DNA Methylation Reprogramming in Mammals. *Front. Cell Dev. Biol.* 8.
- Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C., Almouzni, G., 2004. Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J. Cell Biol.* 166, 493–505. <https://doi.org/10.1083/jcb.200403109>
- Guettg, C., Lienemann, P., Sirri, V., Grummt, I., Hernandez-Verdun, D., Hottiger, M.O., Fussenegger, M., Santoro, R., 2010. The NoRC complex mediates the heterochromatin formation and stability of silent rRNA genes and centromeric repeats. *EMBO J.* 29, 2135–2146. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.17>
- Guettg, C., Santoro, R., 2012. Formation of nuclear heterochromatin: the nucleolar point of view. *Epigenetics* 7, 811–814. <https://doi.org/10.4161/epi.21072>
- Gupta, S., Santoro, R., 2020. Regulation and Roles of the Nucleolus in Embryonic Stem Cells: From Ribosome Biogenesis to Genome Organization. *Stem Cell Rep.* 15, 1206–1219. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.08.012>
- Harkness, L., Chen, X., Gillard, M., Gray, P.P., Davies, A.M., 2019. Media composition modulates human embryonic stem cell morphology and may influence preferential lineage differentiation potential. *PLoS ONE* 14, e0213678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213678>
- Harp, J.M., Hanson, B.L., Timm, D.E., Bunick, G.J., 2000. Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56, 1513–1534. <https://doi.org/10.1107/s0907444900011847>
- Haws, S.A., Yu, D., Ye, C., Wille, C.K., Nguyen, L.C., Krautkramer, K.A., Tomasiewicz, J.L., Yang, S.E., Miller, B.R., Liu, W.H., Igarashi, K., Sridharan, R., Tu, B.P., Cryns, V.L., Lamming, D.W., Denu, J.M., 2020. Methyl-Metabolite Depletion Elicits Adaptive Responses to Support Heterochromatin Stability and Epigenetic Persistence. *Mol. Cell* 78, 210–223.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.004>
- Herranz, G., 2015. The timing of monozygotic twinning: a criticism of the common model. *Zygote* 23, 27–40. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000257>
- Herrera-Delgado, E., Maître, J.-L., 2021. A theoretical understanding of mammalian preimplantation development. *Cells Dev.* 168, 203752. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203752>
- Hoek, M., Stillman, B., 2003. Chromatin assembly factor 1 is essential and couples chromatin assembly to DNA replication in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12183–12188. <https://doi.org/10.1073/pnas.1635158100>
- Howe, F.S., Fischl, H., Murray, S.C., Mellor, J., 2017. Is H3K4me3 instructive for transcription activation? *BioEssays* 39, e201600095. <https://doi.org/10.1002/bies.201600095>
- Huang, X., Han, X., Uyunbilig, B., Zhang, M., Duo, S., Zuo, Y., Zhao, Y., Yun, T., Tai, D., Wang, C., Li, J., Li, X., Li, R., 2014. Establishment of bovine trophoblast stem-like cells from in

- in vitro-produced blastocyst-stage embryos using two inhibitors. *Stem Cells Dev.* 23, 1501–1514. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0329>
- Inoue, A., Chen, Z., Yin, Q., Zhang, Y., 2018. Maternal Eed knockout causes loss of H3K27me3 imprinting and random X inactivation in the extraembryonic cells. *Genes Dev.* 32, 1525–1536. <https://doi.org/10.1101/gad.318675.118>
- Inoue, A., Jiang, L., Lu, F., Suzuki, T., Zhang, Y., 2017. Maternal H3K27me3 controls DNA methylation-independent imprinting. *Nature* 547, 419–424. <https://doi.org/10.1038/nature23262>
- Iqbal, K., Jin, S.-G., Pfeifer, G.P., Szabó, P.E., 2011. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3642–3647. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014033108>
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., Zhang, Y., 2011. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333, 1300–1303. <https://doi.org/10.1126/science.1210597>
- Janssen, A., Colmenares, S.U., Karpen, G.H., 2018. Heterochromatin: Guardian of the Genome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 34, 265–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062653>
- Johnson, W.H., Loskutoff, N.M., Plante, Y., Betteridge, K.J., 1995. Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an in vitro derived four-cell embryo. *Vet. Rec.* 137, 15–16. <https://doi.org/10.1136/vr.137.1.15>
- Jones, P.A., 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 13, 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Jung, Y.H., Sauria, M.E.G., Lyu, X., Cheema, M.S., Ausio, J., Taylor, J., Corces, V.G., 2017. Chromatin States in Mouse Sperm Correlate with Embryonic and Adult Regulatory Landscapes. *Cell Rep.* 18, 1366–1382. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.034>
- Kaji, K., Caballero, I.M., MacLeod, R., Nichols, J., Wilson, V.A., Hendrich, B., 2006. The NuRD component Mbd3 is required for pluripotency of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 285–292. <https://doi.org/10.1038/ncb1372>
- Kang, M., Garg, V., Hadjantonakis, A.-K., 2017. Lineage Establishment and Progression within the Inner Cell Mass of the Mouse Blastocyst Requires FGFR1 and FGFR2. *Dev. Cell* 41, 496–510.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.05.003>
- Kass, S.U., Pruss, D., Wolffe, A.P., 1997. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet. TIG* 13, 444–449. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(97\)01268-7](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(97)01268-7)
- Ke, Y., Xu, Y., Chen, X., Feng, S., Liu, Z., Sun, Y., Yao, X., Li, F., Zhu, W., Gao, L., Chen, H., Du, Z., Xie, W., Xu, X., Huang, X., Liu, J., 2017. 3D Chromatin Structures of Mature Gametes and Structural Reprogramming during Mammalian Embryogenesis. *Cell* 170, 367–381.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.029>
- Keppler, B.R., Archer, T.K., 2008. Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets – Part 1. *Expert Opin. Ther. Targets* 12, 1301–1312. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.10.1301>
- Khan, A., Giri, S., Wang, Y., Chakraborty, A., Ghosh, A.K., Anantharaman, A., Aggarwal, V., Sathyan, K.M., Ha, T., Prasanth, K.V., Prasanth, S.G., 2015. BEND3 represses rDNA

- transcription by stabilizing a NoRC component via USP21 deubiquitinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 8338–8343. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424705112>
- Khan, A., Prasanth, S.G., 2015. BEND3 mediates transcriptional repression and heterochromatin organization. *Transcription* 6, 102–105. <https://doi.org/10.1080/21541264.2015.1100228>
- Khan, D.R., Dubé, D., Gall, L., Peynot, N., Ruffini, S., Laffont, L., Le Bourhis, D., Degrelle, S., Jouneau, A., Duranthon, V., 2012. Expression of pluripotency master regulators during two key developmental transitions: EGA and early lineage specification in the bovine embryo. *PLoS One* 7, e34110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034110>
- Kinoshita, M., Barber, M., Mansfield, W., Cui, Y., Spindlow, D., Stirparo, G.G., Dietmann, S., Nichols, J., Smith, A., 2021. Capture of Mouse and Human Stem Cells with Features of Formative Pluripotency. *Cell Stem Cell* 28, 453–471.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.005>
- Klug, A., Rhodes, D., Smith, J., Finch, J.T., Thomas, J.O., 1980. A low resolution structure for the histone core of the nucleosome. *Nature* 287, 509–516. <https://doi.org/10.1038/287509a0>
- Koyama, M., Kurumizaka, H., 2018. Structural diversity of the nucleosome. *J. Biochem. (Tokyo)* 163, 85–95. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx081>
- Kuijk, E.W., van Tol, L.T.A., Van de Velde, H., Wubbolts, R., Welling, M., Geijsen, N., Roelen, B.A.J., 2012. The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Dev. Camb. Engl.* 139, 871–882. <https://doi.org/10.1242/dev.071688>
- Kunath, T., Arnaud, D., Uy, G.D., Okamoto, I., Chureau, C., Yamanaka, Y., Heard, E., Gardner, R.L., Avner, P., Rossant, J., 2005. Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development* 132, 1649–1661. <https://doi.org/10.1242/dev.01715>
- Kurniawan, F., Chetlangia, N., Kamran, M., Redon, C.E., Pongor, L., Sun, Q., Lin, Y.-C., Mohan, V., Shaqildi, O., Asoudegi, D., Hao, Q., Khan, A., Aladjem, M.I., Prasanth, K.V., Prasanth, S.G., 2022. BEND3 safeguards pluripotency by repressing differentiation-associated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119, e2107406119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2107406119>
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., Jenuwein, T., 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116–120. <https://doi.org/10.1038/35065132>
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, Y., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb,

R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blöcker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowki, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J., Szustakowki, J., International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921. <https://doi.org/10.1038/35057062>

Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A.H.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., Peters, A.H.F.M., 2003. Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. *Curr. Biol.* 13, 1192–1200. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00432-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00432-9)

Leuba, S.H., Bustamante, C., van Holde, K., Zlatanova, J., 1998a. Linker Histone Tails and N-Tails of Histone H3 Are Redundant: Scanning Force Microscopy Studies of Reconstituted Fibers. *Biophys. J.* 74, 10.

Leuba, S.H., Bustamante, C., Zlatanova, J., van Holde, K., 1998b. Contributions of Linker Histones and Histone H3 to Chromatin Structure: Scanning Force Microscopy Studies on Trypsinized Fibers. *Biophys. J.* 74, 7.

Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M.A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L.A., Lander, E.S., Dekker, J.,

2009. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326, 289–293. <https://doi.org/10.1126/science.1181369>
- Liu, X., Wang, C., Liu, W., Li, J., Li, C., Kou, X., Chen, J., Zhao, Y., Gao, H., Wang, H., Zhang, Y., Gao, Y., Gao, S., 2016. Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. *Nature* 537, 558–562. <https://doi.org/10.1038/nature19362>
- Lu, F., Liu, Y., Inoue, A., Suzuki, T., Zhao, K., Zhang, Y., 2016. Establishing Chromatin Regulatory Landscape during Mouse Preimplantation Development. *Cell* 165, 1375–1388. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.050>
- Lu, W., Zhang, Y., Liu, D., Songyang, Z., Wan, M., 2013. Telomeres - Structure, Function, and Regulation. *Exp. Cell Res.* 319, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.09.005>
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Luke, B., Lingner, J., 2009. TERRA: telomeric repeat-containing RNA. *EMBO J.* 28, 2503–2510. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.166>
- Maemura, M., Taketsuru, H., Nakajima, Y., Shao, R., Kakihara, A., Nogami, J., Ohkawa, Y., Tsukada, Y., 2021. Totipotency of mouse zygotes extends to single blastomeres of embryos at the four-cell stage. *Sci. Rep.* 11, 11167. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90653-1>
- Maison, C., Bailly, D., Peters, A.H.F.M., Quivy, J.-P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T., Almouzni, G., 2002. Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat. Genet.* 30, 329–334. <https://doi.org/10.1038/ng843>
- Malik, H.S., Henikoff, S., 2003. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 10, 882–891. <https://doi.org/10.1038/nsb996>
- Marks, H., Kalkan, T., Menafra, R., Denissov, S., Jones, K., Hofemeister, H., Nichols, J., Kranz, A., Stewart, A.F., Smith, A., Stunnenberg, H.G., 2012. The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* 149, 590–604. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.026>
- Martens, J.H.A., O’Sullivan, R.J., Braunschweig, U., Opravil, S., Radolf, M., Steinlein, P., Jenuwein, T., 2005. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J.* 24, 800–812. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600545>
- Martin, C., Beaujean, N., Brochard, V., Audouard, C., Zink, D., Debey, P., 2006. Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development. *Dev. Biol.* 292, 317–332. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.01.009>
- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>

- Martire, S., Banaszynski, L.A., 2020. The roles of histone variants in fine-tuning chromatin organization and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 522–541. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0262-8>
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., Haaf, T., 2000. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403, 501–502. <https://doi.org/10.1038/35000656>
- McLay, D.W., Clarke, H.J., 2003. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reprod. Camb. Engl.* 125, 625–633. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250625>
- Mei, H., Kozuka, C., Hayashi, R., Kumon, M., Koseki, H., Inoue, A., 2021. H2AK119ub1 guides maternal inheritance and zygotic deposition of H3K27me3 in mouse embryos. *Nat. Genet.* 53, 539–550. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00820-3>
- Meister, G., 2013. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* 14, 447–459. <https://doi.org/10.1038/nrg3462>
- Memili, E., First, N.L., 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote Camb. Engl.* 8, 87–96. <https://doi.org/10.1017/s0967199400000861>
- Meng, T.-G., Zhou, Q., Ma, X.-S., Liu, X.-Y., Meng, Q.-R., Huang, X.-J., Liu, H.-L., Lei, W.-L., Zhao, Z.-H., Ouyang, Y.-C., Hou, Y., Schatten, H., Ou, X.-H., Wang, Z.-B., Gao, S.-R., Sun, Q.-Y., 2020. PRC2 and EHMT1 regulate H3K27me2 and H3K27me3 establishment across the zygote genome. *Nat. Commun.* 11, 6354. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20242-9>
- Meyer, A., Schloissnig, S., Franchini, P., Du, K., Woltering, J.M., Irisarri, I., Wong, W.Y., Nowoshilow, S., Kneitz, S., Kawaguchi, A., Fabrizius, A., Xiong, P., Dechaud, C., Spaink, H.P., Volff, J.-N., Simakov, O., Burmester, T., Tanaka, E.M., Schartl, M., 2021. Giant lungfish genome elucidates the conquest of land by vertebrates. *Nature* 590, 284–289. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03198-8>
- Morgani, S., Nichols, J., Hadjantonakis, A.-K., 2017. The many faces of Pluripotency: in vitro adaptations of a continuum of in vivo states. *BMC Dev. Biol.* 17. <https://doi.org/10.1186/s12861-017-0150-4>
- Mozzetta, C., Boyarchuk, E., Pontis, J., Ait-Si-Ali, S., 2015. Sound of silence: the properties and functions of repressive Lys methyltransferases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 499–513. <https://doi.org/10.1038/nrm4029>
- Müller, S., Montes de Oca, R., Lacoste, N., Dingli, F., Loew, D., Almouzni, G., 2014. Phosphorylation and DNA binding of HJURP determine its centromeric recruitment and function in CenH3(CENP-A) loading. *Cell Rep.* 8, 190–203. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.002>
- Neagu, A., van Genderen, E., Escudero, I., Verwegen, L., Kurek, D., Lehmann, J., Stel, J., Dirks, R.A.M., van Mierlo, G., Maas, A., Eleveld, C., Ge, Y., den Dekker, A.T., Brouwer, R.W.W., van IJcken, W.F.J., Modic, M., Drukker, M., Jansen, J.H., Rivron, N.C., Baart, E.B., Marks, H., ten Berge, D., 2020. In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states. *Nat. Cell Biol.* 22, 534–545. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0508-x>

- Niakan, K.K., Eggen, K., 2013. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Dev. Biol.* 375, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.008>
- Nichols, J., Smith, A., 2009. Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell* 4, 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.015>
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., Smith, A., 1998. Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* 95, 379–391. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81769-9)
- Nielsen, C.F., Hickson, I.D., 2016. PICH promotes mitotic chromosome segregation: Identification of a novel role in rDNA disjunction. *Cell Cycle* 15, 2704–2711. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1222336>
- Nishioka, N., Yamamoto, S., Kiyonari, H., Sato, H., Sawada, A., Ota, M., Nakao, K., Sasaki, H., 2008. Tead4 is required for specification of trophoblast in pre-implantation mouse embryos. *Mech. Dev.* 125, 270–283. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2007.11.002>
- Novo, C.L., Tang, C., Ahmed, K., Djuric, U., Fussner, E., Mullin, N.P., Morgan, N.P., Hayre, J., Sienerth, A.R., Elderkin, S., Nishinakamura, R., Chambers, I., Ellis, J., Bazett-Jones, D.P., Rugg-Gunn, P.J., 2016. The pluripotency factor Nanog regulates pericentromeric heterochromatin organization in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev.* 30, 1101–1115. <https://doi.org/10.1101/gad.275685.115>
- O’Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S.C., Surani, M.A., Jenuwein, T., 2001. The Polycomb-Group Gene *Ezh2* Is Required for Early Mouse Development. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4330–4336. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.13.4330-4336.2001>
- Ohinata, Y., Tsukiyama, T., 2014. Establishment of Trophoblast Stem Cells under Defined Culture Conditions in Mice. *PLOS ONE* 9, e107308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107308>
- Okabe, H., Toh, H., Sato, T., Hiura, H., Takahashi, S., Shirane, K., Kabayama, Y., Suyama, M., Sasaki, H., Arima, T., 2018. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell* 22, 50–63.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.11.004>
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E., 1999. DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6)
- Ostromyshenskii, D.I., Chernyaeva, E.N., Kuznetsova, I.S., Podgornaya, O.I., 2018. Mouse chromocenters DNA content: sequencing and in silico analysis. *BMC Genomics* 19, 151. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4534-z>
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W., Walter, J., 2000. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr. Biol.* CB 10, 475–478. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00448-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00448-6)
- Ou, H.D., Phan, S., Deerinck, T.J., Thor, A., Ellisman, M.H., O’Shea, C.C., 2017. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* 357, eaag0025. <https://doi.org/10.1126/science.aag0025>

- Pailles, M., Hirlemann, M., Brochard, V., Chebrout, M., Oudin, J.-F., Marks, H., Jouneau, A., Bonnet-Garnier, A., 2022. H3K27me3 at pericentromeric heterochromatin is a defining feature of the early mouse blastocyst. *Sci. Rep.* 12, 13908. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17730-x>
- Pasini, D., Bracken, A.P., Jensen, M.R., Denchi, E.L., Helin, K., 2004. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J.* 23, 4061–4071. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600402>
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., Bonner, W.M., 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol. CB* 10, 886–895. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00610-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00610-2)
- PELLICER, J., FAY, M.F., LEITCH, I.J., 2010. The largest eukaryotic genome of them all? *Bot. J. Linn. Soc.* 164, 10–15. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01072.x>
- Peng, J.C., Karpen, G.H., 2007. H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability. *Nat. Cell Biol.* 9, 25–35. <https://doi.org/10.1038/ncb1514>
- Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M., Jenuwein, T., 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107, 323–337. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00542-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00542-6)
- Peters, A.H.F.M., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A.H.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J.H.A., Jenuwein, T., 2003. Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin. *Mol. Cell* 12, 1577–1589. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00477-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00477-5)
- Pichugin, A., Le Bourhis, D., Adenot, P., Lehmann, G., Audouard, C., Renard, J.-P., Vignon, X., Beaujean, N., 2010. Dynamics of constitutive heterochromatin: two contrasted kinetics of genome restructuring in early cloned bovine embryos. *REPRODUCTION* 139, 129–137. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0435>
- Piliszek, A., Grabarek, J.B., Frankenberg, S.R., Plusa, B., 2016. Cell fate in animal and human blastocysts and the determination of viability. *Mol. Hum. Reprod.* 22, 681–690. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw002>
- Piquet, S., Le Parc, F., Bai, S.-K., Chevallier, O., Adam, S., Polo, S.E., 2018. The Histone Chaperone FACT Coordinates H2A.X-Dependent Signaling and Repair of DNA Damage. *Mol. Cell* 72, 888–901.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.010>
- Pitchai, G.P., Kaulich, M., Bizard, A.H., Mesa, P., Yao, Q., Sarlos, K., Streicher, W.W., Nigg, E.A., Montoya, G., Hickson, I.D., 2017. A novel TPR–BEN domain interaction mediates PICH–BEND3 association. *Nucleic Acids Res.* 45, 11413–11424. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx792>
- Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., Hadjantonakis, A.-K., 2008. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Dev. Camb. Engl.* 135, 3081–3091. <https://doi.org/10.1242/dev.021519>

- Pöschl, E., Streeck, R.E., 1980. Prototype sequence of bovine 1.720 satellite DNA. *J. Mol. Biol.* 143, 147–153. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(80\)90128-x](https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90128-x)
- Posfai, E., Kunzmann, R., Brochard, V., Salvaing, J., Cabuy, E., Roloff, T.C., Liu, Z., Tardat, M., van Lohuizen, M., Vidal, M., Beaujean, N., Peters, A.H.F.M., 2012. Polycomb function during oogenesis is required for mouse embryonic development. *Genes Dev.* 26, 920–932. <https://doi.org/10.1101/gad.188094.112>
- Postepska-Igielska, A., Kronic, D., Schmitt, N., Greulich-Bode, K.M., Boukamp, P., Grummt, I., 2013. The chromatin remodelling complex NoRC safeguards genome stability by heterochromatin formation at telomeres and centromeres. *EMBO Rep.* 14, 704–710. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.87>
- Probst, A.V., Almouzni, G., 2011. Heterochromatin establishment in the context of genome-wide epigenetic reprogramming. *Trends Genet.* 27, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.02.002>
- Probst, A.V., Okamoto, I., Casanova, M., El Marjou, F., Le Baccon, P., Almouzni, G., 2010. A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev. Cell* 19, 625–638. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.002>
- Puschendorf, M., Terranova, R., Boutsma, E., Mao, X., Isono, K., Brykczynska, U., Kolb, C., Otte, A.P., Koseki, H., Orkin, S.H., van Lohuizen, M., Peters, A.H.F.M., 2008. PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. *Nat. Genet.* 40, 411–420. <https://doi.org/10.1038/ng.99>
- Reddy, M.A., Natarajan, R., 2015. Recent developments in epigenetics of acute and chronic kidney diseases. *Kidney Int.* 88, 250–261. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.148>
- Régnier, V., Vagnarelli, P., Fukagawa, T., Zerjal, T., Burns, E., Trouche, D., Earnshaw, W., Brown, W., 2005. CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3967–3981. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.10.3967-3981.2005>
- Reik, W., Walter, J., 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* 2, 21–32. <https://doi.org/10.1038/35047554>
- Reynolds, N., Salmon-Divon, M., Dvinge, H., Hynes-Allen, A., Balasooriya, G., Leaford, D., Behrens, A., Bertone, P., Hendrich, B., 2012. NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression. *EMBO J.* 31, 593–605. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.431>
- Ricci, M.A., Manzo, C., García-Parajo, M.F., Lakadamyali, M., Cosma, M.P., 2015. Chromatin Fibers Are Formed by Heterogeneous Groups of Nucleosomes In Vivo. *Cell* 160, 1145–1158. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.054>
- Roode, M., Blair, K., Snell, P., Elder, K., Marchant, S., Smith, A., Nichols, J., 2012. Human hypoblast formation is not dependent on FGF signalling. *Dev. Biol.* 361, 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.10.030>
- Rossant, J., 2008. Stem Cells and Early Lineage Development. *Cell* 132, 527–531. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.039>

- Saiz, N., Grabarek, J.B., Sabherwal, N., Papalopulu, N., Plusa, B., 2013. Atypical protein kinase C couples cell sorting with primitive endoderm maturation in the mouse blastocyst. *Dev. Camb. Engl.* 140, 4311–4322. <https://doi.org/10.1242/dev.093922>
- Saiz, N., Plusa, B., 2013. Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reproduction* 145, R65–R80. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0381>
- Saiz, N., Williams, K.M., Seshan, V.E., Hadjantonakis, A.-K., 2016. Asynchronous fate decisions by single cells collectively ensure consistent lineage composition in the mouse blastocyst. *Nat. Commun.* 7, 13463. <https://doi.org/10.1038/ncomms13463>
- Saksouk, N., Barth, T.K., Ziegler-Birling, C., Olova, N., Nowak, A., Rey, E., Mateos-Langerak, J., Urbach, S., Reik, W., Torres-Padilla, M.-E., Imhof, A., Déjardin, J., 2014. Redundant mechanisms to form silent chromatin at pericentromeric regions rely on BEND3 and DNA methylation. *Mol. Cell* 56, 580–594. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.001>
- Saksouk, N., Simboeck, E., Déjardin, J., 2015. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* 8, 3. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-8-3>
- Sanborn, A.L., Rao, S.S.P., Huang, S.-C., Durand, N.C., Huntley, M.H., Jewett, A.I., Bochkov, I.D., Chinnappan, D., Cutkosky, A., Li, J., Geeting, K.P., Gnirke, A., Melnikov, A., McKenna, D., Stamenova, E.K., Lander, E.S., Aiden, E.L., 2015. Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E6456–6465. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518552112>
- Santoro, R., Li, J., Grummt, I., 2002. The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat. Genet.* 32, 393–396. <https://doi.org/10.1038/ng1010>
- Sathyan, K.M., Shen, Z., Tripathi, V., Prasanth, K.V., Prasanth, S.G., 2011. A BEN-domain-containing protein associates with heterochromatin and represses transcription. *J. Cell Sci.* 124, 3149–3163. <https://doi.org/10.1242/jcs.086603>
- Sauvegarde, C., Paul, D., Bridoux, L., Jouneau, A., Degrelle, S., Hue, I., Rezsöházy, R., Donnay, I., 2016. Dynamic Pattern of HOXB9 Protein Localization during Oocyte Maturation and Early Embryonic Development in Mammals. *PloS One* 11, e0165898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165898>
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., Jenuwein, T., 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 18, 1251–1262. <https://doi.org/10.1101/gad.300704>
- Schuh, M., Lehner, C.F., Heidmann, S., 2007. Incorporation of Drosophila CID/CENP-A and CENP-C into centromeres during early embryonic anaphase. *Curr. Biol. CB* 17, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.051>
- Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G.G., Rauscher, F.J., 2002. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.* 16, 919–932. <https://doi.org/10.1101/gad.973302>

- Schumacher, A., Faust, C., Magnuson, T., 1996. Positional cloning of a global regulator of anterior–posterior patterning in mice. *Nature* 383, 250–253. <https://doi.org/10.1038/383250a0>
- Schwartz, B.E., Ahmad, K., 2005. Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev.* 19, 804–814. <https://doi.org/10.1101/gad.1259805>
- Séguin, C.A., Draper, J.S., Nagy, A., Rossant, J., 2008. Establishment of Endoderm Progenitors by SOX Transcription Factor Expression in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3, 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.06.018>
- Sendžikaitė, G., Kelsey, G., 2019. The role and mechanisms of DNA methylation in the oocyte. *Essays Biochem.* 63, 691–705. <https://doi.org/10.1042/EBC20190043>
- Seo, J., Kim, S.C., Lee, H.-S., Kim, J.K., Shon, H.J., Salleh, N.L.M., Desai, K.V., Lee, J.H., Kang, E.-S., Kim, J.S., Choi, J.K., 2012. Genome-wide profiles of H2AX and γ -H2AX differentiate endogenous and exogenous DNA damage hotspots in human cells. *Nucleic Acids Res.* 40, 5965–5974. <https://doi.org/10.1093/nar/gks287>
- Simmet, K., Zakhartchenko, V., Philippou-Massier, J., Blum, H., Klymiuk, N., Wolf, E., 2018. OCT4/POU5F1 is required for NANOG expression in bovine blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 2770–2775. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718833115>
- Simpson, R.T., 1978. Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* 17, 5524–5531. <https://doi.org/10.1021/bi00618a030>
- Singer, Z.S., Yong, J., Tischler, J., Hackett, J.A., Altinok, A., Surani, M.A., Cai, L., Elowitz, M.B., 2014. Dynamic Heterogeneity and DNA Methylation in Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell* 55, 319–331. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.029>
- Skowronski, J., Plucienniczak, A., Bednarek, A., Jaworski, J., 1984. Bovine 1.709 satellite: Recombination hotspots and dispersed repeated sequences. *J. Mol. Biol.* 177, 399–416. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90292-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90292-4)
- Smith, Z.D., Chan, M.M., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A., Meissner, A., 2012. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* 484, 339–344. <https://doi.org/10.1038/nature10960>
- Soto, D.A., Navarro, M., Zheng, C., Halstead, M.M., Zhou, C., Guiltinan, C., Wu, J., Ross, P.J., 2021. Simplification of culture conditions and feeder-free expansion of bovine embryonic stem cells. *Sci. Rep.* 11, 11045. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90422-0>
- Sozen, B., Amadei, G., Cox, A., Wang, R., Na, E., Czukiewska, S., Chappell, L., Voet, T., Michel, G., Jing, N., Glover, D.M., Zernicka-Goetz, M., 2018. Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures. *Nat. Cell Biol.* 20, 979–989. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0147-7>
- Strumpf, D., Mao, C.-A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., Rossant, J., 2005. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Dev. Camb. Engl.* 132, 2093–2102. <https://doi.org/10.1242/dev.01801>

- Sullivan, B., Karpen, G., 2001. Centromere identity in *Drosophila* is not determined in vivo by replication timing. *J. Cell Biol.* 154, 683–690. <https://doi.org/10.1083/jcb.200103001>
- Tadros, W., Lipshitz, H.D., 2009. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Dev. Camb. Engl.* 136, 3033–3042. <https://doi.org/10.1242/dev.033183>
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., Nakatani, Y., 2004. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51–61. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01064-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01064-x)
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., Rao, A., 2009. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* 324, 930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>
- Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A.K., Nagy, A., Rossant, J., 1998. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282, 2072–2075. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2072>
- Tardat, M., Albert, M., Kunzmann, R., Liu, Z., Kaustov, L., Thierry, R., Duan, S., Brykczynska, U., Arrowsmith, C.H., Peters, A.H.F.M., 2015. Cbx2 Targets PRC1 to Constitutive Heterochromatin in Mouse Zygotes in a Parent-of-Origin-Dependent Manner. *Mol. Cell* 58, 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.013>
- Teixeira, M., Py, B.F., Bosc, C., Laubret, D., Moutin, M.-J., Marvel, J., Flamant, F., Markossian, S., 2018. Electroporation of mice zygotes with dual guide RNA/Cas9 complexes for simple and efficient cloning-free genome editing. *Sci. Rep.* 8, 474. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18826-5>
- Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., McKay, R.D.G., 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196–199. <https://doi.org/10.1038/nature05972>
- Thakur, J., Henikoff, S., 2018. Unexpected conformational variations of the human centromeric chromatin complex. *Genes Dev.* 32, 20–25. <https://doi.org/10.1101/gad.307736.117>
- Toralova, T., Kinterova, V., Chmelikova, E., Kanka, J., 2020. The neglected part of early embryonic development: maternal protein degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 3177–3194. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03482-2>
- Torres-Flores, U., Hernández-Hernández, A., 2020. The Interplay Between Replacement and Retention of Histones in the Sperm Genome. *Front. Genet.* 11.
- Tosenberger, A., Gonze, D., Bessonard, S., Cohen-Tannoudji, M., Chazaud, C., Dupont, G., 2017. A multiscale model of early cell lineage specification including cell division. *NPJ Syst. Biol. Appl.* 3, 16. <https://doi.org/10.1038/s41540-017-0017-0>
- Tosolini, M., Brochard, V., Adenot, P., Chebrout, M., Grillo, G., Navia, V., Beaujean, N., Francastel, C., Bonnet-Garnier, A., Jouneau, A., 2018. Contrasting epigenetic states of heterochromatin in the different types of mouse pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 8, 5776. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23822-4>

- Tosolini, M., Jouneau, A., 2016a. Acquiring Ground State Pluripotency: Switching Mouse Embryonic Stem Cells from Serum/LIF Medium to 2i/LIF Medium. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1341, 41–48. https://doi.org/10.1007/7651_2015_207
- Tosolini, M., Jouneau, A., 2016b. From Naive to Primed Pluripotency: In Vitro Conversion of Mouse Embryonic Stem Cells in Epiblast Stem Cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1341, 209–216. https://doi.org/10.1007/7651_2015_208
- Tsumura, A., Hayakawa, T., Kumaki, Y., Takebayashi, S., Sakaue, M., Matsuoka, C., Shimotohno, K., Ishikawa, F., Li, E., Ueda, H.R., Nakayama, J., Okano, M., 2006. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 11, 805–814. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00984.x>
- Veiga, A., Calderon, G., Barri, P.N., Coroleu, B., 1987. Pregnancy after the replacement of a frozen-thawed embryo with less than 50% intact blastomeres. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 2, 321–323. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136542>
- Veillard, A.-C., Marks, H., Bernardo, A.S., Jouneau, L., Laloë, D., Boulanger, L., Kaan, A., Brochard, V., Tosolini, M., Pedersen, R., Stunnenberg, H., Jouneau, A., 2014. Stable Methylation at Promoters Distinguishes Epiblast Stem Cells from Embryonic Stem Cells and the In Vivo Epiblasts. *Stem Cells Dev.* 23, 2014–2029. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0639>
- Walter, M., Teissandier, A., Pérez-Palacios, R., Bourc'his, D., 2016. An epigenetic switch ensures transposon repression upon dynamic loss of DNA methylation in embryonic stem cells. *eLife* 5, e11418. <https://doi.org/10.7554/eLife.11418>
- Wang, C., Han, X., Zhou, Z., Uyunbilig, B., Huang, X., Li, R., Li, X., 2019. Wnt3a Activates the WNT-YAP/TAZ Pathway to Sustain CDX2 Expression in Bovine Trophoblast Stem Cells. *DNA Cell Biol.* 38, 410–422. <https://doi.org/10.1089/dna.2018.4458>
- Wang, C., Liu, X., Gao, Y., Yang, L., Li, C., Liu, W., Chen, C., Kou, X., Zhao, Y., Chen, J., Wang, Y., Le, R., Wang, H., Duan, T., Zhang, Y., Gao, S., 2018. Reprogramming of H3K9me3-dependent heterochromatin during mammalian embryo development. *Nat. Cell Biol.* 20, 620–631. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0093-4>
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., Zhang, Y., 2004. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873–878. <https://doi.org/10.1038/nature02985>
- Wang, L., Zhang, Jun, Duan, J., Gao, X., Zhu, W., Lu, X., Yang, L., Zhang, Jing, Li, G., Ci, W., Li, W., Zhou, Q., Aluru, N., Tang, F., He, C., Huang, X., Liu, J., 2014. Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell* 157, 979–991. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.017>
- Wang, Xiaoxiao, Xiang, Y., Yu, Y., Wang, R., Zhang, Y., Xu, Q., Sun, H., Zhao, Z.-A., Jiang, X., Wang, Xiaoqing, Lu, X., Qin, D., Quan, Y., Zhang, J., Shyh-Chang, N., Wang, H., Jing, N., Xie, W., Li, L., 2021. Formative pluripotent stem cells show features of epiblast cells poised for gastrulation. *Cell Res.* 31, 526–541. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00477-x>
- Wei, J.-W., Huang, K., Yang, C., Kang, C.-S., 2017. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncol. Rep.* 37, 3–9. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5236>

- Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., Hanna, J.H., 2016. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 155–169. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.28>
- White, M.D., Angiolini, J.F., Alvarez, Y.D., Kaur, G., Zhao, Z.W., Mocskos, E., Bruno, L., Bissiere, S., Levi, V., Plachta, N., 2016. Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo. *Cell* 165, 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.032>
- Wijchers, P.J., Geeven, G., Eyres, M., Bergsma, A.J., Janssen, M., Versteegen, M., Zhu, Y., Schell, Y., Vermeulen, C., Wit, E. de, Laat, W. de, 2015. Characterization and dynamics of pericentromere-associated domains in mice. *Genome Res.* 25, 958–969. <https://doi.org/10.1101/gr.186643.114>
- Wijchers, P.J., Krijger, P.H.L., Geeven, G., Zhu, Y., Denker, A., Versteegen, M.J.A.M., Valdes-Quezada, C., Vermeulen, C., Janssen, M., Teunissen, H., Anink-Groenen, L.C.M., Verschure, P.J., de Laat, W., 2016. Cause and Consequence of Tethering a SubTAD to Different Nuclear Compartments. *Mol. Cell* 61, 461–473. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.001>
- Williams, S.P., Athey, B.D., Muglia, L.J., Schappe, R.S., Gough, A.H., Langmore, J.P., 1986. Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length. *Biophys. J.* 49, 233–248. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(86\)83637-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(86)83637-2)
- Wray, J., Kalkan, T., Smith, A.G., 2010. The ground state of pluripotency. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1027–1032. <https://doi.org/10.1042/BST0381027>
- Xia, W., Xie, W., 2020. Rebooting the Epigenomes during Mammalian Early Embryogenesis. *Stem Cell Rep.* 15, 1158–1175. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.09.005>
- Xie, Wei, Barr, C.L., Kim, A., Yue, F., Lee, A.Y., Eubanks, J., Dempster, E.L., Ren, B., 2012. Base-Resolution Analyses of Sequence and Parent-of-Origin Dependent DNA Methylation in the Mouse Genome. *Cell* 148, 816–831. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.035>
- Xie, Wenbing, Ling, T., Zhou, Y., Feng, W., Zhu, Q., Stunnenberg, H.G., Grummt, I., Tao, W., 2012. The chromatin remodeling complex NuRD establishes the poised state of rRNA genes characterized by bivalent histone modifications and altered nucleosome positions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 8161–8166. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201262109>
- Xu, Q., Xie, W., 2018. Epigenome in Early Mammalian Development: Inheritance, Reprogramming and Establishment. *Trends Cell Biol.* 28, 237–253. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.10.008>
- Xu, R., Li, C., Liu, X., Gao, S., 2021. Insights into epigenetic patterns in mammalian early embryos. *Protein Cell* 12, 7–28. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00757-z>
- Yamaguchi, K., Hada, M., Fukuda, Y., Inoue, E., Makino, Y., Katou, Y., Shirahige, K., Okada, Y., 2018. Re-evaluating the Localization of Sperm-Retained Histones Revealed the Modification-Dependent Accumulation in Specific Genome Regions. *Cell Rep.* 23, 3920–3932. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.094>

- Yun, M., Wu, J., Workman, J.L., Li, B., 2011. Readers of histone modifications. *Cell Res.* 21, 564–578. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.42>
- Zafon, C., Gil, J., Pérez-González, B., Jordà, M., 2019. DNA methylation in thyroid cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 26, R415–R439. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0093>
- Zee, B.M., Levin, R.S., Xu, B., LeRoy, G., Wingreen, N.S., Garcia, B.A., 2010. In Vivo Residue-specific Histone Methylation Dynamics *. *J. Biol. Chem.* 285, 3341–3350. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.063784>
- Zhai, J., Xiao, Z., Wang, Y., Wang, H., 2022. Human embryonic development: from peri-implantation to gastrulation. *Trends Cell Biol.* 32, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.008>
- Zhang, B., Zheng, H., Huang, B., Li, W., Xiang, Y., Peng, X., Ming, J., Wu, X., Zhang, Y., Xu, Q., Liu, W., Kou, X., Zhao, Y., He, W., Li, C., Chen, B., Li, Y., Wang, Q., Ma, J., Yin, Q., Kee, K., Meng, A., Gao, S., Xu, F., Na, J., Xie, W., 2016. Allelic reprogramming of the histone modification H3K4me3 in early mammalian development. *Nature* 537, 553–557. <https://doi.org/10.1038/nature19361>
- Zhang, J., Zhang, Y., You, Q., Huang, C., Zhang, Tiantian, Wang, M., Zhang, Tianwei, Yang, X., Xiong, J., Li, Y., Liu, C.-P., Zhang, Z., Xu, R.-M., Zhu, B., 2022. Highly enriched BEND3 prevents the premature activation of bivalent genes during differentiation. *Science* 375, 1053–1058. <https://doi.org/10.1126/science.abm0730>
- Zhang, W., Li, L., Deng, X., Kapusinszky, B., Delwart, E., 2014. What is for dinner? Viral metagenomics of US store bought beef, pork, and chicken. *Virology* 468–470, 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.025>
- Zhang, Y., Xiang, Y., Yin, Q., Du, Z., Peng, X., Wang, Q., Fidalgo, M., Xia, W., Li, Y., Zhao, Z., Zhang, W., Ma, J., Xu, F., Wang, J., Li, L., Xie, W., 2017. Dynamic epigenomic landscapes during early lineage specification in mouse embryos. *Nat. Genet.* <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0003-x>
- Zhao, Y., Zhang, D., Liu, M., Tian, Y., Lu, J., Gao, S., Wang, H., Lu, Z., 2021. Maternal Ezh1/2 deficiency in oocyte delays H3K27me2/3 restoration and impairs epiblast development responsible for embryonic sub-lethality in mouse.
- Zheng, H., Huang, B., Zhang, B., Xiang, Y., Du, Z., Xu, Q., Li, Y., Wang, Q., Ma, J., Peng, X., Xu, F., Xie, W., 2016. Resetting Epigenetic Memory by Reprogramming of Histone Modifications in Mammals. *Mol. Cell* 63, 1066–1079. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.032>
- Zhu, D., Fang, J., Li, Y., Zhang, J., 2009. Mbd3, a Component of NuRD/Mi-2 Complex, Helps Maintain Pluripotency of Mouse Embryonic Stem Cells by Repressing Trophoblast Differentiation. *PLOS ONE* 4, e7684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007684>
- Żylicz, J.J., Heard, E., 2020. Molecular Mechanisms of Facultative Heterochromatin Formation: An X-Chromosome Perspective. *Annu. Rev. Biochem.* 89, 255–282. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012655>

Title : Heterochromatin as a pluripotency marker : comparison between *in vivo* (mammals embryos) and *in vitro* (stem cells) models

Keywords : Heterochromatin, Embryo, Stem cells, Pluripotency

Abstract :

Following fertilization, the embryonic genome undergoes various epigenetic and structural remodelings, essential for its activation. These various changes proceed further throughout development, as the embryo progresses from totipotency to pluripotency and differentiation. Pluripotency is a complex and transient state in which the cells that will later give rise to the future organism progress from a "naïve" to a "primed" state. The rise and progression of pluripotency is accompanied by changes in the distribution of DNA methylation and post-translational histones modifications. Previous work highlighted that the epigenetic profile of pericentromeric heterochromatin discriminates naïve from primed murine pluripotent cells *in vitro*. Notably, H3K27me₃, is found at the chromocenters of naïve mESCs while this epigenetic mark is absent from the chromocenters of primed mEpiSCs. Thus, the objectives of this project were to (i) describe the epigenetic profile of chromocenters during early murine development, (ii) identify which actors are implied in the apposition of H3K27me₃ to chromocenters, and (iii) determine whether these same epigenetic features are preserved at chromocenters of bovine blastocysts and/or in bovine ESCs.

We showed that, in mouse embryo, H3K27me₃ accumulates at the chromocenters from their formation at the 2-cell stage and is then maintained during pre-implantation development. Interestingly, the distribution of H3K27me₃ seems to be related to the maturation of the pluripotent lineage since the profile of H3K27me₃ changes upon segregation of the naïve epiblast from the primitive endoderm. In the post-implantation embryo, H3K27me₃ is not anymore at chromocenters whatever the lineages including the primed pluripotent epiblast. We were able to highlight important differences between the embryos *in vivo* - where the profile of H3K27me₃ is homogeneous in all epiblast cells - and what was described *in vitro* in mESCs. Finally, we showed that the presence of H3K27me₃ at chromocenters is not involved in the transcriptional control of pericentromeric sequences since their transcription tends to decrease during development, independently of the presence of H3K27me₃.

This study also focused on EZH2 and BEND3 proteins to assess their involvement in H3K27me₃ apposition. We found that EZH2 localizes to the periphery of the chromocenters from their clustering, in conjunction with the progressive enrichment of H3K27me₃; whereas BEND3 appears to interact with chromocenters only from the 8-cell stage onwards - suggesting that BEND3 is not the main driver of EZH2 recruitment to chromocenters in the embryo -. Similarly, in the pre-implantation embryo and in mESCs, the location of BEND3 at chromocenters does not correlate with the presence of H3K27me₃ - in contrast to EZH2 whose change in distribution in the embryo precedes the change in localization of H3K27me₃ at chromocenters -. Using a siRNA approach targeting either EZH2 or BEND3 transcripts, we showed that neither the strong reduction of BEND3, nor that of EZH2 influences the localization of H3K27me₃ at chromocenters or the transcription of pericentromeric sequences.

Finally, this study highlights that H3K27me₃ is found at the chromocenters periphery in bovine blastocyst, although the profile of H3K27me₃ at chromocenters seems not to evolve with the progression of pluripotency. These results highlighted similarities between species, where the localization of H3K27me₃ at the chromocenters appears to be a feature of early embryonic development.

Titre : L'hétérochromatine comme marqueur de l'état de pluripotence : comparaison de modèles *in vivo* (embryons de mammifères) et *in vitro* (cellules souches)

Mots-clés : Hétérochromatine, Embryon, Cellules souches, Pluripotence

Résumé :

A la suite de la fécondation, le génome embryonnaire subit différents remodelages épigénétiques et structuraux, nécessaires à son activation. Ces différents remaniements se poursuivent tout au long du développement, alors que l'embryon progresse de l'état de totipotence vers la pluripotence et la différenciation. La pluripotence est un état complexe et transitoire au cours duquel les cellules à l'origine du futur organisme progressent d'un état « naïf » vers un état « amorcé ». L'émergence et l'évolution de la pluripotence s'accompagnent notamment de changements dans la distribution de la méthylation de l'ADN et des modifications post-traductionnelles des histones. De précédents travaux avaient mis en évidence que le profil épigénétique de l'hétérochromatine péri-centromérique permet de discriminer les cellules murines pluripotentes naïves et amorcées *in vitro*. Notamment, H3K27me3 est retrouvée aux chromocentres des mESCs naïves tandis qu'elle est absente des chromocentres des mEpiSCs amorcées. Ainsi, ce projet avait pour objectifs de (i) décrire le profil épigénétique des chromocentres au cours du développement précoce murin, (ii) identifier les acteurs qui participent à l'apposition de H3K27me3 aux chromocentres, et (iii) déterminer si ces mêmes caractéristiques épigénétiques sont conservées aux chromocentres du blastocyste bovin et/ou dans les ESCs bovines.

Nous avons montré que, dans l'embryon murin, H3K27me3 s'accumule aux chromocentres dès leur formation au stade 2-cellules et y est maintenue au cours du développement pré-implantation. De façon intéressante, la distribution de H3K27me3 semble être liée à la maturation du lignage pluripotent puisque le profil de H3K27me3 change au moment de la ségrégation de l'épiblaste naïf par rapport à l'endoderme primitif. Dans l'embryon post-implantation, H3K27me3 n'est plus présente aux chromocentres quel que soit le lignage, y compris l'épiblaste pluripotent amorcé. Nous avons pu souligner des différences entre la situation *in vivo* - où le profil de H3K27me3 est homogène dans l'ensemble des cellules de l'épiblaste - et ce qui avait été décrit *in vitro* dans les mESCs. Enfin, il a été mis en évidence que la présence de H3K27me3 aux chromocentres n'est pas impliquée dans le contrôle transcriptionnel des séquences péri-centromériques puisque leur transcription tend à diminuer au cours du développement, indépendamment de la présence de H3K27me3.

Cette étude s'est également intéressée aux protéines EZH2 et BEND3, pour déterminer leurs implications respectives dans l'apposition de H3K27me3. Nous avons montré qu'EZH2 se localise en périphérie des chromocentres dès leur formation, conjointement à l'enrichissement progressif en H3K27me3 ; alors que BEND3 ne semble interagir avec les chromocentres qu'à partir du stade 8-cellules - suggérant que BEND3 n'est pas l'élément principal de recrutement d'EZH2 aux chromocentres dans l'embryon -. Ainsi, dans l'embryon pré-implantation et dans les mESCs non mutantes, la présence de BEND3 aux chromocentres n'est pas couplée à la présence de H3K27me3 - contrairement aux observations faites pour EZH2 dont le changement de distribution dans l'embryon précède le changement de localisation de H3K27me3 aux chromocentres -. A l'aide d'une approche par siRNA ciblant les transcrits EZH2 ou les transcrits BEND3, il a été mis en évidence que ni la forte diminution de BEND3, ni celle d'EZH2, n'impactent la localisation de H3K27me3 aux chromocentres ou la transcription des séquences péri-centromériques.

Enfin, cette étude montre que H3K27me3 se localise en périphérie des chromocentres du blastocyste bovin. Cependant le profil de H3K27me3 ne semble pas évoluer avec la progression de l'état de pluripotence, contrairement à ce qui a été décrit pour le modèle murin. Ces résultats ont permis de mettre en évidence que la localisation de H3K27me3 au niveau des chromocentres semble être une caractéristique du développement embryonnaire précoce quel que soit l'espèce.