



HAL
open science

**Etude des embryons doubles mutants Nanog^{-/-} ;
Gata6^{-/-} durant la spécification de la masse cellulaire
interne. Mise en évidence d'une nouvelle hétérogénéité.**

Sabine Chauveau

► **To cite this version:**

Sabine Chauveau. Etude des embryons doubles mutants Nanog^{-/-}; Gata6^{-/-} durant la spécification de la masse cellulaire interne. Mise en évidence d'une nouvelle hétérogénéité.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2016. Français. NNT : 2016CLF1MM29 . tel-02415208

HAL Id: tel-02415208

<https://theses.hal.science/tel-02415208>

Submitted on 17 Dec 2019

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.

*ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité
Biologie cellulaire et biologie du développement

Soutenue le 16 décembre 2016

CHAUVEAU Sabine

Etude des embryons doubles mutants Nanog^{-/-} ; Gata6^{-/-} durant la
spécification de la masse cellulaire interne : mise en évidence
d'une nouvelle hétérogénéité

Président : Mme VAURY Chantal, Directeur de Recherche

Rapporteurs : M. SAVATIER Pierre, Directeur de Recherche

Rapporteurs : M. KODJABACHIAN Laurent, Directeur de Recherche

Sous la direction de : CLAIRE CHAZAUD, Directeur de Recherche

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à Laurent Kodjabachian, Pierre Savatier et Chantal Vaury qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je remercie également cette dernière pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire, et ses conseils avisés tout au long de ces années.

Je remercie vivement Claire Chazaud pour m'avoir accueillie dans son équipe et encadrée pendant ces trois années. Merci pour la confiance que tu m'as accordée. Travailler au sein de ton équipe a été un réel plaisir.

Préparer une thèse est un travail d'équipe.

Je remercie tous les membres de cette formidable équipe et notamment Cynthia qui m'a transmis tout son savoir et tous les bons gestes techniques. Sa patience et sa gentillesse m'ont permis d'avoir les meilleures bases pour réaliser ce travail.

Un grand merci à Stéphanie. Nous avons traversé toutes ces années ensemble. Nous avons partagé les moments de bonheur et de galère et je suis sûre que ce ne sont pas les derniers. Tu as été d'un soutien sans faille jusque dans les derniers instants et je t'adresse tout mon soutien pour la fin de ta thèse.

Nicolas, je te remercie énormément pour ton aide et ton sérieux. Travailler avec toi a été vraiment très agréable : tu es le collègue que tout le monde rêve d'avoir. Je te souhaite tout le bonheur pour la suite autant professionnel que personnel.

Merci également à Cécilia et Lorena. Nous continuerons à décrypter les épisodes de Game of Throne la saison prochaine. Je remercie également tous les membres de l'équipe passés : Maxime, Kasha, Adel et Fatma.

Je n'oublie pas tous mes collègues doctorants avec qui les discussions scientifiques ou non, sont toujours passionnées : Guillaume, Lilia, Emilie, Manue, Fabianna, Amandine, Hervé, Marion, Aurélie, Benjamin, avec une mention spéciale pour mes nouvelles voisines de bureau : Marie-Elisa, Gil et Mélanie, et pour mes collègues de congrès : Cristiana (je n'arriverai jamais à l'écrire !), Colin et Quentin.

Merci aux fidèles du midi : Catherine, Michaela, Cédric et Lucie et à Yoan pour tes dépannages informatiques !

Un immense merci également à Stéphanie et Isa, mes références mamans. Merci d'avoir toujours répondu à toutes mes questions et mes doutes à la fois scientifiques et personnels. Merci également à Francky pour tes petits surnoms.

Une pensée toute particulière pour Bertille. Les mots ne sont pas assez forts pour exprimer toute ma reconnaissance. Plus qu'une collègue, tu es devenue une

véritable amie. Nous avons partagé beaucoup de choses, des rires, des goûts musicaux (formidables), des secrets, et même récemment des larmes. Je te souhaite le meilleur pour ton avenir personnel et professionnel (il est déjà tout tracé !).

Je remercie enfin tout le personnel du laboratoire. C'est toujours un grand plaisir de travailler dans l'ambiance très agréable qui règne dans les couloirs du GReD. Je tiens à mentionner particulièrement tout le personnel du « service commun », dont le travail facilite nos recherches chaque jour.

Sur un plan plus personnel, je tiens à remercier mes amis d'enfance : Célia, Clément, Delphine et Mathieu. Cette fois, ça y est j'ai fini mes années étudiantes, vous ne pourrez plus me chambrer !

Merci également à mes amis « éclaireurs », Anne, Anne-po, Elsa, Delphine, Celia (encore), nos échanges du vendredi sont toujours source de bonheur. Merci aussi à Jess pour m'avoir forcé à faire un peu de sport. Merci à Manon, ta description d'une fin de thèse n'était pas erronée.

Je remercie également mes amis musiciens, cette bouffée d'oxygène qui arrive le vendredi soir m'a permis de tenir le marathon de ces trois dernières années. Vous nommez tous prendrait trop de place, mais j'ai une pensée particulière pour mes collègues de pupitre et pour Cyrille, chef et parrain, merci pour tout.

Je remercie également toute ma famille, malgré la distance vous m'avez toujours suivi et encouragé dans mes choix même quand ils étaient surprenants.

Merci également à toute ma belle-famille. Vous êtes une drôle et formidable famille et je suis ravie d'en faire partie.

Je remercie bien sûr mes parents et ma sœur qui m'ont toujours soutenu et aidé dans tous mes choix, je vous aime. Merci papa pour ta relecture, et je vous promets, cette thèse là est la dernière !

Enfin, mes pensées vont aux deux amours de ma vie : William et Chloé. William, rien n'aurait été possible sans toi. Tu m'as soutenue (supportée) pendant ces trois ans. Ton amour, ton humour, tes voyages surprises et ta cuisine : un quatuor gagnant ! Tous les projets que nous avons concrétisés et tous ceux à venir me remplissent de joie. Tu m'as aussi offert au cours de ces années le plus grand des bonheurs, celui d'être maman, et retrouver ma poussinette tous les soirs m'a permis d'oublier tous les moments difficiles. Je vous aime fort. Cette thèse c'est aussi la vôtre.

Résumé

Lors de la formation du blastocyste, l'embryon de souris est constitué d'un épithélium externe, le trophoctoderme (TE), et d'une masse cellulaire interne (MCI). L'épiblaste (EPI) et l'endoderme primitif (EPr) se spécifient au sein de la MCI sous un patron de « sel et poivre » caractérisé par l'expression complémentaire de NANOG, marqueur de l'EPI et de GATA6, marqueur de l'EPr. *Nanog* est nécessaire pour l'acquisition d'une identité EPI et *Gata6* induit le devenir en EPr. La voie FGF/MAPK joue un rôle critique dans l'acquisition de l'identité EPr et la perturbation de son activité impacte directement sur le ratio EPr/EPI dans la MCI.

Je recherche des facteurs qui seraient exprimés de manière hétérogène avant la spécification des cellules internes et pourraient faire pencher la balance vers un destin ou l'autre. Pour cela, j'ai disséqué l'évolution des cellules de la MCI au sein des embryons *Nanog*^{-/-} et *Gata6*^{-/-}.

Ces embryons forment correctement le TE et la MCI qui ne se spécifie ni en EPI ni en EPr. En effet, les cellules internes des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} restent bloquées autour du stade E3.25. De manière étonnante, dans les cellules de la MCI, le facteur de transcription SOX2 est présent et ce, de manière hétérogène. De plus, grâce à des traitements inhibiteurs de la voie FGF/MAPK, je montre que cette voie n'est pas responsable de l'hétérogénéité d'expression de SOX2.

Ainsi, l'expression hétérogène de SOX2 dans les cellules internes des embryons est donc indépendante de *Nanog*, de *Gata6* et de la voie FGF/MAPK.

Mot clé : développement pré-implantatoire, Sox2, Epiblaste, FGF4, Nanog, spécification.

Abstract

During mouse blastocyst formation, the embryo consists of an outer epithelium, the trophoctoderm (TE), and the inner cell mass (ICM). The epiblast (EPI) and the primitive endoderm (PrE) are specified within the MCI in a "salt and pepper" pattern characterized by the complementary expression of NANOG, marker of EPI and *gata6*, marker of PrE. *Nanog* is mandatory to acquire an EPI identity and *Gata6* induces the PrE identity. FGF /MAPK pathway plays a critical role in the acquisition of a PrE identity and disruption of its activity directly impacts the PrE/Epi ratio within the ICM.

I'm looking for factors that would be expressed heterogeneously before the specification of internal cells and might tilt the balance towards one fate or the other. For this, I dissected the evolution of ICM cells within *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} embryos.

These embryos form properly the TE and MCI that specifies neither EPI nor PrE. Indeed, the internal cells of *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} embryos remain stuck around the stage of E3.25. Surprisingly, in the MCI cells, the transcription factor SOX2 is present and this, heterogeneously. Moreover, using inhibitors treatments of the FGF/MAPK pathway, I show that this pathway is not responsible for the heterogeneity of expression of SOX2.

Thus, the heterogeneous expression of SOX2 in the inner cells of the embryos is therefore independent of *Nanog*, *Gata6* and the FGF/MAPK pathway.

Key words : pre-implantatory development, Sox2, Epiblast, FGF4, Nanog, specification.

Sommaire

Liste des abréviations	1
Liste des figures	3
Développement embryonnaire préimplantatoire	6
A. D'une cellule à 8 cellules totipotentes, le début de l'hétérogénéité	7
B. Dérivation de cellules pluripotentes	10
C. Formation des deux premiers lignages	13
1. Polarisation, compaction et divisions asymétriques	13
2. Implications moléculaires	16
3. Les marqueurs de la MCI	25
D. Hétérogénéité au sein de la MCI	33
1. Cavitation et polarisation	33
2. La spécification des cellules de la MCI	34
3. Qui contrôle la spécification EPI vs EPr	35
4. Les acteurs de la spécification	43
5. La plasticité cellulaire est présente jusqu'au stade blastocyste tardif	51
6. Modèle de spécification	53
E. Maturation des lignages	55
1. La maturation de l'EPr	55
2. La maturation de l'EPI	59
Objectifs	62
Résultats	64
A. Publication méthodologique	64
B. Analyse des embryons <i>Nanog</i>^{-/-} ; <i>Gata6</i>^{-/-} mutants	74
1. Les embryons <i>Nanog</i> ^{-/-} ; <i>Gata6</i> ^{-/-} sont morphologiquement retardés	74
2. Expression de différents marqueurs au sein des embryons <i>Nanog</i> ^{-/-} ; <i>Gata6</i> ^{-/-}	75
C. Expression de SOX2 au cours du développement embryonnaire	84

D. SOX2 est exprimé dans les embryons <i>Nanog</i>^{-/-} ; <i>Gata6</i>^{-/-}	86
1. Expression de <i>Sox2</i> en fonction du temps et des génotypes	86
2. La protéine SOX2 est présente de manière hétérogène dans les embryons <i>Nanog</i> ^{-/-} ; <i>Gata6</i> ^{-/-} au stade E3.25	87
3. L'intensité d'expression de SOX2 ne varie pas en fonction des génotypes au stade E3.25	88
4. L'expression de SOX2 est toujours présente dans les embryons <i>Nanog</i> ^{-/-} ; <i>Gata6</i> ^{-/-} au stade E3.75	89
5. La présence de NANOG influence l'expression de SOX2 au stade E3.75	90
E. Effet de la voie MAPK sur l'expression de SOX2	92
1. Les acteurs de la voie FGF sont présents dans les embryons <i>Nanog</i> ^{-/-} ; <i>Gata6</i> ^{-/-}	92
2. L'expression de SOX2 reste hétérogène en absence de la voie FGF/MAPK au stade E3.25	95
3. L'expression hétérogène de SOX2 est indépendante de <i>Nanog</i> , de <i>Gata6</i> et de la voie FGF/MAPK au stade E3.75	96
4. Confirmation de l'expression hétérogène de SOX2 dans les embryons <i>Nanog</i> ^{-/-} ; <i>Gata6</i> ^{-/-} traités avec les inhibiteurs de la voie FGF/MAPK	98
F. Effet de l'expression exogène de FGF4 sur l'expression de SOX2	100
1. L'expression exogène de FGF4 entraîne une expression cytoplasmique de SOX2	100
2. L'expression de SOX17 et OCT4 est nucléaire lors du traitement des embryons avec du FGF4	101
3. <i>Nanog</i> reste exprimé dans les embryons <i>Gata6</i> ^{-/-} traités au <i>Fgf4</i>	102
4. Expression de SOX2 dans les embryons <i>Nanog</i> ^{-/-} ; <i>Gata6</i> ^{-/-} traités avec du FGF4 exogène	103
Discussion	105
A. Développement des embryons <i>Nanog</i>^{-/-} ; <i>Gata6</i>^{-/-}	105
1. Développement morphologique	105
2. Expression des marqueurs du TE	106
3. Expression de <i>Nanog</i> et <i>Gata6</i>	107
4. Expression des marqueurs de l'EPI et de l'EPr	108
B. Expression hétérogène de SOX2 au sein des embryons	110
C. Expression des acteurs de la voie de signalisation FGF/MAPK	113
1. Expression de <i>Fgf4</i>	113
2. Expression de <i>Fgfr2</i>	114
3. Expression de <i>Dusp4</i>	115

Conclusion	118
Matériels et Méthodes	120
A. Obtention des embryons	120
B. Culture d'embryons <i>ex vivo</i>	121
C. Immunofluorescence	122
D. Calcul de l'intensité des cellules	122
E. Analyses statistiques	123
F. Analyse RT qPCR sur la MCI	123
Références bibliographiques	126

Liste des abréviations

Acox3 :	Acyl-CoA Oxidase 3	FGF :	Fibroblast growth factor
Amot :	Angiomotine	FGFR :	Fibroblast growth factor receptor
Ap2γ :	Activator protein 2	Gata :	GATA Binding Protein
aPKC :	Atypical protein kinase C	Grb2 :	Growth-factor-receptor-bound protein
BMI1 :	Polycomb Ring Finger	GSK :	Glycogen synthase kinase
BMP :	Bone morphogenetic protein	Hand1 :	Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 1
BrdU :	Bromodésoxyuridine	HMG :	High-mobility group
Camk :	Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase	ID2 :	Inhibitor Of DNA Binding 2
CARM1 :	Coactivator Associated Arginine Methyltransferase	iPSC :	Induced pluripotent stem cells
CDX :	Caudal Type Homeobox	JAK/STAT :	Janus kinase/ Signal Transducer And Activator Of Transcription
Cripto :	Cryptic Family Protein	KD :	Knocked Down
CSDE1 :	Cold Shock Domain Containing E1	Klf :	Kruppel-Like Factor
DAB2 :	Disabled-homolog	KO :	Knocked Out
Dapi :	4',6-diamidino-2-phénylindole	KRT :	Cytokératine
Dusp :	Dual Specificity Phosphatase	LATS :	Large Tumor Suppressor Kinase
E :	Jour embryonnaire	Lif :	Leukemia inhibitory factor
EOMES :	Eomesodermine	MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase
EPI :	Epiblaste	MCI :	Masse cellulaire interne
EPr :	Endoderme primitif	MEK :	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
ERK :	Mitogen-Activated Protein Kinase 1	MOB :	Mps One Binder Kinase Activator
ES :	Cellule souche embryonnaire	MZ :	Maternel/Zygotique

Na/K ATPase :	Pompe Sodium potassium adénosine triphosphatase	Stat :	signal transducer and activator of transcription
Nanog :	Homeobox Transcription Factor Nanog	TAZ :	WW Domain Containing Transcription Regulator 1
NES :	Nuclear export signal	TE :	Trophectoderme
Nf1 :	Neurofibromin 1	TEAD :	TEA Domain Transcription Factor
NLS :	Nuclear localisation signal	TGC :	Cellules trophoblastiques géantes
Nodal :	Nodal Growth Differentiation Factor	TGF :	Transforming growth factor
Notch :	Translocation-Associated Notch Protein	TS :	Cellule souche du trophoctoderme
OCT4 :	Octamer-binding transcription factor	XEN :	Cellule souche de l'endoderme extra-embryonnaire
Par6 :	Partitioning defection 6	YAP :	Yes-associated protein
PDGF :	Platelet derived growth factor	ZO :	Zonula Occludens-1
Pecam :	Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule		
PLAT :	T-Plasminogen Activator		
Pou :	Pit-Oct-Unc		
PRDM14 :	PR Domain-Containing Protein 14		
Rex :	RNA Exonuclease 1 Homolog		
RNAi :	RNA inhibitor		
RTK :	Recepteur tyrosine kinase		
Sall4 :	Spalt-Like Transcription Factor 4		
SAV :	Salvador Family WW Domain Containing Protein 1		
shRNA :	short hairpin ARN		
siRNA :	small interference ARN		
SOX :	Sex determining region Y-box		

Liste des figures

Figure 1 : Stade pré-implantatoire du développement embryonnaire chez la souris.

Figure 2 : Cinétique d'OCT4 et allocation des lignées cellulaires dans l'embryon précoce.

Figure 3 : Processus mécanique contrôlant la compaction.

Figure 4 : Localisation apico-basale des protéines de polarité après la phase de compaction.

Figure 5 : Divisions symétriques et asymétriques.

Figure 6 : Expression de CDX2 durant le développement pré-implantatoire.

Figure 7 : Contrôle de la ségrégation entre TE et EPI par la voie Hippo.

Figure 8 : Localisation de SOX2 au sein des cellules de l'embryon.

Figure 9 : Expression de SOX2 durant le développement pré-implantatoire.

Figure 10 : Expression de NANOG et GATA6 durant le développement pré-implantatoire.

Figure 11 : Expression des marqueurs de la voie de signalisation Fgf au cours du développement.

Figure 12 : La voie de signalisation FGF/FGFR.

Figure 13 : Effet de la voie de signalisation FGF sur des embryons en culture.

Figure 14 : Analyse des embryons *Gata6*^{-/-}.

Figure 15 : Analyse des embryons *Nanog*^{-/-}.

Figure 16 : Sauvetage de l'expression de SOX17 et GATA4 par traitement avec du FGF4 exogène dans les embryons *Nanog*^{-/-}.

Figure 17 : Génération de deux populations dans la MCI.

Figure 18 : Modèle de la spécification dans l'embryon pré-implantatoire.

Figure 19 : Conséquence de l'association d'OCT4 avec différents membres de la famille des SOX dans les cellules ES.

Tableau 1 : Pourcentage d'embryons dans chaque génotype en fonction du stade de prélèvement.

Figure 20 : Distribution des embryons collectés dans chaque génotype en fonction de leur morphologie.

Figure 21 : Quantification de l'expression ARN des marqueurs du TE comparée entre embryons entiers et MCI au stade E3,75.

Tableau 2 : Nombre d'embryons analysés en RT qPCR en fonction du stade de développement et du génotype.

Figure 22 : Quantification de l'expression ARN des marqueurs du TE au cours du développement embryonnaire.

Figure 23 : Quantification de l'expression ARN d'*Oct4* au cours du développement embryonnaire.

Figure 24 : Expression protéique d'OCT4 dans les embryons doubles mutants *Nanog*^{-/-}; *Gata6*^{-/-}.

Figure 25 : Quantification de l'expression ARN de *Nanog* et *Gata6* au cours du développement embryonnaire.

Figure 26 : Quantification de l'expression ARN des marqueurs de l'EPI au cours du développement embryonnaire.

Figure 27 : Quantification de l'expression ARN des marqueurs de l'EPr au cours du développement embryonnaire.

Figure 28: Expression protéique de PDGFR α en fonction du génotype des embryons.

Figure 29 : Expression protéique de SOX2 et NANOG au cours du développement embryonnaire.

Figure 30 : Quantification de l'expression ARN de *Sox2* au cours du développement embryonnaire.

Figure 31 : Expression protéique de SOX2 au stade E3.25 dans différentes combinaisons de mutants *Nanog* et *Gata6*.

Figure 32 : Intensité de l'expression protéique de SOX2 au stade E3.25 en fonction du génotype des embryons.

Figure 33 : Expression protéique de SOX2 au stade E3.75 en fonction du génotype des embryons.

Figure 34 : Intensité de l'expression protéique de SOX2 au stade E3.75 en fonction du génotype des embryons.

Figure 35 : Quantification de l'expression ARN des marqueurs de la voie FGF/MAPK au cours du développement embryonnaire.

Figure 36 : Expression protéique de SOX2 et NANOG après un traitement aux inhibiteurs de la voie FGF/MAPK jusqu'au stade E3.25 en fonction du génotype des embryons.

Figure 37 : Expression protéique de SOX2 et NANOG après un traitement aux inhibiteurs de la voie FGF/MAPK jusqu'au stade E3.75 en fonction du génotype des embryons.

Figure 38 : Expression protéique de SOX2 et NANOG après un traitement aux inhibiteurs de la voie des RTK jusqu'au stade E3.75 en fonction du génotype des embryons.

Figure 39 : Expression protéique de SOX2 et NANOG après un traitement au FGF4 exogène jusqu'au stade E3,75.

Figure 40 : Expression protéique de SOX17 et OCT4 après un traitement au FGF4 exogène.

Figure 41 : Expression protéique de SOX2 et NANOG dans les embryons simples mutants *Gata6*^{-/-} après un traitement au FGF4 exogène.

Figure 42 : Modèle de la spécification dans l'embryon pré-implantatoire.

Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés lors de l'étude.

Introduction bibliographique

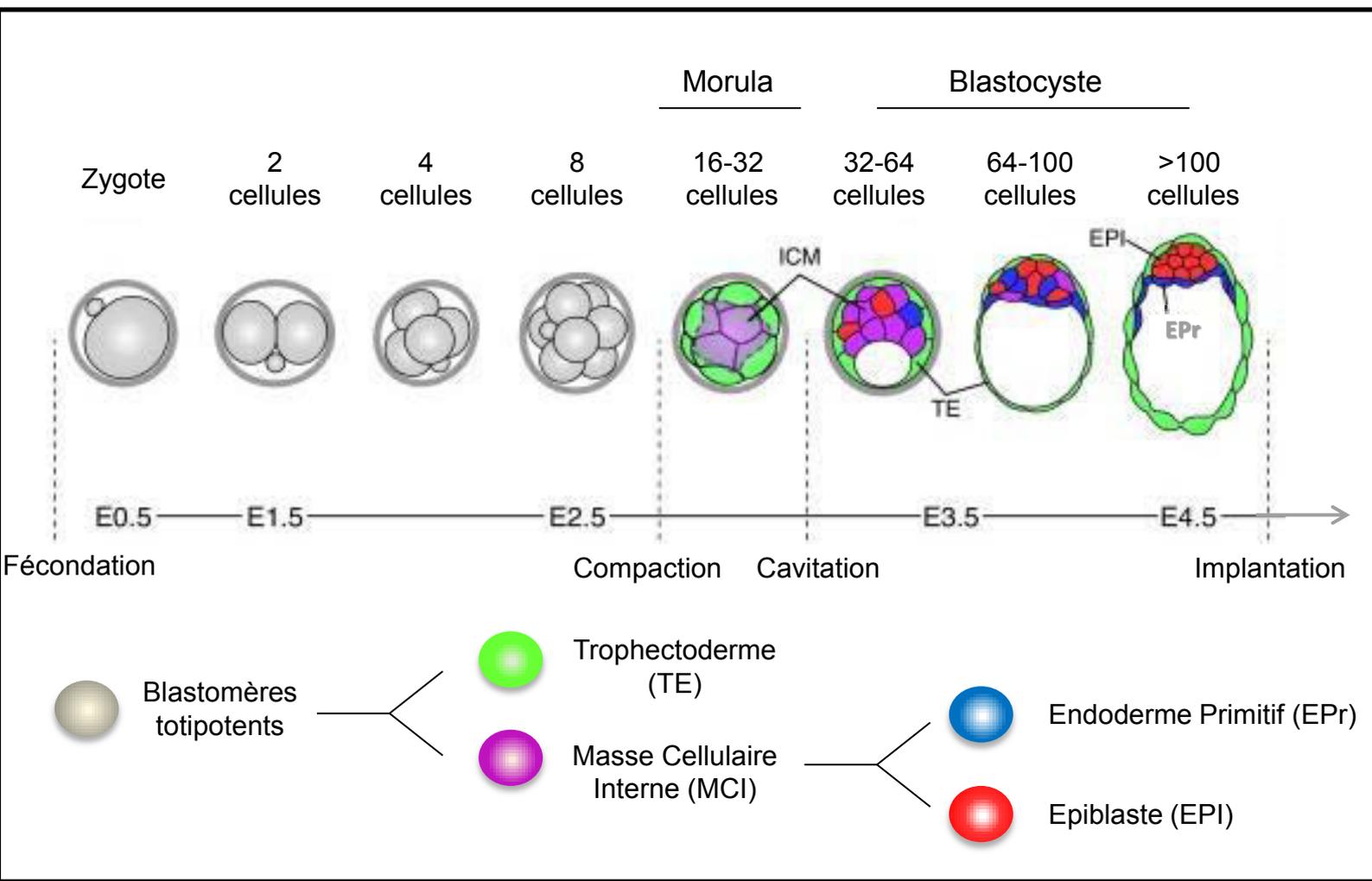


Figure 1 : Stade pré-implantatoire du développement embryonnaire chez la souris.
 (adaptée de Saiz *et al*, 2015)

Développement embryonnaire préimplantatoire

Le développement préimplantatoire s'étend de la fécondation jusqu'à l'implantation de l'embryon dans l'utérus, qui se produit chez la souris aux alentours de 4,5 jours de développement (E4.5). A ce stade, l'embryon est constitué de trois lignages morphologiquement et fonctionnellement distincts : le trophoctoderme (TE), l'épiblaste (EPI) et l'endoderme primitif (EPr). (Fig. 1)

Chacun de ces lignages participe ensuite à la formation des tissus embryonnaires et extra-embryonnaires. Le TE contribue à la formation du placenta, l'EPr à la formation du sac vitellin et l'EPI donne tous les tissus du futur fœtus ainsi qu'une partie des tissus extra-embryonnaires.

Avant son implantation dans la corne utérine, l'embryon va passer par différentes étapes développementales et notamment la différenciation des cellules externes et internes en TE et MCI (Masse Cellulaire Interne) respectivement ainsi que la spécification de l'EPI et de l'EPr au sein de la MCI.

A. D'une cellule à 8 cellules totipotentes, le début de l'hétérogénéité

Après la fécondation, l'embryon passe par trois phases successives de division. Ces divisions permettent la formation d'un embryon composé de 8 blastomères (stade 8 cellules) après 2,5 jours de développement (E2.5).

A ce stade, toutes les cellules sont totipotentes, c'est-à-dire que chacune d'entre-elles peut donner chacun des tissus extra-embryonnaires et embryonnaires (Kelly, 1977). Toutefois, il existe déjà, à partir du stade 4 cellules, une certaine hétérogénéité entre ces cellules.

Tout d'abord, à 4 cellules, il existe une hétérogénéité d'expression de gènes entre les cellules sœurs issues d'une même cellule. Certains gènes exprimés de manière bimodale entre cellules sœurs, montrent une corrélation ou une anti-corrélation avec d'autres gènes (comme *Acox3* et *Camk1d*), ce qui suggère que cette hétérogénéité n'est pas due à une expression transcriptionnelle aléatoire (Biase, Cao, & Zhong, 2014; Piras, Tomita, & Selvarajoo, 2014).

De plus, le suivi de chaque cellule individuellement au sein d'un embryon a permis de mettre en évidence une certaine hétérogénéité entre ces cellules dans leur contribution aux différents lignages.

En effet, si le suivi des cellules filles issues de la deuxième division (2 à 4 cellules) montre une distribution aléatoire au sein des tissus de l'embryon, il existe un biais pour les cellules suivies à partir du stade 4 cellules. Ainsi, dans 30% des cas, la progéniture d'une cellule issue d'un embryon à 4 cellules contribuerait uniquement au TE (Fujimori, 2003; Piotrowska-Nitsche & Zernicka-Goetz, 2005; Tabansky *et al.*, 2013).

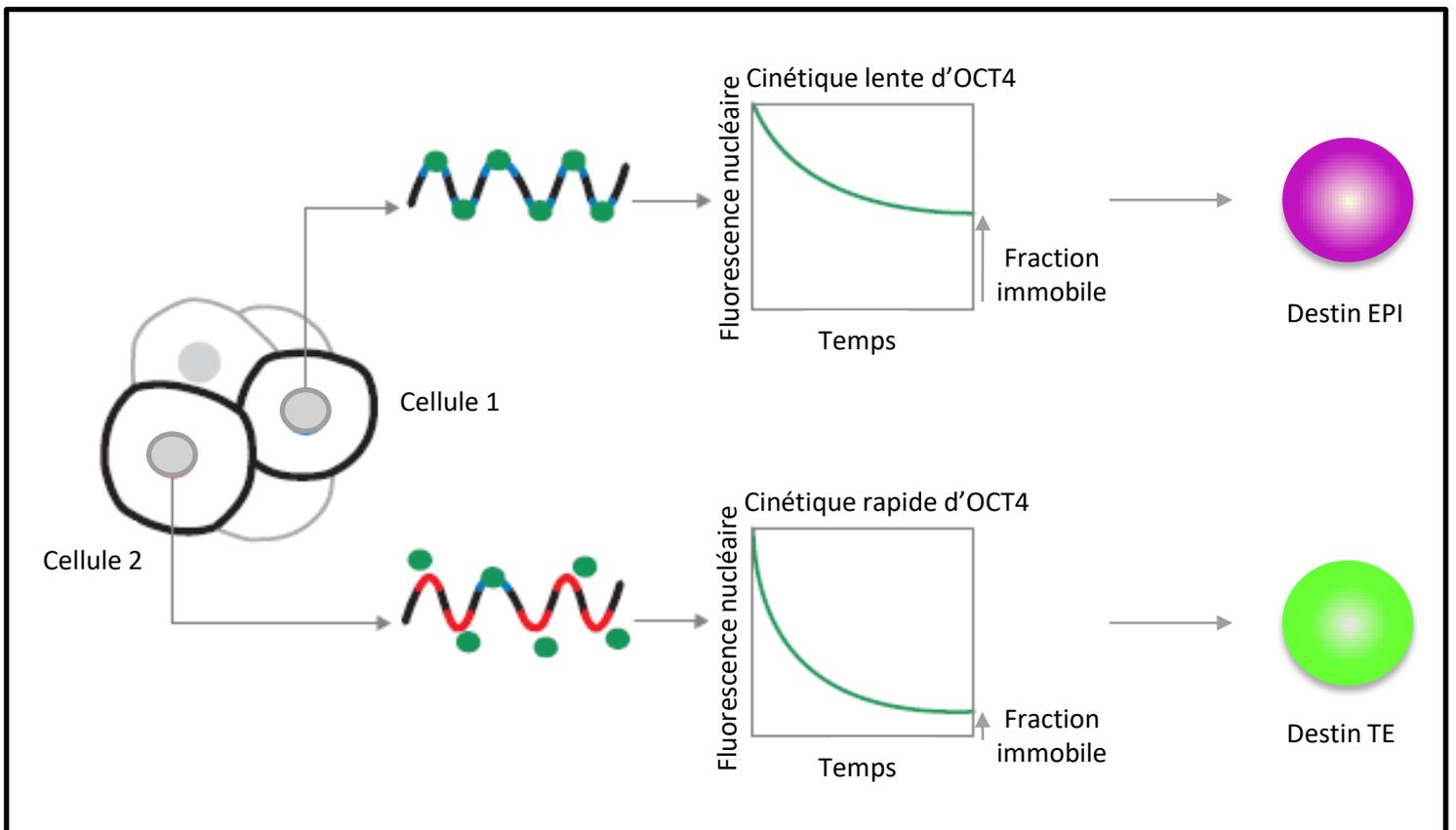


Figure 2 : Cinétique d'OCT4 et allocation des lignées cellulaires dans l'embryon précoce.

(issue de Plachta *et al*, 2011)

L'accès au site de fixation d'OCT4 sur l'ADN diffère entre les cellules, probablement dû à une structuration de la chromatine différente. Le blocage de ces sites par d'autres facteurs en excès entraîne une augmentation du renouvellement d'OCT4. Les cellules avec une large fraction immobile et une faible cinétique d'OCT4 contribueront préférentiellement à la MCI, tandis que les cellules avec une faible fraction immobile et une forte cinétique contribueront plus au TE.

En outre, il existe à partir du stade 4 cellules une hétérogénéité de certaines marques d'histone. Ces marques sont les cibles de la *H3 arginine methyltransférase* (CARM1) comme par exemple la marque H3R26me (Torres-Padilla *et al.*, 2007). De plus, PRDM14, un autre acteur épigénétique qui interagit avec CARM1, est également distribué de manière hétérogène au stade 4 cellules (Burton *et al.*, 2013). Une différence d'expression entraîne les progénitures vers des destins différents. En effet, augmenter le niveau de cette marque dans une cellule, par une surexpression de CARM1 ou de PRDM14 oriente la progéniture de celle-ci vers un destin d'EPI. De plus, il a été montré par corrélation que les cellules présentant une plus faible intensité de H3R26me pourraient contribuer principalement au TE. Donc, la présence d'une hétérogénéité des informations épigénétiques au sein des cellules d'un embryon à 4 cellules peut favoriser un biais dans le destin de leur progéniture (Torres-Padilla *et al.*, 2007; Burton *et al.*, 2013). Toutefois, les embryons mutants zygotiques pour *Carm1* et *Prdm14* ne possèdent pas de phénotype particulier à ces stades précoces du développement. (Yadav *et al.*, 2003; Yamaji *et al.*, 2008).

Enfin, à ce stade il existe également une hétérogénéité cellulaire pour le dynamisme de l'expression d'OCT4 (POU5F1) qui est un facteur de transcription impliqué dans la pluripotence et dans le développement embryonnaire précoce. Bien que la protéine OCT4 soit uniformément exprimée au sein des cellules d'un embryon à 4 cellules, le renouvellement de celle-ci varie entre les différents blastomères. Il est ainsi possible de regrouper les blastomères en deux groupes : les cellules qui possèdent un important métabolisme protéique d'OCT4 et les cellules avec une forte part immobile. Cette différence de cinétique est principalement due à une différence dans l'accès aux sites de fixation à l'ADN spécifique d'OCT4, sûrement à cause d'une structuration de la chromatine différente. Les cellules du deuxième groupe vont contribuer de manière plus importante à l'EPI (Fig. 2) (Plachta *et al.*, 2011).

Finalement, *Oct4* et *Sox2* sont exprimés de manière très hétérogène entre les différents blastomères au stade 4 cellules (Goolam *et al.*, 2016)

Il existe donc à partir du stade 4 cellules une hétérogénéité entre les différents blastomères d'un embryon à la fois au niveau génétique, épigénétique et métabolique. Cette hétérogénéité précoce va aider à briser la symétrie présente dans l'embryon jusqu'à ce stade et donc favoriser la mise en place des premiers lignages.

B. Dérivation de cellules pluripotentes

Il est possible de dériver des cellules de chacun des trois premiers lignages de l'embryon. Ces cellules ont pour particularité d'être pluripotentes : elles peuvent se différencier en différents types de tissus. Elles ont une capacité d'auto-renouvellement c'est-à-dire qu'elles peuvent également se répliquer indéfiniment et sont capables de proliférer en culture.

Pour reproduire le développement embryonnaire, les cellules souches sont exposées à des signaux qui provoqueront la différenciation cellulaire. Il est également possible de former des structures tridimensionnelles qui récapitulent les trois feuilletts embryonnaires : les corps embryoïdes. Ce sont des colonies sphéroïdes qui se créent quand les cellules sont mises en suspension.

- *Cellules ES, iPSC et EpiSC, reflet de l'EPI*

Les cellules ES ont été isolées grâce à la culture de blastocystes sur des fibroblastes servant de cellules nourricières (Martin, 1981; Evans & Kaufman, 1981). Les cellules ES expriment les marqueurs de pluripotence OCT4, NANOG et SOX2. Ces trois gènes forment les régulateurs principaux de la pluripotence des cellules ES (Niwa, Miyazaki, & Smith, 2000; Masui *et al.*, 2007; Chambers *et al.*, 2007). Elles présentent donc des caractéristiques de l'EPI de blastocystes au stade E4.5 (Boroviak *et al.*, 2015). Ces cellules ajoutées en quantité suffisante lors de la formation de blastocyste conduisent à la formation de chimère.

L'amélioration des méthodes de culture dispense désormais de la présence des cellules nourricières pour maintenir la pluripotence. L'utilisation du LIF (Leukemia inhibitory Factor) et de sérum de veau foetal permet de les maintenir indifférenciées en absence de cellules nourricières (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988). De plus, il a été montré que l'ajout de BMP4 permettait de s'affranchir du sérum (Ying *et al.*, 2003). Le maintien de l'état indifférencié est induit par l'activation du facteur de transcription *Stat3* dû à sa phosphorylation dépendante du LIF. De plus, les

embryons mutants pour *Stat3* présentent des défauts de maintenance de la MCI. Toutefois, la formation de la MCI n'est pas impactée ce qui confirme que les cellules ES sont le reflet des cellules EPI à un stade plus tardif (Do *et al.*, 2013).

Finalement, des cellules souches ont été obtenues à partir d'EPI issu d'embryons postimplantatoires (E5.5-E5.75). Il s'agit des cellules souches épiblastiques (EpiSC) (Brons *et al.*, 2007). Tout comme les cellules ES, les EpiSC expriment les marqueurs OCT4, NANOG et SOX2. En revanche, elles présentent de nombreuses différences par rapport aux cellules ES. Tout d'abord, les EpiSC ne peuvent pas être dérivées à partir du milieu classiquement utilisé pour les cellules ES. Leur milieu de dérivation nécessite la complémentation en Activine combinée au ligand FGF2. De plus, ces cellules s'intègrent mal lors de la formation de chimères à l'inverse des cellules ES. L'analyse globale du profil d'expression des gènes par microarrays a montré que les cellules EpiSC sont transcriptionnellement plus proches des cellules issues de l'EPI tardif que des cellules ES (Brons *et al.*, 2007; Nichols & Smith, 2009).

- *Les cellules XEN, reflet de l'EPr*

Les cellules XEN (Extra-embryonic endoderm) ont été isolées à partir de blastocystes cultivés sur des cellules nourricières en présence du ligand FGF4 (Kunath, 2005).

La signalisation PDGF (Platelet Derived Growth Factor) est requise pour leur isolement (Artus, Panthier, & Hadjantonakis, 2010), tout comme *Gata6* et *Sox17* (Niakan *et al.*, 2010). Elles expriment différents marqueurs de l'EPr (GATA4, GATA6) et n'expriment pas les marqueurs de l'EPI (NANOG, OCT4) ni du TE (CDX2, EOMES) (Kunath, 2005; Niakan *et al.*, 2010). En conclusion, les cellules XEN sont le reflet de l'EPr. La production de chimères avec ces cellules montre qu'elles ne participent pas à la formation de l'EPI ni du TE mais qu'elles participent majoritairement à la formation de l'EPr (Kunath, 2005).

Ces cellules peuvent aussi être obtenues par expression ectopique de facteurs spécifiques de l'EPr. Ainsi l'expression de *Gata6* ou *Gata4* seule est suffisante pour convertir les cellules ES en cellules XEN (Fujikura *et al.*, 2002; Shimosato, Shiki, & Niwa, 2007). Ces cellules induites partagent les mêmes caractéristiques fonctionnelles et moléculaires que les cellules XEN dérivées de blastocyste et notamment leur contribution à l'EPr dans les embryons chimères (Shimosato *et al.*, 2007). Des cellules XEN-Like ont aussi pu être générées par l'expression ectopique de *Sox17* (Niakan *et al.*, 2010; Rugg-Gunn *et al.*, 2012). Cependant, l'expression de *Sox17* seule n'est pas suffisante pour obtenir des cellules XEN puisque ces cellules maintiennent une expression de gènes associés aux cellules ES comme *Nanog* et *Oct4* (Niakan *et al.*, 2010; Rugg-Gunn *et al.*, 2012; Aksoy *et al.*, 2013). Toutefois, *Sox17* est requis pour la dérivation des cellules XEN (Niakan *et al.*, 2010; Artus *et al.*, 2010).

- *Les cellules TS, reflet du TE*

Les cellules TS ont été établies à partir d'embryons à E3.5 et à partir d'Ectoderme Extra-Embryonnaire du stade E6.5. Elles ont été obtenues par culture sur des cellules nourricières en présence du ligand FGF4 et d'héparine. Elles expriment les marqueurs du TE comme *Cdx2*, *Eomes*, *Gata3*, *Fgfr2* et n'expriment pas *Oct4* (Tanaka *et al.*, 1998; Home *et al.*, 2009).

La formation d'embryons chimères indique que les cellules TS contribuent à la formation du TE et de ses dérivés mais qu'elles ne participent pas à la formation de l'EPI ou de l'EPr (Tanaka *et al.*, 1998). Lorsque ces cellules sont cultivées en absence du ligand FGF4, elles prennent une morphologie de TGC (Cellules trophoblastiques géantes) avec l'apparition de cellules polyploïdes (Tanaka *et al.*, 1998). Toutes ces observations permettent de conclure que les cellules TS se différencient spontanément en TGC en absence de FGF4 dans le milieu de culture.

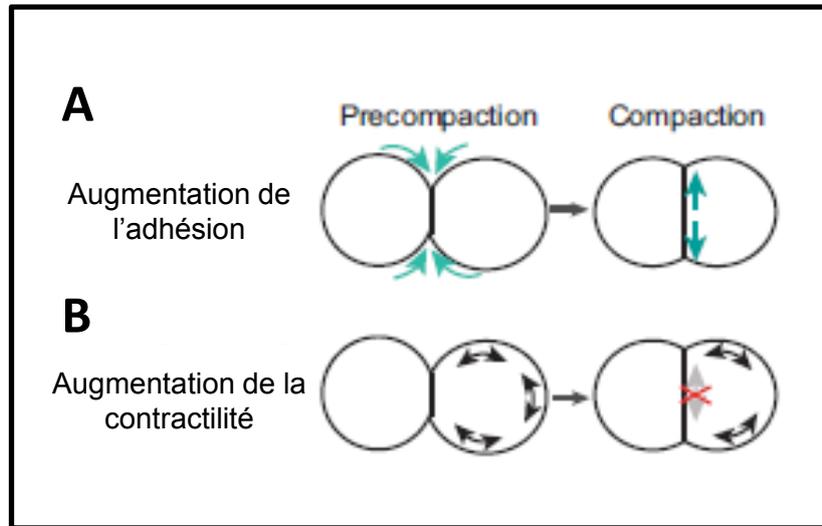


Figure 3 : Processus mécanique contrôlant la compaction.

(adaptée de Chazaud *et al*, 2016)

A : Une augmentation de l'adhésion entre cellules favorise un accroissement du contact cellule à cellule.

B : Une augmentation de la surface de contractilité corticale contrôle la compaction. Dans ce modèle, le contact entre cellule médié par *Cdh1* empêche une augmentation de la contractilité à ce niveau.

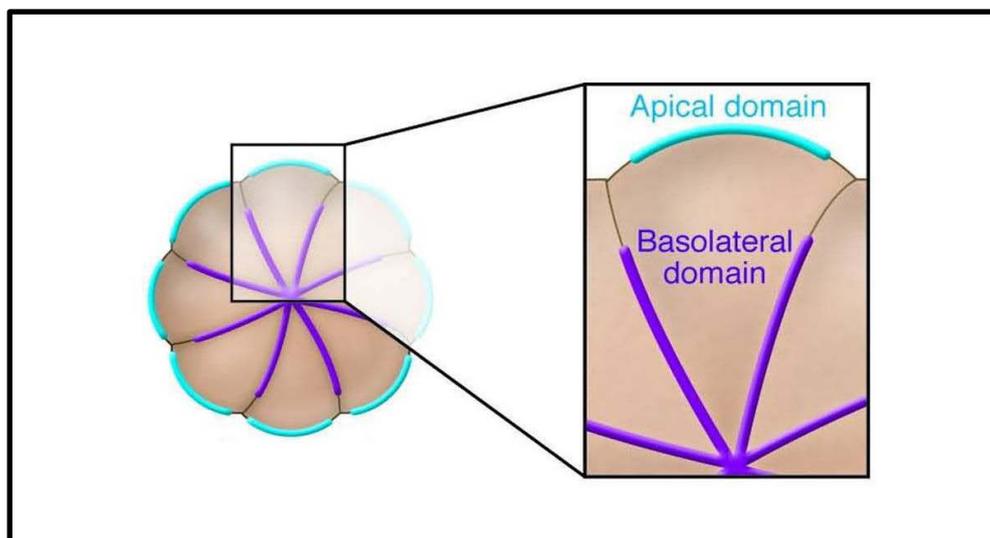


Figure 4 : Localisation apico-basale des protéines de polarité après la phase de compaction.

(issue de Cockburn *et al*, 2010)

Les protéines aPKC et PAR6 se localisent au domaine apical (cyan) alors que la protéines E-CADHÉRINE se localise au niveau basolatéral (violet).

C. Formation des deux premiers lignages

1. Polarisation, compaction et divisions asymétriques

La première différenciation cellulaire implique la formation de deux populations distinctes qui diffèrent à la fois par leur position et par leur destinée : d'une part, le TE qui se situe sur l'extérieur de l'embryon et d'autre part, la MCI pluripotente qui se trouve à l'intérieur (Fig. 1).

Une fois spécifié, le TE forme un épithélium avec des jonctions serrées qui vont favoriser la formation de la cavité blastocœlique.

- *Mécanisme de la compaction*

Dans un premier temps, les blastomères des embryons à 8 cellules vont se polariser et se compacter pour former la morula (Ziomek & Johnson, 1980). Au cours de la compaction, les blastomères qui étaient auparavant sphériques vont s'aplatir les uns contre les autres. Cela va permettre de minimiser la surface totale de l'embryon et rendre chaque blastomère morphologiquement indiscernable. La compaction nécessite une augmentation de l'interaction entre les cellules. Elle est conduite par une augmentation des tensions et de la contractilité de manière autocrine au niveau des surfaces externes (Fig.3). L'augmentation de la surface d'interaction cellulaire entraîne également une réduction de la surface exposée au milieu. La contractilité va donc permettre le positionnement des cellules au sein de l'embryon et donc orienter leur destin (Fig.3) (Maître *et al.*, 2016).

Les interactions entre cellules sont alors caractérisées par la présence d'E-CADHERINE (*Cdh1*). Les cellules des embryons mutants pour l'*e-cadhérine* expriment normalement les marqueurs du TE comme *Cdx2* et peuvent donc se différencier en TE mais ne forment jamais de cavité blastocœlique ni d'épithélium (Stephenson, Yamanaka, & Rossant, 2010). De plus, la présence d'E-CADHERINE

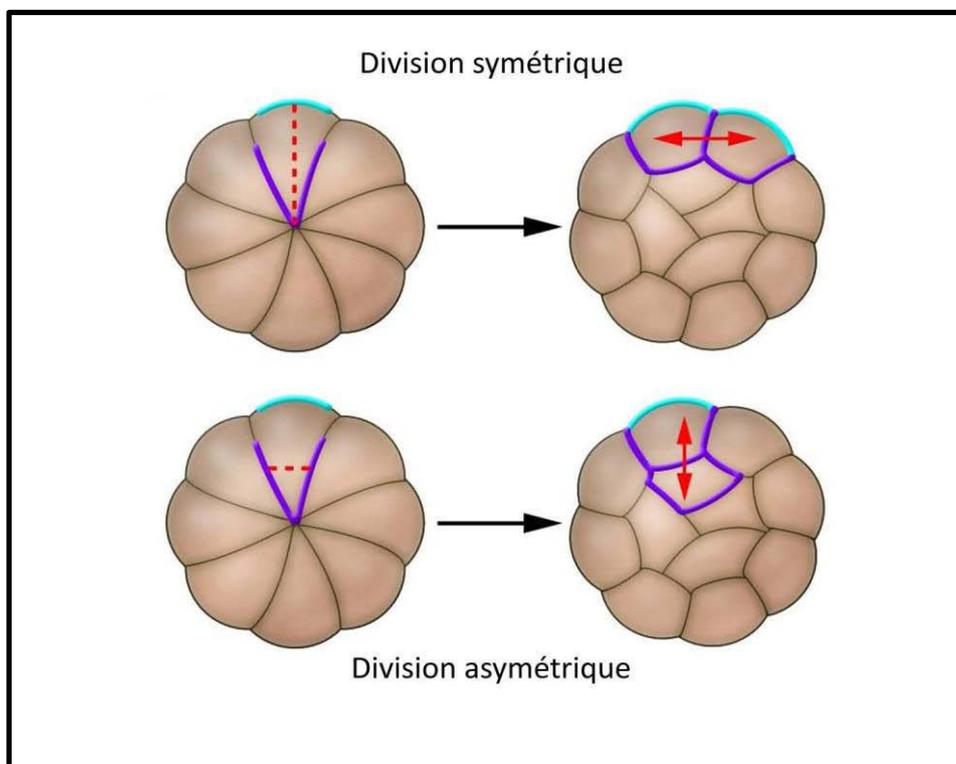


Figure 5 : Divisions symétriques et asymétriques.

(issue de Cockburn *et al*, 2010)

Les pointillés rouges représentent l'axe de division et les flèches doubles indiquent les deux cellules-filles obtenues après la mitose.

au niveau des jonctions cellulaires permet d'éviter une augmentation de la contractilité à ce niveau pour favoriser la compaction (Fig. 3) (Maître *et al.*, 2015).

- *Polarisation et divisions asymétriques*

Au stade 8 cellules, les cellules vont également se polariser : un pôle basal et un pôle apical vont être établis. Le domaine externe apical est caractérisé par l'expression d'aPKC et *Par6*. La progéniture de cellules traitées avec un dominant négatif aPKC va avoir tendance à s'internaliser (Plusa, 2005) et les cellules externes, qui présentent une expression plus faible d'aPKC auront tendance à s'internaliser pour contribuer à la MCI (Fig. 4) (Morris, Guo, & Zernicka-Goetz, 2012).

La compaction et la polarisation des cellules vont permettre l'internalisation de certaines cellules et donc orienter leur devenir.

Par la suite, durant le passage de 8 à 16 cellules et de 16 à 32 cellules, les cellules peuvent se diviser selon deux axes possibles : soit symétriquement selon l'axe interne-externe qui pourra permettre la formation de deux cellules polarisées, soit asymétriquement favorisant la formation d'une cellule polaire et une apolaire (Fig. 5).

La différence de contractilité entre les blastomères est suffisante pour permettre l'internalisation des cellules. En effet, les cellules internalisées ne possèdent pas de domaine apical et n'exigent pas une contractilité des cellules voisines. Le processus d'internalisation se rapproche plus d'un processus de tri cellulaire (Maître *et al.*, 2016). De plus, l'angle de division des cellules n'influence pas leur devenir cellulaire (Watanabe *et al.*, 2014).

La fréquence des divisions asymétriques va permettre de déterminer la proportion de cellules apolaires et polaires et donc le nombre de cellules formant la MCI et le TE. Toutefois, il existe une grande variation de fréquence des divisions asymétriques durant la transition de 8 à 16 cellules. Dans certains embryons tous les blastomères peuvent se diviser asymétriquement tandis que dans d'autres, seules une ou deux cellules subiront une division asymétrique (Anani *et al.*, 2014).

Pour compenser cette variabilité, l'embryon peut mettre en œuvre un certain nombre de mécanismes. Par exemple, il existe un processus de tri actif qui permet d'internaliser des cellules externes, qui sont apolaires, basé sur une augmentation de la contractilité (Anani *et al.*, 2014; Maître *et al.*, 2016).

Enfin, si le nombre de divisions asymétriques est faible durant la transition de 8 à 16 cellules, il augmente durant la division de 16 à 32 cellules, : en effet, plus de cellules externes vont se diviser de manière asymétrique pour équilibrer le ratio cellules externes/cellules internes (Fig. 5) (Fleming, 1987).

Tout cela permet la formation de deux populations cellulaires distinctes : les cellules externes polarisées qui formeront par la suite le TE et les cellules de la MCI non polarisées.

2. Implications moléculaires

La décision de chaque cellule de contribuer à la MCI ou au TE dépend de différents facteurs :

- leur position au sein de l'embryon : une cellule transplantée dans un embryon va adapter son destin en fonction de sa nouvelle position dans l'embryon (Hillman, Sherman, & Graham, 1972; Rossant & Lis, 1979).

- leur différence d'héritage : par exemple, lors d'une division asymétrique la cellule mère va donner une large cellule fille qui conserve le pôle apical polaire et une cellule fille plus petite qui hérite du pôle basal non polarisé (Johnson & Ziomek, 1981).

L'expression de gènes spécifiques de chacun des deux lignages, *Cdx2* (Caudal-related homeobox 2) et *Oct4* (Octamer-binding transcription factor 4) va ensuite renforcer cette décision. Alors qu'ils sont co-exprimés au stade 8-cellules, l'expression de CDX2 se restreint au TE alors que celle d'OCT4 se limite à la MCI (Palmieri *et al.*, 1994; Dietrich & Hiiragi, 2007; Ralston & Rossant, 2008; Guo *et al.*, 2010). De plus, une forte expression de CDX2 dans les cellules favorise la polarisation et augmente la fréquence de divisions symétriques (Ajduk, Biswas Shivhare, & Zernicka-Goetz, 2014).

a. CDX2, un marqueur du TE

- *Expression de CDX2 au cours du développement embryonnaire*

Le facteur de transcription CDX2 est un facteur clé spécifique du TE. Son expression débute en mosaïque au stade 8 cellules avec le début de la différenciation des cellules externes. Elle est ensuite restreinte au TE au stade E3.25

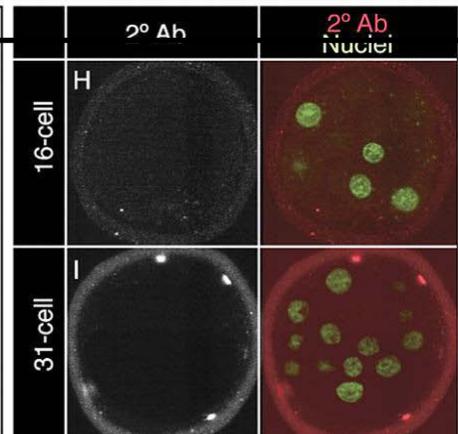
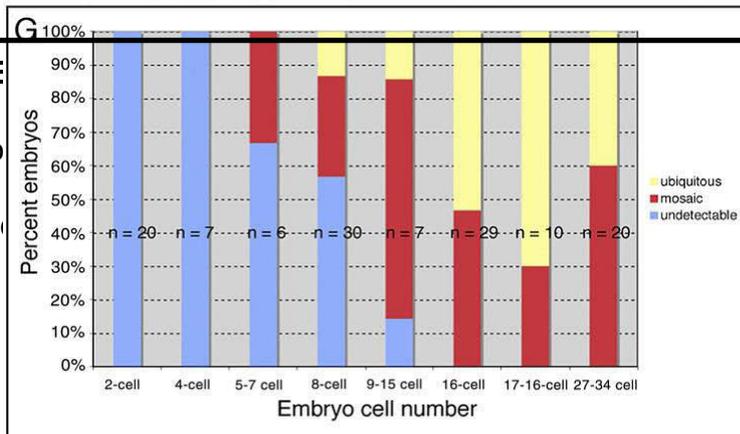
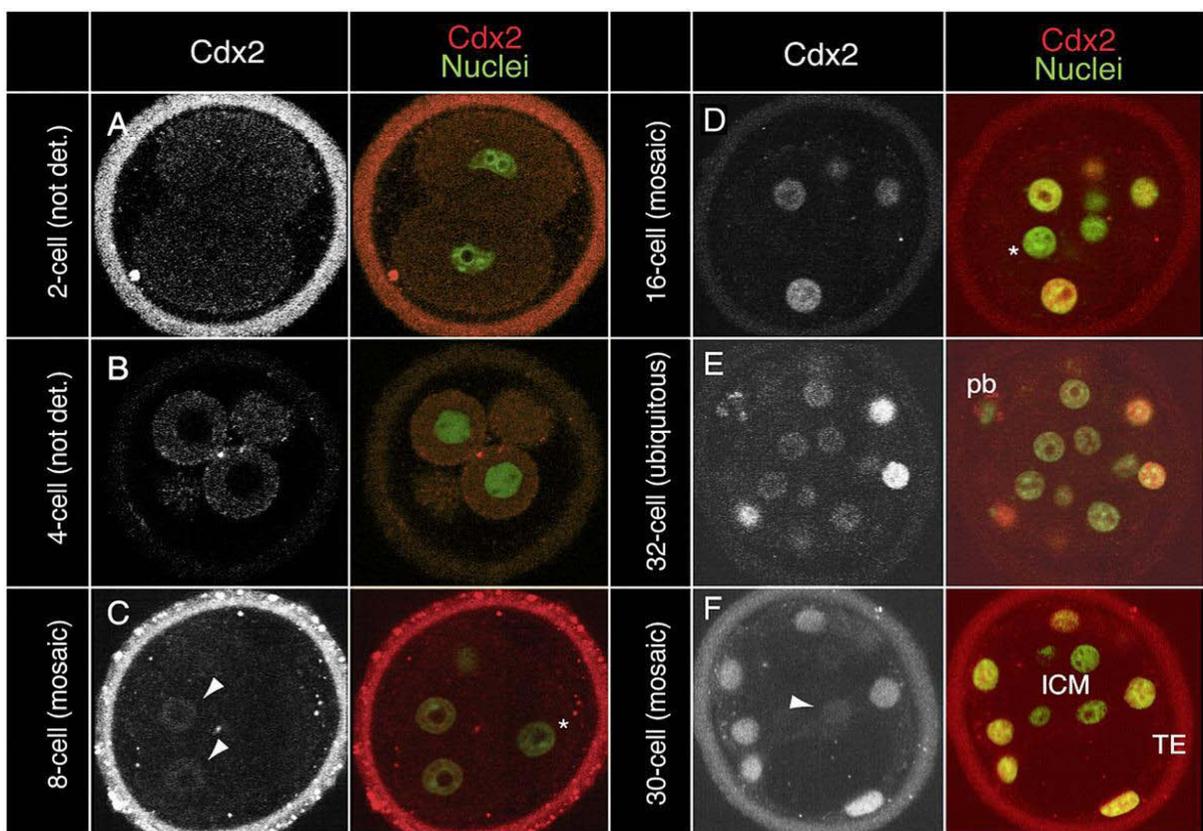


Figure 6 : E
Immunofluo
Les flèches
expression

stage E3,25.
noyaux sans

(Fig. 6) (Dietrich & Hiragi, 2007; Ralston & Rossant, 2008). Il existe également une expression réduite du transcrite maternel aux stades 2 et 4 cellules (Jedrusik *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010).

- *Rôles de CDX2 sur la cavitation et l'épithélialisation*

CDX2 est essentiel à la formation du TE fonctionnel (Strumpf, 2005). En effet, les embryons *Cdx2*^{-/-} arrivent à former une cavité blastocœlique ; toutefois ils présentent un défaut de maintien de celle-ci au stade E3.5. Ces embryons possèdent également un défaut d'éclosion, c'est-à-dire qu'ils n'arrivent pas à se libérer de la zone pellucide.

De plus, l'épithélialisation n'est pas maintenue dans ces embryons : une mauvaise localisation des marqueurs E-CADHERINE et ZO-1 (Zonula Occludens-1) a été observée (Strumpf, 2005; Wu *et al.*, 2010) entraînant une perte des jonctions serrées. Cependant, les jonctions adhérentes n'étant pas affectées, l'initiation de l'épithélialisation a lieu (Wu *et al.*, 2010). De même, l'expression et la polarisation de la protéine aPKC reste inchangée, ainsi que l'expression de KRT8 (Cytokératine 8, marqueur du TE) qui, malgré son expression diminuée, reste localisée correctement (Ralston & Rossant, 2008). Cela montre que la polarisation n'est pas affectée. Ces embryons sont donc capables de former un épithélium bien que celui-ci ne soit pas maintenu.

Ce phénotype s'accompagne de la perte de l'expression de certains transcrits spécifiques du TE plus tardifs comme *Eomes* (*Eomesodermine*) ou *Hand1*, couplée à une expression ectopique des marqueurs de la MCI (OCT4, NANOG) dans les cellules externes et à une augmentation de la mort cellulaire au niveau de ces cellules (Strumpf, 2005).

Au final, bien que la formation des blastocystes commence dans les embryons *Cdx2*^{-/-}, la formation du TE est compromise au-delà du stade blastocyste précoce.

- *Influence de Cdx2 sur le devenir cellulaire*

Afin de vérifier si CDX2 influence la position des cellules de l'intérieur vers l'extérieur, des chimères ont été formées avec des blastomères d'embryons *Cdx2*^{-/-}. Ces cellules contribuent alors à la formation du TE avec la même fréquence que des blastomères sauvages (Ralston & Rossant, 2008). Ainsi, même si CDX2 est requis pour la différenciation trophoblastique, des facteurs situés en amont de CDX2 contrôlent la position, la polarisation et l'engagement des cellules vers les destins de MCI ou de TE.

Savoir à quel moment CDX2 intervient précisément reste à ce jour une question en suspens. En effet, une équipe suggère que la protéine CDX2 issue du transcrit maternel aurait un rôle dans la différenciation du TE (Jedrusik *et al.*, 2010, 2015), tandis que d'autres équipes montrent qu'il n'existe pas d'influence de celle-ci sur le développement (Wu *et al.*, 2010; Blij *et al.*, 2012).

L'étude des embryons *Cdx2* mutants au niveau maternel et zygotique (MZ *Cdx2*^{-/-}) a fait l'objet de deux analyses séparées qui révèlent des résultats contradictoires. Tandis qu'une 1ère équipe montre que la contribution maternelle de *Cdx2* n'influence pas le développement pré-implantatoire (Blij *et al.*, 2012), une autre met en évidence que les embryons MZ *Cdx2*^{-/-} possèdent un phénotype plus sévère que les embryons *Cdx2*^{-/-} zygotiques. En effet, pour cette deuxième équipe, les embryons MZ *Cdx2*^{-/-} ont une mort cellulaire plus précoce et leur développement s'arrête au stade morula (Jedrusik *et al.*, 2015).

Ces résultats contradictoires pourraient provenir d'une différence dans le fond génétique de ces souris, ainsi que de différences dans les conditions de culture.

- *Dérivation et expression dans les cellules en culture*

La modulation de l'expression de CDX2 entraîne des phénotypes drastiques *in vitro*. Les cultures d'explants issus des embryons *Cdx2*^{-/-} ne permettent pas le développement trophoblastique. De plus, des cellules souches pluripotentes (cellules ES) peuvent être dérivées de ces embryons ce qui signifie que le développement de la MCI n'est pas affecté (Chawengsaksophak *et al.*, 2004).

En outre, CDX2 est exprimé dans les cellules TS où il est nécessaire pour leur auto-renouvellement (Niwa *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'expression ectopique de *Cdx2* dans les cellules ES entraîne leur différenciation en cellules ressemblant aux cellules TS. Elles expriment les marqueurs du TE *Fgfr2*, *Eomes* et n'expriment pas *Oct4* (Niwa *et al.*, 2005; Tolkunova *et al.*, 2006). De plus, lorsque ces cellules sont injectées dans des blastocystes, elles vont exclusivement contribuer à la formation du placenta (Niwa *et al.*, 2005)

Finalement, bien que CDX2 soit requis pour la différenciation du TE, il ne l'est pas pour l'engagement des cellules dans cette voie de différenciation (Ralston & Rossant, 2008; Wu *et al.*, 2010).

b. La voie Hippo contrôle la première décision du destin cellulaire

- *La voie Hippo*

L'importance de la voie Hippo pour la détermination des cellules en TE a été mise en évidence récemment. D'abord identifiée chez la drosophile, cette voie est conservée chez la souris et chez l'Homme (Yu & Guan, 2013). Il s'agit d'une signalisation de type Serine/Thréonine Kinase avec une activation en cascade (Fig. 7). Les composants principaux de cette voie de signalisation sont les kinases MST 1/2 (Hippo chez la drosophile) et LATS 1/2 qui ont pour cofacteurs SAV 1 et MOB

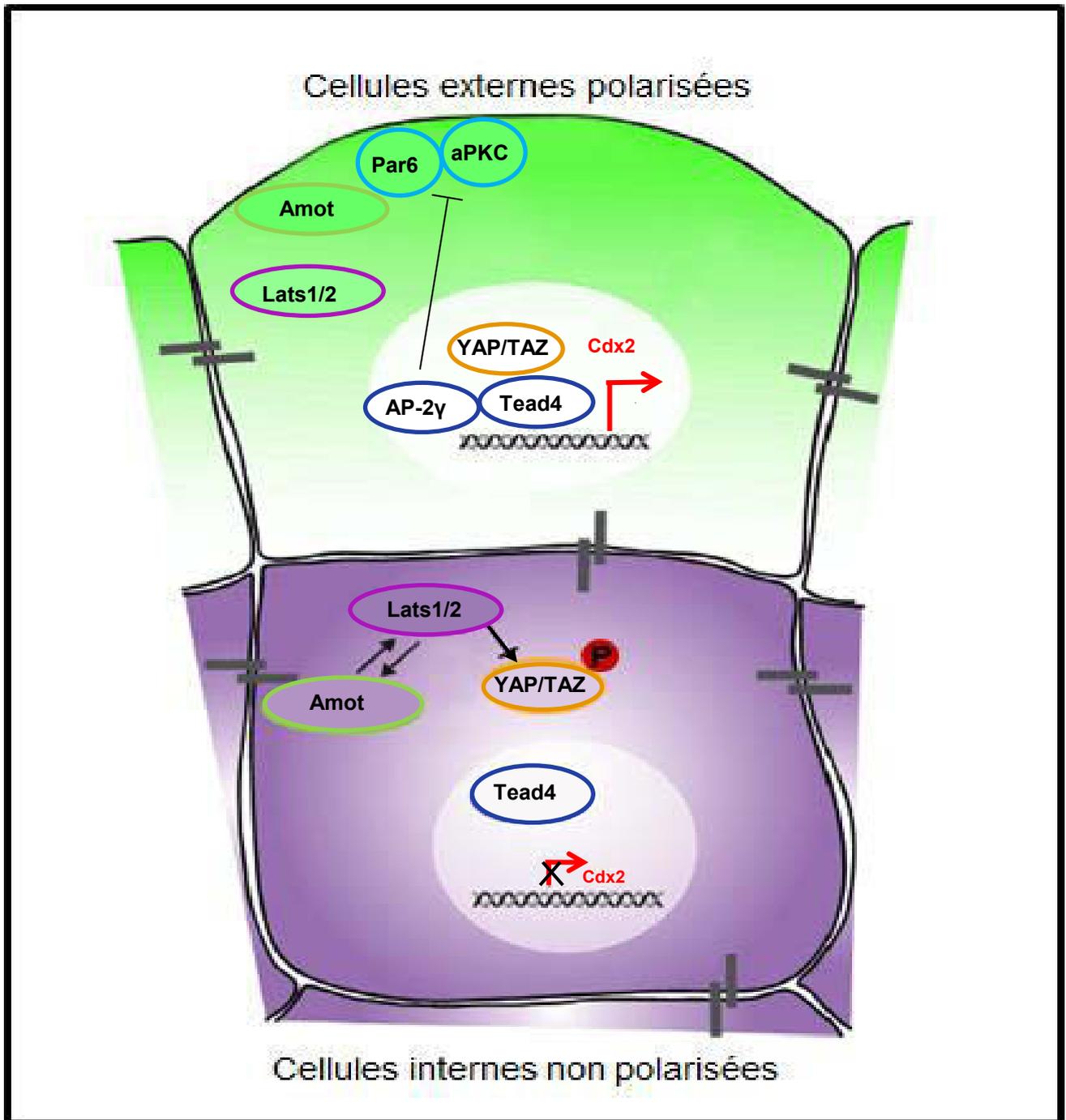


Figure 7 : Contrôle de la ségragation entre TE et EPI par la voie Hippo.

(adaptée de Graham *et al*, 2016)

L'activité de TEAD4 est régulée de manière différente entre les cellules externes et les cellules internes, ceci à cause de l'absence de polarité cellulaire entraînant une activation différentielle de la voie Hippo. Dans les cellules externes, la protéine AMOT est restreinte au pôle apical ce qui permet l'entrée dans le noyau de YAP et donc l'activation de la transcription par TEAD4 de *Cdx2*. AP2γ favorise cette transcription en inhibant les acteurs de la voie Hippo et favorisant l'expression des protéines de polarité. Dans les cellules apolaires, AMOT est localisée au niveau des jonctions adhérentes (barres grises). Elle séquestre alors YAP, qui est phosphorylé, dans le cytoplasme, ce qui inhibe l'activité de TEAD4 et l'expression de *Cdx2*.

1A/B respectivement et pour co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ. Ces derniers vont s'associer avec les facteurs de transcription avec des domaines TEA : TEAD1 à 4 pour activer la transcription. Lorsque la voie Hippo est activée, cela entraîne une augmentation de la phosphorylation de YAP par LATS1/2 empêchant son accumulation nucléaire ce qui inhibe l'activité transcriptionnelle des TEAD (Fig. 7) (Yu & Guan, 2013).

Dans l'embryon, les différences de position des cellules entraînent une différence d'activation de la voie Hippo. En effet, la voie Hippo est activée par l'absence de polarité dans les cellules internes tandis que les acteurs de cette voie sont séquestrés à la membrane dans les cellules externes.

- *Le rôle de TEAD4*

Dans l'embryon, TEAD 1, 2 et 4 sont exprimés à partir du stade 8 cellules. Les embryons *Tead4* mutants possèdent un phénotype plus sévère que les embryons *Cdx2* mutants. En effet, ces embryons ne forment pas de cavité blastocœlique. De plus, ils n'expriment ni *Cdx2*, ni *Eomes* (Yagi *et al.*, 2007). Ces résultats démontrent que TEAD4 intervient en amont de CDX2. L'absence de *Tead4* entraîne une expression de OCT4 dans toutes les cellules sans variation du nombre de cellules totales, ni de phénotype au niveau des jonctions cellulaires (β -caténine), ou de la polarité (aPKC) (Nishioka *et al.*, 2008). TEAD4 n'est donc pas requis pour la compaction des blastomères ni pour leur polarisation ou pour le développement de la MCI mais il est requis pour l'engagement des cellules vers le TE (Yagi *et al.*, 2007; Nishioka *et al.*, 2008). L'expression ectopique de *Tead4* induite par le tamoxifène dans des cellules ES en différenciation, entraîne une morphologie de cellules TS qui expriment des marqueurs du TE comme *Eomes*, *Cdx2* et *Hand1* (Nishioka *et al.*, 2009). Cela démontre que TEAD4 contrôle l'expression de nombreux gènes du TE, notamment celle de *Cdx2*.

Outre son rôle sur le contrôle de la spécification du TE, TEAD4 permet également de prévenir le stress oxydatif dans l'embryon, en limitant l'accumulation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). L'intégrité de ce processus est requise pour la formation de la cavité blastocœlique. Ce rôle est spécifique de TEAD4, puisque les embryons *Tead4* mutants expriment CDX2 et forment une cavité s'ils sont cultivés dans des conditions où le stress oxydant est réduit. TEAD4 joue donc un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie énergétique (Kaneko & DePamphilis, 2013).

Enfin, TEAD4 est exprimé dans tous les blastomères, Cependant, il n'exerce ses fonctions activatrices que dans les cellules externes (Nishioka *et al.*, 2009; Hirate *et al.*, 2012). Cela est dû à la régulation de son activité par les co-activateurs YAP et TAZ (Fig. 7) (Nishioka *et al.*, 2009).

- *La protéine YAP*

La protéine YAP est exprimée au niveau nucléaire à partir de 4 cellules, puis est restreinte aux cellules externes à partir du stade 16 cellules. Sa présence au niveau nucléaire conduit à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de TEAD4 sur *Cdx2* notamment (Nishioka *et al.*, 2009).

Dans les cellules internes, la voie Hippo est activée, ce qui entraîne une phosphorylation de YAP sur la sérine 112. La forme phosphorylée de YAP reste cytoplasmique et est dégradée. Il y a alors un arrêt de l'accumulation de YAP au niveau nucléaire et donc une inactivation de la transcription dépendante de TEAD4 (Fig. 7). A l'inverse, dans les cellules externes, la voie Hippo est inactive, ce qui favorise la localisation de la forme non phosphorylée de YAP au niveau nucléaire et donc une activation de TEAD4 et des transcrits qui lui sont associés comme *Cdx2*. La localisation nucléaire de YAP est due non seulement à la position de la cellule mais également à la localisation des marqueurs apicaux (Fig. 7) (Stephenson *et al.*, 2010).

- *Les autres acteurs de la voie Hippo*

L'inactivation des acteurs de la voie Hippo dans les embryons doubles mutants *Lats1*^{-/-} ; *Lats2*^{-/-}, entraîne une expression nucléaire de YAP dans toutes les cellules de l'embryon et une expression ectopique de CDX2 dans les cellules internes qui sont donc identifiées comme des cellules du TE (Nishioka *et al.*, 2009). De plus, l'inhibition de *Lats 1/2*, par des siRNA dans des cellules empêche la dérivation de ces cellules en cellules ES. Il existe également une redondance fonctionnelle et une autorégulation de LATS1 et LATS2 (Lorthongpanich *et al.*, 2013).

La protéine ANGIOMOTINE (AMOT), protéine de jonction, joue un rôle important dans l'activation de la voie Hippo. Une inhibition de *Amot* par des siRNA entraîne les mêmes phénotypes qu'une inhibition de la voie Hippo au sein de l'embryon. La protéine AMOT est détectée, à partir du stade 8 cellules compactées, au niveau membranaire. Elle est restreinte au pôle apical des cellules polaires au stade 16 cellules et reste plus abondante dans les cellules de la MCI au stade blastocyste.

Les membres de la famille AMOT s'associent avec l'E-CADHERINE. AMOT est donc le lien entre la polarité cellulaire et l'activation de la voie Hippo (Hirate *et al.*, 2013; Leung & Zernicka-Goetz, 2013).

- *Les autres voies impliquées*

La voie Notch joue également un rôle dans la différenciation des cellules en TE. Elle est active dans quelques cellules au stade 8 cellules et son activité est restreinte aux cellules du TE au stade E3.5. De plus, les blastomères dans lesquels la voie Notch est active vont former préférentiellement la population externe de l'embryon (Rayon *et al.*, 2014). Elle va également, en coordination avec la voie Hippo favoriser l'expression de CDX2 dans les cellules externes.

La voie Notch et la voie Hippo agissent donc ensemble dans l'embryon pré-implantatoire, pour la viabilité de l'embryon, pour favoriser l'expression de CDX2 et permettre la différenciation du TE.

Une étude de la perte et du gain de fonction du facteur de transcription AP-2 γ (TFAP2C) a mis en évidence que celui-ci est requis pour l'expression de CDX2. Pendant le passage du stade 8 cellules au stade morula, AP-2 γ potentialise les effets de la polarité cellulaire en inhibant la voie Hippo dans les cellules externes. Il facilite donc la spécification du TE en permettant la régulation de la transcription de *Cdx2* et de la polarité cellulaire (Fig. 7) (Cao *et al.*, 2015). Toutefois, les embryons mutants pour AP-2 γ au niveau maternel et zygotique conservent leur capacité à former un blastocyste (Winger, 2006).

c. Les autres marqueurs du TE

Les cellules du TE expriment également d'autres marqueurs comme GATA3 (GATA Binding Protein 3) ou EOMES.

Dans l'embryon, *Gata3* est détecté dès le zygote à des niveaux très faibles. Ce niveau augmente à partir du stade 4 cellules et se maintient jusqu'au stade blastocyste. L'ARNm *Gata3* n'est pas détecté au sein de MCI isolées par immunochirurgie, signifiant qu'il doit être exprimé exclusivement dans le TE (Home *et al.*, 2009). Ce résultat est corroboré par l'immunofluorescence de GATA3 qui montre sa co-localisation avec CDX2 (Ralston *et al.*, 2010). L'injection de shARN *Gata3* au stade 2 cellules entraîne une diminution de l'expression de *Cdx2* mais ne modifie pas celle de *Tead4*. GATA3 n'est donc pas requis pour l'initiation du TE mais il est requis pour sa maturation, notamment en favorisant l'expression de CDX2. De même, l'expression de GATA3 est toujours détectée dans les embryons *Cdx2* mutants mais est largement diminuée dans les embryons *Tead4* mutants, montrant que TEAD4

régule en parallèle l'expression de *Cdx2* et de *Gata3*. De plus, GATA3 peut se fixer et réguler directement le maintien de la transcription de *Cdx2* car celui-ci possède dans sa séquence un motif conservé GATA (Home *et al.*, 2009; Ralston *et al.*, 2010).

L'expression de *Gata3* est également enrichie dans les cellules TS. Son inhibition par RNAi entraîne une diminution de la transcription de *Cdx2* et son expression ectopique dans les cellules ES est suffisante pour induire leur différenciation en cellules ressemblant aux cellules TS (Ralston *et al.*, 2010). Cependant, elles ne peuvent pas être maintenues, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent pas être conservées en culture au cours du temps, à l'inverse des cellules obtenues par l'expression ectopique de *Cdx2* (Niwa *et al.*, 2005). GATA3 et CDX2 jouent donc des rôles différents mais il est également possible qu'ils agissent en parallèle dans le développement trophoblastique.

Concernant le gène *Eomes*, il est induit dans les cellules engagées vers un devenir trophoblastique. Ce gène code un facteur de transcription à domaine T. EOMES est détecté au niveau nucléaire dans l'ovocyte puis dans tous les blastomères au cours du développement préimplantatoire (McConnell *et al.*, 2005). Au stade blastocyste, l'expression d'EOMES se restreint au niveau du TE. Les embryons mutants pour *Eomes* meurent lors de l'implantation. Ce phénotype s'explique par un défaut de différenciation du TE. En effet, dans ces embryons mutants, il n'y a pas de propagation de cellules de type trophoblastique (Russ *et al.*, 2000).

3. Les marqueurs de la MCI

Les cellules internes du blastocyste vont constituer la MCI. Les facteurs principaux influant sur la pluripotence sont OCT4 et SOX2.

a. OCT4, marqueur de pluripotence

OCT4 est considéré comme étant « l'interrupteur génétique principal » dans la mise en place de la totipotence/ pluripotence (Pesce & Schöler, 2001).

La protéine OCT4 est codée par le gène *Pou5f1*. C'est un facteur de transcription à homéodomaine de la famille des POU (Pit-Oct-Unc). Il va activer l'expression de ses gènes cibles grâce à sa fixation sur une séquence consensus (ATGCAAAT).

Dans l'embryon, l'expression d'OCT4 commence dès le stade 1 cellule, il s'agit alors des protéines issues du transcrit maternel. Au stade 2 cellules, l'expression maternelle est remplacée par la protéine issue du transcrit zygotique (Nichols *et al.*, 1998). L'expression d'OCT4 reste uniforme dans toutes les cellules de l'embryon au stade morula, puis avec la différenciation des cellules du TE, l'expression d'OCT4 au niveau transcriptionnelle et protéique est restreinte aux cellules de la MCI et disparaît peu à peu des cellules du TE au stade blastocyste tardif. Cela signifie qu'OCT4 et CDX2 sont dans un premier temps co-exprimés avant d'avoir une expression mutuellement exclusive (Palmieri *et al.*, 1994; Dietrich & Hiiragi, 2007; Guo *et al.*, 2010). Finalement, l'expression d'OCT4 est restreinte aux cellules de l'EPI à partir du stade E4.5 (Grabarek *et al.*, 2012).

L'expression maternelle d'OCT4 n'est pas essentielle à la formation du zygote (Frum *et al.*, 2013; Le Bin *et al.*, 2014). En effet, les embryons mutants pour *Oct4* au niveau maternel et zygotique se développent jusqu'au stade blastocyste. La

distribution entre cellules externes et internes ainsi que la prolifération et la survie cellulaire sont maintenues jusqu'à ce stade, et les embryons arrivent à caviter partiellement. Toutefois, la MCI n'est plus pluripotente et les cellules internes prennent une identité de TE puisqu'elles expriment KRT8 et CDX2 au stade blastocyste tardif (Nichols *et al.*, 1998; Ralston *et al.*, 2010; Frum *et al.*, 2013).

Dans les modèles *in vitro*, la protéine OCT4 est exprimée dans les cellules ES. Une quantité précise d'OCT4 est requise pour l'auto-renouvellement des cellules ES. Une augmentation ou une diminution de sa concentration induit une modification du programme de développement (Niwa *et al.*, 2000). En effet, l'inactivation génique ou l'inhibition d'*Oct4* dans les cellules entraîne un changement de morphologie cellulaire couplée à l'expression de marqueurs du TE comme *Cdx2*, *Krt8* et *Eomes* (Niwa *et al.*, 2000; Velkey & O'Shea, 2003). A l'inverse, une augmentation de l'expression d'OCT4 conduit à la différenciation des cellules en EPr (Niwa *et al.*, 2000). Ainsi, OCT4 apparaît comme indispensable pour le maintien de la pluripotence au sein de la MCI.

b. Quelques facteurs de pluripotence régulant OCT4

La régulation de l'expression d'OCT4 peut se faire par différentes voies. CDX2 se fixe sur le gène *Pou5f1*. Des expériences de reporteurs d'activité luciférase ont montré que l'effet repressif de CDX2 sur *Oct4* passe par le blocage de ses fonctions (Niwa *et al.*, 2005).

Le facteur de transcription SALL4, un homologue du gène homéotique de la drosophile *spalt*, peut également se fixer sur *Oct4* et induire sa transcription dans les cellules ES (Zhang *et al.*, 2006).

De plus, l'inactivation de ce gène (ES *Sall4* *-/-* ou par siRNA) entraîne une expression ectopique des marqueurs du TE comme *Cdx2*, *Eomes* et *Hand1*. Lors de la formation de chimères, ces cellules contribuent aussi bien au TE qu'à la MCI, ce qui signifie qu'elles conservent leur pluripotence et ne se différencient pas totalement en TE (Sakaki-Yumoto, 2006; Zhang *et al.*, 2006). Ainsi, une réduction de l'expression de *Sall4* peut conduire à une re-spécification des cellules en TE. A l'inverse, une surexpression de ce gène favorise l'expression des marqueurs de la MCI comme OCT4, NANOG ou SOX2 (Zhang *et al.*, 2006).

Dans l'embryon, SALL4 est exprimé à la fois dans la MCI et dans le TE. Les embryons *Sall4* mutants meurent aux alentours du stade E6.5. Donc *Sall4* n'est pas nécessaire pour la spécification des premiers lignages. En effet, les marqueurs de la MCI (*Oct4*) et du TE (*Cdx2*) sont correctement exprimés dans ces embryons (Sakaki-Yumoto, 2006). Toutefois dans ces embryons, l'incorporation de BrdU (marqueur de la prolifération) est plus faible que dans les embryons sauvages. De plus, les cellules *Sall4**-/-* possèdent une prolifération plus faible que les cellules ES. *Sall4* est donc essentiel pour la prolifération des cellules mais pas pour le maintien de la pluripotence (Sakaki-Yumoto, 2006; Yuri *et al.*, 2009).

Les membres de la famille des Krüppel-Like facteur, KLF2, KLF4 et KLF5 se fixent sur *Oct4* (Parisi *et al.*, 2008) et favorisent l'auto-renouveau des cellules ES en absence de LIF (Jeon *et al.*, 2016). L'expression de ces 3 KLF est donc associée à un état indifférencié des cellules ES. Un KD de ces trois gènes en cellules ES entraîne un défaut d'auto-renouveau tandis que les KO simples n'ont pas le même effet. Cela signifie que ces 3 facteurs possèdent des fonctions redondantes au niveau de l'auto-renouveau (Jiang *et al.*, 2008). Toutefois, leurs fonctions diffèrent au niveau de la régulation de la différenciation des cellules ES. Ainsi, le KD de *Klf4* dans les cellules ES entraîne la différenciation de celles-ci en endoderme, tandis que le KD de *Klf5* les entraîne vers un destin mésodermique. En conclusion, *Klf4* régule négativement l'expression des marqueurs de l'endoderme tandis que *Klf5*

régule négativement l'expression des marqueurs du mésoderme (Aksoy *et al.*, 2014).

Cependant, seuls les embryons *Klf5*^{-/-} possèdent un phénotype au stade blastocyste : les embryons *Klf4*^{-/-} meurent peu avant la naissance et les embryons *Klf2*^{-/-} meurent au stade E12.5 (Kuo *et al.*, 1997; Segre, Bauer, & Fuchs, 1999). Cela pourrait être dû au fait que les autres membres de la famille des KLF pourraient jouer un rôle redondant (Nakagawa *et al.*, 2007).

Dans l'embryon, la protéine KLF5 est présente dès le stade 2 cellules. Au stade morula, son expression ainsi que l'expression de sa forme acétylée est ubiquitaire, et devient plus intense dans les cellules externes puis dans le TE alors qu'elle diminue dans la MCI (Parisi *et al.*, 2008; Ema *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2010; Zhao, Liu, & Chen, 2015).

L'étude des embryons *Klf5*^{-/-} montre une létalité précoce marquée par la perte d'expression de *Cdx2*, *Eomes* et *Krt8* indiquant que *Klf5* est requis pour la formation du TE (Lin *et al.*, 2010).

De plus, la prolifération des cellules est diminuée et la dérivation en cellules ES n'est pas possible. La mort cellulaire est également élevée dans ces embryons (Lin *et al.*, 2010). *Klf5* est donc requis pour la formation du TE et de la MCI.

c. SOX2, premier marqueur des cellules internes

SOX2 appartient à la famille des *SRY related gene* dont chaque membre possède un domaine HMG (*High Mobility Group*) très conservé permettant la liaison à l'ADN. SOX2 appartient au sous-groupe B1 qui comprend SOX1, SOX2 et SOX3.

- *Coopération entre SOX2 et OCT4*

Le facteur de transcription SOX2 peut réguler l'expression d'OCT4.

SOX2 et OCT4 agissent en coopération pour permettre leur propre transcription par une boucle d'autorégulation positive dans les cellules ES (Okumura-Nakanishi *et al.*, 2005). Les motifs de liaison à l'ADN de *Oct4* et *Sox2* correspondent à la cassette HMG/POU (Chen *et al.*, 2008). Cette cassette est constituée d'une séquence HMG reconnue par SOX2 et d'une séquence POU reconnue par OCT4. Ce motif est retrouvé dans un très grand nombre de gènes impliqués dans la pluripotence et l'auto-renouveaulement comme *Oct4*, *Sox2* ou encore *Nanog* (Okumura-Nakanishi *et al.*, 2005; Rodda, 2005; Chew *et al.*, 2005). Ces trois facteurs appartiennent à un grand complexe qui intervient notamment dans le maintien de la pluripotence (Gao *et al.*, 2012).

De plus, OCT4 et SOX2 partagent plus de 400 cibles communes ce qui fait d'eux les régulateurs maîtres du circuit de régulation transcriptionnelle responsable de l'auto-renouveaulement et de la pluripotence des cellules ES (Boyer *et al.*, 2005). La fixation de SOX2 au niveau du petit sillon de l'ADN et la liaison d'OCT4 au grand sillon leur permet d'interagir physiquement au niveau de la cassette HMG/POU. Ces deux séquences peuvent être adjacentes ou bien séparées de 3 nucléotides. Il est évident que l'association des 2 facteurs de transcription sera plus forte dans le 1^{er} cas (Jerabek *et al.*, 2014) et donc l'activité transcriptionnelle plus importante (Rizzino & Wuebben, 2016). A l'inverse, ajouter des nucléotides entraîne une perte de liaison entre les deux facteurs et donc une perte d'activité (Aksoy *et al.*, 2013).

- *Importance de la modulation de l'expression et des mouvements cellulaires de SOX2*

La modulation d'*Oct4* et *Sox2* entraîne des changements profonds au sein des cellules ES. En effet, une inhibition de *Sox2* dans les cellules ES par construction de cellules *Sox2* mutantes inductibles, par RNAi ou par génération d'un mutant dominant négatif, entraîne une diminution des transcrits pour *Sox2*, *Nanog* et *Oct4* ce qui provoque une perte de pluripotence et une différenciation en TE (Chew *et al.*,

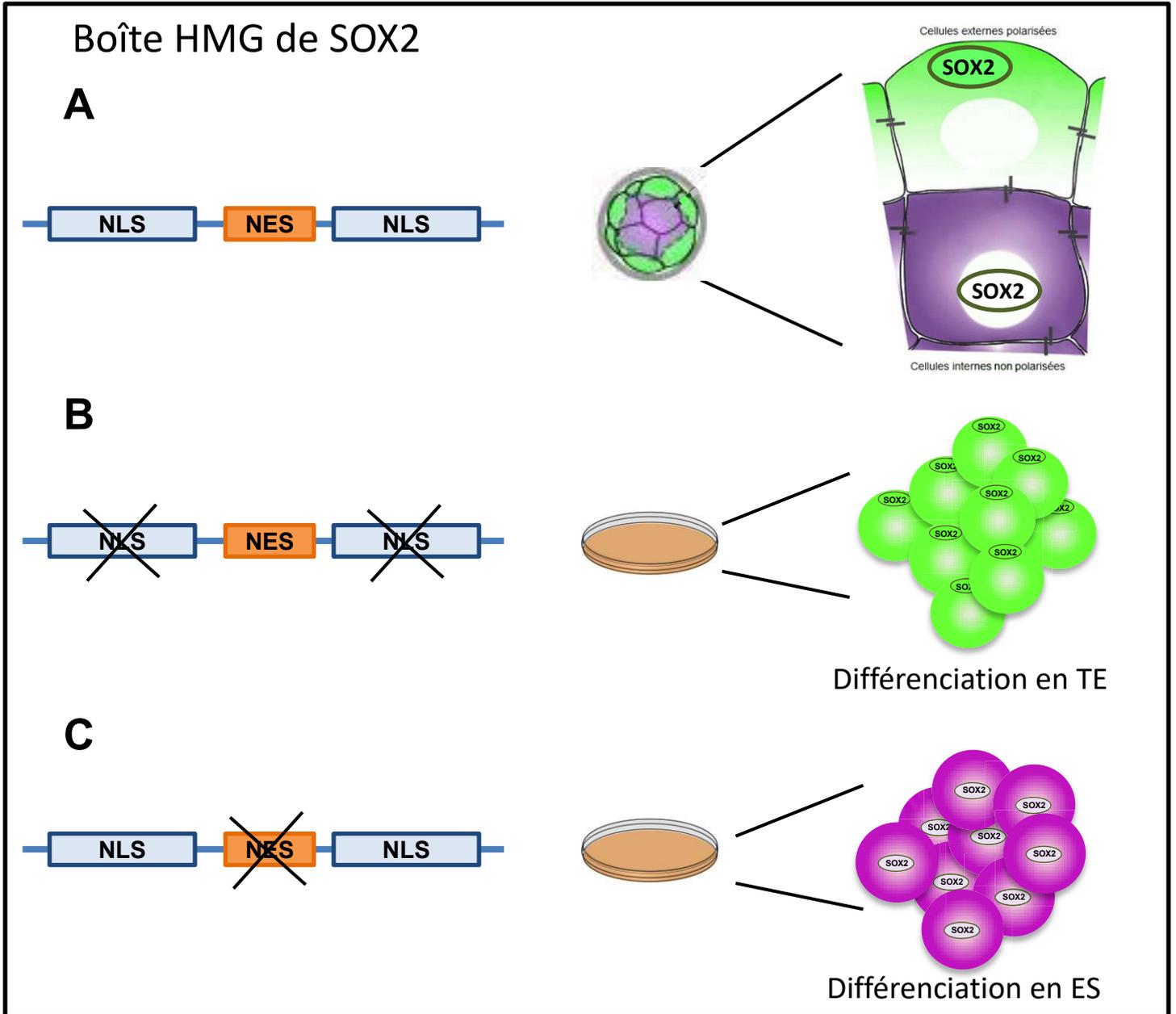


Figure 8 : Localisation de SOX2 au sein des cellules de l'embryon.

A : Au stade E3,25 SOX2 est exprimé dans le noyau des cellules de la MCI.

B : Une mutation dans les NLS (*Nuclear Localisation Signal*) de SOX2 empêche son import dans le noyau et favorise la différenciation en TE des cellules ES.

C : Une mutation dans la séquence NES (*Nuclear Export Signal*) de SOX2 entraîne sa rétention dans le noyau et favorise l'expression des marqueurs de pluripotence dans les cellules ES.

2005; Li *et al.*, 2007; Masui *et al.*, 2007). Notamment, la formation du dominant négatif est due à la mutation des deux sites NLS (Nuclear localisation signal) au sein de la séquence HMG de Sox2. Ces mutations bloquent l'entrée de SOX2 dans le noyau et altèrent sa liaison avec OCT4. Cela suggère que la présence de SOX2 dans le noyau permet le maintien de la pluripotence en coopération avec OCT4 (Fig. 8) (Li *et al.*, 2007).

A l'inverse, le blocage de l'acétylation de la lysine 75 au sein de la séquence NES (Nuclear Export Signal) de SOX2 retient la protéine dans le noyau. Cela a pour conséquence de favoriser l'expression des marqueurs de pluripotence. De plus, favoriser l'acétylation de SOX2 entraîne son export et sa dégradation par le protéasome (Fig. 8) (Baltus *et al.*, 2009).

Enfin, la surexpression de Sox2 dans les cellules ES s'accompagne d'une diminution des transcrits Sox2, Oct4 et Nanog et d'une différenciation morphologique de celles-ci. En effet les gènes associés au neuroectoderme, au mésoderme et au trophoctoderme sont alors surexprimés. Enfin, une trop forte surexpression de Sox2 provoque une mort cellulaire massive (Boer *et al.*, 2007; Kopp *et al.*, 2008).

Toutes ces études montrent que le niveau de SOX2 est optimisé dans les cellules ES et qu'une petite augmentation ou diminution entraîne une différenciation de ces cellules.

- *Expression de Sox2 dans l'embryon*

Dans l'embryon, l'expression du transcrit maternel Sox2 est retrouvée de manière importante au stade 1 cellule. Cette expression est ensuite relayée par l'expression du transcrit zygotique qui augmente fortement et devient spécifique des cellules de la MCI au stade 32 cellules. Cela fait de Sox2 le premier facteur de pluripotence connu restreint à la MCI. Cette expression est inversement corrélée avec celle de *Id2*, marqueur spécifique du TE, considéré comme le premier marqueur

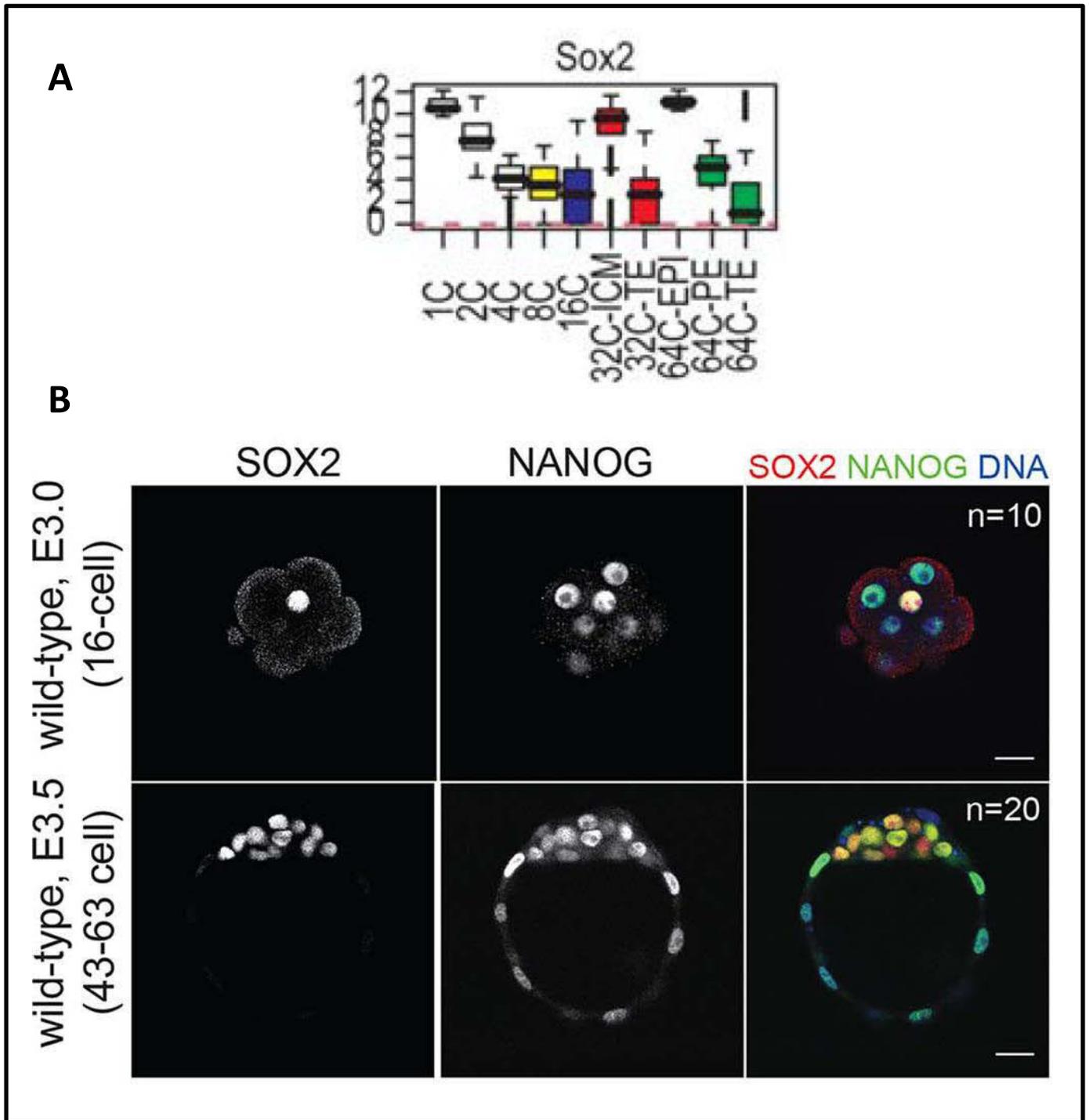


Figure 9 : Expression de SOX2 durant le développement pré-implantatoire.

A : (issue de Guo *et al*, 2010)

ARNm de Sox2 quantifié par RT-PCR sur cellule unique au cours du développement pré-implantatoire.

B : (issue de Wicklow *et al*, 2014)

Immunofluorescence des protéines SOX2 et NANOG au sein des embryons au stade 16 cellules et au stade E3,5. La protéine SOX2 est détectée spécifiquement dans les cellules de la MCI, alors que NANOG est présent dans toutes les cellules au stade E3,5.

des cellules externes. Ainsi, le couple *Sox2/Id2* constitue le premier marqueur de différenciation au sein des populations cellulaires du blastocyste (Fig. 9) (Guo *et al.*, 2010).

La protéine est détectée dans quelques cellules internes à partir du stade 16 cellules. (Fig. 9) (Guo *et al.*, 2010; Wicklow *et al.*, 2014). Au stade blastocyste, l'expression de SOX2 diminue progressivement dans les cellules de l'EPr, pour devenir spécifique des cellules EPI. De manière intéressante, l'expression de SOX2 est initiée après celle d'OCT4 mais est restreinte aux cellules EPI avant elle (Avilion, 2003; Wicklow *et al.*, 2014).

- *Etudes des embryons Sox2 mutants*

Les cultures d'explants d'embryons mutants pour *Sox2* forment des cellules géantes trophoblastiques tout comme les embryons *Oct4* mutants. Toutefois ils expriment également PLAT (*tissue Plasminogen Activator*) qui est un marqueur de l'EPr (Avilion, 2003).

Cependant, les embryons traités avec un siRNA au stade 2 cellules ne se développent pas jusqu'au stade blastocyste. De plus, ces embryons possèdent des défauts d'expression des gènes du TE comme *Cdx2* ou *Tead4* ainsi que des gènes requis pour le développement de l'embryon qui sont alors diminués, comme *Fgf4* (Keramari *et al.*, 2010). Ces embryons possèdent donc un phénotype plus délétère que les embryons mutants suggérant un rôle maternel et zygotique de *Sox2*.

Pour supprimer toute ambiguïté sur le rôle de SOX2 dans l'embryon, une publication plus récente, a étudié les embryons *Sox2* mutants au niveau maternel et zygotique (Wicklow *et al.*, 2014). L'absence de SOX2 maternel et zygotique ne bloque pas la formation du blastocyste. De plus, SOX2 n'est pas nécessaire pour l'initiation de l'expression d'OCT4 au niveau embryonnaire. Cette différence de résultat entre ces publications pourrait être due à une certaine toxicité des siRNA transfectés.

Enfin, l'expression de *Sox2* maternelle n'est pas nécessaire pour le développement de l'embryon (Campolo *et al.*, 2013; Wicklow *et al.*, 2014).

La régulation de SOX2 au sein des blastocystes passe par la voie Hippo. En effet, une expression ectopique de SOX2 dans les cellules externes est présente dans les embryons mutants pour *Tead4*, ou lors d'une surexpression de LATS1/2 (Wicklow *et al.*, 2014). De plus, dans les cellules ES il a été montré que la protéine YAP pouvait se lier à la séquence de *Sox2* (Lian *et al.*, 2010).

Tous ces résultats soutiennent l'idée que SOX2 et OCT4 sont importants mais ne sont essentiels pour la formation de la MCI.

D. Hétérogénéité au sein de la MCI

1. Cavitation et polarisation

La formation de la cavité et par conséquent du blastocyste est liée au nombre de cellules dans l'embryon (Smith & McLaren, 1977; Johnson & McConnell, 2004). La cavité blastocœlique apparaît au stade E3.25 et gonfle jusqu'à l'implantation. (Fig. 1) Celle-ci se remplit de liquide ce qui va repousser les cellules de la MCI vers un pôle de l'embryon. La cavitation peut s'initier à différents endroits, les cavités se regroupant ensuite pour former une seule cavité de taille plus conséquente (Motosugi *et al.*, 2005).

Le transport actif du liquide se fait notamment à l'aide des pompes Na/K ATPases. Traiter des embryons avec la Ouabaïne, un inhibiteur de ces pompes, entraîne une perturbation de la cavitation et une perte des jonctions serrées entre les cellules du TE (Violette, Madan, & Watson, 2006).

Ces pompes possèdent plusieurs sous-unités, mais, seules les sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ se situent au pôle baso-latéral du TE alors qu'elles sont distribuées de manière équivalente le long des membranes des cellules de la MCI (MacPhee *et al.*, 2000). Les embryons mutants pour le gène codant la sous-unité $\alpha 1$ de cette pompe ne forment pas de cavité et meurent vers E3.5 (Barcroft *et al.*, 2004). De plus, l'utilisation de siRNA contre la sous-unité $\beta 1$ de cette pompe, provoque un arrêt du développement des embryons au stade morula et les protéines des jonctions serrées comme ZO1 et l'OCCLUDINE ne sont pas correctement localisées (Madan, Rose, & Watson, 2007).

La bonne localisation et l'activité de la pompe Na/K ATPase sont donc indispensables pour l'expansion correcte de la cavité blastocœlique.

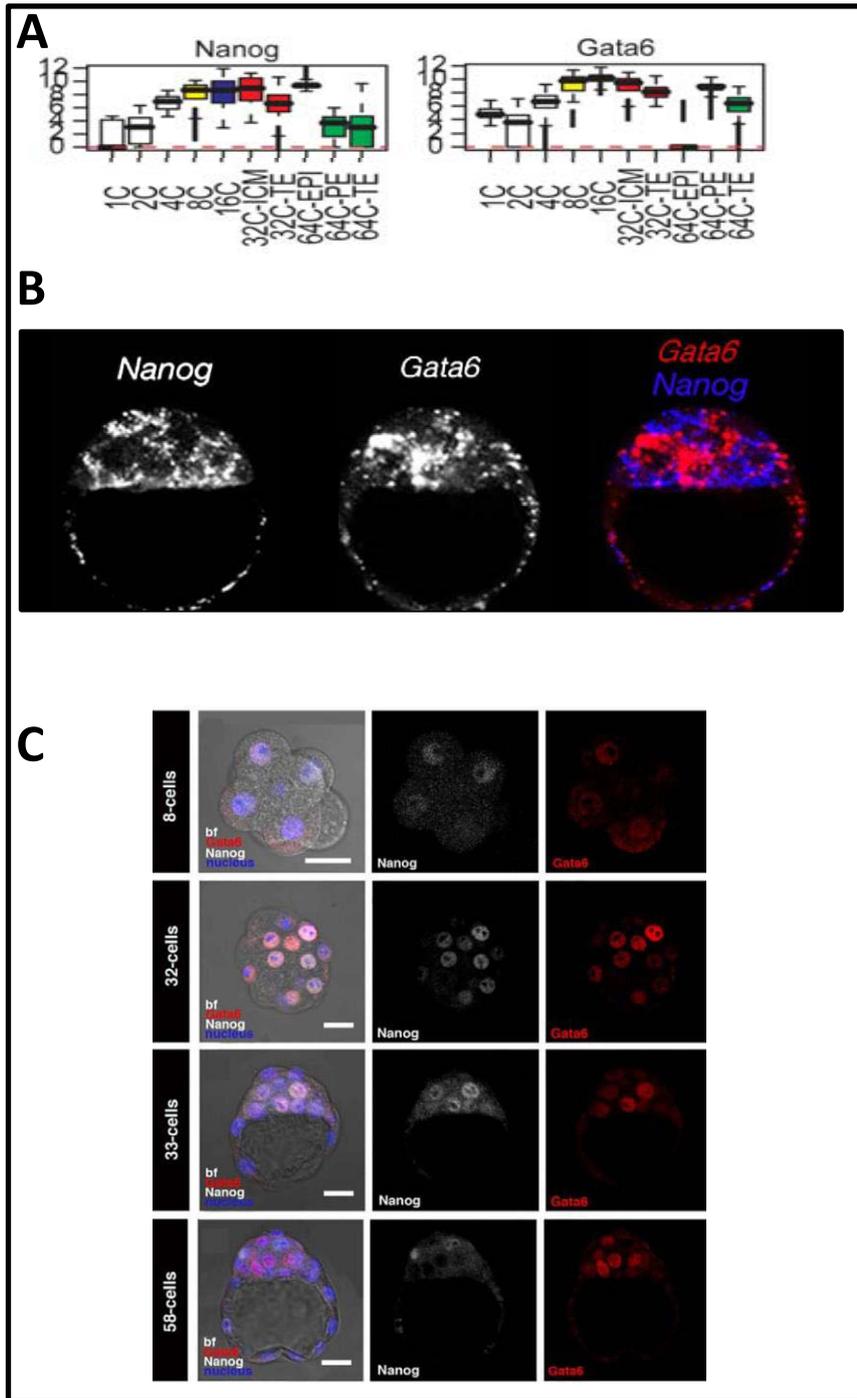


Figure 10 : Expression de NANOG et GATA6 durant le développement pré-implantatoire.

A : (issue de Guo *et al*, 2010)

ARNm de *Nanog* et *Gata6* quantifiés par RT-qPCR sur cellule unique au cours du développement pré-implantatoire.

B : (issue de Chazaud *et al*, 2006)

ARNm de *Nanog* et *Gata6* observé par hybridation in situ au sein d'un embryon au stade E3,5.

C : (issue de Plusa *et al*, 2008)

Immunofluorescence des protéines NANOG (blanc) et GATA6 (rouge) au sein des embryons du stade 8 cellules au stade E3,75.

2. La spécification des cellules de la MCI

En parallèle de la cavitation, la MCI devient hétérogène. Les cellules morphologiquement indistinctes de la MCI vont se différencier en EPI et EPr par un processus comportant plusieurs étapes avec en premier lieu une spécification en EPI ou EPr, puis une maturation par la mise en place des réseaux de gènes spécifiques, et en parallèle un tri des cellules permettant de former deux compartiments distincts (Fig. 1).

L'analyse des facteurs de transcription NANOG (marqueur de l'EPI) et GATA6 (marqueur de l'EPr) est le meilleur reflet de la spécification des cellules de la MCI. Les deux sont co-exprimés dans tous les embryons au stade 8 cellules. Entre 3.0 et 3.25, l'expression de ces deux facteurs se restreint, certaines cellules exprimant préférentiellement NANOG et d'autres GATA6, entraînant les cellules vers un destin d'EPI ou d'EPr respectivement. L'émergence de cellules NANOG positives et GATA6 négatives est le premier signe du processus de spécification et ceci se produit indépendamment de la position qu'occupe la cellule au sein de la MCI. Cela génère une organisation en « poivre et sel » au stade E3.75 (Fig. 10) (Kurimoto, 2006; Chazaud *et al.*, 2006; Plusa *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2010; Bessonnard *et al.*, 2014).

La mise en place de cette expression en « poivre et sel » correspond à la perte de l'un des deux marqueurs et en parallèle à une augmentation de l'autre marqueur individuellement dans chaque cellule (Guo *et al.*, 2010; Bessonnard *et al.*, 2014). Cette organisation se fait de manière asynchrone, c'est-à-dire que l'expression exclusive ne débute pas au même moment dans toutes les cellules, ainsi, il existe encore quelques cellules exprimant à la fois NANOG et GATA6 au stade E3.75 (Fig. 10) (Kurimoto, 2006; Chazaud *et al.*, 2006; Gerbe *et al.*, 2008; Plusa *et al.*, 2008; Meilhac *et al.*, 2009; Xenopoulos *et al.*, 2015). La spécification permet donc la mise en place des deux lignages EPI et EPr dans les cellules de la MCI de manière asynchrone.

3. Qui contrôle la spécification EPI vs EPr

L'environnement extrinsèque et les facteurs intrinsèques des cellules sont importants pour leur spécification. Plusieurs voies de signalisation peuvent jouer un rôle lors de cette spécification, mais la plus importante est la voie de signalisation FGF/MAPK.

a. La signalisation FGF/MAPK contrôle la spécification EPI vs EPr

La signalisation FGF (*fibroblast growth factor*) est classée dans la famille des voies de signalisation à RTK (récepteurs Tyrosine Kinase). Les vertébrés possèdent 22 ligands FGF et 5 récepteurs ; chacun avec un profil d'expression particulier au cours du développement.

- *Les ligands FGF*

Les ligands FGF ne sont pas tous exprimés durant l'embryogénèse précoce. Seuls *Fgf3* et *Fgf4* sont exprimés de manière non négligeable dans l'embryon pré-implantatoire. Les autres ligands sont très faiblement exprimés et de manière ubiquitaire durant la spécification (Ohnishi *et al.*, 2013). L'étude des mutants pour chacun des FGF a montré que seuls les mutants *Fgf4* possédaient un phénotype précoce (contrairement à l'absence de phénotype péri-implantatoire pour *Fgf1*, *Fgf2*, *Fgf3*, *Fgf5*, *Fgf8*, *Fgf9*, *Fgf10*, *Fgf17*, *Fgf18*) (Zhong *et al.*, 2006; Lanner & Rossant, 2010).

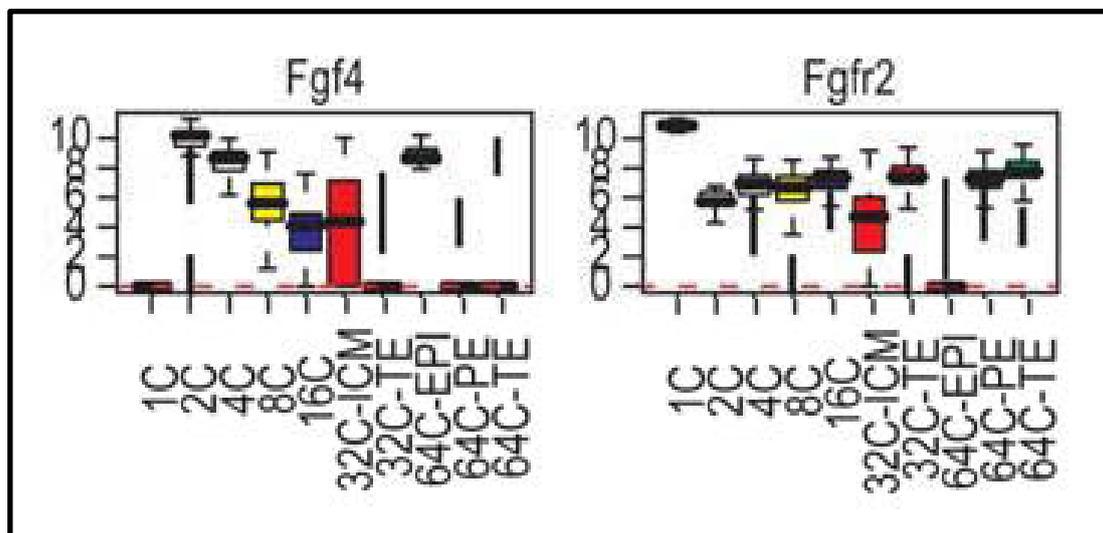


Figure 11 : Expression des marqueurs de la voie de signalisation Fgf au cours du développement.
(issue de Guo *et al*, 2010)

ARNm de *Fgf4* et *Fgfr2* quantifiés par RT-PCR sur cellule unique au cours du développement pré-implantatoire.

- *Expression de Fgf4 durant l'embryogénèse*

Dans l'embryon, FGF4 possède une expression maternelle, qui est ensuite substituée par l'expression zygotique. Son expression est hétérogène au sein de la MCI au stade E3.25. Cette hétérogénéité d'expression et donc sa disponibilité, font de FGF4 le 1er facteur critique pour l'expression différentielle des gènes de l'EPI et de l'EPr dans le processus de spécification (Fig. 11) (Guo *et al.*, 2010; Ohnishi *et al.*, 2013; Krupa *et al.*, 2014). Au stade E3.5, *Fgf4* est secrété par les cellules de l'EPI, et n'est pas présent dans les cellules de l'EPr sur lesquelles il va agir, il a donc une expression bimodale et agit de manière paracrine. C'est le premier marqueur de bimodalité entre EPI et EPr (Fig. 11) (Guo *et al.*, 2010; Frankenberg *et al.*, 2011; Ohnishi *et al.*, 2013).

- *Etude des mutants Fgf4^{-/-}*

Les embryons *Fgf4^{-/-}* montrent une létalité péri-implantatoire résultant d'un défaut de différenciation des types cellulaires extra-embryonnaires (Feldman *et al.*, 1995). Ils possèdent le même nombre de cellules dans la MCI que les embryons sauvages, mais le ratio EPI/EPr n'est pas régulé correctement. En effet, ces embryons n'expriment pas les marqueurs tardifs de l'EPr comme SOX17 ou GATA4 et toutes les cellules de la MCI expriment NANOG. Ces embryons ne se différencient pas en EPr (Kang *et al.*, 2013; Krawchuk *et al.*, 2013). De plus, dans les embryons *Fgf4^{+/-}*, il existe une légère diminution du nombre de cellules de l'EPr, mais cette diminution est compensé par d'autres mécanismes (Kang *et al.*, 2013; Krawchuk *et al.*, 2013). Cela signifie que le dosage de FGF4 dans l'embryon est important pour la spécification de l'EPr.

Enfin, traiter ces embryons avec du FGF4 exogène, permet de sauver la spécification de la MCI (Feldman *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 2013; Krawchuk *et al.*, 2013). De plus, l'augmentation de la proportion de cellules de l'EPr dépend de la dose de FGF4 : au-delà d'une concentration de FGF4 exogène de 250ng/ml, toutes les cellules de la

MCI se spécifient alors en EPr. De ce fait, la quantité de FGF4 est limitée et finement régulée dans l'embryon de manière à spécifier le nombre de cellules appropriées et ainsi obtenir un ratio EPI/EPr correct (Kang *et al.*, 2013; Krawchuk *et al.*, 2013).

Cette même conclusion a été obtenue *in vitro*. Le ligand FGF4 est produit en grande quantité par les cellules ES indifférenciées (Wilder *et al.*, 1997; Kunath *et al.*, 2007). Les cellules *Fgf4*^{-/-} ne se différencient pas en EPr lorsque celles-ci sont poussées en différenciation par un traitement à l'acide rétinoïque (Wilder *et al.*, 1997). Ce phénotype est sauvé lorsqu'elles sont cultivées en présence de FGF4 exogène. De plus, ces études montrent que la différenciation spontanée de ces cellules est réduite et que FGF4 est requis pour la différenciation endodermique (Wilder *et al.*, 1997; Kunath *et al.*, 2007).

Par ailleurs, l'expression maternelle de FGF4 favorise la spécification des cellules de l'EPr mais n'est pas essentielle pour le développement embryonnaire (Krawchuk *et al.*, 2013).

Enfin, dans les embryons *Fgf4*^{-/-}, l'expression d'OCT4 est maintenue dans la MCI, ce qui signifie que cette identité cellulaire est maintenue et que l'expression d'OCT4 ne dépend pas de *Fgf4*. De plus, les marqueurs du TE tel que *Cdx2* ou *Eomes* restent identiques entre les embryons sauvages et mutants, montrant que *Fgf4* n'est pas requis pour la différenciation du TE (Goldin & Papaioannou, 2003). En conclusion, la disparité d'expression de *Fgf4* dans la MCI va moduler le ratio EPI/EPr au cours de la spécification.

- *Les récepteurs de la voie FGF (FGFR)*

Concernant les FGFR, seuls les mutants pour *Fgfr2* possèdent un phénotype au cours de l'embryogénèse précoce.

FGFR2 est exprimé dans le TE et la MCI au stade E3.25, puis est restreint au TE et aux cellules qui se situent à l'interface entre la MCI et la cavité blastocœlique (Rappolee, Patel, & Jacobson, 1998; Haffner-Krausz *et al.*, 1999). De manière plus

précise, l'ARNm de *Fgfr2* est présent dans toutes les cellules de l'embryon au stade E3.25 puis dans les cellules du TE et de l'EPr au stade E3.75 (Fig. 11) (Guo *et al.*, 2010; Ohnishi *et al.*, 2013). Il existe également une expression maternelle de *Fgfr2*. Les embryons *Fgfr2* *-/-* meurent peu après l'implantation avec une implantation aléatoire et une cavité étiolée. De plus, la croissance de la MCI est stoppée et l'endoderme viscéral dérivé de l'EPr ne se forme pas *in vitro*. FGFR2 contribue donc à la croissance de la MCI et est requis pour la différenciation normale de l'EPr (Arman *et al.*, 1998). Par ailleurs, une surexpression de *Fgfr2* dans les embryons, par injection d'ARN au stade 2 cellules, conduit à une augmentation de l'EPr au sein de la MCI (Morris *et al.*, 2013).

Les récepteurs FGFR3 et FGFR4 sont principalement exprimés dans l'EPr au stade E4.5 (Ohnishi *et al.*, 2013). Toutefois, les mutants pour chacun de ces récepteurs n'entraînent des défauts qu'après l'implantation (Rappolee *et al.*, 1998; Lanner & Rossant, 2010).

Le récepteur FGFR2 est donc le principal récepteur par lequel le signal d'activation de la voie FGF sera transmis afin de permettre la spécification EPI/EPr.

- *La signalisation FGF*

La signalisation FGF est activée par la liaison du ligand à son récepteur ce qui provoque une autophosphorylation de tyrosines dans la région intracellulaire du FGFR. Le signal peut être ensuite relayé par 4 voies distinctes : la voie MAPK/ERK, la voie JAK/ STAT (Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription), la voie des PLC γ (phosphoinositide phospholipase C) et la voie des PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase).

Des études se sont intéressées à la transduction du signal afin de savoir quelle cascade intracellulaire est requise pour la spécification des cellules. Elles ont montré que la transduction du signal passe par la voie ERK/MAPK. Dans cette voie,

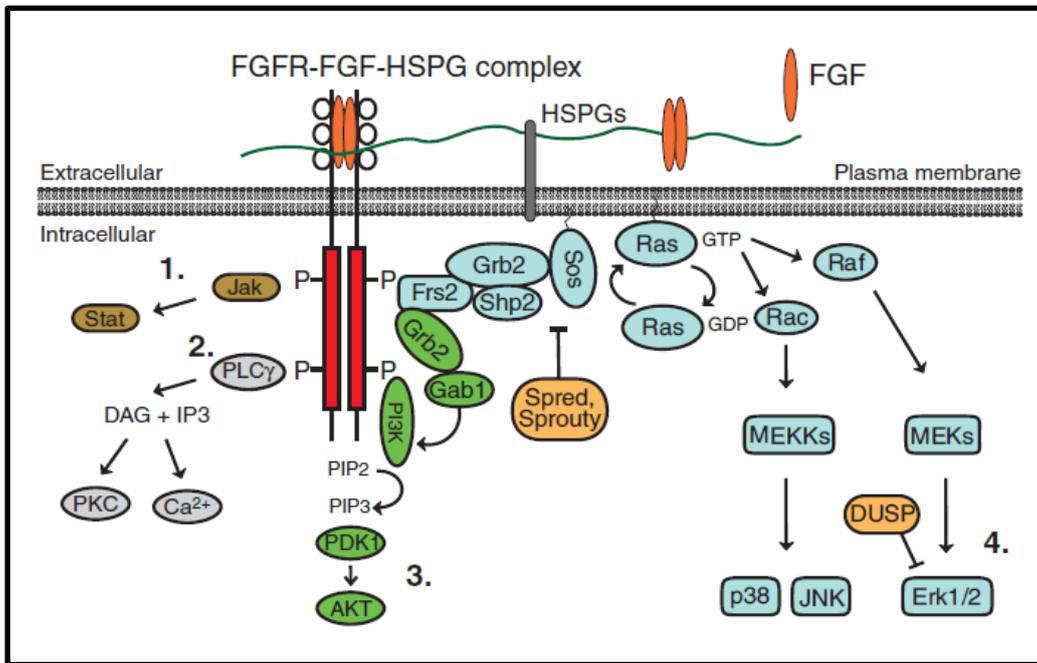


Figure 12 : La voie de signalisation FGF/FGFR.

(issue de Lanner *et al*, 2010)

Les protéoglycanes de sulfate d'héparine jouent le rôle de corécepteur et de modulateur de la biodisponibilité du ligand FGF. Les quatre principales voies de signalisation qui peuvent être activées par la signalisation Fgf sont : 1- la voie Jak/Stat (en marron), 2- la voie PLC γ (en violet), 3- la voie PI3K (en vert), 4- la voie des MAP kinases (Ras/Mek/Erk).

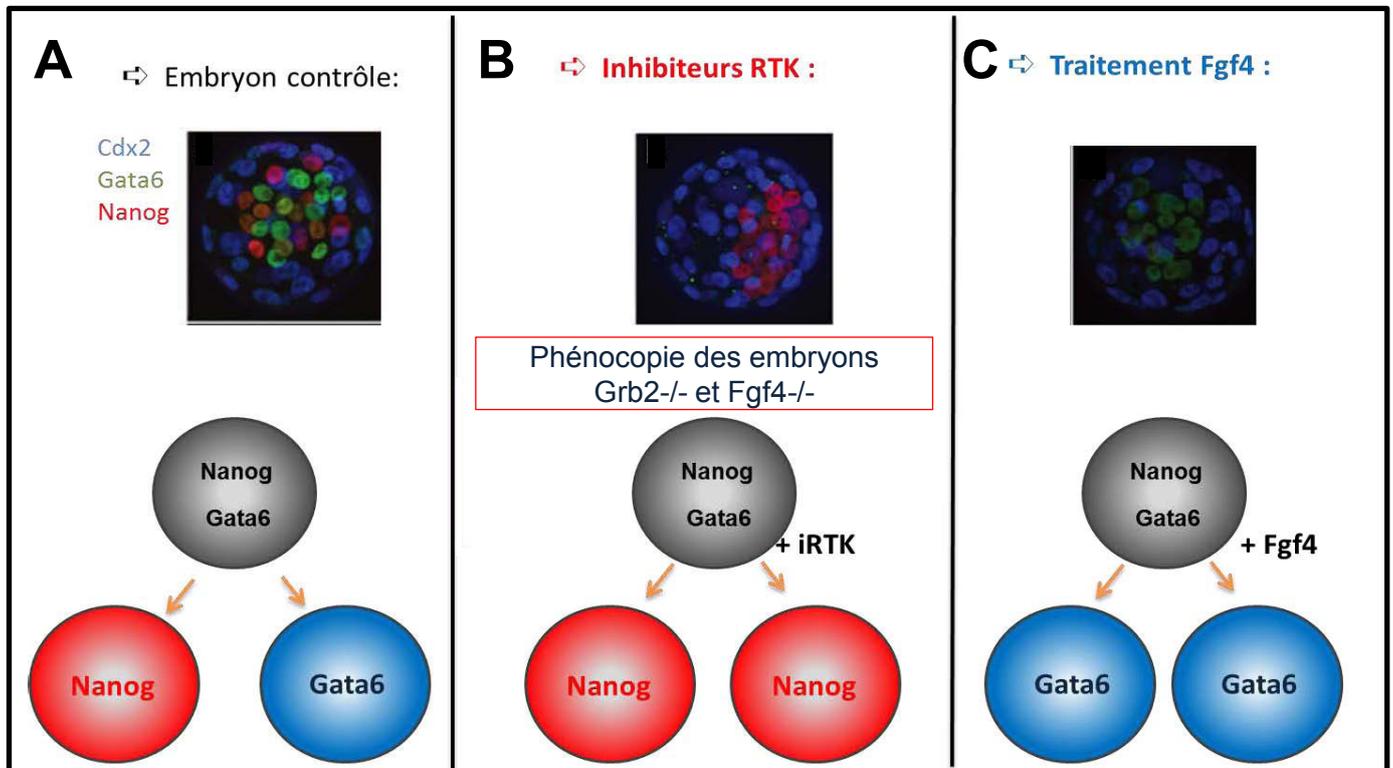


Figure 13 : Effet de la voie de signalisation FGF sur des embryons en culture.

A : En culture, les embryons développent classiquement une MCI en « poivre et sel ».

B : Les cellules de la MCI des embryons traités en présence d'inhibiteurs de la voie FGF/MAPK vont toutes exprimer NANOG et se spécifier en EPI.

C : Les cellules de la MCI des embryons traités en présence de FGF4 exogène vont toutes exprimer GATA6 et se spécifier en EPR.

la formation d'un complexe entre FRS2 (fibroblast growth factor receptor substrate 2), SHP2 (Src homology region 2 domain containing phosphatase 2) et GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) va alors favoriser l'activation de la voie RAS/MEK/ERK kinase (MAPK) (Fig. 12) (Lanner & Rossant, 2010).

Les embryons mutants pour *Grb2* présentent une létalité péri-implantatoire qui s'explique par l'absence de cellules d'EPr au sein de la MCI à E3.5 (Cheng *et al.*, 1998). En son absence, toutes les cellules prennent des caractéristiques Epi (Chazaud *et al.*, 2006). De plus, les cellules *Grb2* *-/-* qui ne peuvent pas former de dérivés endodermiques, sont sauvées par l'expression d'une protéine RAS constitutivement active (Cheng *et al.*, 1998). Cela démontre que la signalisation FGF active la voie des Ras-Mek-Erk/MAPK dans les embryons (Fig. 12 et 13).

En outre, l'utilisation d'inhibiteurs contre MEK et FGFR sur des cultures d'embryons montre le même phénotype que lors de la perte de l'expression de FGF4 ou de GRB2. Les embryons cultivés en présence d'inhibiteurs possèdent une MCI comparable au contrôle. Il n'y a donc ni prolifération, ni apoptose, cependant, toutes les cellules expriment les marqueurs de l'EPI comme NANOG. Il s'agit donc bien d'un choix sélectif de lignage (Fig. 13). La culture de ces embryons en présence d'inhibiteurs jusqu'à des stades plus tardifs entraîne également une diminution du nombre de cellules du TE (Nichols *et al.*, 2009). A l'inverse, des embryons cultivés en présence de ligand FGF4 exogène à partir du stade E2.5 présentent une expression des marqueurs de l'EPr comme GATA6 et GATA4 dans toute la MCI combinée à une absence de NANOG (Fig. 13) (Yamanaka, Lanner, & Rossant, 2010).

La spécification progressive de l'EPI et de l'EPr est donc dépendante de la voie de signalisation FGF/MAPK.

- *Régulation de la signalisation FGF*

De par les observations précédentes, la signalisation FGF doit être régulée de manière très fine afin de conserver le ratio EPI/EPr au cours du développement. Elle est modulée à différents niveaux d'activation à la fois intracellulaire et extracellulaire.

Au niveau extracellulaire par exemple, les ligands FGF peuvent se lier aux sulfates d'héparine qui vont permettre une meilleure affinité du ligand à son récepteur et donc augmenter la demi-vie du complexe FGF/FGFR (Ornitz, 2000).

Au niveau intracellulaire, la cascade d'activation est régulée par une boucle de régulation négative comme par exemple DUSP4 (Dual Specificity phosphatases 4), cible de la voie MAPK, qui une fois activée, va inhiber la phosphorylation de ERK (Fig. 12) (Lanner & Rossant, 2010).

La régulation de la voie de signalisation FGF passe également par le contrôle de la transcription de *Fgf4*. Il est le premier facteur ciblé par OCT4 et SOX2 à avoir été découvert (Dailey, Yuan, & Basilico, 1994; Yuan *et al.*, 1995). En effet, dans la séquence activatrice de *Fgf4* se trouve une cassette HMG/POU qui va pouvoir être reconnue par le complexe SOX2/OCT4. La formation de ce complexe va permettre la transcription de *Fgf4*. En outre, en plus de la liaison à l'ADN de SOX2 et OCT4 de manière synergique par leur site de liaison respectif, il faut également une interaction entre les deux facteurs pour activer la transcription de *Fgf4*. Les deux facteurs coopèrent donc pour réguler l'expression de FGF4 (Dailey *et al.*, 1994; Yuan *et al.*, 1995; Ambrosetti *et al.*, 2000).

Dans les embryons *Oct4*^{-/-} ainsi que dans les embryons *Sox2*^{-/-}, le niveau de *Fgf4* est plus faible que dans les embryons sauvages (Nichols *et al.*, 1998; Wicklow *et al.*, 2014). Dans les embryons *Oct4*^{-/-}, le nombre de cellules de l'EPr est plus faible que dans les embryons sauvages au stade E4.0 et aucun marqueur tardif de l'EPr n'est exprimé (SOX17, GATA4) (Frum *et al.*, 2013).

Le même phénotype est présent dans les embryons *Sox2* mutants qui présentent une perte d'expression des facteurs de l'EPr au stade blastocyste. Cependant, au

stade blastocyste tardif, leur expression redevient similaire aux embryons sauvages (Wicklow *et al.*, 2014).

En l'absence de *Sox2* ou d'*Oct4*, l'expression de *Fgf4* est plus faible ce qui engendre un retard dans la spécification des cellules de l'EPr. Cela signifie que *Sox2* et *Oct4* favorisent l'expression de *Fgf4* (Frum *et al.*, 2013; Wicklow *et al.*, 2014).

b. Les autres voies de signalisation impliquées

Plusieurs autres voies de signalisation sont impliquées dans la survie et la prolifération des cellules de l'EPr et de l'EPI au cours de la spécification.

La voie BMP (Bone Morphogenetic Protein) est une voie de signalisation impliquée dans la différenciation précoce des différents lignages.

Bmp4 est exprimé dans les cellules EPI au stade E3.75 (Guo *et al.*, 2010; Graham *et al.*, 2014; Boroviak *et al.*, 2015).

De plus, l'expression d'un dominant négatif pour BMPR2 entraîne une diminution du nombre de cellule de l'EPr. Enfin, l'inhibition de la voie BMP par différents inhibiteurs provoque également une diminution des cellules de l'EPr par un amenuisement du nombre de précurseurs de l'EPr et une augmentation de l'apoptose dans les cellules GATA6 positives. En revanche, l'EPI ne semble pas touché par ces inhibiteurs ce qui signifie qu'il s'agit d'un problème de survie des cellules spécifiées de l'EPr (Graham *et al.*, 2014).

Cette survie cellulaire semble également être contrôlée par la voie PDGF. PDGF α est exprimé par l'EPI et l'EPr, tandis que son récepteur PDGFR α est lui spécifique de l'EPr au stade E3.5 (Plusa *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2010; Boroviak *et al.*, 2015).

Les embryons qui n'ont plus la voie PDGF activée (comme les embryons *Pdgfra*^{-/-}) ont une mort cellulaire plus importante au niveau de l'EPr. Ici encore, l'inhibition de la voie n'affecte pas la spécification des cellules, mais intervient dans la survie de l'EPr (Artus *et al.*, 2013).

A l'inverse, la voie JAK/STAT activée par le LIF entraîne une augmentation de la population de cellules de l'EPr (Morgani & Brickman, 2015). Cette augmentation est due à la fois à une augmentation de la prolifération et à une inhibition de l'apoptose qui a lieu normalement dans l'EPr. La taille de celui-ci est donc également déterminée par la quantité de LIF produit dans l'embryon (Morgani & Brickman, 2015). Toutefois, les embryons mutants pour *Stat3* ne possèdent pas de défauts morphologiques au stade E3.5. Dans ces mutants, les défauts au niveau de la MCI apparaissent au moment de l'implantation où les cellules de la MCI entrent en apoptose (Do *et al.*, 2013).

Enfin, la voie des TGF β semble également avoir un rôle dans la différenciation de l'EPI. En effet, l'inhibition de cette voie favorise la prolifération des cellules épiblastiques sans atteindre le nombre de cellules de l'EPr. L'activation de la voie TGF dans l'embryon a donc un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules de l'EPI. (Ghimire *et al.*, 2015).

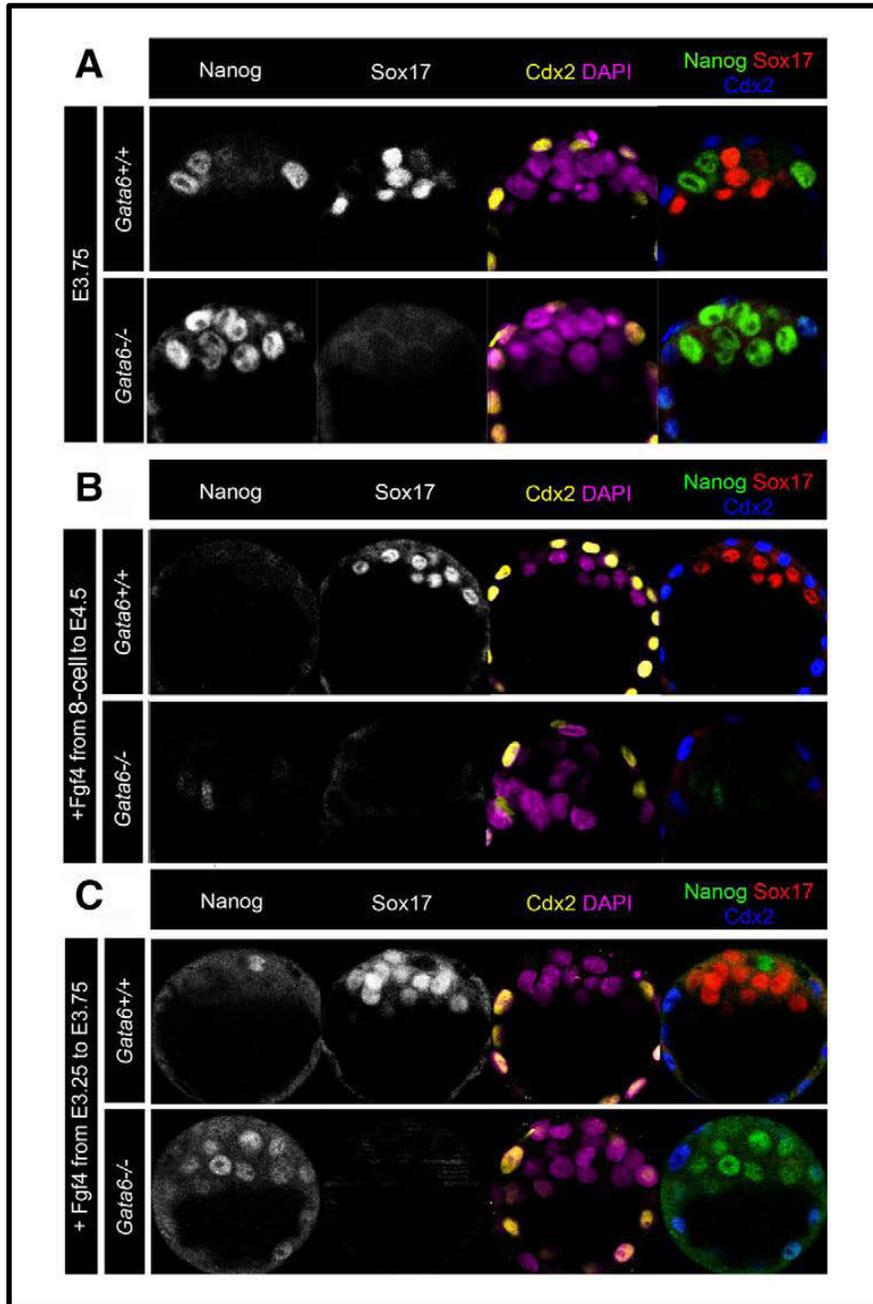


Figure 14 : Analyse des embryons *Gata6*^{-/-}.

(issue de Bessonard *et al*, 2014)

A : Immunolocalisation de NANOG, SOX17 et CDX2 au stade E3,75 dans les embryons sauvages et *Gata6*^{-/-}. L'EPr ne se spécifie pas en l'absence de *Gata6*.

B - C : Immunolocalisation de NANOG, SOX17 et CDX2 dans les embryons sauvages et *Gata6*^{-/-} après culture en présence de FGF4 du stade 8 cellules au stade E4,5 (B) ou du stade E3,25 au stade E3,75 (C).

4. Les acteurs de la spécification

a. Gata6 est nécessaire à la spécification de l'EPr

La famille GATA est composée de 6 membres (GATA1 à 6). Ce sont des phosphoprotéines avec deux doigts de zinc permettant leur liaison à l'ADN. Les facteurs de transcription GATA vont reconnaître une séquence consensus : A/T-GATA-A/G (Ko & Engel, 1993; Merika & Orkin, 1993).

Dans les cellules de l'EPr, l'activation des facteurs de transcription se fait selon l'ordre suivant : GATA6 > PDGFR α > SOX17 > GATA4 > SOX7 (Niakan *et al.*, 2010; Artus, Piliszek, & Hadjantonakis, 2011). GATA6 est donc le premier marqueur exprimé dans l'EPr.

- *Etudes des embryons Gata6^{-/-} mutants*

Les embryons *Gata6^{-/-}* présentent une absence complète d'EPr et meurent au stade E5.5 (Koutsourakis *et al.*, 1999; Schrode *et al.*, 2014). En effet, les marqueurs plus tardifs de l'EPr comme SOX17 ou GATA4 sont absents dans ces embryons. Toutefois, le nombre de cellules de la MCI ne varie pas dans les embryons mutants, ce qui signifie qu'il n'y a pas d'augmentation de l'apoptose ni de la prolifération dans ces embryons. De plus, les cellules de la MCI expriment toutes NANOG à un niveau d'expression équivalent à celui des cellules de l'EPI dans les embryons sauvages. En l'absence de GATA6 toutes les cellules de la MCI vont donc adopter un destin d'EPI. La présence de GATA6 est donc nécessaire à la spécification des cellules en EPr (Fig. 14) (Schrode *et al.*, 2014; Bessonard *et al.*, 2014).

Des cellules ES *Gata6^{-/-}* peuvent contribuer à la formation de l'EPI et de ses dérivés lorsqu'elles sont utilisées pour former des chimères après injection au stade

blastocyste. *Gata6* n'est donc pas requis pour la formation de l'EPI (Koutsourakis *et al.*, 1999).

En outre, dans les embryons *Gata6H2B-Venus/H2B-Venus* homozygotes (embryons *Gata6*^{-/-}), dont la régulation de la Vénus dépend du promoteur de *Gata6*, l'expression de la Venus est toujours visible malgré l'absence de GATA6. Cela suggère que *Gata6* n'est pas nécessaire à sa propre expression. Ce maintien d'expression pourrait être dû au maintien de la machinerie d'activation de *Gata6* dans ces embryons (Freyer *et al.*, 2015).

- *Etude des embryons Gata6 hétérozygotes*

Les embryons hétérozygotes pour *Gata6* possèdent également un phénotype : dans ces embryons le nombre de cellules d'EPr est plus faible que dans les embryons sauvages (Schrode *et al.*, 2014; Bessonard *et al.*, 2014), suggérant que la perte d'un allèle *Gata6* entraîne un effet dose dépendant qui se traduit par un biais vers un devenir EPI des cellules.

De plus, ces embryons présentent, jusqu'à des stades tardifs, un nombre plus important de cellules co-exprimant NANOG et GATA6 que les embryons sauvages. La spécification des cellules de l'EPr est donc retardée par la diminution de GATA6 (Schrode *et al.*, 2014; Bessonard *et al.*, 2014). Toutefois, ce retard n'affecte pas les fonctions de l'EPr, puisque les embryons hétérozygotes sont viables. Il est possible que l'EPr tolère une variabilité du nombre de cellules.

Par ailleurs, l'activation artificielle de la signalisation FGF/MAPK chez ces embryons *Gata6*^{+/-} montre une insensibilité des cellules EPI à celle-ci dès le stade E3.25. La perte de plasticité des cellules EPI hétérozygotes est donc plus précoce que celle des cellules EPI sauvages. (Schrode *et al.*, 2014; Bessonard *et al.*, 2014).

- *Régulation de l'expression de GATA6 par les facteurs de pluripotence*

Dans les cellules ES, il existe une répression mutuelle de NANOG et de GATA6 de manière à permettre une expression exclusive.

En effet, le promoteur de *Gata6* contient une séquence permettant la fixation de NANOG. NANOG pourrait donc réprimer de manière directe la transcription de *Gata6* (Singh *et al.*, 2007).

De plus, dans les cellules ES, GATA6 peut également interagir de manière directe avec sa propre séquence et ainsi permettre son maintien (Wamaitha *et al.*, 2015) contrairement à ce qui a été observé dans les embryons.

OCT4 est également nécessaire au maintien de GATA6 au stade blastocyste tardif (E4.0). En effet, dans les embryons *Oct4* mutants à ce stade, l'expression de GATA6 est présente dans très peu de cellules et à un faible niveau (Frum *et al.*, 2013).

- *Régulation de l'expression de GATA6 par la voie de signalisation FGF/MAPK*

La signalisation FGF/MAPK favorise la spécification en EPr, et va également jouer un rôle sur GATA6. En effet, dans les embryons *Fgf4* mutants, GATA6 est exprimé jusqu'au stade E3.25. Cela signifie que ni le FGF4 maternel ni le FGF4 zygotique ne sont requis pour l'initiation de l'expression de GATA6. En revanche, FGF4 est nécessaire pour le maintien de son expression (Kang *et al.*, 2013; Krawchuk *et al.*, 2013).

Cependant, inhiber la voie de signalisation FGF/MAPK entraîne une perte de l'expression de GATA6, comme le montrent les embryons *Grb2* mutants ou les traitements aux inhibiteurs de MEK et de FGFR2 (Chazaud *et al.*, 2006; Nichols *et al.*, 2009; Yamanaka *et al.*, 2010). Il existe deux hypothèses : soit une inhibition indirecte de *Gata6* due à la surexpression de NANOG soit un effet direct de la voie de signalisation FGF/MAPK sur *Gata6*. Le test de ces hypothèses, par un traitement avec des inhibiteurs contre FGFR et MEK sur des embryons *Nanog* mutants, a

montré une réponse en deux temps. Les embryons traités à partir du stade 8 cellules jusqu'au stade E4.5, ne montrent plus d'expression de GATA6. Donc, même si l'initiation de GATA6 ne requiert pas *Fgf4*, l'activation de la voie de signalisation FGF/MAPK par un autre facteur est nécessaire, de manière indépendante de NANOG. A l'inverse les embryons traités à partir de E3.25 expriment encore GATA6 ce qui signifie qu'à partir du stade blastocyste, l'expression de GATA6 est en partie contrôlée par l'expression de NANOG. Ceci est probablement nécessaire pour la mise en place du poivre et sel (Frankenberg *et al.*, 2011).

Il y a ensuite une boucle d'activation car en réponse à son activation par la signalisation FGF/MAPK, GATA6 peut se fixer sur le promoteur de la séquence *Fgfr2* et ainsi favoriser sa transcription (Wamaitha *et al.*, 2015).

Finalement, le traitement de cellules ES en cours de différenciation, par l'inhibiteur de MEK, entraîne une diminution de nombre de cellules exprimant GATA6. Par conséquent, la voie de signalisation MAPK détermine le seuil de GATA6 nécessaire pour la spécification en EPr (Schröter *et al.*, 2015).

- *Régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle de Gata6*

CSDE1, une protéine de liaison à l'ARN, est impliquée dans la répression de GATA6 dans les cellules ES. Les cellules déficientes pour *Csde1* se différencient spontanément en EPr pour 25% d'entre elles, avec une expression forte de *Gata6*, *Gata4* et *Pdgfra*. Le traitement des cellules à l'actinomycine, une molécule permettant de bloquer la transcription, a permis de montrer que l'absence de CSDE1 entraîne une augmentation de 25% de la stabilité de l'ARNm de *Gata6*. La répression post-transcriptionnelle de GATA6 par CSDE1 contribuerait donc à stabiliser la pluripotence des cellules EPI (Elatmani *et al.*, 2011).

Par ailleurs, GATA6 interagit avec BMI1. Ce facteur est retrouvé de manière homogène au stade 4 cellules, puis du stade 8 cellules au stade blastocyste précoce, il est présent dans les cellules qui co-expriment NANOG et GATA6 (Lavial *et al.*,

2012). Ensuite, son expression se réduit aux cellules exprimant uniquement GATA6. BMI1 et GATA6 s'associent pour stabiliser GATA6 grâce à l'inhibition de son ubiquitination et de sa dégradation par le protéasome. Cette stabilité permet de créer un biais au niveau de la balance entre NANOG et GATA6 au niveau cellulaire et donc renforce la spécification des cellules vers un destin d'EPr (Lavial *et al.*, 2012).

b. Nanog est nécessaire à la spécification de l'EPI

- *Expression de NANOG dans les cellules ES*

NANOG est un facteur de transcription à homéodomaine. Dans les cellules ES, l'expression de NANOG fluctue au cours du temps lorsqu'elles sont maintenues dans un état indifférencié, ceci même dans un milieu utilisant deux inhibiteurs de la voie de signalisation FGF (un inhibiteur de MEK et un inhibiteur de GSK3 : cocktail 2i) (Chambers *et al.*, 2007; Abranches *et al.*, 2014). Son invalidation génique dans ces cellules entraîne une diminution de la pluripotence au fil des passages marquée par la réduction de l'expression d'*Oct4* combinée à l'activation de *Gata6* et *Gata4* ainsi que par l'adoption d'une morphologie de type endodermique. NANOG n'est pas requis pour le maintien de la pluripotence mais il renforce fortement cet état puisque les cellules ES *Nanog*^{-/-} ont une plus grande tendance à se différencier. En revanche, il est requis pour la mise en place de la pluripotence puisqu'il est impossible de dériver des cellules ES à partir des embryons *Nanog*^{-/-} (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003).

- *Régulation de NANOG dans les cellules ES*

Dans de nombreux modèles *in vitro* de cellules pluripotentes, NANOG est requis ainsi que SOX2 et OCT4. Il existe une cassette de régulation HMG/POU au niveau du promoteur de *Nanog*. La fixation du complexe SOX2/OCT4 sur *Nanog* est encore plus efficace que pour *Fgf4* (Rodda, 2005). Le promoteur de *Nanog* possède

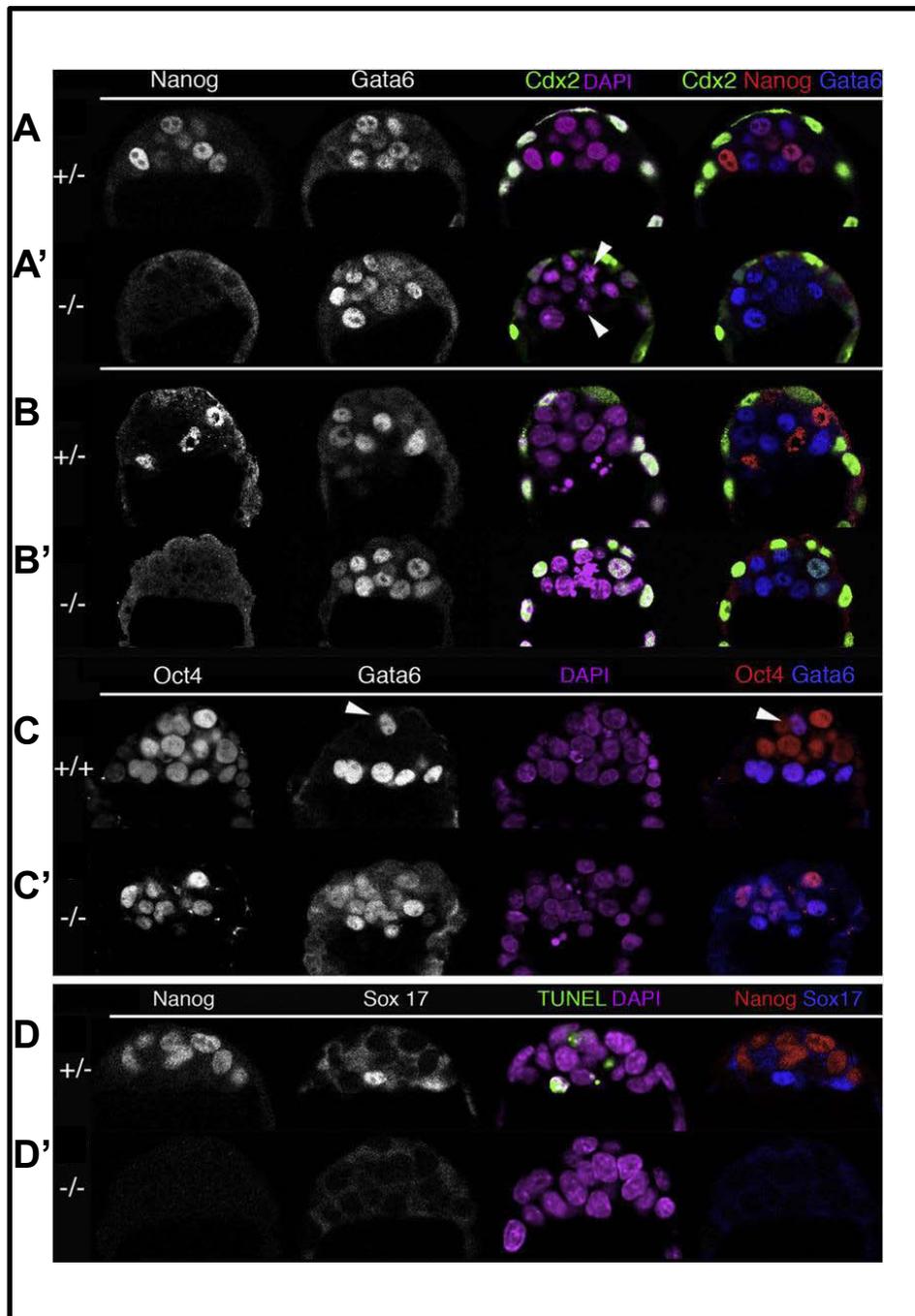


Figure 15 : Analyse des embryons *Nanog*^{-/-}.

(issue de Frankenberg *et al*, 2011)

A-A' : Immunolocalisation de NANOG, GATA6 et CDX2 au stade E3,5 dans les embryons sauvages (A) et *Nanog*^{-/-} (A'). Les têtes de flèche indiquent les cellules mitotiques dans lesquelles GATA6 n'a pas une localisation nucléaire.

B-B' : Immunolocalisation de NANOG, GATA6 et CDX2 au stade E4,0 dans les embryons sauvages (B) et *Nanog*^{-/-} (B'). *Nanog* est nécessaire à la spécification des cellules EPI.

C-C' : Expression de OCT4 et GATA6 au stade E4,5 dans les embryons sauvages (C) et les embryons *Nanog*^{-/-} (C'). Les têtes de flèche indiquent les cellules non triées qui expriment GATA6.

D-D' : Immunomarquage de NANOG, SOX17 et du TUNEL dans les embryons sauvages (D) et les embryons *Nanog*^{-/-} (D') au stade E3,75. La différenciation de l'EPI nécessite la présence de *Nanog*.

également une cassette GATA qui permet la fixation directe de GATA6 et donc permettrait sa répression (Wamaitha *et al.*, 2015). Enfin, le promoteur de *Nanog* possède également une séquence consensus qui permet la fixation de sa propre protéine. Ainsi, NANOG peut s'autoréguler (Loh *et al.*, 2006). Dans les cellules ES, NANOG va s'autoréprimer. En effet, une induction de la perte de NANOG dans les cellules ES conduit à une augmentation de sa transcription (Navarro *et al.*, 2012; Fidalgo *et al.*, 2012).

Dans sa séquence, *Nanog* possède un seul cadre ouvert de lecture et 4 exons. Il existe un épissage alternatif qui peut donner deux exons¹ différents. Les différents variants ne possèdent pas les mêmes capacités pour l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules ES (Mitsui *et al.*, 2003; Das, Jena, & Levasseur, 2011).

- *Expression de NANOG durant l'embryogénèse précoce*

Durant le développement embryonnaire il existe 2 phases d'expression de NANOG. Son expression débute au stade 8 cellules et augmente rapidement durant le stade morula. Durant la spécification NANOG est maintenu dans les cellules EPI et est réprimé dans les cellules spécifiées en EPr de manière dépendante de la voie de signalisation FGF/MAPK. Il est alors distribué de manière bimodale au sein de la MCI (Chambers *et al.*, 2003; Chazaud *et al.*, 2006; Dietrich & Hiragi, 2007; Guo *et al.*, 2010; Xenopoulos *et al.*, 2015; Komatsu & Fujimori, 2015). Finalement l'expression de NANOG décroît à partir du stade E4.5 (Chambers *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2013)

Nanog serait transcrit de manière mono-allélique durant le développement précoce de l'embryon, son expression devenant progressivement bi-allélique au stade blastocyste tardif. L'expression allélique de *Nanog* est régulée par la voie de signalisation FGF qui induit un changement de conformation de la chromatine au niveau du promoteur de *Nanog* (Miyanari & Torres-Padilla, 2012).

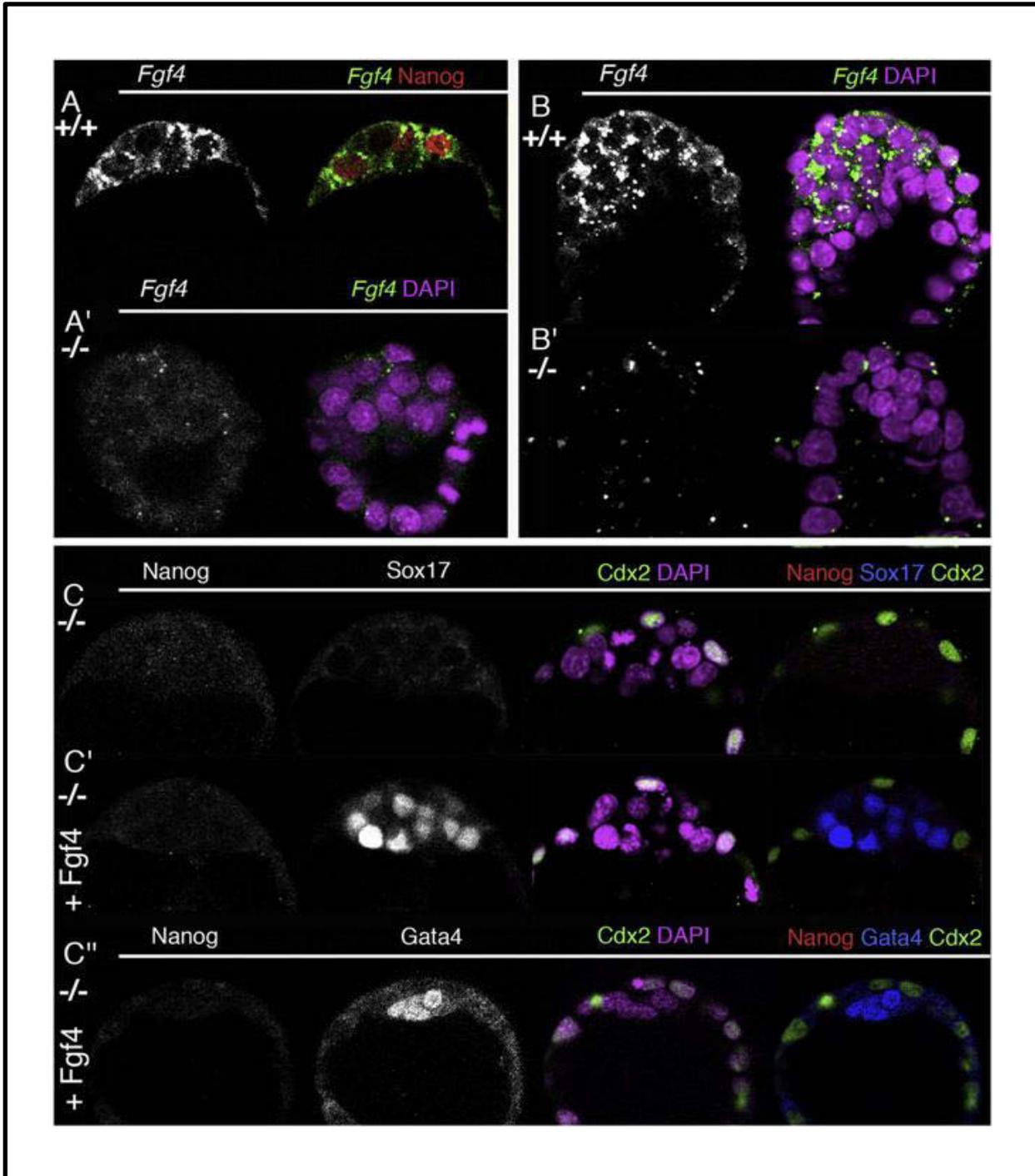


Figure 16 : Sauvetage de l'expression de SOX17 et GATA4 par traitement avec du FGF4 exogène dans les embryons *Nanog*^{-/-}.

(issue de Frankenberg *et al*, 2011)

A-A' ; **B-B'** : ARNm de *Fgf4* observé par hybridation *in situ* sur des embryons sauvages et *Nanog*^{-/-} au stade E3,75 (A-A') ou au stade E4,5 (B-B').

C-C'-C'' : Embryons *Nanog*^{-/-} cultivés en absence ou en présence de FGF4 exogène du stade E3,25 au stade E4,0 ou E4,5 (C'').

- *Etude des embryons Nanog^{-/-}*

Les embryons *Nanog^{-/-}* ne développent pas d'EPI, tandis que les embryons hétérozygotes pour *Nanog* ne montrent pas de problème de développement au stade blastocyste précoce, donc une seule copie du gène est suffisante pour remplir les fonctions de NANOG à ce stade (Fig. 15) (Messerschmidt & Kemler, 2010; Frankenberg *et al.*, 2011; Miyanari & Torres-Padilla, 2012). Toutefois, au stade blastocyste tardif, les embryons hétérozygotes pour *Nanog* présentent un délai dans la formation de l'EPr, suggérant l'importance de l'expression bi-allélique à ce stade (Miyanari & Torres-Padilla, 2012).

Les embryons *Nanog^{-/-}* présentent le même nombre de cellules au sein de la MCI et ne présentent pas de mort cellulaire plus importante. De plus, dans ces embryons toutes les cellules de la MCI expriment GATA6 montrant que NANOG est requis pour la spécification de l'EPI et en son absence les cellules de la MCI sont spécifiées en EPr. Toutefois, elles n'expriment pas les marqueurs tardifs de l'EPr comme GATA4 ou SOX17. Cela signifie que NANOG est requis pour la différenciation de l'EPr de manière paracrine (Fig. 15) (Messerschmidt & Kemler, 2010; Frankenberg *et al.*, 2011).

En outre, dans les embryons *Nanog* mutants l'expression de *Fgf4* qui se limite normalement aux cellules de l'EPI, est perdue. Ce résultat implique que NANOG est requis pour l'expression de *Fgf4* (Fig. 16). Or, FGF4 est nécessaire pour l'expression des marqueurs tardifs de l'EPr. En effet, lorsque les embryons *Nanog* mutants sont traités avec du FGF4 exogène, l'expression de SOX17 et de GATA4 dans les précurseurs de l'EPr est restaurée. NANOG agit ainsi sur la différenciation de l'EPr de manière paracrine via la signalisation FGF/MAPK (Fig. 16).

- *Régulation de l'expression de NANOG par la voie de signalisation FGF/MAPK*

La signalisation FGF/MAPK inhibe l'expression de NANOG. En effet, les embryons traités avec du FGF4 exogène, n'expriment plus NANOG (Yamanaka *et al.*, 2010). Cette inhibition pourrait être due à une surexpression de GATA6 qui inhiberait *Nanog*.

Pour répondre à cette question, deux équipes ont traité des embryons *Gata6* mutants avec du FGF4 exogène mais n'obtiennent pas les mêmes résultats. En effet, Schrode *et al* montrent que l'expression de NANOG persiste dans les embryons mutants traités. Ils en concluent que GATA6 est nécessaire pour inhiber NANOG par cette voie (Schrode *et al.*, 2014). A l'inverse, nous avons montré qu'il existe deux phases dans l'expression de NANOG, tout comme pour GATA6. Dans un premier temps, NANOG est sensible au FGF4 indépendamment de GATA6, il est donc absent dans les embryons *Gata6*^{-/-} traité au FGF4 précocement. Dans un second temps, NANOG devient insensible au FGF4 et reste exprimé lorsque les embryons sont traités au FGF4 à partir du stade E3.25 (Fig. 14), ceci impliquant la présence de GATA6 pour la répression de NANOG (Bessonnard *et al.*, 2014).

Il est donc difficile à l'heure actuelle de conclure sur les effets directs que la signalisation FGF/MAPK pourrait avoir sur NANOG.

5. La plasticité cellulaire est présente jusqu'au stade blastocyste tardif

Après la phase de spécification, les cellules de la MCI conservent une certaine plasticité dans leur engagement vers un lignage durant la spécification.

Des cultures d'embryons en présence d'inhibiteurs de la voie FGF/MAPK ont été réalisées avec différentes fenêtres de traitement afin d'étudier la phase suivant la spécification au stade E3.75 (Yamanaka *et al.*, 2010). La présence de ces inhibiteurs entraîne l'expression de NANOG dans toutes les cellules de la MCI (Fig. 13). Cependant, lorsque les embryons sont traités de E2.5 jusqu'à E3.75 en présence d'inhibiteurs puis sans durant 18h, GATA6 est exprimé dans certaines cellules (Yamanaka *et al.*, 2010). A l'inverse l'ajout d'inhibiteurs dans le milieu d'embryons cultivés sans jusqu'au stade E3.75 provoque l'expression de NANOG dans toutes les cellules de la MCI (Yamanaka *et al.*, 2010). Au-delà de ce stade, certaines cellules ne répondent plus au traitement inhibiteur et conserve leur destin. Les cellules de la MCI conservent donc une certaine plasticité jusqu'au stade blastocyste tardif pour contribuer aux différents lignages jusqu'à ce stade. En effet, bien que tous les progéniteurs de la MCI aient un potentiel équivalent pour contribuer à l'EPI et à l'EPr, certaines cellules peuvent modifier leur destin si la signalisation FGF/MAPK est modifiée (Yamanaka *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2010; Krupa *et al.*, 2014).

De plus, des expériences d'isolement de blastomères au stade 32 cellules ou au stade E3.5, remis en culture avec des cellules issues d'embryons à 4 cellules ou de morula ont été réalisées. Ces expériences montrent que les cellules descendantes de ces blastomères sont capables de contribuer à la fois à l'EPI et à l'EPr alors que leur destin est normalement décidé (Tarkowski *et al.*, 2010; Grabarek *et al.*, 2012).

Cependant, les précurseurs de l'EPI possèdent une plasticité réduite en comparaison des précurseurs de l'EPr, ceci est probablement dû au fait que ceux-ci sont à un stade plus avancé du fait de l'asynchronie de spécification des cellules (Grabarek *et al.*, 2012; Xenopoulos *et al.*, 2015).

La perte de cette plasticité semble plutôt coïncider avec l'exclusion d'OCT4 des cellules de l'EPr plutôt que due à l'expression des marqueurs de lignages spécifiques (Grabarek *et al.*, 2012).

En conclusion, après leur spécification asynchrone, les cellules de la MCI entre E3.25 et E3.75 gardent la capacité à donner n'importe lequel des 3 lignages, alors qu'une cellule issue d'un embryon à E4.5 est incapable de changer d'identité (Grabarek *et al.*, 2012). Le destin cellulaire est donc fixé entre E3.75 et E4.5.

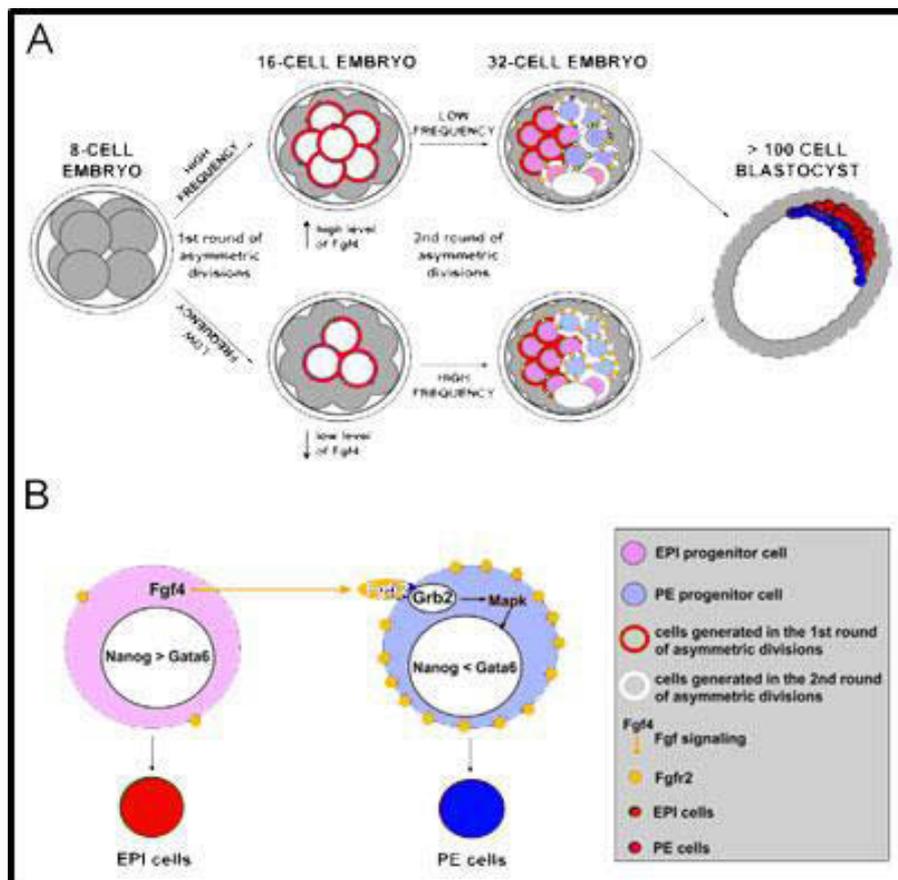


Figure 17 : Génération de deux populations dans la MCI.

(issue de Krupa *et al*, 2014)

A : La quantité de FGF4 produit par les blastomères issus de la première vague de divisions asymétriques entraîne une différence de réponse des cellules issues de la deuxième vague de divisions asymétriques.

B : Les cellules de l'EPr se spécifient en réponse à la sécrétion de FGF4 par les cellules de l'EPI.

6. Modèle de spécification

Tous ces résultats ont permis de mettre en évidence un système de régulation de la spécification basé sur les interactions entre NANOG, GATA6 et FGF4 (Fig. 18). Dans ce modèle, l'expression de chaque gène spécifique des différents lignages s'affine peu à peu, à la fois par des boucles de régulation positive et par une répression mutuelle, pour créer deux populations de cellules (Ohnishi *et al.*, 2013; Bessonnard *et al.*, 2014).

Dans un premier temps, NANOG et GATA6 s'inhibent l'un l'autre, et chacun active ou réprime sa propre expression *in vitro*. Cette boucle d'activation peut être directe comme chacune des deux protéines peut se lier à sa propre séquence, ou indirecte.

Il existe au sein de l'embryon 3 états stables :

Un état « MCI » où NANOG et GATA6 sont co-exprimés.

Un état « EPI » où NANOG est exprimé mais pas GATA6.

Un état « EPr » où GATA6 est exprimé mais pas NANOG.

En plus de ces deux facteurs, la voie de signalisation FGF/MAPK joue un rôle majeur dans la spécification. Cette voie, activée par la fixation de FGF4 à son récepteur FGFR2, favorise la synthèse de GATA6 et réprime l'expression de NANOG. Finalement NANOG va moduler l'expression de *Fgfr2* tandis que GATA6 la favorise (Fig. 17 et 18) (Niakan *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011).

La spécification d'une ou plusieurs cellules de la MCI en EPI vers E3,0 va toujours précéder la spécification en EPr dans les autres cellules (Bessonnard *et al.*, 2014; Xenopoulos *et al.*, 2015). Ainsi, NANOG est spécifié en premier et de manière asynchrone dans les cellules de la MCI. Les cellules spécifiées en EPI vont synthétiser et sécréter du FGF4 (Fig.18) (Guo *et al.*, 2010; Krawchuk *et al.*, 2013;

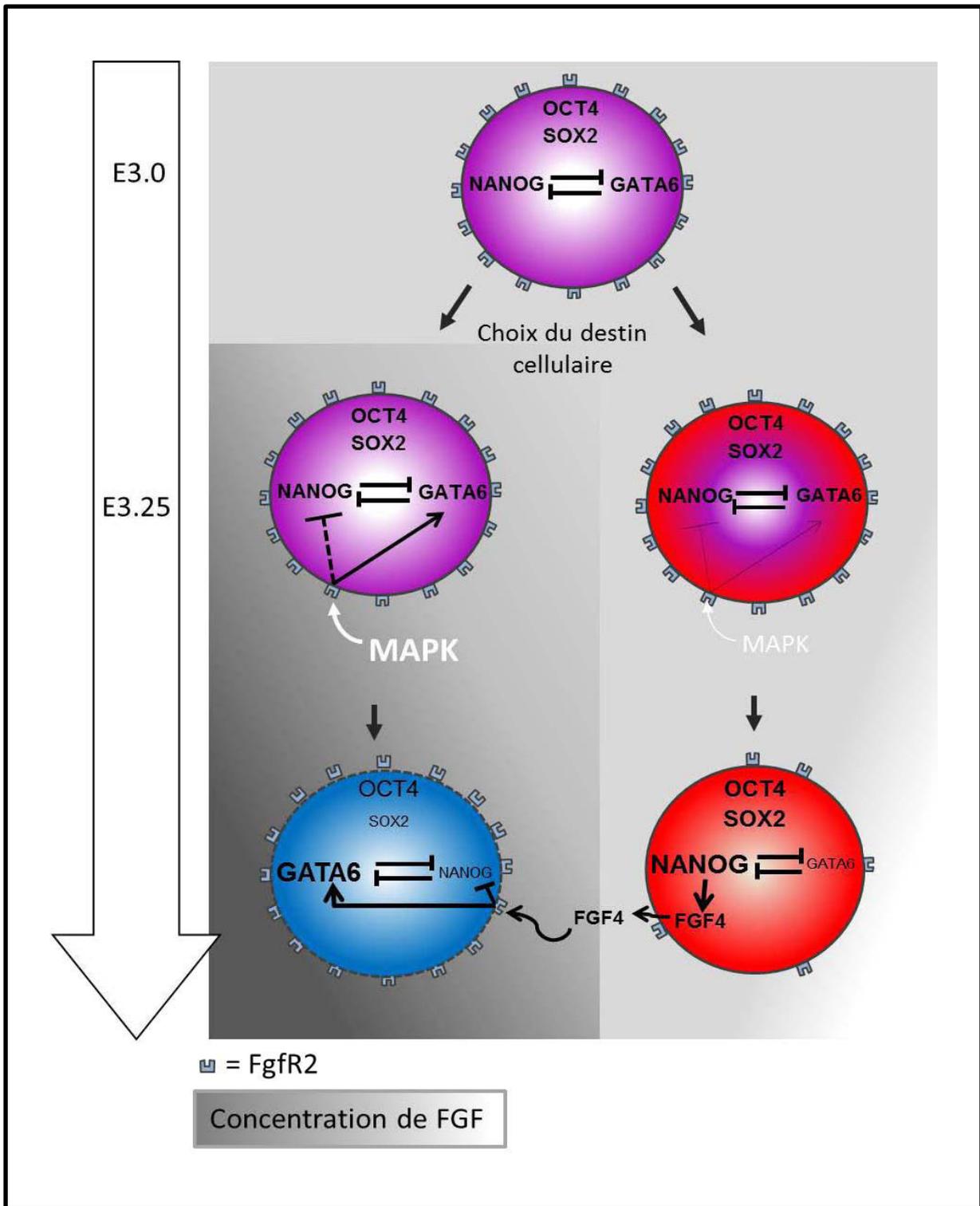


Figure 18 : Modèle de la spécification dans l'embryon pré-implantatoire.
 Une diminution du signal MAPK va entraîner dans certaines cellules, la perte de l'équilibre entre NANOG et GATA6 en faveur de NANOG (cellule violette/rouge). Cela permet une spécification de certaines cellules en EPI (cellule rouge) et donc la sécrétion par ces cellules de FGF4. Celui-ci va se fixer sur les cellules voisines ce qui va permettre la spécification de celles-ci en Epr (cellule bleue).

Krupa *et al.*, 2014) qui va se fixer sur les récepteurs FGFR2 des cellules les plus proches.

Les cellules alentours exprimant FGFR2 vont pouvoir répondre au signal FGF4 généré par les premières cellules. En réponse à l'activation de la voie de signalisation FGF/MAPK, l'expression de GATA6 va donc augmenter dans ces cellules entraînant alors une inhibition de l'expression de NANOG, à la fois par GATA6 et par l'activation de la voie FGF/MAPK. Ces cellules vont donc se spécifier en EPr (Fig 17 et 18).

Néanmoins, la raison pour laquelle l'expression de FGF4 et/ou NANOG augmente dans seulement quelques cellules reste encore obscure. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer l'induction du motif en « poivre et sel » :

- activation stochastique de l'expression génique, renforcée par les différences intercellulaires au niveau de la sécrétion et de la signalisation FGF/MAPK (Ohnishi *et al.*, 2013).
- diminution de la forme phosphorylée de ERK, ou la présence/absence d'un autre facteur dans quelques cellules qui favoriserait l'expression de NANOG et faciliterait la sécrétion de FGF4 (Fig.18) (Bessonard *et al.*, 2014).
- l'historique du biais de divisions cellulaires asymétriques, basé soit sur l'expression de *Fgfr2* soit sur l'accumulation de cellules internes exprimant FGF4 (Fig. 17) (Krupa *et al.*, 2014).

La spécification en « poivre et sel » serait donc conditionnée par un dialogue entre les cellules (Morris *et al.*, 2013; Krupa *et al.*, 2014). Ce dialogue passe par une expression hétérogène de FGF4. En effet, l'expression hétérogène de FGF4 permettrait à certaines cellules de se spécifier en EPI en asynchronie tandis que d'autres se spécifient en EPr (Fig. 18).

E. Maturation des lignages

1. La maturation de l'EPr

Les cellules engagées vers l'EPr vont ensuite maturer, exprimer des marqueurs plus tardifs comme GATA4, SOX17 et PDGFR α (Platelet derived growth factor α), se différencier en EPr fonctionnel et migrer à la surface de la MCI pour former une monocouche de cellules polarisées entre la cavité blastocœlique et l'EPI.

Dans les cellules de l'EPr, l'activation des facteurs de transcription se fait selon l'ordre suivant : GATA6 > PDGFR α > SOX17 > GATA4 > SOX7 (Niakan *et al.*, 2010; Artus *et al.*, 2011).

- *Etude de SOX17 dans l'embryon*

SOX17 est un des premiers facteurs à être activé dans l'EPr. En effet, la transcription de *Sox17* commence entre le stade morula et le stade blastocyste. Au niveau protéique, son apparition se fait au stade blastocyste où elle est restreinte aux cellules de l'EPr qui expriment également GATA6 (Niakan *et al.*, 2010).

Dans les embryons *Sox17*^{-/-}, la spécification des 3 premiers lignages n'est pas affectée et la localisation des marqueurs de l'EPr comme GATA6 et SOX7 reste correcte. La présence de SOX7 pourrait donc compenser la perte de SOX17. Cependant, les cellules de l'EPr se dispersent dans l'embryon et migrent prématurément. Ceci est dû à une mauvaise localisation des protéines constituant la matrice extracellulaire. En effet, SOX17 n'est pas requis pour l'expression des protéines de la membrane basale mais pour leur localisation (Artus *et al.*, 2011). Par ailleurs, SOX17 peut se lier aux régions régulatrices d'un grand nombre de gènes codant des composants de la membrane basale et favoriser leur expression (Niakan *et al.*, 2010). En outre, il est impossible de dériver des cellules XEN (cellules

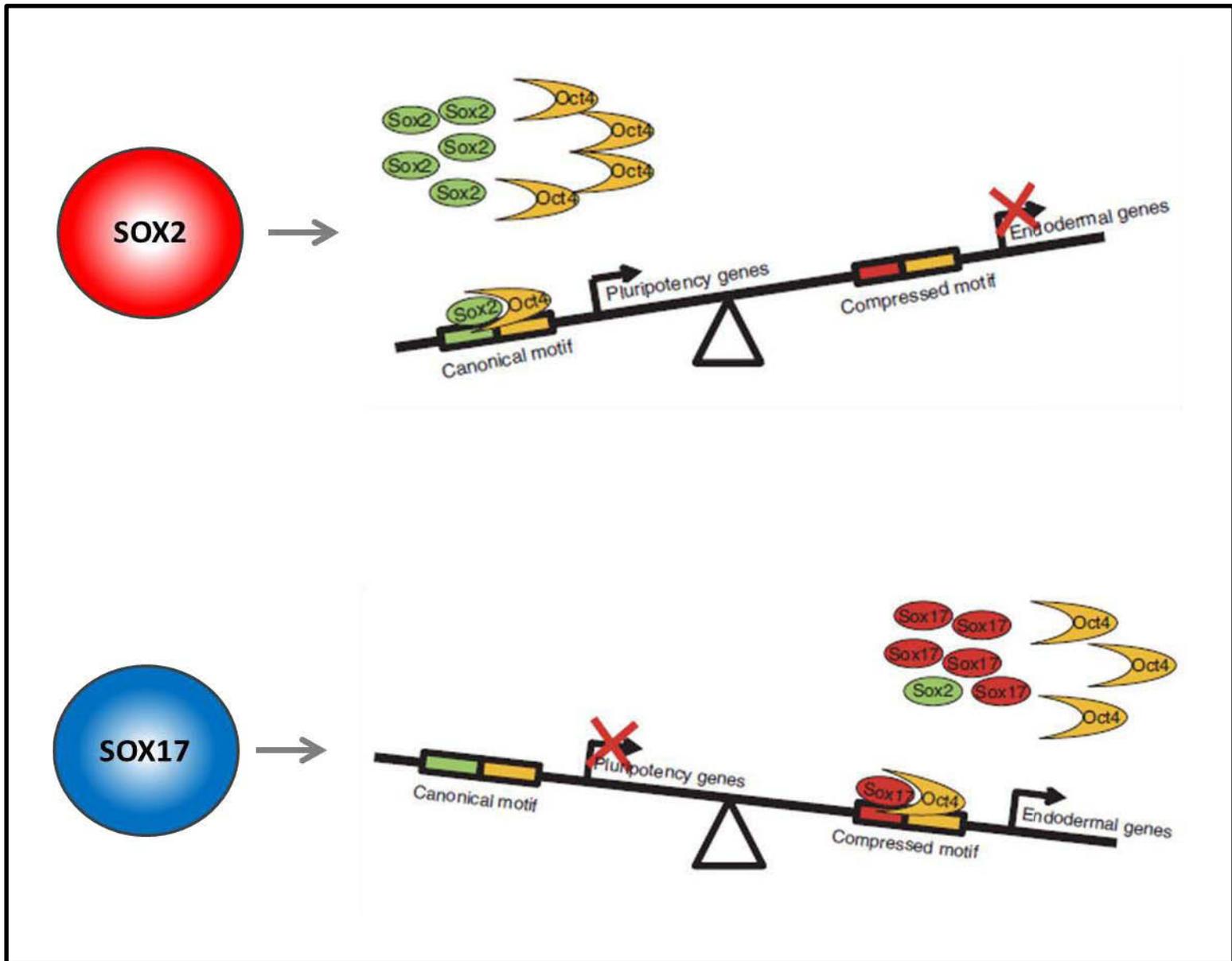


Figure 19 : Conséquence de l'association d'OCT4 avec différents membres de la famille des SOX dans les cellules ES.

(adaptée de Aksoy *et al*, 2013)

Dans les cellules ES indifférenciées, OCT4 coopère avec SOX2 et reconnaît un motif canonique présent dans de nombreux gènes de pluripotence. Lorsque SOX17 apparaît dans la cellule, la balance des facteurs SOX bascule, OCT4 change de partenaire et reconnaît des séquences compressées présentes dans de nombreux gènes de l'EPr.

souches de l'endoderme extra-embryonnaire) à partir des embryons *Sox17*^{-/-}. Cela implique que SOX17 joue un rôle dans l'intégrité épithéliale mais également dans la différenciation de l'EPr (Niakan *et al.*, 2010).

En revanche, l'induction de *Sox17* dans les cellules ES est suffisante pour permettre l'expression de marqueurs de l'EPr comme *Gata6* ou *Gata4* ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène IV ou la laminine B1. Cependant, son induction n'est pas suffisante pour éteindre l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence notamment NANOG dont l'expression ne varie pas après une induction de 48h (Niakan *et al.*, 2010; Aksoy *et al.*, 2013).

- *SOX17 et SOX2 en compétition*

Comme pour SOX2, la fixation de SOX17 sur l'ADN, se fait sur des cassettes HMG/POU en association avec OCT4 (Aksoy *et al.*, 2013). Toutefois, la séquence n'est pas exactement la même que pour la fixation de SOX2. En effet, le recrutement coopératif de SOX17 et OCT4 se fait par reconnaissance d'une séquence dite « compressée ». Ce motif possède une paire de bases en moins que le motif « canonique » reconnu par le couple SOX2/OCT4 (Aksoy *et al.*, 2013). Le profil de liaison génomique d'OCT4 dépend donc du facteur SOX présent dans la cellule. Un motif « compressé » est retrouvé dans un grand nombre de promoteurs de gènes transcrits lors de la différenciation endodermique comme *Gata4* ou *Lama1* (laminine α 1), tandis que le motif canonique prédomine dans les domaines de régulation des gènes de l'EPI (Fig. 19). Finalement la perte du motif compressé au profit d'un motif canonique entraîne un changement de partenaire pour OCT4 et donc une altération de la différenciation de l'EPr (Fig. 19) (Aksoy *et al.*, 2013).

Ce lien entre OCT4, SOX2 et SOX17 a été mis en évidence dans les cellules ES traitées avec du BMP2 où un changement de partenaire entraîne leur différenciation vers un profil cardiaque (Stefanovic *et al.*, 2009; Abboud *et al.*, 2015).

- *Les autres membres de la famille GATA*

Deux autres membres de la famille GATA sont impliqués dans la maturation de l'EPr, il s'agit de GATA4 et GATA5. GATA4 est détectée vers E3.75-E4.0 dans les cellules de l'EPr (Plusa *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2008). L'analyse des embryons mutants pour ces gènes donne des phénotypes au niveau cardiaque pour *Gata4* (Molkentin *et al.*, 1997) et au niveau du tractus génital femelle pour *Gata5* (Molkentin, 2000). GATA4 et GATA5 ne sont donc pas requis pour la différenciation de l'EPr. Toutefois, dans des cellules ES, l'absence de GATA4 ne permet pas l'expression de DAB2 malgré une expression ectopique de GATA6, ce qui signifie que ces deux facteurs sont nécessaires. En outre, la transfection de GATA5 dans ces cellules restaure l'expression de DAB2 (Capo-chichi *et al.*, 2005) suggérant qu'il existe une redondance fonctionnelle importante entre ces gènes. Cela laisse à penser que des mécanismes de compensation permettent de sauver le phénotype préimplantatoire des embryons *Gata4*^{-/-} et *Gata5*^{-/-}.

- *Tri cellulaire*

En parallèle de leur différenciation, les cellules de l'EPr vont se trier pour former une monocouche de cellules séparant l'EPI de la cavité blastocœlique. Ce tri implique à la fois des mécanismes passifs et actifs.

Ainsi, la culture d'embryons en présence de cytochalasine D, une mycotoxine qui bloque la polymérisation de l'actine, provoque une diminution importante des mouvements cellulaires. La ségrégation des cellules de la MCI requiert donc un mouvement actif dépendant de l'actine (Meilhac *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2009).

Par ailleurs, les divisions cellulaires vont aussi influencer les mouvements cellulaires. En effet, une cellule en métaphase va s'arrondir, poussant les cellules voisines. A l'inverse, après l'anaphase, lorsque les deux cellules sœurs se séparent,

les cellules voisines vont occuper l'espace entre elles (Meilhac *et al.*, 2009). Ainsi, les cellules filles ne seront pas positionnées au même endroit que la cellule mère.

De plus, l'apoptose qui touche la MCI au stade E3.75 pourrait être un mécanisme supplémentaire favorisant la ségrégation des deux tissus (Plusa *et al.*, 2008; Meilhac *et al.*, 2009; Morris *et al.*, 2010; Xenopoulos *et al.*, 2015).

En outre, l'acquisition de la polarité peut également influencer le tri et la position des cellules. L'établissement de la polarité par le biais de la localisation apicale de DAB2 et aPKC est requis pour fixer les cellules à la surface et pour éviter un remélange (Yang *et al.*, 2007; Gerbe *et al.*, 2008; Saiz *et al.*, 2013). Ainsi, un mécanisme dépendant de la polarité maintient la séparation des cellules EPI de l'EPr. Ainsi, les cellules de l'EPr situées à la surface de la MCI se polarisent de manière individuelle sans attendre que toutes les cellules de l'EPr soient positionnées (Gerbe *et al.*, 2008). La polarisation de la protéine aPKC est en effet dépendante du positionnement des cellules, mais est également soumise à l'acquisition par la cellule d'une identité d'EPr dépendante de la voie de signalisation FGF (Saiz *et al.*, 2013).

2. La maturation de l'EPI

Au stade E4.5, les cellules de l'EPr forment une simple couche adjacente à la cavité blastocœolique et recouvrent les cellules EPI apolaires. L'EPI est la lignée cellulaire qui produira toutes les cellules du futur fœtus. Très peu de choses sont connues sur la maturation de l'EPI. Ces cellules doivent rester dans un état de pluripotente. Elles sont caractérisées par l'expression de SOX2 (Chambers *et al.*, 2003; Avilion, 2003).

Il existe une diminution de l'expression de NANOG au stade E4.5 qui dépend de la présence de *Fgf4* (Chambers *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2013). Dans les embryons *Gata6* mutants, l'expression de NANOG diminue de la même manière que dans les embryons sauvages ce qui signifie que cette perte d'expression n'est pas dépendante de l'EPr (Bessonard *et al.*, 2014). En outre, cette diminution est hétérogène. Les cellules pour lesquelles NANOG n'est plus exprimé vont en retour exprimer un activateur de la voie Nodal : ASE. Cela suggère que la perte de NANOG lève l'inhibition de la voie Nodal. Il a été montré que l'absence de Nodal induit une différenciation neurale très précoce. Ainsi, un relais entre NANOG et la voie TGF β /Nodal pourrait maintenir la pluripotente (Camus *et al.*, 2006; Granier *et al.*, 2011).

Il existe d'autres marqueurs de l'EPI comme *Fgf5* dont l'expression commence au stade E4.5 (Haub & Goldfarb, 1991) ou encore *Essrb* (Guo *et al.*, 2010).

Pendant l'implantation, les cellules EPI évoluent d'un état de pluripotente « naïf » à un état « apprêté » en vue de la gastrulation. Ce changement de potentiel est associé à un profond changement morphogénétique. L'EPI va passer d'une masse apolaire de cellules à un épithélium simple couche polarisé entourant un lumen central, la cavité amniotique.

Des études ont d'abord suggéré que cette transformation était médiée par une phase d'apoptose au sein de l'EPI suivie d'une polarisation et d'une épithélialisation (Coucouvanis & Martin, 1995).

Cependant, une étude récente a montré que l'EPI forme d'abord une structure polarisée en rosette et que la formation et l'expansion du lumen se fait indépendamment de l'apoptose. L'élément déclencheur de la formation en rosette semble être la production de protéines de la matrice extracellulaire entourant l'EPI, comme les laminines (Bedzhov *et al.*, 2014).

En conséquence, l'internalisation des cellules, leur position, leur polarisation et leur tri cellulaire se combinent pour déterminer et maturer les lignages distincts de l'embryon préimplantatoire de souris.

Objectifs

Objectifs

Au sein de l'équipe, nous nous intéressons aux mécanismes génétiques qui régissent la spécification des lignages cellulaires au sein de l'embryon et plus particulièrement entre l'EPI et l'EPr.

Toutes les études menées jusqu'à présent impliquent le rôle des facteurs de transcription NANOG et GATA6. Il s'agit de facteurs clés dans la différenciation des cellules en EPI ou en EPr. De plus, la voie FGF/MAPK joue un rôle critique dans l'acquisition de l'identité EPr et la perturbation de son activité impacte directement sur le ratio EPr/EPI dans la MCI.

Il a également été montré dans notre équipe que, chez les mutants homozygotes pour NANOG, toutes les cellules de la MCI expriment GATA6 et se spécifient donc en EPr. A l'inverse, dans les mutants homozygotes pour GATA6, toutes les cellules de la MCI expriment NANOG et donc deviennent des cellules épiblastiques.

Nous cherchons actuellement des facteurs en amont qui pourraient faire pencher la balance vers un destin ou l'autre, étant donné que NANOG et GATA6 sont co-exprimés au moment de la spécification.

Je me suis donc attachée à disséquer le devenir des cellules de la MCI dans des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} mutants durant la spécification. En effet, nous pensons que la MCI de ces embryons ne se spécifie ni en EPI, ni en EPr et donc nous cherchons à voir si une autre hétérogénéité existe dans ces embryons.

Pour cela, j'ai analysé l'expression de différents marqueurs, à la fois au niveau protéique par immunofluorescence et au niveau ARN par RT-qPCR sur des MCI isolées pour connaître l'identité de ces cellules.

Puis j'ai cultivé ces embryons en présence d'inhibiteur ou d'activateur de la voie FGF et observé le comportement des cellules de la MCI.

Résultats

Résultats

A. Publication méthodologique

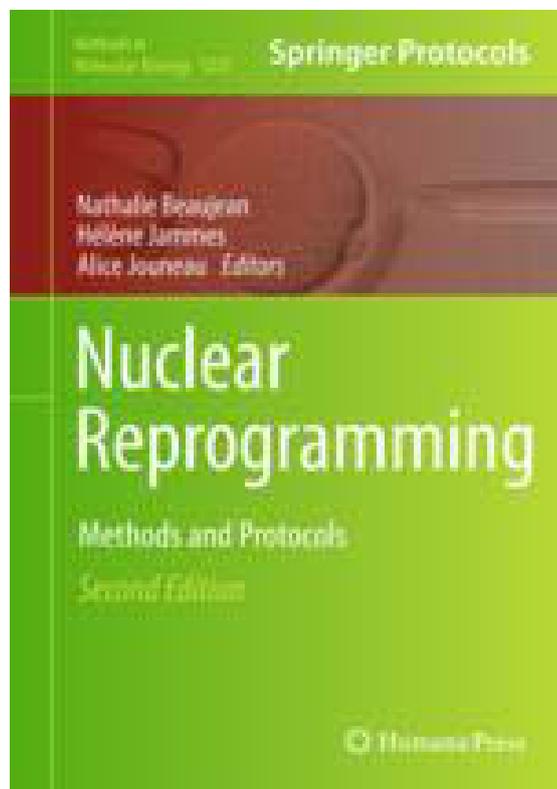
Au cours de ma thèse, j'ai co-signé en co-auteur un chapitre de livre concernant l'analyse des lignées et de la mort cellulaires au sein des blastocystes par immunomarquage.

Titre: Assessment of cell lineages and cell death in blastocysts by immunostaining.

Sabine Chauveau¹ and Claire Chazaud¹

1 GReD; INSERM 1103; UMR CNRS 6293; Clermont Université; F-63001 Clermont-Ferrand

* E-mail: claire.chazaud@udamail.f



Summary:

During the last decade it was shown that most mammalian blastocysts are consisted of three cell lineages. Immunofluorescence with multiple antibodies enables to identify each cell type allowing an easy detection of eventual defects. It is complementary to RT-PCR experiments as this technique allows to look at cell position and to analyse and count the proportions between the different cell types. Thus after any kind of embryo manipulation such as nuclear transfer (NT), the analysis of the three cell lineages by immunofluorescence will provide criteria for good or poor development.

Key words: immunofluorescence, blastocyst, cell lineages, cell death detection, confocal microscopy

1. Introduction

Early in development, mammalian embryos establish extraembryonic tissues to prepare for nutritional needs while developing pluripotent cells for the formation of the embryo proper. The first cell lineage differentiation separates inner cell mass (ICM) cells from trophectoderm (TE) cells. Due to their position and polarisation, the outer cells of the late morula acquire a TE identity, visualized by the expression of *Cdx2*, *Gata3* and, later, *Eomesodermin* **(1)**. ICM cells on the other hand express *Oct4*. In mice, while *Cdx2*, *Gata3* and *Oct4* are initially coexpressed from around the 8-cell stage, their expression is clearly restricted to the TE or the ICM respectively at the blastocyst stage. Thus, the presence of ambiguous cells could be a sign of developmental delay or defect. After TE specification, ICM cells differentiate into Epiblast (Epi) and Primitive Endoderm (PrE) lineages. By the late blastocyst stage in the mouse, Epi- and PrE-precursor cells are intermingled within the ICM in a "salt and pepper" pattern. Up to now, cell fate was not clearly associated to cell position and actual models present a stochastic activation of cell specification. *Nanog* and *Gata6* were the first genes to show an exclusive and reciprocal expression pattern by E3.5 in the mouse **(2)** while being coexpressed at earlier stages **(3)**. Between the late morula stage (E3.0) and the late blastocyst stage (E3.75), individual ICM cells select their identity by downregulating either *Nanog* or *Gata6* expression **(4)**. However cells are not synchronized, some ICM cells being specified later than others, yielding to difficult analyses. In spite of that, cells are generally specified by E3.75. Differences in the populations proportions has been observed between mouse strains but are generally close to 50% for Epi (50-40% of ICM cells) and PrE (50-60%) **(5)**. Thus, when analysing other mammalian species or strains, it is advised to examine cell numbers of on freshly collected blastocysts and compare to NT embryos. The proportions between these two cell populations might be important for the correct development of the embryo. Indeed, these cell lineages require each other for their further development and differentiation. For example, PrE needs *Fgf4* secreted from the Epi cells to be able to express *Gata4* and *Sox17*, that are later markers of PrE differentiation **(5, 6)**. Once ICM cells are specified, the two populations sort to give rise to two distinct tissues by E4.0, the PrE epithelium separating the Epi

from the blastocyst cavity. The correct segregation of ICM cells is another criteria of correct development.

Thus it is important that cells select their identity properly and in correct proportions of the three lineages. Analyses by RT-PCR have been done on whole NT embryos as the embryo is small ($\approx 80 \mu\text{m}$ wide) at that stage **(7, 8)**, but, as the different cell types are intermingled, it is difficult to assess the quality. Single cell RT-PCR techniques are available to study blastocysts **(4)** and are suitable to quantify each marker, however *in situ* analyses remain essential to observe cell repartition and numbers.

The following protocole is suitable to many (but not all) antibodies, although to identify the three cell types, we advise to use Cdx2 (TE), Nanog (Epi) and Gata6 (PrE) or Sox17 (PrE) antibodies. They are all transcription factors that label the nucleus, making it easy for detection and cell count. As the three cell lineages must be detected on the same samples, antibodies produced in different animals are to be used to avoid cross-reactions. A TUNEL reaction can be added to detect cell death. Note that as TUNEL detects fragmented DNA, nucleus integrity is lost in the dying cells and it is thus impossible to determine the identity of the cell with the above markers.

Here we describe the protocole routinely carried out on mouse preimplantation embryos. Briefly embryos are collected and fixed with paraformaldehyde. They are then incubated with the primary antibodies, all at the same time and afterwards with secondary antibodies. A TUNEL reaction can be added as a last step. Observation is then performed on a confocal microscope to be able to distinguish the different nuclei within the volume of the embryo. Finally, after image acquisition, different softwares (manual or automated) can be used to count cell types.

For other mammals, this protocol has to be adapted (fixation, permeabilization...) and the antibodies that work well in the mouse need to be individually tested in other species.

2. Materials

1. Pulled Pasteur pipets and mouth tubing (*see Note 1*)
2. 4-well plates
3. Nutator mixer
4. 1X Phosphate Buffer Saline (PBS)
5. PFA: freshly dissolved 4% paraformaldehyde in PBS (can be kept at +4°C for one week)
6. PBT: 0.1% Tween 20 in PBS (*see Note 2*).
7. Fetal Bovine Serum (FBS)
8. Primary antibodies directed against Nanog, Cdx2, Gata6 and Sox 17 (*see Note 3*).
9. Secondary antibodies directed against the different animals of the primary antibodies. Make sure that each antibody is coupled to a different fluorophore that can be distinguished by the confocal microscope that will be used. Generally, Alexa488, Cy3, Cy5 suit to most microscopes (*see Note 4*).
10. Dapi or Hoechst DNA stains
11. TUNEL reaction kit that allows cell death detection (*see Note 5*). Coverslips for confocal microscopy
12. Coverslips for confocal microscopy
13. Isolators: Press-to-seal™ (P24743, Invitrogen) to avoid squashing the embryos during image acquisition.
14. Inverted confocal microscope
15. Image analysis software (*see Note 6*).

3. Methods

Unless otherwise indicated, experiments are performed at room temperature (RT) in 500 μ l solutions in 4-well plates. Except for mouth pipet transfers, embryos are kept in the well: the old solution is removed and replaced by the next one (gentle use of micropipets). During RT incubations and washes we use a nutator mixer that gradually places the embryos at the center of the well, enabling an easier pipeting and avoiding loss of samples.

3.1 Fixation

The protocol can be performed on freshly collected blastocysts or NT ones.

1. Briefly rinse the embryos in a 50 μ l drop of PBS by mouth pipet transfer.
2. Transfer embryos into PFA. Fix 15 min at RT or overnight (O/N) at +4°C (*see Note 7*).
3. Transfer in PBT. Wash three times 5 min in PBT.

3.2 Immunolabeling

4. Block antibody-specific sites with 10% FBS in PBT for 30 min.
5. Incubate with primary antibodies O/N at +4°C (*see Note 8*).
6. Wash with PBT for 5, 10, 15, 15 min.
7. Incubate for 30 min at RT with secondary antibodies and DNA dye, diluted in 10% FBS in PBT at concentrations advised by manufacturers.
8. Wash twice 5 min in PBT

3.3 TUNEL

For an additional TUNEL reaction using the In Situ Cell Death Kit (*see Note 9*):

1. Dilute the Enzyme Solution in the Label Solution at 1/10 (v/v). Mix well.
2. Transfer embryos in a 100 μ l drop of this labelling solution. Incubate 1 h at 37°C in a humidified chamber, in the dark.
3. Wash twice 5 min in PBT.

3.4 Mounting, imaging and counting

1. Cut out and stick insulator wells onto a coverslip. Remove the protection film. Fill microwells with 52 μ l of PBT.
2. Transfer embryos into a well. Cover with another coverslip, avoiding bubbles.
3. Confocal image acquisition can then be performed (*see Note 10*) using x40 objectives (Fig. 1).
Make z-sections every 2 microns.
4. Analyse/count each cell for its identity (single or colocalisation of different labellings) (*see Note 11*).

4. Notes

1. To prepare mouth pipets, stretch a glass capillary or a Pasteur pipet in the flame. Mouth tubing can be hand-made but are also commercially available. For more details refer to Chapter 11 and to Nagi and collaborators (**9**).
2. Tween can be replaced by Triton X100 at each PBT step
3. We recommend using the following primary antibodies that provide good signals (**Fig. 1**): rabbit Nanog (ab80892, Abcam, UK); mouse Cdx2 (ab86949, Abcam, UK); goat Gata6 (AF1700, R&D Systems, MN, USA); goat Sox17 (AF1924, R&D Systems, MN, USA).
4. For the primary antibodies cited in Note 3 you will need the following secondary antibodies: anti-mouse, -rabbit, -goat made in donkey. We usually work with antibodies from Jackson ImmunoResearch Laboratories (PA, USA) at 1/300 dilution.
5. We usually use the *In Situ* Cell Death Kit from Roche-Applied-Science.
6. ImageJ free software for example can be downloaded at <http://rsbweb.nih.gov/ij/>. IMARIS from Bitplane is another, more sophisticated, software dedicated to image restoration, visualization and analysis.
7. We have not seen any difference between 15 min RT and O/N at +4°C for the described antibodies Embryos can be stored a couple of days in PFA but it is preferable not to.
8. Dilute Nanog and Gata6 or Sox17 antibodies (see **Note 4**) at 1/300 into the Cdx2 antibody solution which is provided at 1X.. This Sox17 antibody makes a brighter signal than Gata6's. However, Sox17 is only suitable for late blastocyst stages as it is a later PrE marker than Gata6 in the mouse.
9. TUNEL reaction will occupy one channel during confocal imaging. Depending on your microscope and antibodies/fluorophores availability, it will be possible to carry out 4-channel acquisition (5 with DNA stainings). Otherwise, only two antibodies will be chosen for the experiment.

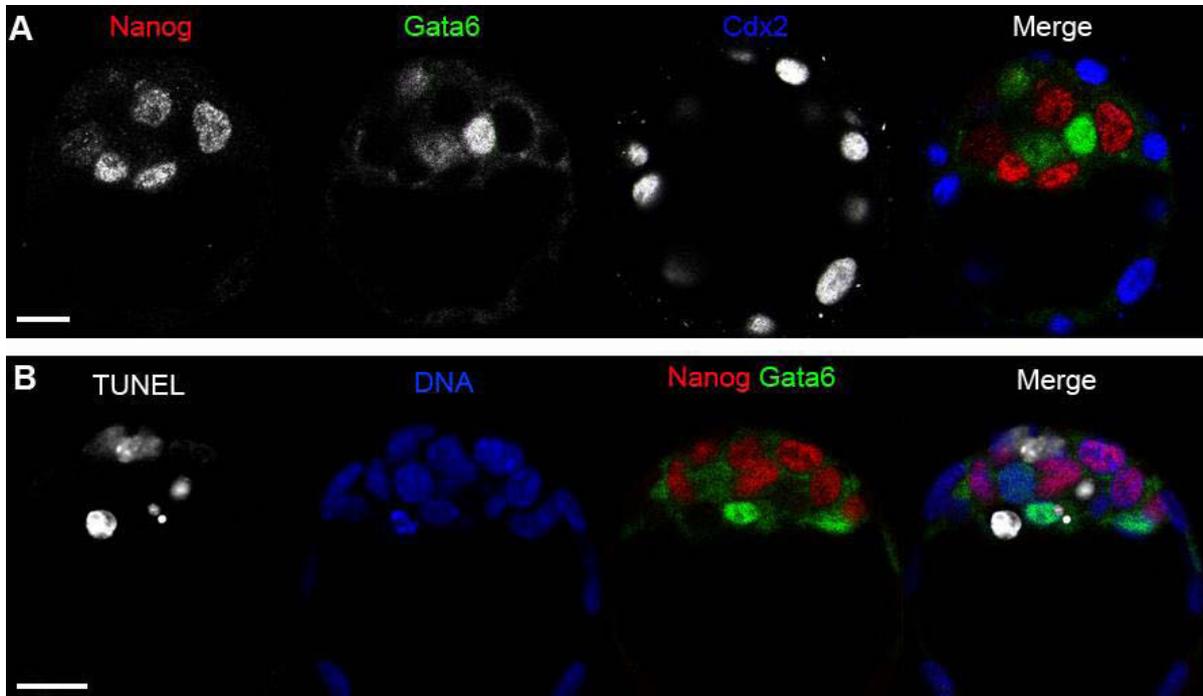


Figure 1 : Labeling of E3.75 mouse embryos. A: Immunostaining with Nanog (Cy3), Gata6 (Alexa-488) and Cdx2 (Cy5). B: TUNEL, DNA and immunofluorescence stainings. On this z-section 4 cells are apoptotic. Scale bars 20 μ m.

10. As embryos are mounted in PBT, image acquisition has to be done within 24h. Alternatively mounting media can be used.
11. This step can be manually carried out using the "multi-point selection" tool of ImageJ section by section or using more sophisticated tools, for example from IMARIS (Bitplane).

Acknowledgement

This work was supported by the ANR "EpiNodal".

Figure 1: Labeling of E3.75 mouse embryos. A: Immunostaining with Nanog (Cy3), Gata6 (Alexa-488) and Cdx2 (Cy5). B: TUNEL, DNA and immunofluorescence stainings. On this z-section 4 cells are apoptotic. Scale bars 20 μm .

References

1. Stephenson R.O., Rossant J., Tam P.P. (2012) Intercellular interactions, position, and polarity in establishing blastocyst cell lineages and embryonic axes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, doi:10.1101/cshperspect.a008235
2. Chazaud C., Yamanaka Y., Pawson T. et al. (2006) Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Dev Cell* **10**, 615-624
3. Plusa B., Piliszek A., Frankenberg S. et al. (2008) Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* **135**, 3081-3091
4. Guo G., Huss M., Tong G.Q. et al. (2010) Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev Cell* **18**, 675-685.
5. Frankenberg S., Gerbe F., Bessonard S. et al. (2011) Primitive Endoderm Differentiates via a Three-Step Mechanism Involving Nanog and RTK Signaling. *Dev Cell* **21**, 1005-1013.
6. Kang M, Piliszek A, Artus J, Hadjantonakis AK (2013) FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Development* **140**, 267-279.
7. Sebastiano V., Gentile L., Garagna S. et al. (2005) Cloned pre-implantation mouse embryos show correct timing but altered levels of gene expression. *Mol Reprod Dev* **70**, 146-154.
8. Jouneau A., Zhou Q., Camus A. et al. (2006) Developmental abnormalities of NT mouse embryos appear early after implantation. *Development* **133**, 1597-1607.
9. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K. et al. (2003) Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor edn., New York

Embryons issus du croisement ♀ Nanog+/- ; Gata6+/- * ♂ Nanog+/- ; Gata6+/-

Tri en fonction du stade de prélèvement

Nanog Gata6	+/+			+/-			-/-			total
	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-	

E3,25

Total	10	29	11	23	66	22	13	22	12	210
Pourcentages observés	4,76%	13,81%	5,24%	10,95%	31,43%	10,48%	6,19%	10,48%	5,71%	
Pourcentages mendéliens	6%	13%	6%	13%	25%	13%	6%	13%	6%	

E3,5

total	6	3	2	7	8	4	1	5	2	47
pourcentages observés	12,77%	6,38%	4,26%	14,89%	17,02%	8,51%	2,13%	10,64%	4,26%	
pourcentages mendéliens	6%	13%	6%	13%	25%	13%	6%	13%	6%	

E3,75

Total	15	44	20	27	89	36	14	30	15	298
Pourcentages observés	5,03%	14,77%	6,71%	9,06%	29,87%	12,08%	4,70%	10,07%	5,03%	
Pourcentages mendéliens	6%	13%	6%	13%	25%	13%	6%	13%	6%	

E4,5

Total	3	7	2	4	6	2	1	1	1	27
Pourcentages observés	11,11%	25,93%	7,41%	14,81%	22,22%	7,41%	3,70%	3,70%	3,70%	
Pourcentages mendéliens	6%	13%	6%	13%	25%	13%	6%	13%	6%	

Tableau 1 : Pourcentage d'embryons dans chaque génotype en fonction du stade de prélèvement.
 En bleu : embryons sauvages, en vert : embryons *Gata6*^{-/-}, en rouge : embryons *Nanog*^{-/-}, en violet : embryons *Nanog*^{-/-}; *Gata6*^{-/-}.

B. Analyse des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} mutants

1. Les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} sont morphologiquement retardés

Dans un premier temps, j'ai cherché à déterminer si les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} ont un phénotype plus précoce que les embryons simples mutants *Nanog*^{-/-} ou *Gata6*^{-/-}. Pour cela, j'ai collecté des embryons issus de croisements entre souris doubles hétérozygotes *Nanog*^{+/-} ; *Gata6*^{+/-}.

Les embryons ont été classés en fonction des stades auxquelles ils ont été prélevés. Quel que soit le stade de prélèvement des embryons, les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} sont retrouvés dans les proportions mendéliennes, avec de légères variations lorsque le nombre d'embryons collectés est faible (Tableau 1). Il apparaît donc que les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} se développent correctement jusqu'au stade E3.75. Le faible nombre d'embryons au stade E4.5 ne nous permet pas de conclure pour ce stade.

De manière intéressante, j'ai noté qu'au sein d'une même portée, tous les embryons ne sont pas au même stade de développement. Par conséquent, pour chaque stade, au sein d'un génotype, les embryons ont été classés selon leur morphologie (Fig. 20). Ce classement a été confirmé par l'expression de marqueurs étudiés par la suite.

L'examen morphologique des embryons a permis d'observer qu'au stade de prélèvement E3.25, certains embryons avaient plus la morphologie d'embryons de stade E3.0 sans cavité et d'autres sont déjà au stade E3.5 (Fig. 20).

Par ailleurs, au stade E3.75, les embryons pour lesquels *Gata6* est absent présentent un retard de développement. En effet, au stade attendu E3.75, 35,7% des embryons *Gata6*^{-/-} sont morphologiquement au stade E3.25 ou E3.5 (soit 4

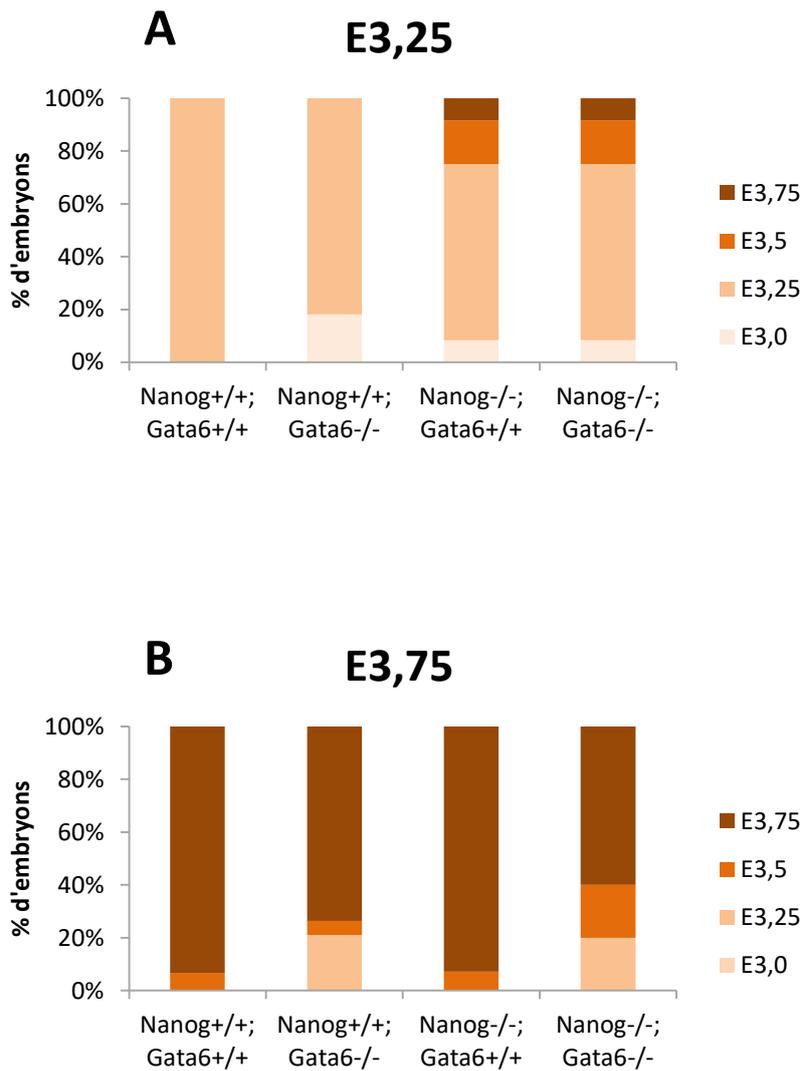


Figure 20 : Distribution des embryons collectés dans chaque génotype en fonction de leur morphologie.

Histogramme montrant la distribution des embryons prélevés au stade E3,25 (A) ou au stade E3,75 (B).

embryons sur 14 et 1 embryon sur 14 respectivement). De plus, 40% des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} sont retardés (soit 3 embryons sur 15 au stade E3.5 et 3 embryons sur 15 au stade E3.25) (Fig. 20).

Ainsi, au stade E3.75, l'absence de *Gata6* entraîne un retard de développement morphologique dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}.

Finalement, l'embryon *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} récolté au stade E4.5 était étioilé.

En conclusion, les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} ne sont pas morphologiquement différenciables des autres embryons jusqu'au stade E3.25 puis, leur morphologie n'est plus en adéquation avec le stade de développement. Ils ont tendance à être retardés morphologiquement bien que leur proportion mendélienne ne soit pas affectée.

De ce fait, pour la suite de mon étude, j'ai classé les embryons en fonction de leur morphologie plutôt qu'en fonction du stade de prélèvement. Les différents marqueurs étudiés et le nombre de cellules constituant la MCI ont confirmé ce classement morphologique.

2. Expression de différents marqueurs au sein des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}

Les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} restant morphologiquement intacts jusqu'au stade E3.25, l'identité des cellules de la MCI dans ces embryons a été étudiée.

Pour cela, des qRT-PCR ont été réalisées sur chaque MCI d'embryons pour les différents génotypes. L'expression relative de chaque gène est rapportée à son expression au début de la spécification au stade E3.0, dans les embryons sauvages.

Jusqu'au stade E3.0, la totalité de l'embryon est conservé puis, aux stades suivants, seule la MCI est conservée après immunochirurgie. Les stades E3.25 et E3.75 ont été privilégiés pour l'obtention des différents génotypes car il s'agit des stades au cours desquels à lieu la spécification.

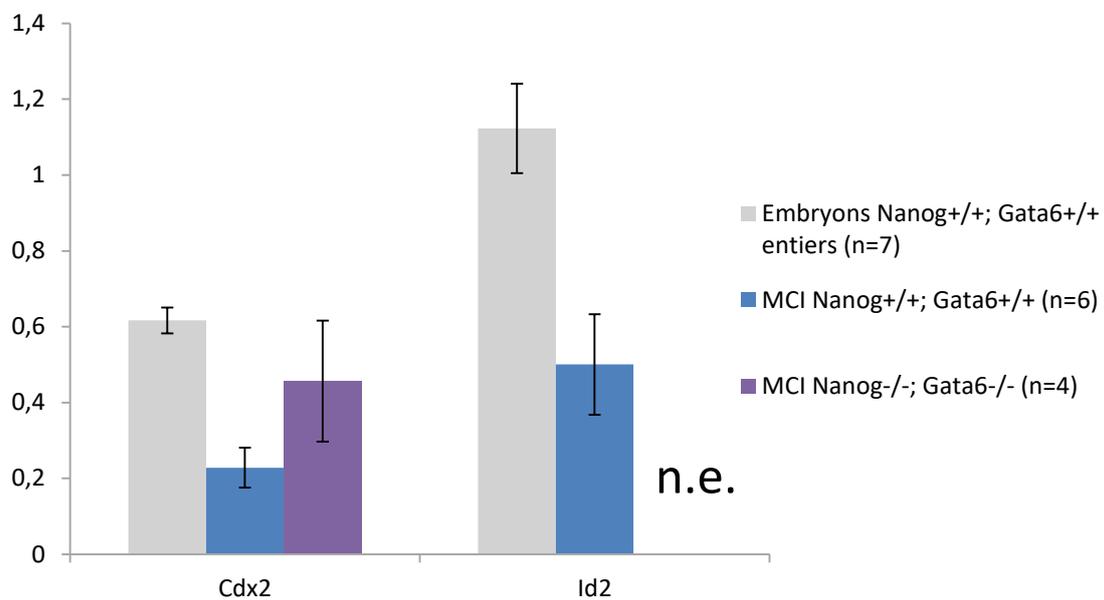


Figure 21 : Quantification de l'expression ARN des marqueurs du TE comparée entre embryons entiers et MCI au stade E3,75.

Histogramme montrant l'expression des marqueurs du TE dans des embryons entiers ou dans les MCI après immunochirurgie. Les valeurs brutes sont rapportées à la moyenne géométrique des valeurs obtenues pour les gènes de référence. n.e. : non exprimé.

a. Les marqueurs du TE sont sous la dépendance de *Nanog* et de *Gata6*

Dans un premier temps, les marqueurs du TE ont été analysés afin de déterminer si, en l'absence de *Nanog* et de *Gata6*, les cellules internes gardent une identité de MCI ou se spécifient en TE.

Comme les cellules du TE sont détruites lors de l'immunochirurgie, il n'est pas possible de comparer les valeurs obtenues pour les cellules de la MCI à celles du TE. Je les ai donc comparées avec celles obtenues lors d'analyse de ces marqueurs sur des embryons entiers (Fig.21).

L'expression de *Cdx2* est divisée par 3 lorsque la MCI des embryons sauvages est isolée, tandis qu'elle ne varie pas significativement pour les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} comparée aux embryons totaux sauvages (p=0.29, test de Mann Whitney) (Fig. 21). *Cdx2* est donc transcrit dans la MCI des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}. L'expression d'*Id2* est également divisée par 3 dans la MCI isolée des embryons sauvages comparée aux embryons totaux sauvages, et est complètement absente dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} (Fig. 21). L'absence de ce marqueur montre que les cellules de la MCI ne se spécifient pas en TE.

J'ai également comparé l'expression de *Cdx2*, *Gata3* et *Id2* au sein de la MCI des différents génotypes. Jusqu'au stade E3.0, l'étude des marqueurs a été faite sur l'embryon entier et montre que leur expression augmente (Fig. 22).

Chez les embryons *Nanog*^{-/-}, il existe une forte augmentation de l'expression de ces marqueurs entre les stades E3.25 et E3.75. Cette expression diffère significativement des embryons sauvages pour *Cdx2* au stade E3.75 (p=0,0152, test de Mann-Whitney) (Fig. 22 A). Les cellules de la MCI des embryons *Nanog*^{-/-} pourraient donc se spécifier en TE. En effet, il existe une légère expression de CDX2 dans la MCI des embryons *Nanog*^{-/-} au stade E4.5 (Chen et al., 2009; Silva et al.,

		<i>Nanog</i> ^{+/+} ; <i>Gata6</i> ^{+/+}	<i>Nanog</i> ^{+/+} ; <i>Gata6</i> ^{-/-}	<i>Nanog</i> ^{-/-} ; <i>Gata6</i> ^{+/+}	<i>Nanog</i> ^{-/-} ; <i>Gata6</i> ^{-/-}
Stade de développement	2 cellules	10			
	8 cellules compactées	3		4	
	16 cellules	3		4	
	E3,25	5	8	5	5
	E3,75	6	5	6	4

Tableau 2 : Nombre d'embryons analysés en RT qPCR en fonction du stade de développement et du génotype.

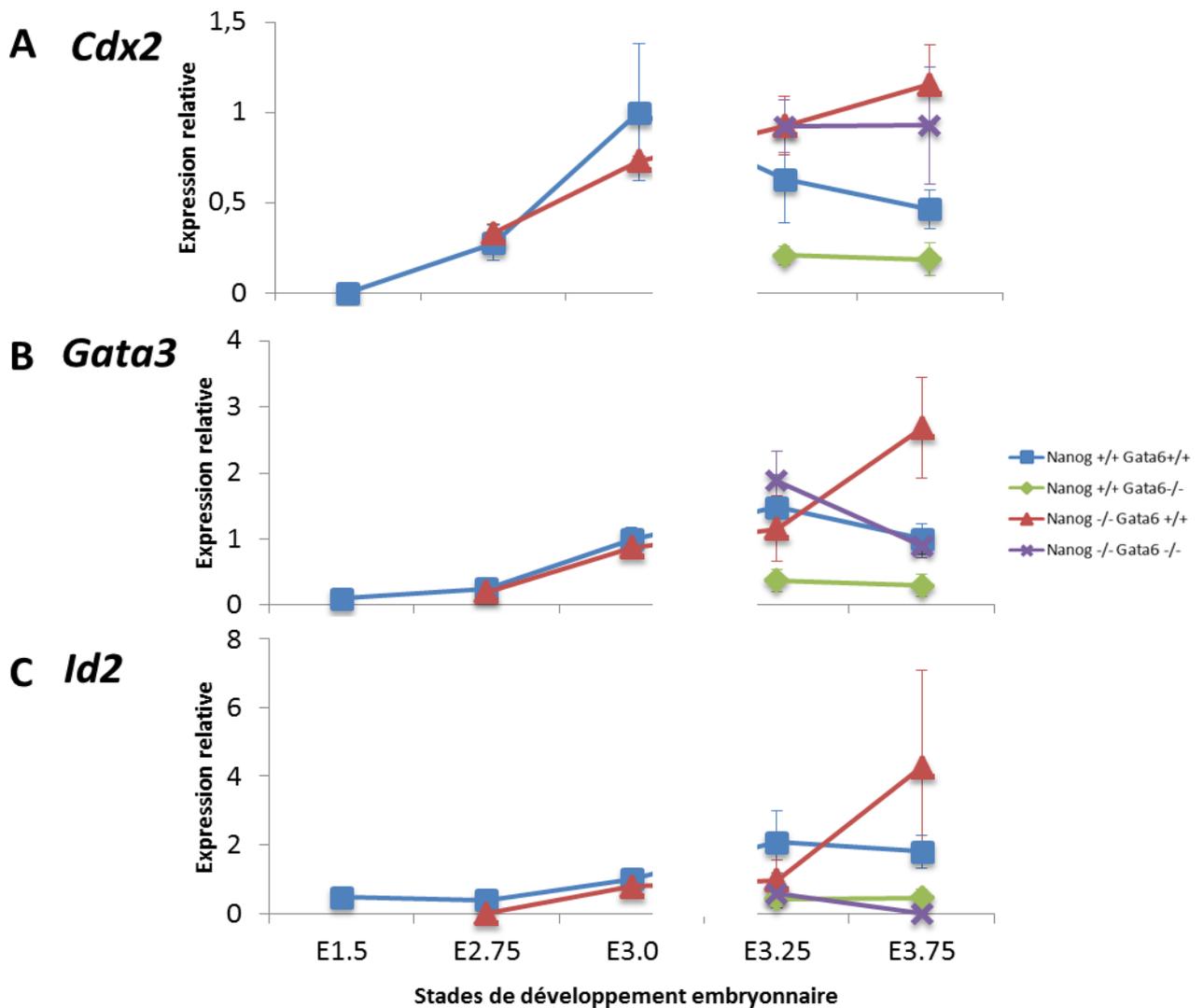


Figure 22 : Quantification de l'expression ARN des marqueurs du TE au cours du développement embryonnaire.

Expression de *Cdx2* (A), *Gata3* (B), *Id2* (C) au sein des cellules de la MCI en fonction du stade de développement et du génotype.

2009), cependant cette expression est plus faible que dans les cellules du TE. Il serait intéressant de regarder si ces marqueurs sont exprimés autant dans les MCI des embryons *Nanog*^{-/-} que dans les embryons entiers.

Les embryons *Gata6*^{-/-} montrent une faible expression des marqueurs *Cdx2*, *Gata3* et *Id2* aux stades E3.25 et E3.75 comparée aux autres génotypes. Enfin, il existe une différence d'expression entre ces 3 marqueurs dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}. *Cdx2* est assez fortement exprimé aux stades E3.25 et E3.75 et ne varie pas entre ces deux stades ($p=0.82$, test de Mann-Whitney) (Fig. 22 A). A l'inverse, *Gata3* et *Id2* sont plus faiblement exprimés et diminuent entre les deux stades (Fig. 22 B, C). L'expression de *Cdx2* est donc contrôlée par *Nanog*. En l'absence de celui-ci, son expression augmente et à l'inverse si *Nanog* est fortement exprimé, *Cdx2* est réprimé. Enfin, les expressions d'*Id2* et de *Gata3* sont régulées à la fois par *Nanog* et par *Gata6*.

En conclusion, les cellules de la MCI des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} ne se spécifient pas en TE. De plus, les différents gènes du TE sont régulés de manière différente.

b. L'expression du marqueur *Oct4* ne varie pas

J'ai ensuite analysé l'expression d'*Oct4* pour vérifier que l'identité des cellules de la MCI des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} n'est pas compromise.

L'expression d'*Oct4* ne diffère pas significativement quel que soit le stade et le génotype observé (Fig. 23). Cela signifie que les cellules internes des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} conservent leur identité de MCI.

L'expression d'OCT4 au sein de la MCI des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} a également été analysée au niveau protéique par immunomarquage (Fig. 24) (résultats obtenus par Sylvain Bessonard et par moi-même).

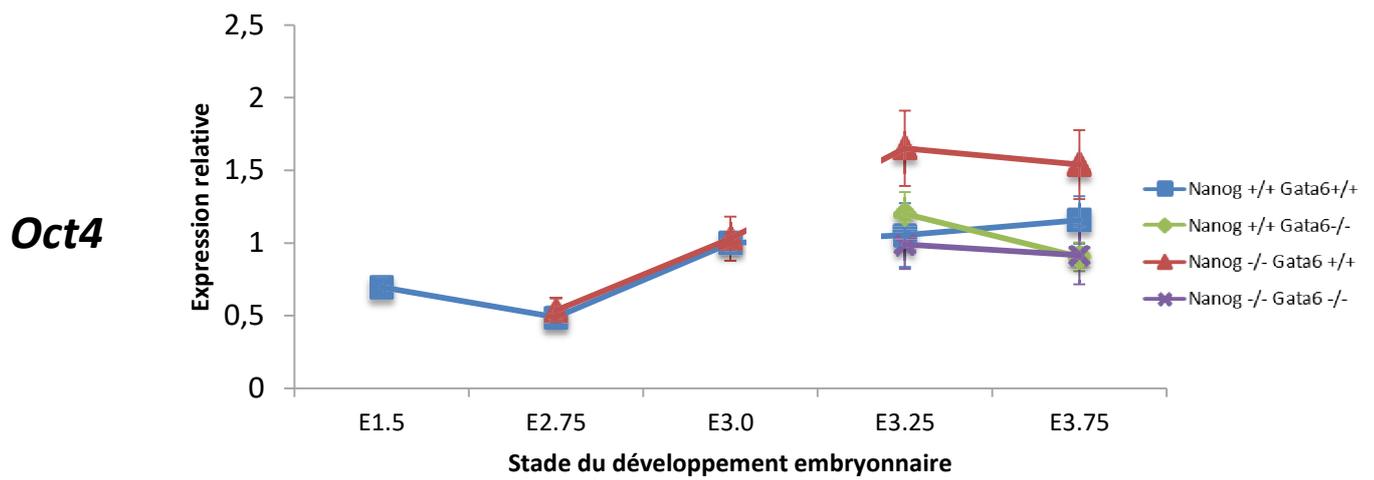


Figure 23 : Quantification de l'expression ARN d'Oct4 au cours du développement embryonnaire. Expression d'Oct4 au sein des cellules de la MCI en fonction du stade de développement et du génotype.

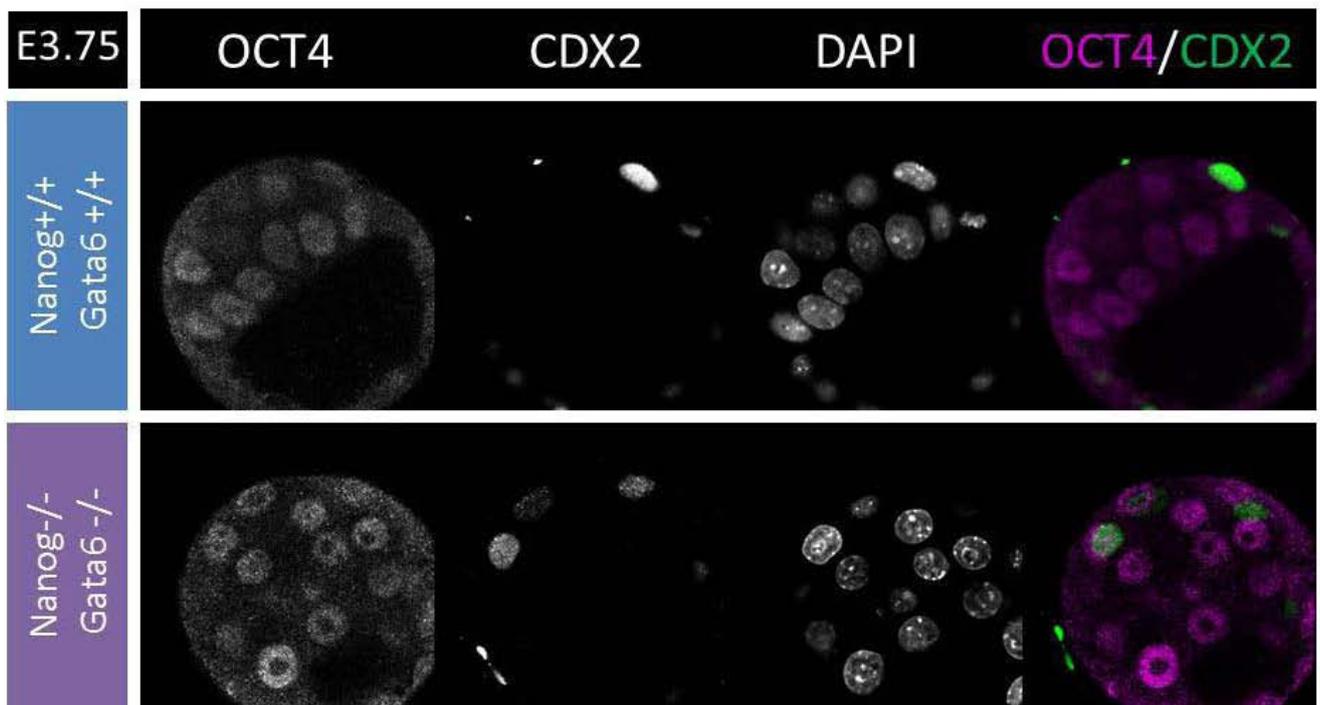


Figure 24 : Expression protéique d'OCT4 dans les embryons doubles mutants *Nanog*^{-/-}; *Gata6*^{-/-}. Immunomarquage sur des embryons fraîchement recueillis. L'expression d'OCT4 ne varie pas entre les différents génotypes.

Dans les embryons sauvages, l'expression d'OCT4 est restreinte à la MCI au stade E3.75. Cette même expression est retrouvée dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} (Fig. 24). Cela signifie que l'expression d'OCT4 n'est pas affectée par la perte de *Nanog* et de *Gata6* et donc que la MCI des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} conserve son identité.

c. Expression de *Nanog* et *Gata6*

• *Expression de Nanog*

L'expression de *Nanog* et *Gata6* a été étudiée afin de comprendre comment ces facteurs se régulent mutuellement *in vivo*.

L'expression de *Nanog* augmente progressivement au cours du temps puis diminue à partir du stade E3.75 dans les embryons sauvages. Guo *et al* ont montré, en cellule unique, que l'expression de *Nanog* augmente au cours du temps dans les cellules de la MCI puis dans les cellules de l'EPI (Guo *et al.*, 2010). De plus, *Nanog* n'est plus exprimé dans les cellules de l'EPI à partir du stade E4.5 (Chambers *et al.*, 2003). La diminution de *Nanog* observée dans mes résultats au stade E3.75 (Fig. 25 A) peut être expliquée par le fait que les cellules de l'EPI sont en poivre et sel dans la MCI à ce stade entraînant une dilution de la quantité de *Nanog* présente.

Dans les embryons *Nanog*^{-/-}, l'expression de *Nanog*, en amont de la cassette, reste très faible, et est significativement plus faible que dans les embryons sauvages ($p=0,0159$ au stade E3.25, $p=0,0022$ au stade E3.75, test de Mann-Whitney) (Fig. 25 A). L'absence de *Nanog* n'entraînant pas d'augmentation de sa transcription, cela signifie qu'il n'existe pas d'auto-répression de *Nanog* dans les embryons. Ce comportement est différent de celui observé dans les cellules ES dans lesquelles il a été montré que *Nanog* s'autoréprime (Navarro *et al.*, 2012; Fidalgo *et al.*, 2012). De plus, la diminution de l'expression de *Nanog* en absence de protéine NANOG fonctionnelle indique qu'il est nécessaire à sa transcription.

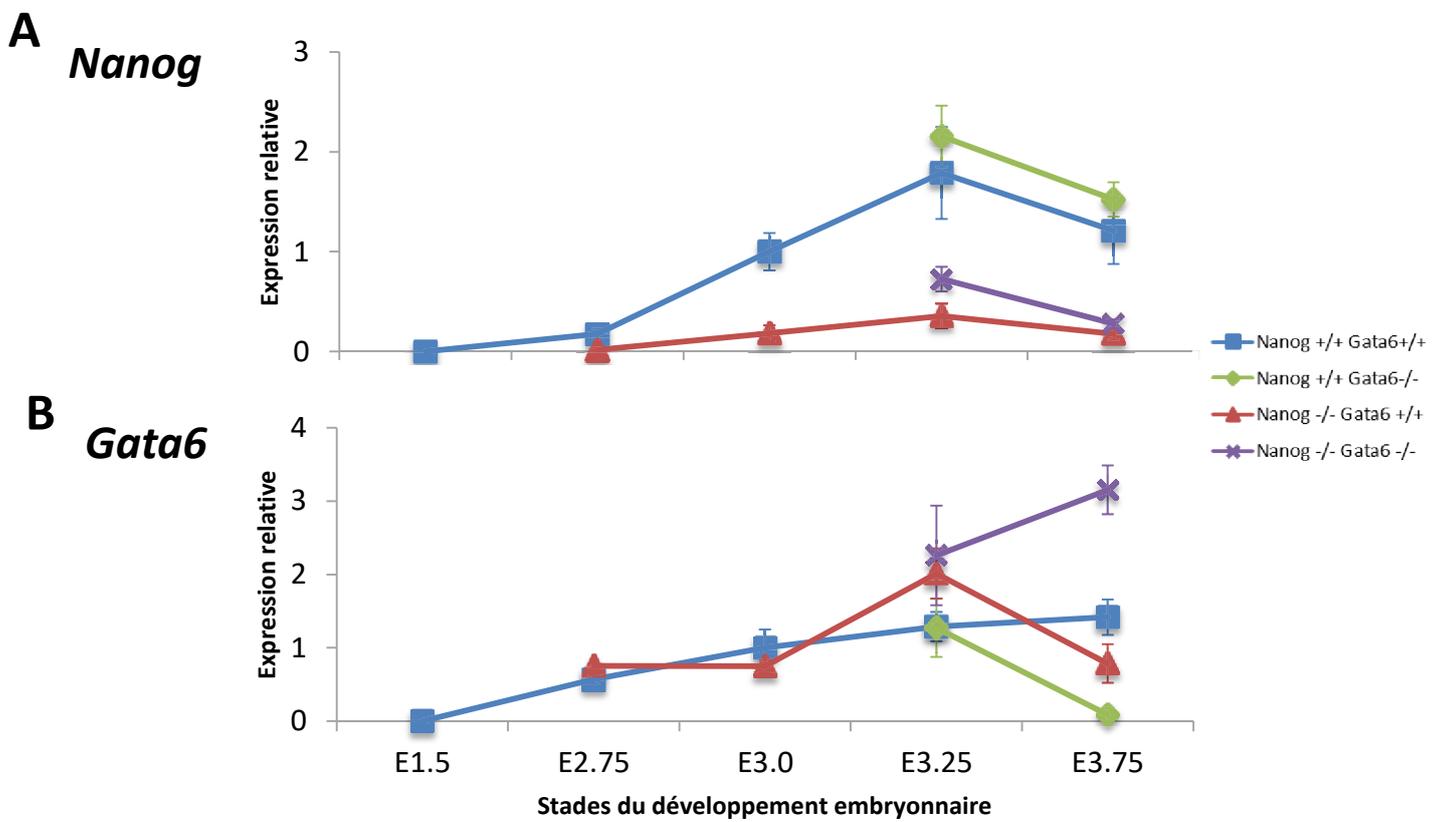


Figure 25 : Quantification de l'expression ARN de *Nanog* et *Gata6* au cours du développement embryonnaire.

Expression de *Nanog* (A) et de *Gata6* (B) au sein des cellules de la MCI en fonction du stade de développement et du génotype.

Dans les embryons *Gata6*^{-/-}, l'expression de *Nanog* est similaire à celle des embryons sauvages et, son expression dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} est similaire à celle des mutants *Nanog*^{-/-} (Fig. 25 A). L'absence de *Gata6* n'influence donc pas l'expression de *Nanog*.

En conclusion, *Nanog* s'auto-active dans la MCI et *Gata6* n'influence pas son expression.

•Expression de *Gata6*

La transcription de *Gata6* augmente progressivement au cours du temps dans les embryons sauvages (Fig. 25 B). Au stade E3.25, l'expression de *Gata6* est plus élevée dans les embryons *Nanog*^{-/-} et *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} que dans les embryons sauvages et *Gata6*^{-/-} (Fig. 25 B). Ces différences restent cependant non significatives. *Nanog* pourrait posséder un léger effet répresseur sur *Gata6* à ce stade.

Au stade E3.75, l'expression de *Gata6* reste significativement très élevée dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} (entre embryons sauvages et embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} $p=0,0190$, entre embryons *Nanog*^{-/-} et embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} $p=0,0095$, entre embryons *Gata6*^{-/-} et embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} $p=0.0159$, test de Mann-Whitney) (Fig. 25 B). A l'inverse, elle diminue pour les embryons simples mutants *Nanog*^{-/-} et *Gata6*^{-/-}. Cela signifie que le maintien de l'expression de *Gata6* entre les stades E3.25 et E3.75 est sous la dépendance de *Nanog*, probablement par le biais de FGF4.

En conclusion, dans un premier temps *Nanog* réprime l'expression de *Gata6* puis il est nécessaire à son maintien indirectement. De plus, il pourrait réprimer *Gata6* de manière autocrine ; seule une étude de l'expression de ces facteurs sur cellule unique permettra de répondre à cette question.

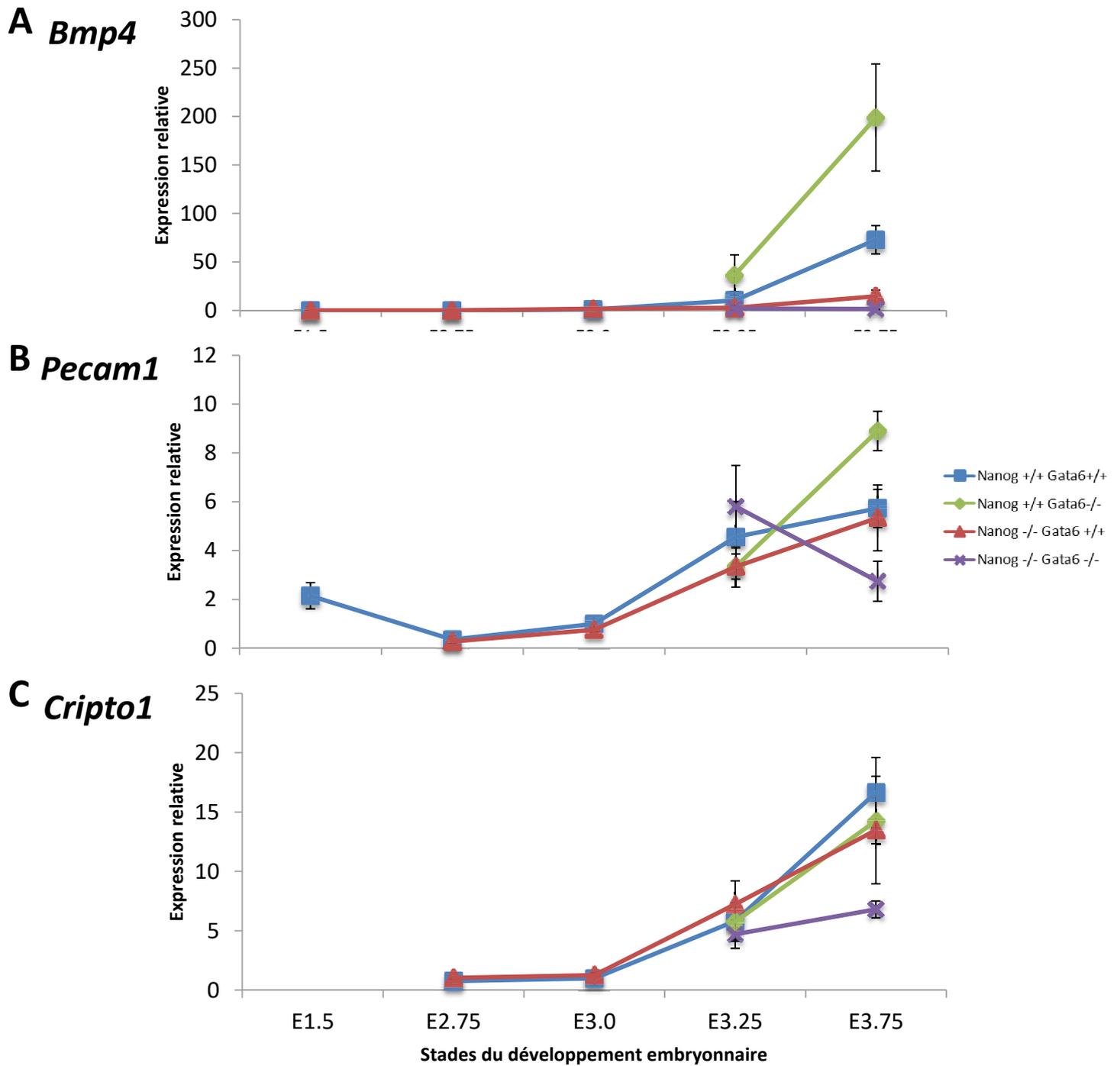


Figure 26 : Quantification de l'expression ARN des marqueurs de l'EPI au cours du développement embryonnaire.

Expression de *Bmp4* (A), *Pecam1* (B), *Cripto1* (C) au sein des cellules de la MCI en fonction du stade de développement et du génotype.

d. La MCI ne se spécifie pas en EPI

Au cours de l'évolution, la formation d'annexes embryonnaires est apparue chez les mammifères. Durant la mise en place de ces annexes, les cellules constituant le futur fœtus doivent être maintenues pluripotentes. Il est donc possible que *Nanog* soit présent dans certaines cellules pour bloquer l'expression de *Gata6* et éviter la différenciation de toutes cellules de la MCI en cellules de l'EPr. En conséquence, les marqueurs de l'EPI *Bmp4*, *Pecam1* et *Cripto,1* ont été analysés pour voir s'ils sont affectés par la perte de *Nanog* et *Gata6*.

Bmp4 est détecté dans les cellules internes à partir du stade 16 cellules (Graham *et al.*, 2014) puis est exprimé dans les cellules EPI au stade E3.75 (Guo *et al.*, 2010). *Pecam1* est exprimé dans l'EPI à partir du stade E3.75 (Robson *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2010). Enfin, notre équipe a montré que *Cripto1*, codant un co-récepteur de NODAL, est présent à partir du stade E3.5 dans les cellules EPI (Fiorenzano *et al.*, 2016).

Dans les embryons sauvages, l'expression de ces trois marqueurs augmente à partir du stade E3.0. Au stade E3.75, cette augmentation est significative ($p=0,0087$ pour *Bmp4*, ns pour *Pecam1*, $p=0,0087$ pour *Cripto1*, test de Mann-Whitney) (Fig. 26).

Au stade E3.25, pour chacun des marqueurs étudiés, il n'existe pas de différence d'expression entre les différents génotypes (Fig. 26). Entre les stades E3.25 et E3.75, dans les mutant *Gata6*^{-/-} les transcrits de *Bmp4* et *Pecam1* augmentent significativement de manière plus importante ($p=0.0109$ pour *Bmp4* et $p=0.0031$ pour *Pecam1*, test de Mann-Whitney) (Fig. 26 A, B). En revanche, dans les embryons *Nanog*^{-/-} aux mêmes stades, leur expression reste très faible pour *Bmp4* ou similaire aux embryons sauvages pour *Pecam1*. De manière surprenante, l'expression de *Cripto1* ne semble pas être affectée ni par l'absence de *Gata6* ni par celle de *Nanog* (Fig. 26 C).

Finalement dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} les transcrits de *Bmp4*, *Pecam1* et *Cripto1* sont plus faiblement exprimés que dans les embryons sauvages ($p=0.0095$ pour *Bmp4*, $p=0,067$ pour *Pecam1*, $p=0,0190$ pour *Cripto1*, test de Mann-Whitney) (Fig. 26). De plus, l'expression de *Cripto1* ne semble pas évoluer entre les stades E3.25 et E3.75 comme si la transcription de ce marqueur était bloquée au niveau du stade E3.25.

En conclusion, l'expression du transcrit *Bmp4* est dépendante de *Nanog* (Fig. 26 A), l'expression de *Pecam1* dépend de la présence relative des deux facteurs *Nanog* et *Gata6* (Fig. 26 B) et en l'absence de *Nanog* et *Gata6*, *Cripto1* reste exprimé de manière stable entre les stades E3.25 et E3.75. *Nanog* n'est donc pas le seul facteur régulant *Cripto1* ; il serait intéressant de vérifier si son expression reste en poivre et sel dans les embryons *Nanog*^{-/-} ou si elle est uniforme dans toutes les cellules de la MCI.

D'autres marqueurs plus tardifs de l'EPI comme *Prdm14*, *Nodal* ou *Rex1* ont également été analysés. L'expression de chacun de ces gènes n'évolue pas entre les stades E3.25 et E3.75, dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} (Annexe 1).

En conclusion, les marqueurs de l'EPI ne sont que très peu ou pas exprimés dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}. Cela signifie que les cellules de la MCI présentes dans ces embryons ne se spécifient pas en EPI.

e. La MCI ne se spécifie pas en EPr

Les marqueurs de l'EPr ont été analysés pour savoir si les cellules de la MCI peuvent se différencier en dérivés d'EPr en absence de *Nanog* et de *Gata6*. J'ai suivi entre autres, les marqueurs *Sox17* et *Gata4*.

Dans les embryons sauvages, *Sox17* connaît deux salves d'expression, une première au stade E2.75 et une seconde à partir du stade E3.75 ($p=0,0216$ entre E3.25 et E3.75, test de Mann-Whitney) (Fig. 27 A). Guo *et al* ont précédemment montré une légère augmentation de l'expression de *Sox17* au stade 32 cellules dans

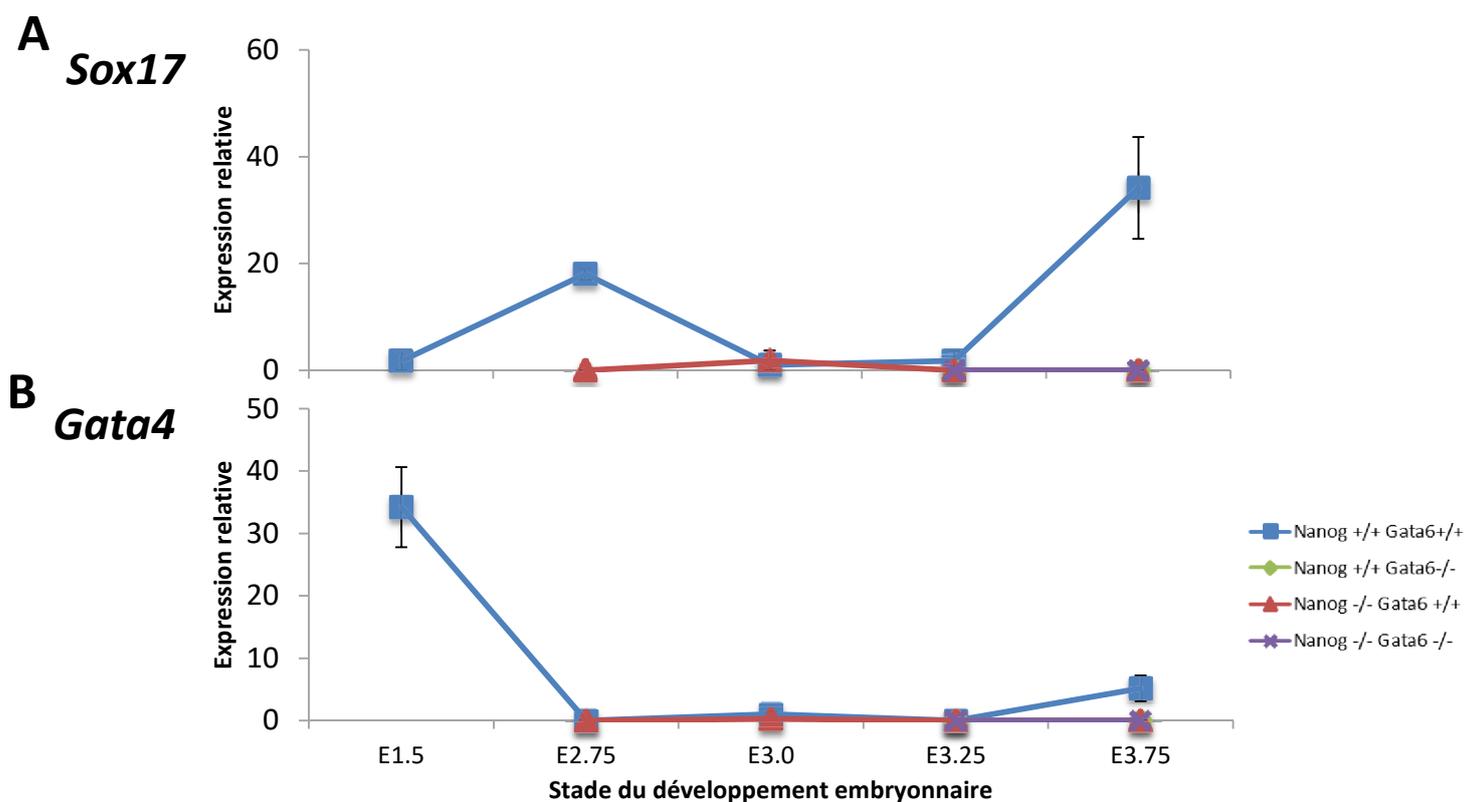


Figure 27 : Quantification de l'expression ARN des marqueurs de l'EPr au cours du développement embryonnaire.

Expression de *Sox17* (A) et *Gata4* (B) en fonction du stade de développement et du génotype.

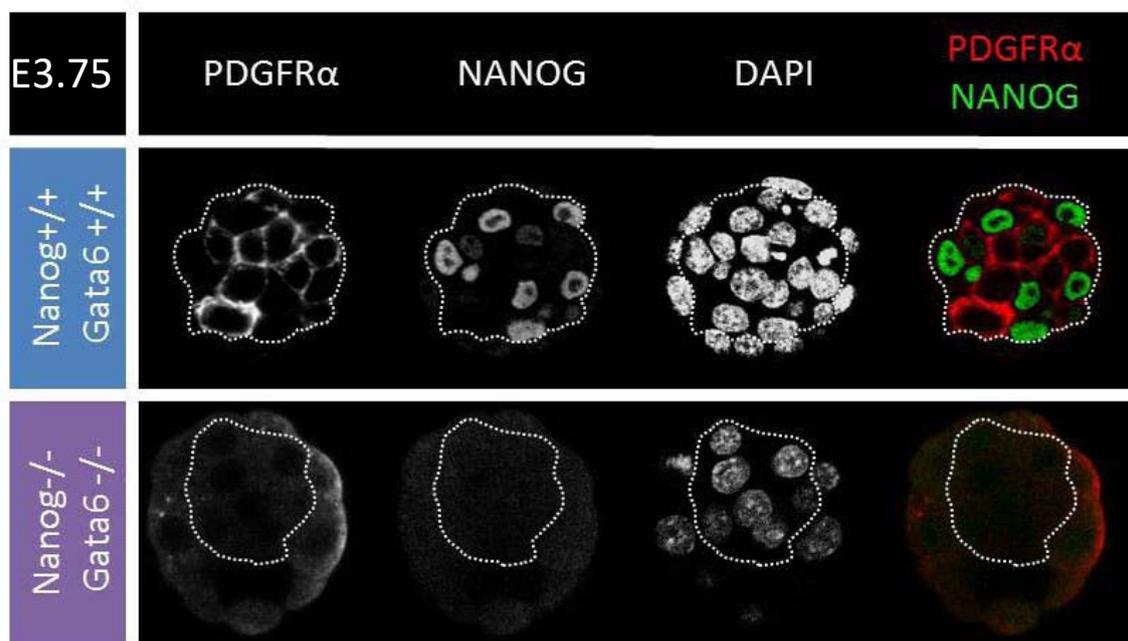


Figure 28: Expression protéique de PDGFR α en fonction du génotype des embryons.

Immunomarquage sur des embryons fraîchement recueillis. Il n'y a pas d'expression de PDGFR α dans les embryons doubles mutants *Nanog* -/-; *Gata6* -/-. La MCI de l'embryon est délimitée par des pointillés.

les cellules de la MCI puis au stade 64 cellules dans les cellules de l'EPr (Guo *et al.*, 2010).

Gata4 est exprimé fortement au stade E1.5, puis n'est plus du tout présent dans les embryons sauvages jusqu'au stade E3.75 où son expression augmente progressivement ($p=0.0087$ entre E3.25 et E3.75, test de Mann-Whitney) (Fig. 27 B).

Pour tous les autres génotypes *Sox17* et *Gata4* ne sont pas exprimés (Fig. 27) confirmant la nécessité de *Gata6* pour la spécification de l'EPr (Schrode *et al.*, 2014; Bessonard *et al.*, 2014) et celle de *Nanog* de manière paracrine pour la différenciation de ce lignage, par le biais de l'expression de FGF4 (Frankenberg *et al.*, 2011).

J'ai également analysé d'autres marqueurs de l'EPr, comme *Hnf1 β* et *Sox7*. Ces marqueurs se comportent comme *Sox17* et *Gata4* dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} (Annexe 2).

L'absence des marqueurs de l'EPr dans la MCI des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} indique donc que les cellules de la MCI ne peuvent pas se spécifier en EPr.

Pdgfra possède deux salves d'expression, une première entre les stades 8 et 16 cellules où il est présent dans les cellules internes puis une seconde au stade E3.75 où il est restreint aux cellules de l'EPr (Plusa *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2010). Le niveau protéique de ce marqueur a été analysé par immunomarquage dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} (Cynthia DENNIS) afin de savoir si les cellules de la MCI restent bloquées à un stade proche du stade 16 cellules.

Dans les embryons sauvages, au stade E3.75, PDGFR α est spécifique de l'EPr, il est présent dans les cellules qui n'expriment pas NANOG et est absent des cellules CDX2 positives (Fig. 28). Cependant, le marquage membranaire de PDGFR α est absent dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} (Fig. 28).

Cela confirme que l'expression de PDGFR α nécessite la présence de *Nanog* et de *Gata6* et que les cellules de la MCI ne se spécifient pas en EPr dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}.

En conclusion, les cellules de la MCI des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} ont un comportement différent des cellules de la MCI des embryons des autres génotypes. Ainsi, elles semblent bloquées au stade E3.25 et ne pas évoluer au cours de la spécification. Il serait donc intéressant de réaliser une analyse sur cellules uniques afin de connaître l'identité des cellules de la MCI des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}.

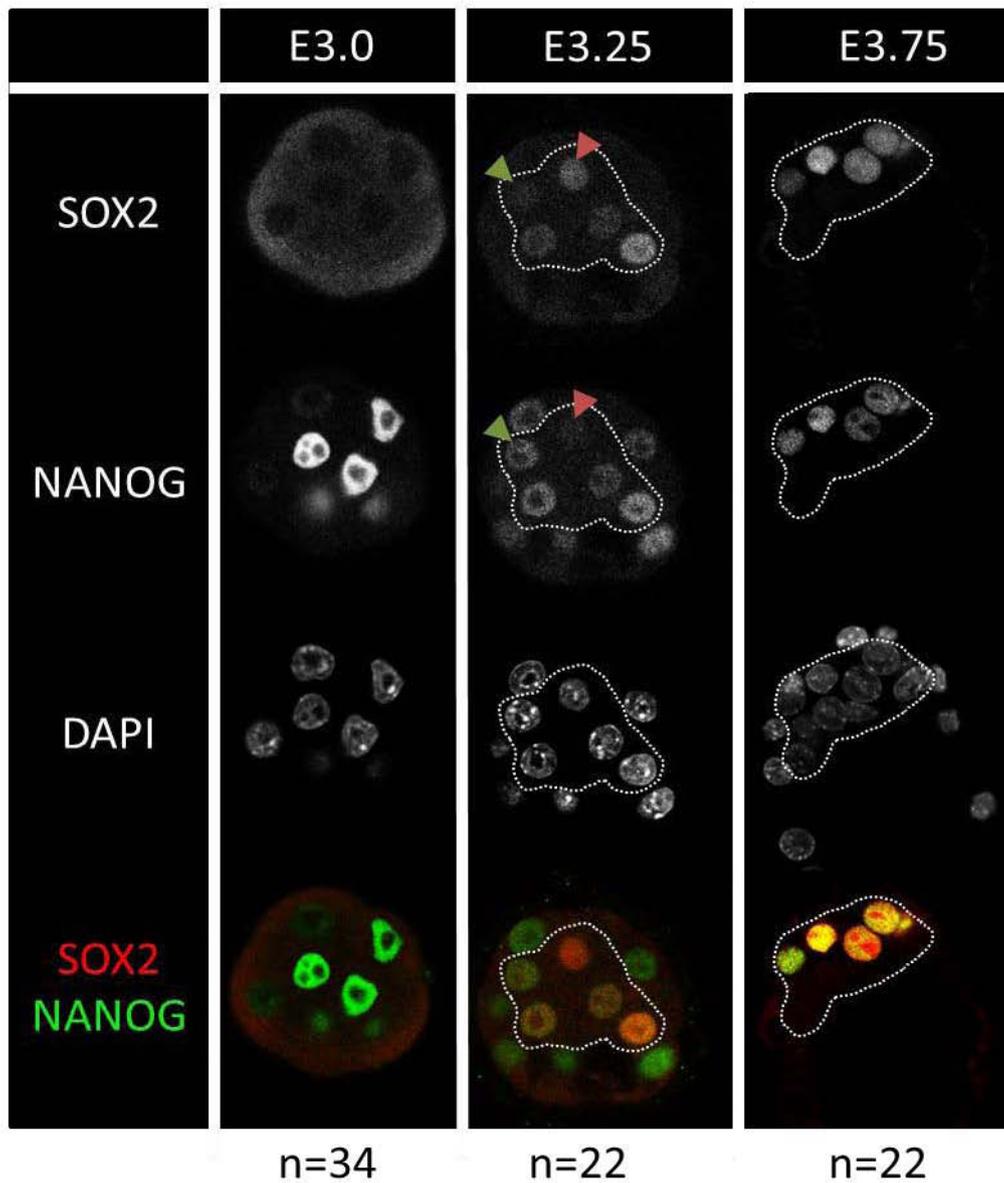


Figure 29 : Expression protéique de SOX2 et NANOG au cours du développement embryonnaire. Immunomarquage sur des embryons fraîchement recueillis. La MCI de l'embryon est délimitée par des pointillés. Les flèches vertes signalent un noyau marqué par NANOG et une absence de SOX2. Les flèches rouges signalent un noyau marqué par SOX2 et où NANOG est absent.

C. Expression de SOX2 au cours du développement embryonnaire

Sox2 est le premier facteur spécifique de la MCI puis il se restreint aux cellules EPI (Guo *et al.*, 2010; Wicklow *et al.*, 2014). Il pourrait donc agir en amont de *Nanog* et *Gata6* lors de la spécification. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai, dans un premier temps, réexaminé l'expression de SOX2 au cours du développement embryonnaire par immunomarquages sur des embryons sauvages à différents stades, avec deux anticorps différents (un fait chez la chèvre et l'autre chez le lapin), dont un validé au préalable sur des embryons mutants *Sox2*^{-/-} (Campolo *et al.*, 2013).

Wicklow *et al* ont montré que le marquage nucléaire de SOX2 débute au stade 16 cellules. Avec les deux anticorps testés ainsi qu'avec l'anticorps utilisé par Wicklow *et al*, je n'ai observé aucun marquage nucléaire pour SOX2 à ce stade (Fig. 29).

J'ai montré que l'expression nucléaire de SOX2 débute aux alentours du stade 32 cellules. Elle est alors absente dans les noyaux des cellules du TE et présente dans les cellules de la MCI où la plupart des noyaux possèdent un marquage pour SOX2 (Fig. 29). Au stade E3.25, elle devient hétérogène au sein de la MCI avec des noyaux qui expriment fortement SOX2, des noyaux dont le marquage est similaire au cytoplasme et des noyaux dans lesquels SOX2 est absent (Fig. 29). A ce stade, l'hétérogénéité de SOX2 observée est différente de celle de NANOG. En effet, certaines cellules de la MCI expriment NANOG et n'expriment pas SOX2 et à l'inverse d'autres expriment SOX2 mais n'expriment pas NANOG (Fig. 29). De plus, l'expression de SOX2 est spécifique des cellules de la MCI avant NANOG (Fig. 29). Puis au stade E3.75, les expressions de SOX2 et de NANOG sont localisées dans les mêmes cellules. Il devient donc spécifique de l'EPI (Fig. 29).

En conclusion, Wicklow *et al* ont montré que l'expression nucléaire de SOX2 débute au stade 16 cellules. SOX2 est ensuite présent dans la presque totalité des cellules de la MCI au stade E3.25 avant de se restreindre aux cellules de l'EPI au stade E3.75. De manière intéressante, j'ai mis en évidence que l'expression nucléaire de SOX2 est hétérogène au stade E3.25.

Sox2

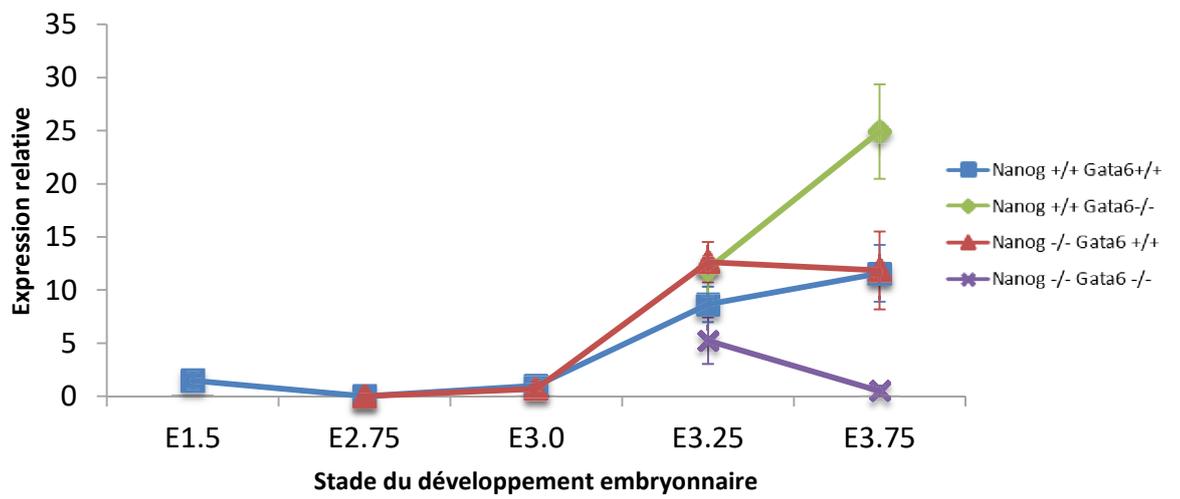


Figure 30 : Quantification de l'expression ARN de Sox2 au cours du développement embryonnaire. Expression de Sox2 au sein des cellules de la MCI en fonction du stade de développement et du génotype.

D. SOX2 est exprimé dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}

1. Expression de Sox2 en fonction du temps et des génotypes

Dans les embryons sauvages, l'expression du transcrite *Sox2* est faible au stade E1.5, puis elle diminue au stade E2.75 et reste très faible au stade E3.0, pour augmenter de nouveau à partir du stade E3.25 (Fig. 30). Ce profil a aussi été mis en évidence dans une étude sur cellule unique (Guo *et al.*, 2010).

L'absence de *Nanog* n'influence pas l'expression de *Sox2* jusqu'au stade E3.75. En effet, son expression est similaire entre les embryons sauvages et les embryons *Nanog*^{-/-}. A l'inverse, l'absence de *Gata6* ou la présence plus importante de *Nanog*, va influencer l'expression de *Sox2* puisque dans les embryons *Gata6*^{-/-}, l'expression de *Sox2* augmente plus rapidement au stade E3.75 ($p=0.045$ entre les stades E3.25 et E3.75, test de Mann-Whitney) (Fig. 30).

Dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, l'expression de *Sox2* est équivalente à celle des autres génotypes au stade E3.25, puis diminue de manière significative par rapport aux autres génotypes au stade E3.75 ($p=0,043$ entre embryons sauvages et embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, $p=0,016$ entre embryons *Gata6*^{-/-} et embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, $p=0,043$ entre embryons *Nanog*^{-/-} et embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, test de Mann-Whitney) (Fig. 30).

En conclusion, l'expression du transcrite *Sox2* semble être dépendante de la diminution de *Gata6* et/ou de l'augmentation de *Nanog* à partir du stade E3.75.

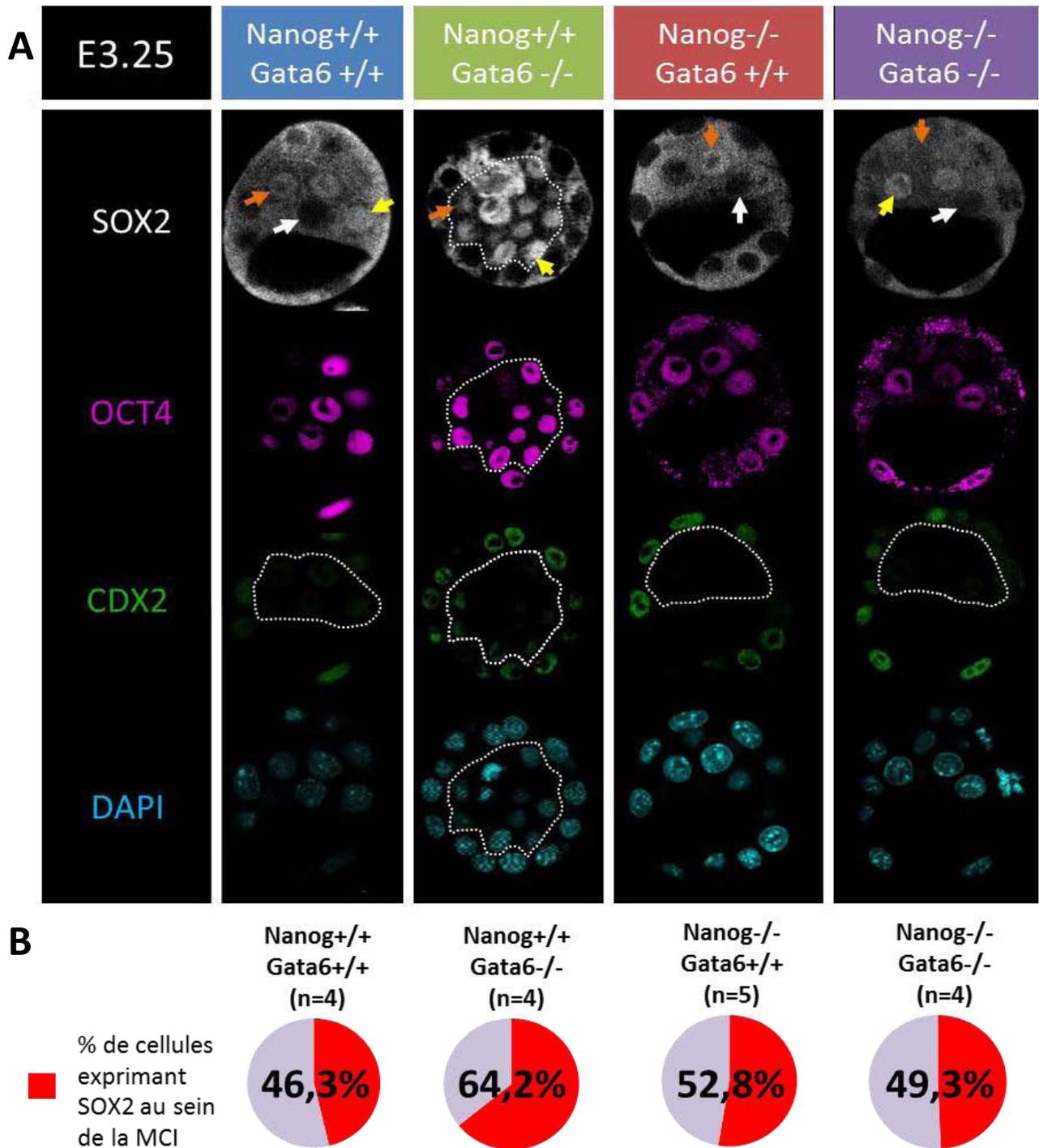


Figure 31 : Expression protéique de SOX2 au stade E3.25 dans différentes combinaisons de mutants *Nanog* et *Gata6*.

A : Immunomarquage sur des embryons fraîchement recueillis. SOX2 est exprimé de manière hétérogène dans tous les embryons au stade E3,25. La MCI de l'embryon est délimitée par des pointillés. Les flèches blanches signalent des noyaux pour lesquels le marquage de SOX2 est similaire à celui dans les noyaux du TE. Les flèches oranges signalent des noyaux avec un marquage similaire à celui présent dans le cytoplasme des cellules. Les flèches jaunes signalent des noyaux avec un marquage de SOX2 plus intense.

B : Comptage du nombre de noyaux exprimant SOX2 au sein de la MCI.

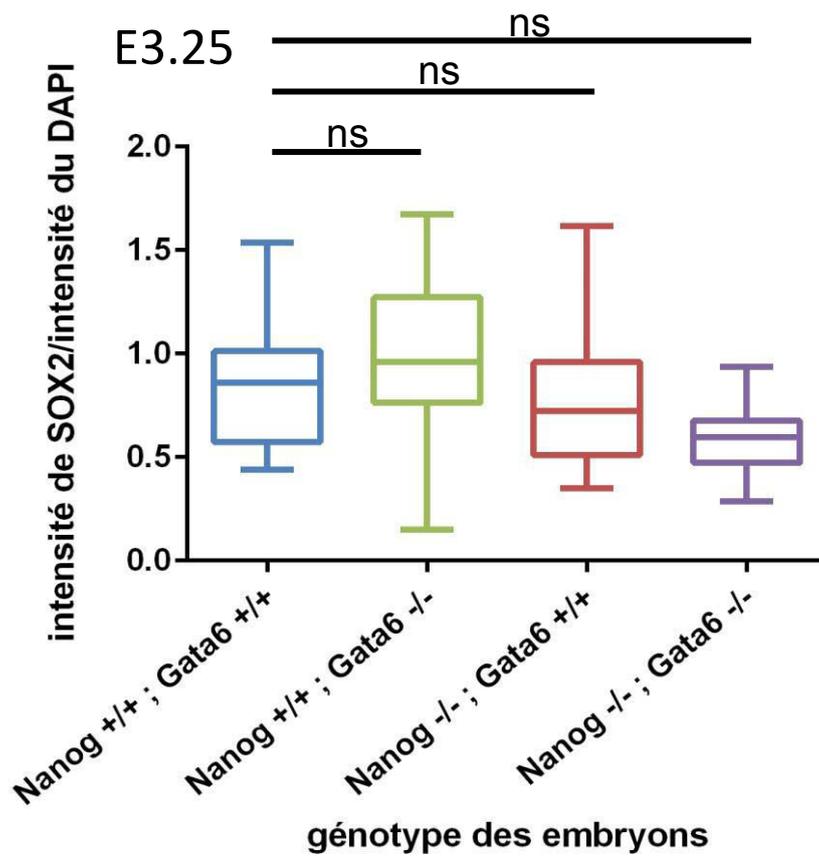
2. La protéine SOX2 est présente de manière hétérogène dans les embryons *Nanog*^{+/-} ; *Gata6*^{+/-} au stade E3.25

Pour analyser l'expression protéique de SOX2, j'ai réalisé des immunomarquages sur des embryons issus de croisements entre doubles hétérozygotes *Nanog*^{+/-} ; *Gata6*^{+/-}.

Dans les embryons sauvages, l'expression de SOX2 est hétérogène au sein des noyaux des cellules de la MCI tandis qu'elle est complètement absente des noyaux de cellules du TE (Fig. 31 A).

J'ai effectué un comptage du nombre de noyaux de la MCI exprimant SOX2. Seules les cellules de la MCI où SOX2 est clairement exprimé dans le noyau, c'est-à-dire les cellules où le marquage nucléaire est supérieur au marquage cytoplasmique, sont prises en compte. Ainsi, l'incertitude du marquage cytoplasmique est prise en compte : correspond-il à un signal spécifique de SOX2 ou s'agit-il de bruit de fond ? Le nombre de cellules de la MCI a été obtenu par soustraction du nombre de cellules qui expriment CDX2 au nombre total de cellules. Le nombre de cellules au sein de la MCI ne varie pas significativement en fonction des génotypes (Annexe 3 A et B). Ces comptages ont montré que 46.3% des cellules expriment SOX2 au sein de la MCI (nombre moyen de cellules exprimant SOX2 dans le noyau : 6.25 et nombre de cellules moyen au sein de la MCI : 13.5) (Fig. 31 B).

Ce même marquage nucléaire hétérogène au sein de la MCI pour SOX2 est retrouvé dans les embryons *Gata6*^{-/-} (Fig. 31 A). Toutefois, il semble que le nombre de cellules avec un marquage nucléaire de SOX2 soit plus important dans ces derniers. En effet, après comptage, 64.2% des noyaux de la MCI sont marqués par SOX2 (nombre moyen de cellules exprimant SOX2 dans le noyau : 10.75 et nombre de cellules moyen au sein de la MCI : 16.75) (Fig. 31 B). Cette différence d'expression entre les embryons sauvages et les embryons *Gata6*^{-/-} n'est cependant pas significative.



génomotype des embryons	Médiane	n
Nanog +/+ ; Gata6 +/+	0,86	n=25
Nanog +/+ ; Gata6 -/-	0,96	n=43
Nanog -/- ; Gata6 +/+	0,72	n=40
Nanog -/- ; Gata6 -/-	0,60	n=20

Figure 32 : Intensité de l'expression protéique de SOX2 au stade E3.25 en fonction du génotype des embryons.

La médiane des intensités ne varie pas entre les différents génotypes.

Test statistique ANOVA, ns = non significatif.

Dans les embryons *Nanog*^{-/-} et dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} le marquage de SOX2 est également hétérogène entre les noyaux des cellules de la MCI, certains noyaux exprimant SOX2 et d'autres ne l'exprimant pas du tout (Fig. 31 A). Pour ces deux génotypes, les proportions de noyaux exprimant SOX2 au sein de la MCI sont respectivement de 52.6% et 49.3% (nombre moyen de cellules exprimant SOX2 dans le noyau : 8 et 8.5 et nombre de cellules moyen au sein de la MCI : 15.2 et 17.25) (Fig. 31 B).

Ainsi, en l'absence de *Nanog* et de *Gata6*, l'expression topologique de SOX2 au sein des noyaux de la MCI ne varie pas.

3. L'intensité d'expression de SOX2 ne varie pas en fonction des génotypes au stade E3.25

J'ai ensuite mesuré l'intensité de l'expression nucléaire de SOX2 au sein des cellules comptées. Le bruit de fond (intensité du marquage au niveau des noyaux des cellules du TE) a été soustrait des valeurs mesurées qui ont ensuite été rapportées aux valeurs du DAPI pour chaque cellule afin de s'affranchir de la différence entre les acquisitions. J'obtiens alors une valeur du rapport d'intensité pour chacune des cellules analysées.

J'ai noté que l'étendue des valeurs est plus importante dans les embryons *Gata6*^{-/-}. De plus, dans ces embryons, la médiane du rapport d'intensité est légèrement plus élevée que pour les autres génotypes. Dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, la dispersion des valeurs est plus faible que dans les autres génotypes. De plus, la médiane du rapport d'intensité est légèrement plus faible que dans les autres génotypes sans significativité. Cela traduit qu'au stade E3.25, de légères variations d'expression sont visibles, toutefois ces différences ne sont pas significatives (Fig. 32).

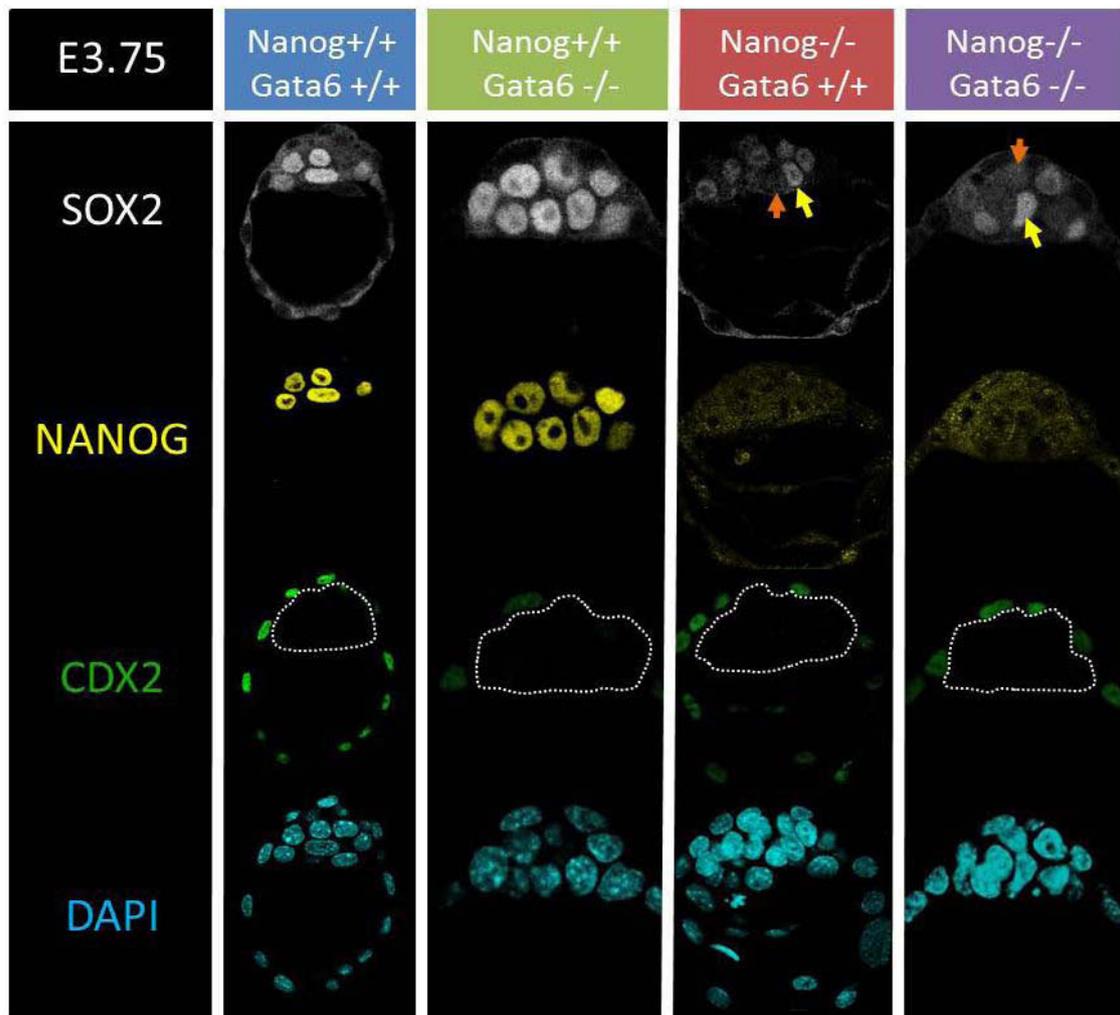
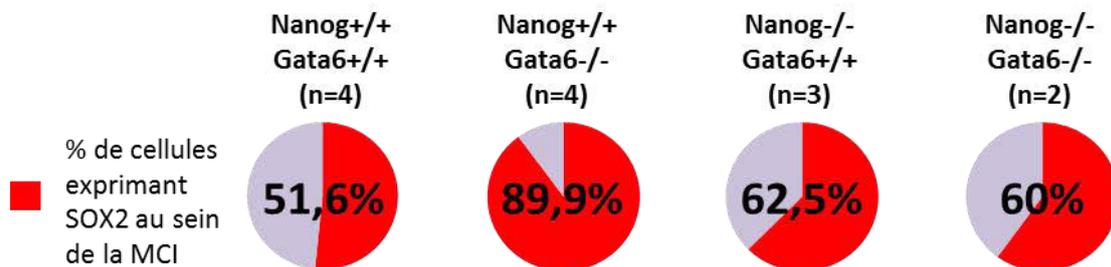
A**B**

Figure 33 : Expression protéique de SOX2 au stade E3.75 en fonction du génotype des embryons.
A : Immunomarquage sur des embryons fraîchement recueillis. SOX2 reste présent de manière hétérogène dans tous les embryons doubles mutants *Nanog*^{-/-}; *Gata6*^{-/-}. La MCI de l'embryon est délimitée par des pointillés. Les flèches blanches signalent des noyaux pour lesquels le marquage de SOX2 est similaire à celui dans les noyaux du TE. Les flèches oranges signalent des noyaux avec un marquage similaire à celui présent dans le cytoplasme des cellules. Les flèches jaunes signalent des noyaux avec un marquage de SOX2 plus intense.
B : Comptage du nombre de noyaux exprimant SOX2 au sein de la MCI.

Ces résultats sont en accord avec l'expression des transcrits de Sox2 pour lesquels il n'existe pas, à ce stade, de variations d'expression significatives quel que soit le génotype (Fig. 30).

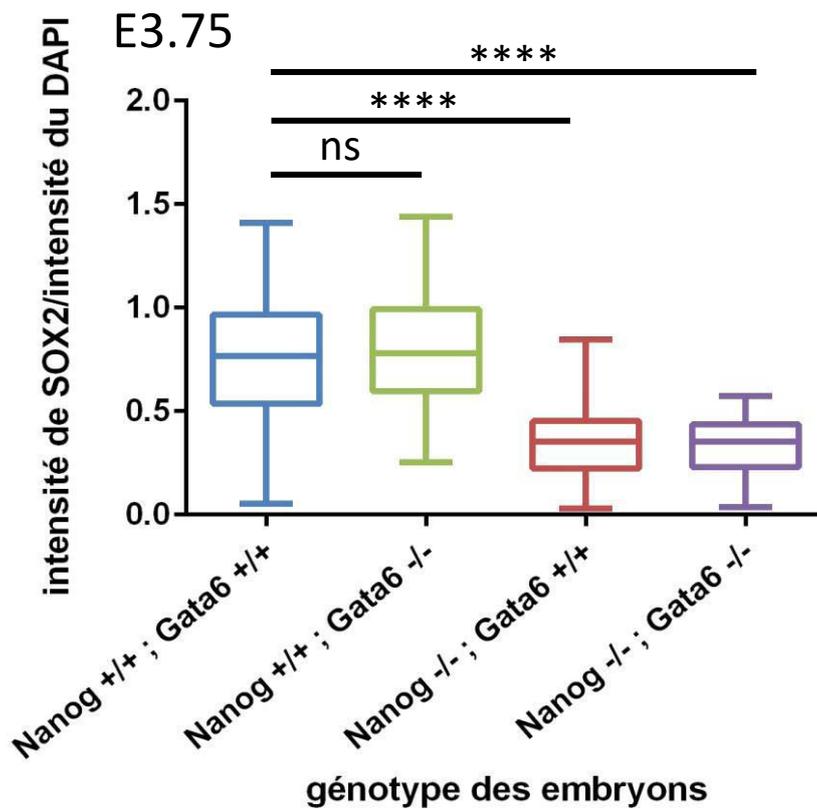
4. L'expression de SOX2 est toujours présente dans les embryons Nanog^{-/-} ; Gata6^{-/-} au stade E3.75

Au stade E3.75, dans les embryons sauvages, l'expression de SOX2 est spécifique des cellules de l'EPI. En effet, SOX2 est co-exprimé avec NANOG (Fig 33 A). Le pourcentage de noyaux des cellules de la MCI exprimant SOX2 est de 51.6%, soit la moitié des cellules de la MCI (nombre moyen de cellules exprimant SOX2 dans le noyau : 16, et nombre de cellules moyen au sein de la MCI : 31) (Fig.33 B). Le nombre de cellules dans la MCI ne varie pas en fonction des génotypes mais il existe une certaine variabilité entre les embryons (Annexe 3 A et C).

Dans les embryons *Gata6^{-/-}* toutes les cellules sont de type épiblastique, elles expriment presque toutes NANOG et SOX2 (Fig. 33 A). 89.9% des cellules expriment SOX2 au sein de la MCI (nombre moyen de cellules exprimant SOX2 dans le noyau : 20 ; et nombre de cellules moyen au sein de la MCI : 22.25) (Fig. 33 B).

La présence de cellules n'exprimant pas SOX2 peut être expliquée par l'asynchronie de spécification des cellules. En effet, Wicklow *et al* ont montré que SOX2 se spécifie après NANOG dans les cellules EPI. Or, les cellules qui expriment plus tardivement NANOG n'expriment peut-être pas encore SOX2, comme suggéré par le fait qu'au stade E4.5, près de 99% des cellules de la MCI de ces embryons expriment SOX2 au stade E4.5 (résultats non montrés).

Dans les embryons *Nanog^{-/-}*, SOX2 est exprimé et de manière hétérogène. Ainsi, certains noyaux possèdent un marquage fort de SOX2, tandis que d'autres possèdent un marquage équivalent au marquage présent dans le cytoplasme (Fig. 33 A). Le pourcentage de noyaux de la MCI exprimant SOX2 est alors de 62.5%



	Nanog +/+ ; Gata6 +/+	Nanog +/+ ; Gata6 -/-	Nanog -/- ; Gata6 +/+	Nanog -/- ; Gata6 -/-
Médiane	0,76	0,78	0,35	0,35
	n=64	n=80	n=50	n=27

Figure 34 : Intensité de l'expression protéique de SOX2 au stade E3.75 en fonction du génotype des embryons.

La médiane des intensités varie lorsque *Nanog* est absent.

Test statistique ANOVA, ns = non significatif ; * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001 ; **** < 0,0001.

(nombre moyen de cellules exprimant SOX2 dans le noyau : 16.67 et nombre de cellules moyen au sein de la MCI : 26.67) (Fig. 33 B).

Cette même expression hétérogène est retrouvée dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, avec un pourcentage de 60% de cellules de la MCI exprimant SOX2 au niveau nucléaire (Fig. 33).

Ainsi, au stade E3.75, en l'absence de *Nanog* et de *Gata6*, qui sont les principaux effecteurs du « poivre et sel », il subsiste une hétérogénéité d'expression au sein des cellules de la MCI. Cette hétérogénéité est représentée par SOX2 et est différente de l'expression en poivre et sel de NANOG et GATA6.

5. La présence de NANOG influence l'expression de SOX2 au stade E3.75

L'étude de l'intensité d'expression de SOX2 montre que les embryons des différents génotypes ne se comportent pas de la même manière. En effet, j'ai constaté deux types de comportements en fonction de la présence ou de l'absence de *Nanog*. En présence de *Nanog*, la médiane des rapports d'intensité est en moyenne de 0,77. L'absence de *Gata6* n'entraîne aucun changement sur le comportement de SOX2. En revanche, en l'absence de *Nanog*, le rapport d'intensité est deux fois plus faible. Une fois encore l'absence de *Gata6* n'entraîne pas de changement dans le rapport d'intensité (Fig. 34).

De plus, en présence de *Nanog*, la dispersion des données est assez large, tandis qu'en l'absence de *Nanog*, elle est très resserrée (Fig. 34). Cela suggère que la présence de *Nanog* induit une hétérogénéité plus importante au sein des cellules de l'EPI.

Par conséquent, la présence de *Nanog* influence de manière positive l'expression de SOX2 au sein des noyaux des cellules de la MCI. A l'inverse, son absence va entraîner une diminution de l'intensité de SOX2. Ce phénomène est

également retrouvé au niveau ARN où les transcrits de *Sox2* sont plus faiblement exprimés dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} (Fig. 32).

En conclusion, au stade E3.25, il n'existe pas de différences significatives d'expression du transcrit ni de la protéine SOX2 entre les différents génotypes, indiquant que l'initiation de l'expression de SOX2 est indépendante de *Nanog* et *Gata6*. De plus, celle-ci reste hétérogène en l'absence de *Nanog* et *Gata6*.

Puis, au stade E3.75, SOX2 reste exprimé dans les cellules de la MCI malgré l'absence de *Nanog* et de *Gata6*. Cependant, la présence de *Nanog* va maintenir l'expression du transcrit et de la protéine SOX2 pour la retrouver uniquement dans les cellules de l'EPI.

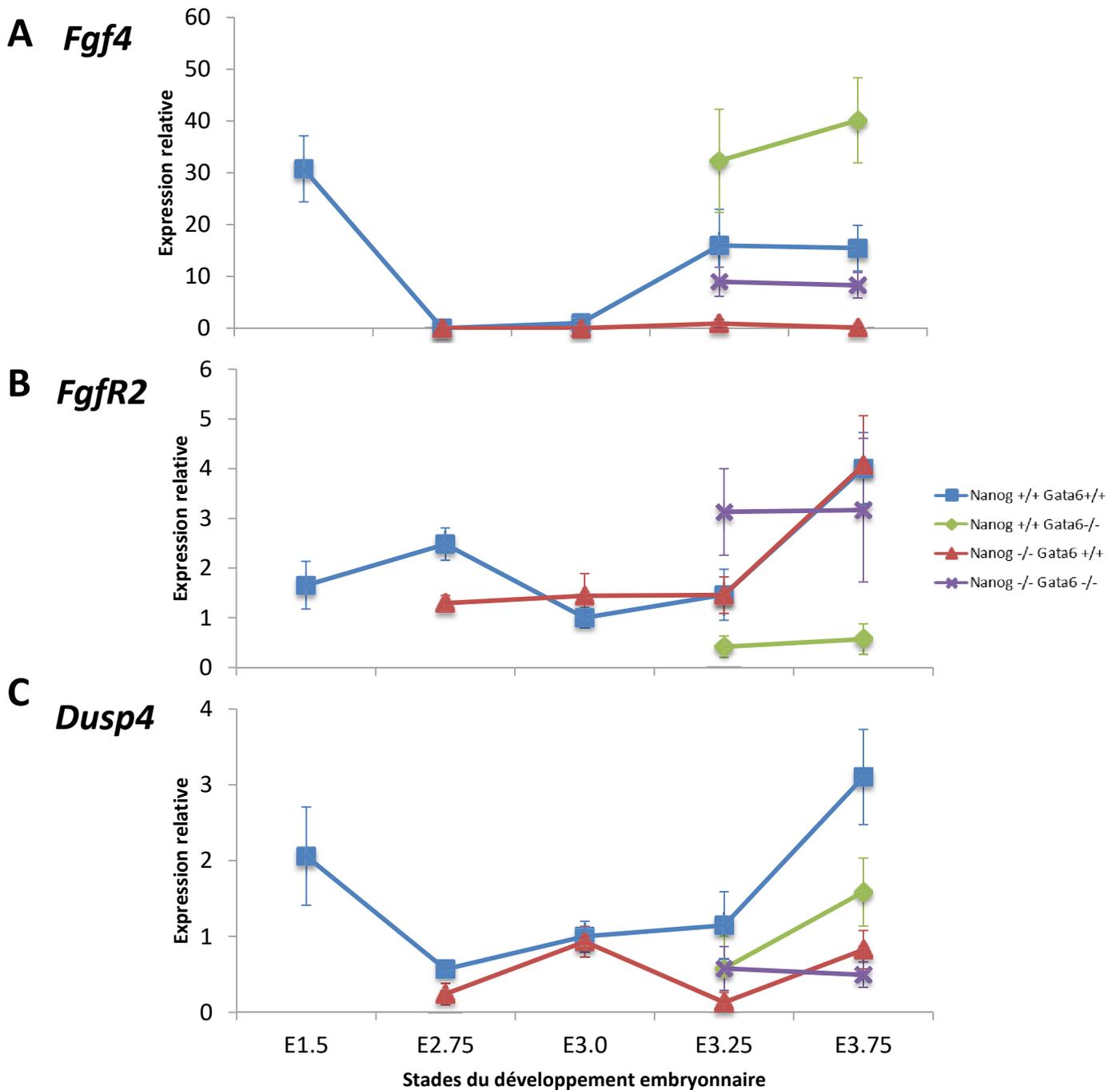


Figure 35 : Quantification de l'expression ARN des marqueurs de la voie FGF/MAPK au cours du développement embryonnaire.

Expression de *Fgf4* (A), *Fgfr2* (B), *Dusp4* (C) au sein des cellules de la MCI en fonction du stade de développement et du génotype.

E. Effet de la voie MAPK sur l'expression de SOX2

Comme l'expression de SOX2 reste hétérogène dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, je me suis demandée quel(s) facteur(s) pourrai(en)t être responsable(s) de cette hétérogénéité. La voie FGF/MAPK étant un facteur majeur responsable de la mise en place du « poivre et sel » lors de la spécification, j'ai cherché à savoir si cette voie est également responsable de l'hétérogénéité de SOX2.

1. Les acteurs de la voie FGF sont présents dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}

L'expression des acteurs de la voie FGF a été analysée par RT-qPCR sur les cellules de la MCI des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, notamment *Fgf4* et *Fgfr2* qui sont connus pour avoir une expression différentielle (Kurimoto, 2006; Guo *et al.*, 2010; Ohnishi *et al.*, 2013; Krupa *et al.*, 2014).

Dans les embryons sauvages, l'expression de *Fgf4* est forte au stade E1.5. Elle devient nulle du stade E2.75 au stade E3.0, puis elle augmente au stade E3.25 et reste stable au stade E3.75 (Fig. 35 A). Ce même profil d'expression a déjà été mis en évidence (Guo *et al.*, 2010).

Comme il a été observé précédemment dans l'équipe, il n'y a pas d'expression de *Fgf4* dans les embryons *Nanog*^{-/-} (Fig. 35 A). Cela a permis de conclure que l'expression de *Fgf4* est sous la dépendance de *Nanog*. A l'inverse, dans les embryons *Gata6*^{-/-} l'expression de *Fgf4* est importante due à la présence de NANOG dans toutes les cellules de la MCI ($p=0.017$, test de Mann-Whitney) (Fig. 35 A). De manière surprenante, dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, *Fgf4* est exprimé malgré l'absence de *Nanog* (Fig. 35 A). Son niveau d'expression reste toutefois faible comparé aux autres génotypes. La présence de ce facteur dans les

embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} montre que *Gata6* a également un effet sur la transcription de *Fgf4*.

Par conséquent, *Nanog* a un effet activateur sur *Fgf4* et que *Gata6* a un effet répresseur sur *Fgf4*, et l'absence de *Nanog* et de *Gata6* n'entraîne pas de perte d'expression de *Fgf4*.

L'expression de *Fgfr2* reste constante jusqu'au stade E3.25 puis augmente au stade E3.75 dans les embryons sauvages ($p=0.017$ entre les stades E3.25 et E3.75, test de Mann-Whitney) (Fig. 35 B). Son expression dans les embryons *Nanog*^{-/-} est équivalente à celle des embryons sauvages à tous les stades. Dans les embryons *Gata6*^{-/-}, son expression est plus faible que dans les embryons sauvages au stade E3.75 ($p=0.0043$, test de Mann-Whitney) (Fig. 35 B).

Dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, l'expression de *Fgfr2* ne varie pas entre les stades E3.25 et E3.75 et est similaire à l'expression dans les embryons *Nanog*^{-/-} au stade E3.75 (Fig. 35 B).

Cela signifie que malgré l'absence de *Nanog* et *Gata6*, *Fgfr2* est exprimé. L'expression de *Fgfr2* ne dépend donc ni de *Nanog*, ni du FGF, mais dépend en partie de *Gata6*.

Comme *Fgf4* et *Fgfr2* sont exprimés dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} à des niveaux similaires aux embryons sauvages, j'ai vérifié si la voie FGF/MAPK est activée. Pour cela, j'ai regardé, dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, l'expression de *Dusp4*, cible de la voie FGF/MAPK (Lanner & Rossant, 2010).

Tout d'abord, dans les embryons sauvages, *Dusp4* est exprimé au stade E1.5, puis diminue jusqu'au stade E2.75. Il augmente faiblement jusqu'au stade E3.25 puis fortement au stade E3.75 ($p=0.03$ entre E3.25 et E3.75, test de Mann-Whitney). Son expression augmente également entre les stades E3.25 et E3.75 chez les embryons *Nanog*^{-/-} et *Gata6*^{-/-}. Cette augmentation n'est toutefois pas significative ($p=0.070$ pour les embryons *Nanog*^{-/-}, $p=0.051$ pour les embryons *Gata6*^{-/-}, test de

Mann-Whitney) (Fig. 35 C). De plus, le niveau de *Dusp4* dans les embryons simples mutants *Nanog*^{-/-} et *Gata6*^{-/-} reste significativement plus faible que dans les embryons sauvages (p=0.0043 entre les embryons sauvages et embryons *Nanog*^{-/-}, p=0.05 entre les embryons sauvages et embryons *Gata6*^{-/-}) (Fig. 35 C). Cela signifie que, pour les embryons simples mutants *Nanog*^{-/-} et *Gata6*^{-/-}, l'activation de la voie FGF n'est pas assez forte pour permettre l'activation de ses régulateurs. En effet, pour chacun des deux génotypes, *Fgf4* ou *Fgfr2* est diminué voir absent.

Dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, au stade E3.75, l'expression de *Dusp4* est largement plus faible que dans les embryons sauvages et dans les embryons *Gata6*^{-/-}, mais ne diffère pas de l'expression dans les embryons *Nanog*^{-/-} (p=0.0095 entre embryons sauvages et embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, p=0.0159 entre les embryons *Gata6*^{-/-} et embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, p=0.66 entre les embryons *Nanog*^{-/-} et embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}) (Fig. 35 C). De plus, l'expression de *Dusp4* reste équivalente et faible entre le stade E3.25 et E3.75. L'expression de *Dusp4* dépend donc de *Nanog* et de *Gata6*. Par conséquent bien que les acteurs de la voie FGF soient présents, la voie MAPK n'est pas activée.

En conclusion, les acteurs de la voie FGF/MAPK, *Fgf4* et *Fgfr2*, sont présents malgré l'absence de *Nanog* et de *Gata6*, mais leur présence n'est pas suffisante pour permettre l'activation de la voie. Cela pourrait être dû au fait que la quantité de *Fgf4* n'est pas suffisante dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} pour permettre l'accumulation et l'activation de la voie FGF/MAPK. De plus, la diffusion du *Fgf4* pourrait ne pas être hétérogène dans ces embryons.

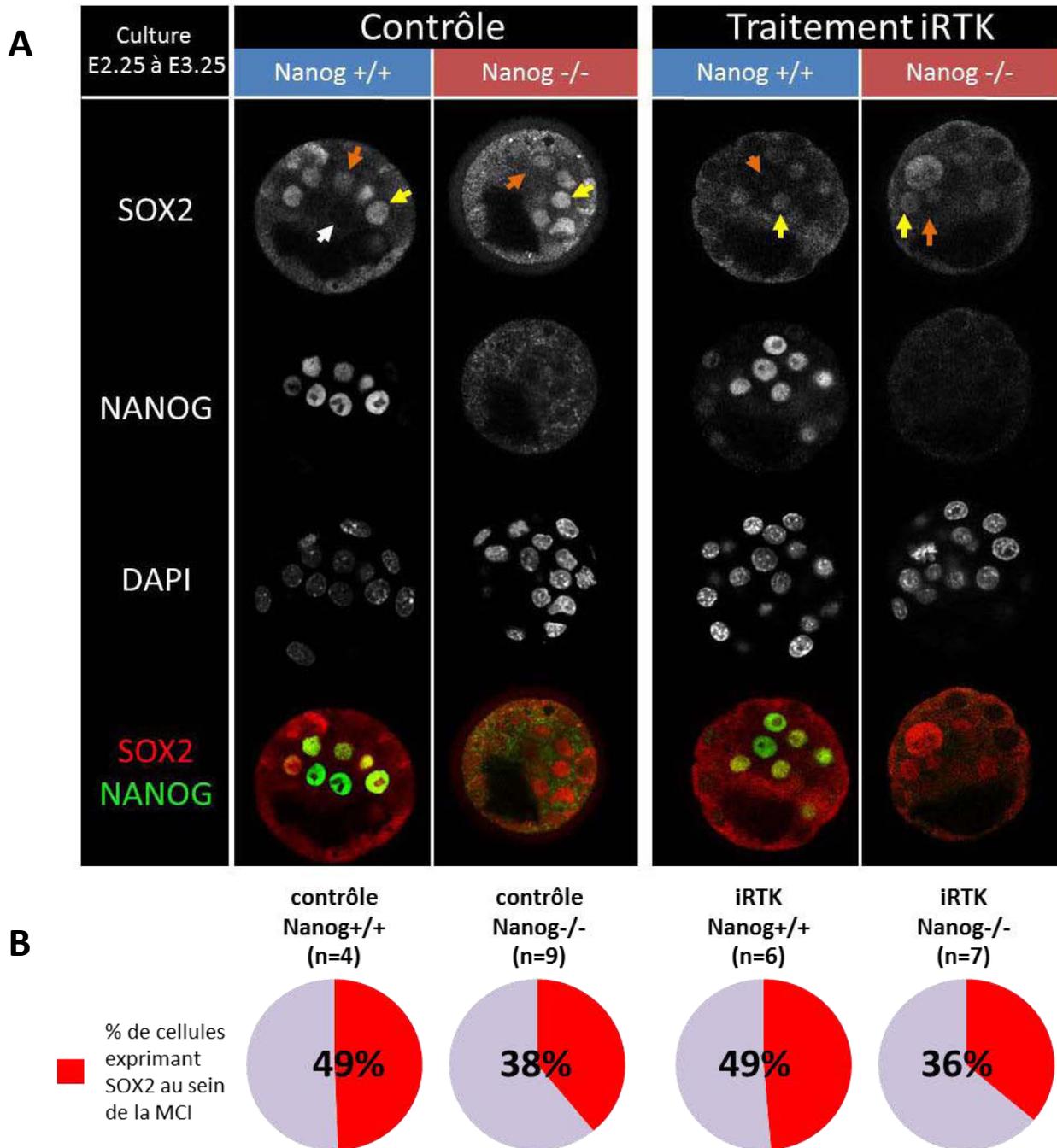


Figure 36 : Expression protéique de SOX2 et NANOG après un traitement aux inhibiteurs de la voie FGF/MAPK jusqu'au stade E3.25 en fonction du génotype des embryons.

A : Immunomarquage sur des embryons cultivés en milieu contrôlé ou en milieu avec traitement inhibiteur de la voie FGF/MAPK (iRTK). SOX2 reste présent de manière hétérogène dans tous les embryons quelque soit le génotype et le traitement. La MCI de l'embryon est délimitée par des pointillés. Les flèches blanches signalent des noyaux pour lesquels le marquage de SOX2 est similaire à celui dans les noyaux du TE. Les flèches oranges signalent des noyaux avec un marquage similaire à celui présent dans le cytoplasme des cellules. Les flèches jaunes signalent des noyaux avec un marquage de SOX2 plus intense.

B : Comptage du nombre de noyaux exprimant SOX2 au sein de la MCI.

2. L'expression de SOX2 reste hétérogène en absence de la voie FGF/MAPK au stade E3.25

Pour savoir si l'expression hétérogène de SOX2 est dépendante de la voie FGF/MAPK, des embryons ont été traités avec des inhibiteurs de cette voie. Un mélange de deux inhibiteurs classiquement utilisés a été employé : un inhibiteur de MEK (un des acteurs de la voie) et un inhibiteur des récepteurs FGF, (Nichols *et al.*, 2009; Yamanaka, Lanner, & Rossant, 2010; Frankenberg *et al.*, 2011).

Il a été prouvé par notre équipe que des embryons *Nanog*^{-/-} traités à partir du stade E2.25 jusqu'au stade E3.75 avec ces inhibiteurs, n'expriment pas GATA6 (Frankenberg *et al.*, 2011). J'ai également vérifié cette absence de GATA6 par immunomarquage (Annexe 4). Dans ces conditions, les embryons *Nanog*^{-/-} se comportent alors comme des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}.

Etant donné que la proportion d'embryons *Nanog*^{-/-} est plus importante que celle des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, j'ai, dans un premier temps, observé l'expression de SOX2 au sein des embryons *Nanog*^{-/-} traités avec les inhibiteurs.

Les embryons ont d'abord été traités sur une période courte, du stade E2.25 au stade E3.25, pour observer les effets des inhibiteurs sur l'initiation de l'expression de SOX2. Après culture en milieu « contrôle » ou en milieu avec traitement, j'ai réalisé des immunomarquages afin d'examiner l'expression de SOX2 et j'ai compté le nombre de cellules ayant une expression nucléaire de SOX2 au sein de la MCI. Durant cette période, NANOG et GATA6 sont co-exprimés dans les cellules de la MCI et l'expression nucléaire de SOX2 est induite dans les cellules de la MCI.

Les embryons mis en culture sans traitement possèdent le même marquage que les embryons frais (Fig. 36 A) avec une expression nucléaire de SOX2 présente dans 49% des cellules de la MCI pour les embryons sauvages et 38% pour les embryons *Nanog*^{-/-} (Fig. 36 B). Il n'y a donc pas de différence d'expression de SOX2

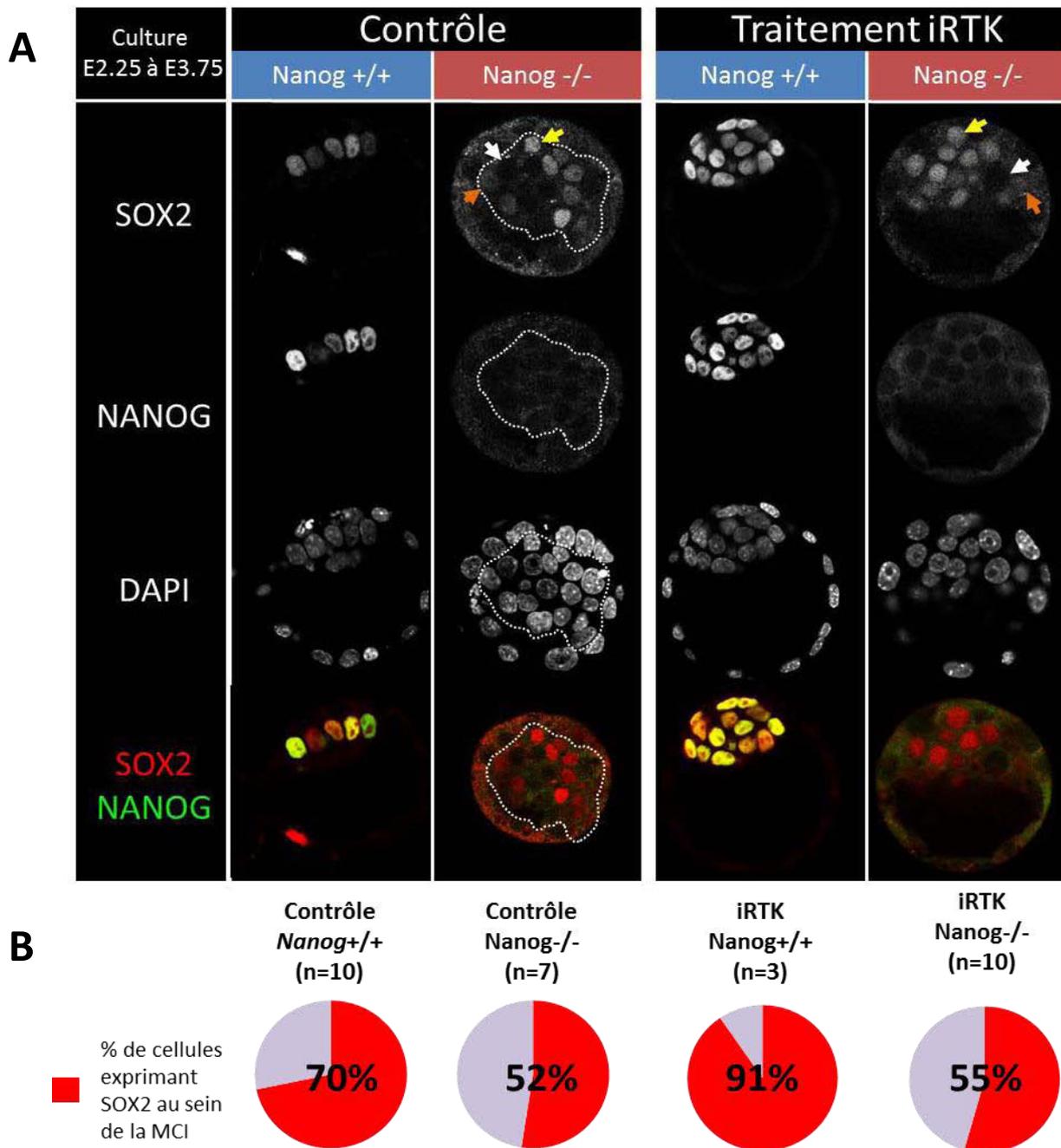


Figure 37 : Expression protéique de SOX2 et NANOG après un traitement aux inhibiteurs de la voie FGF/MAPK jusqu'au stade E3.75 en fonction du génotype des embryons.

A : Immunomarquage sur des embryons cultivés en milieu contrôle ou en milieu avec traitement inhibiteur de la voie FGF/MAPK (iRTK). SOX2 reste présent de manière hétérogène en absence de *Nanog*, de *Gata6* et de la voie Fgf. La MCI de l'embryon est délimitée par des pointillés. Les flèches blanches signalent des noyaux pour lesquels le marquage de SOX2 est similaire à celui dans les noyaux du TE. Les flèches oranges signalent des noyaux avec un marquage similaire à celui présent dans le cytoplasme des cellules. Les flèches jaunes signalent des noyaux avec un marquage de SOX2 plus intense.

B : Comptage du nombre de noyaux exprimant SOX2 au sein de la MCI.

en l'absence de *Nanog* à ce stade ($p=0.32$ entre embryons sauvages et embryons *Nanog*^{-/-}, test de Mann-Whitney).

Lorsque les embryons sauvages sont traités avec des inhibiteurs de la voie FGF/MAPK, l'expression de SOX2 est également hétérogène au sein de la MCI et environ la moitié des cellules possède une expression nucléaire de SOX2 (Fig. 36). De même, dans les embryons *Nanog*^{-/-}, l'expression de SOX2 est également hétérogène avec 36% des noyaux de la MCI positifs pour SOX2. (Fig. 36). De plus, le nombre de cellules au sein de la MCI ne varie pas en fonction du génotype et des traitements (Annexe 5 A et B).

Cela suggère qu'au stade E3.25, en absence de *Nanog*, de *Gata6* et de la voie FGF/MAPK, l'expression de SOX2 reste hétérogène, et donc, que la voie FGF/MAPK n'est pas nécessaire pour l'induction de l'expression de SOX2.

3. L'expression hétérogène de SOX2 est indépendante de *Nanog*, de *Gata6* et de la voie FGF/MAPK au stade E3.75

Puisque SOX2 reste exprimé en absence de *Nanog*, *Gata6* et FGF4, quels sont les effets de la voie FGF/MAPK sur le maintien de l'expression de SOX2 ? Des embryons ont été cultivés avec inhibiteurs de la voie FGF/MAPK du stade E2.25 au stade E3.75 puis le nombre de cellules avec un marquage nucléaire au sein de la MCI a été compté.

A ce stade, les embryons mis en culture sans traitement possèdent le même marquage que les embryons frais (Fig. 37 A), avec 70% des cellules de la MCI exprimant SOX2 pour les embryons sauvages et 52% pour les embryons *Nanog*^{-/-} (Fig. 37 B).

Lorsque les embryons sauvages sont traités avec les inhibiteurs de la voie FGF/MAPK, toutes les cellules de la MCI expriment NANOG. SOX2 est alors également présent dans toutes les cellules de la MCI (Fig. 37 A). En effet, 91% des cellules de la MCI expriment SOX2 au niveau nucléaire (Fig. 37 B). Cette différence d'expression entre les embryons cultivés en milieu contrôle et en milieu traité est significative ($p=0.007$, test de Mann-Whitney). Enfin, les embryons *Nanog*^{-/-} traités avec les inhibiteurs possèdent toujours une expression hétérogène de SOX2 (Fig. 37 A) avec 54% des cellules de la MCI exprimant SOX2 au niveau nucléaire (Fig. 37 B). Il n'y a pas de différence significative avec les embryons cultivés en milieu contrôle ($p=0.95$ entre embryons *Nanog*^{-/-} contrôles et embryons *Nanog*^{-/-} traités, test de Mann-Whitney). De plus, le nombre de cellules au sein de la MCI ne varie pas en fonction du génotype et du traitement (Annexe 5).

En conclusion, en absence de *Nanog*, de *Gata6* et d'activité de la voie FGF/MAPK, il subsiste une hétérogénéité cellulaire portée par l'expression de SOX2. Cela signifie que, à ce stade, la présence de NANOG va influencer l'expression de SOX2 suggérant que les effets de la voie FGF/MAPK sur SOX2 passent par NANOG. En l'absence de ce dernier, l'expression de SOX2 ne varie pas avec le traitement. Ainsi le maintien de l'expression de SOX2 ne nécessite ni la présence de *Nanog*, ni celle de *Gata6*, ni celle de la voie FGF/MAPK.

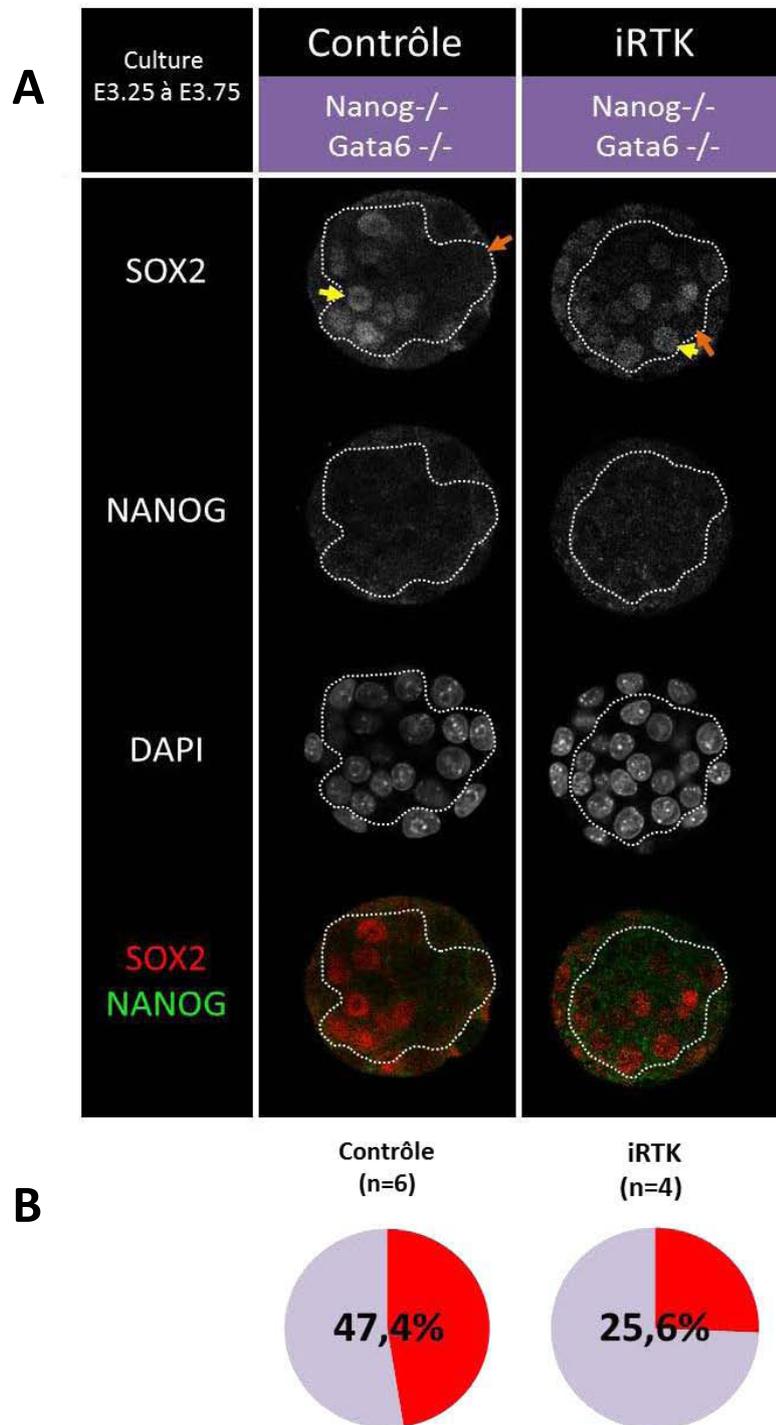


Figure 38 : Expression protéique de SOX2 et NANOG après un traitement aux inhibiteurs de la voie des RTK jusqu'au stade E3.75 en fonction du génotype des embryons.

A : Immunomarquage sur des embryons cultivés en milieu contrôle ou en milieu avec traitement inhibiteur de la voie Fgf. Les mêmes résultats sont observés entre les embryons simples mutants *Nanog*^{-/-} traités aux inhibiteurs et les embryons doubles mutants *Nanog*^{-/-}; *Gata6*^{-/-} traités aux inhibiteurs de la voie Fgf. La MCI de l'embryon est délimitée par des pointillés. Les flèches blanches signalent des noyaux pour lesquels le marquage de SOX2 est similaire à celui dans les noyaux du TE. Les flèches oranges signalent des noyaux avec un marquage similaire à celui présent dans le cytoplasme des cellules. Les flèches jaunes signalent des noyaux avec un marquage de SOX2 plus intense.

B : Comptage du nombre de noyaux exprimant SOX2 au sein de la MCI.

4. Confirmation de l'expression hétérogène de SOX2 dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} traités avec les inhibiteurs de la voie FGF/MAPK

L'expression de SOX2 a été vérifiée dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} traités avec les inhibiteurs de la voie FGF/MAPK.

Les embryons issus de croisement entre hétérozygotes *Nanog*^{+/-} ; *Gata6*^{+/-} ont été cultivés dans un milieu contrôle ou un milieu traité du stade E3.25 au stade E3.75. La culture a commencée à un stade plus tardif car les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} ne se développent pas correctement lorsqu'ils sont mis en culture, puisque la plupart ne forment pas de cavité. La culture a donc débutée au stade E3.25 pour contourner ce problème. Cette période de traitement est suffisante pour réprimer l'expression de GATA6 dans les embryons sauvages et pour exprimer NANOG dans toutes les cellules de la MCI (Yamanaka *et al.*, 2010; Frankenberg *et al.*, 2011) montrant que les inhibiteurs agissent suffisamment rapidement pour être utilisés sur cette période.

Après immunomarquage, j'ai compté le nombre de cellules de la MCI avec un marquage nucléaire de SOX2.

Dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} mis en culture dans un milieu contrôle, l'expression de SOX2 est hétérogène avec des cellules présentant une expression équivalente entre le cytoplasme et le noyau, et des cellules dont l'expression est nucléaire (Fig. 38 A). Près de la moitié des cellules de la MCI possèdent un marquage nucléaire (Fig. 38 B). Le même marquage hétérogène est retrouvé dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} traités avec les inhibiteurs de la voie FGF/MAPK (Fig. 38 A). Cependant, seulement 25,6% des cellules de la MCI possèdent alors un marquage nucléaire (Fig. 38 B). Cette différence provient probablement du génotype plus délétère pour les embryons. En outre, ce même marquage est retrouvé dans les embryons *Nanog*^{-/-} issus de portées de doubles hétérozygotes traités avec les inhibiteurs (43,5% des cellules possèdent un marquage nucléaire, différence non

significative avec les embryons *Nanog*^{-/-} traités issus des portées de simples hétérozygotes, test de Mann Withney).

L'expression hétérogène de SOX2 observée dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} confirme les résultats obtenus avec les embryons *Nanog*^{-/-}.

En conclusion, l'expression hétérogène de SOX2 ne varie pas en l'absence de *Nanog*, de *Gata6* et de la voie FGF/MAPK. Il existe donc une hétérogénéité d'expression entre les cellules de la MCI indépendante de la voie FGF/MAPK et les effets de cette voie, observés sur SOX2, au stade E3.75, passent par l'expression *Nanog*.

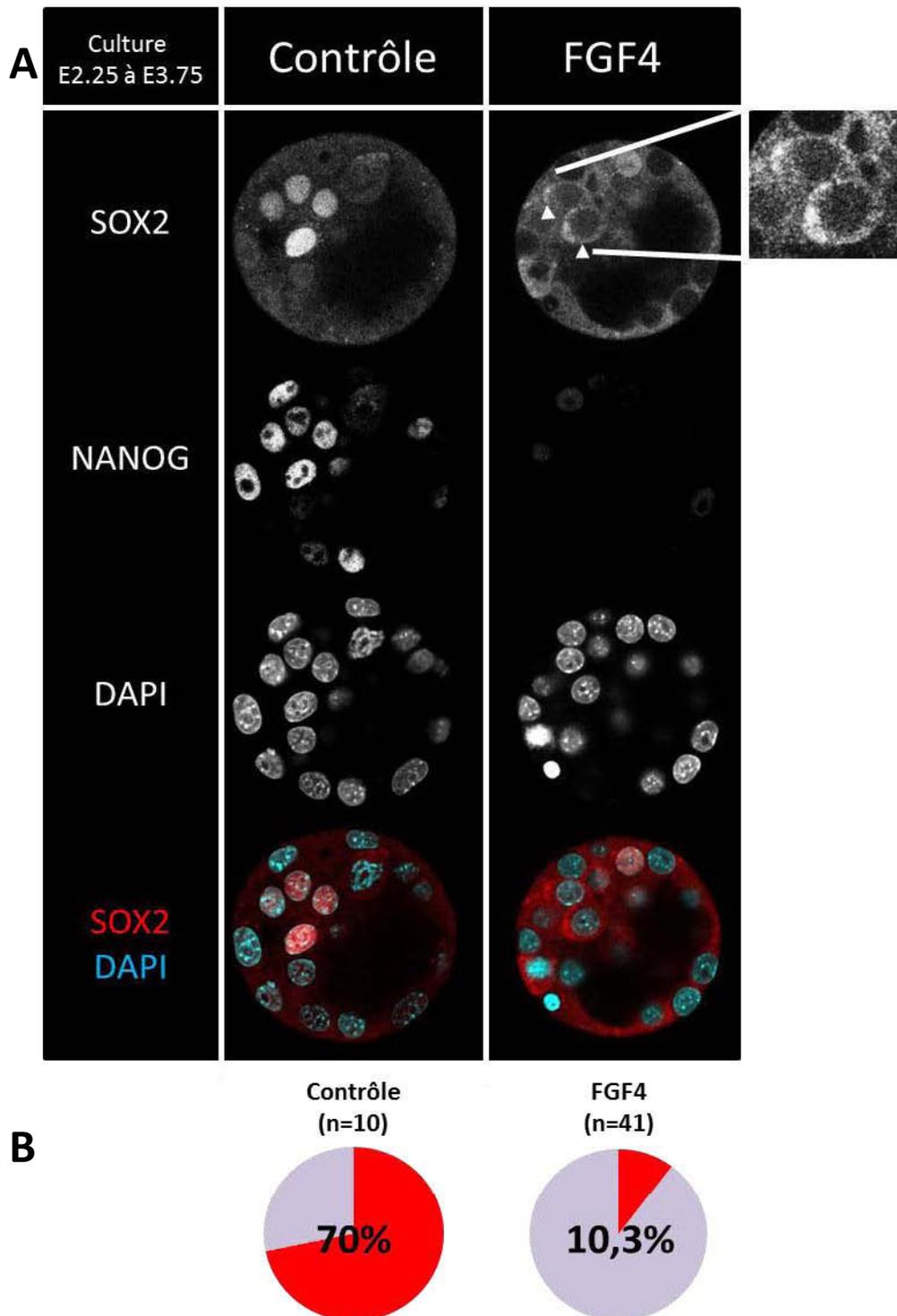


Figure 39 : Expression protéique de SOX2 et NANOG après un traitement au FGF4 exogène jusqu'au stade E3,75.

A : Immunomarquage sur des embryons sauvages cultivés en milieu contrôle ou en milieu avec traitement FGF4. SOX2 possède un marquage cytoplasmique plus intense lors du traitement au FGF4. La MCI de l'embryon est délimitée par des pointillés.

B : Comptage du nombre de noyaux exprimant SOX2 au sein de la MCI.

F. Effet de l'expression exogène de FGF4 sur l'expression de SOX2

1. L'expression exogène de FGF4 entraîne une expression cytoplasmique de SOX2

L'expression de SOX2 a ensuite été étudiée en présence d'un traitement FGF4. En effet, Wicklow *et al* ont montré que traiter des embryons au FGF4 entraîne une perte d'expression de SOX2. J'ai voulu savoir si cet effet est dépendant de *Nanog* et *Gata6*. Des embryons ont été traités avec du FGF4 exogène du stade E2.75 au stade E3.75.

Les embryons cultivés en milieu contrôle montrent une co-expression de NANOG et de SOX2 dans les cellules de l'EPI (Fig. 39 A).

NANOG est absent des embryons sauvages traités avec du FGF4 exogène comme l'ont montré Yamanaka *et al* (Yamanaka *et al.*, 2010). Dans ces embryons traités, très peu de cellules expriment SOX2 au niveau nucléaire (Fig. 39 A). Seul 10% des cellules de la MCI expriment encore SOX2 au niveau nucléaire, soit une moyenne de 2,6 noyaux exprimant SOX2 dans une MCI de 22 cellules en moyenne, contre 70% dans les embryons non traités, soit 17,9 noyaux exprimant SOX2 dans une MCI de 25,6 cellules en moyenne ($p < 0.0001$, test de Student) (Fig. 39 B). De plus, la taille des MCI ne varie pas en fonction du traitement (Annexe 5 D). Finalement, le traitement d'embryons sauvages avec du FGF4 ectopique sur une période plus longue, allant du stade E2.75 au stade E4.5, entraîne une perte totale d'expression de SOX2 (Wicklow *et al.*, 2014).

De plus, en présence de FGF4, certaines cellules de la MCI possèdent un marquage fort au niveau du cytoplasme (Fig. 39 A). J'ai mis en évidence ce marquage cytoplasmique avec les deux anticorps SOX2 que j'ai testés (Annexe 6).

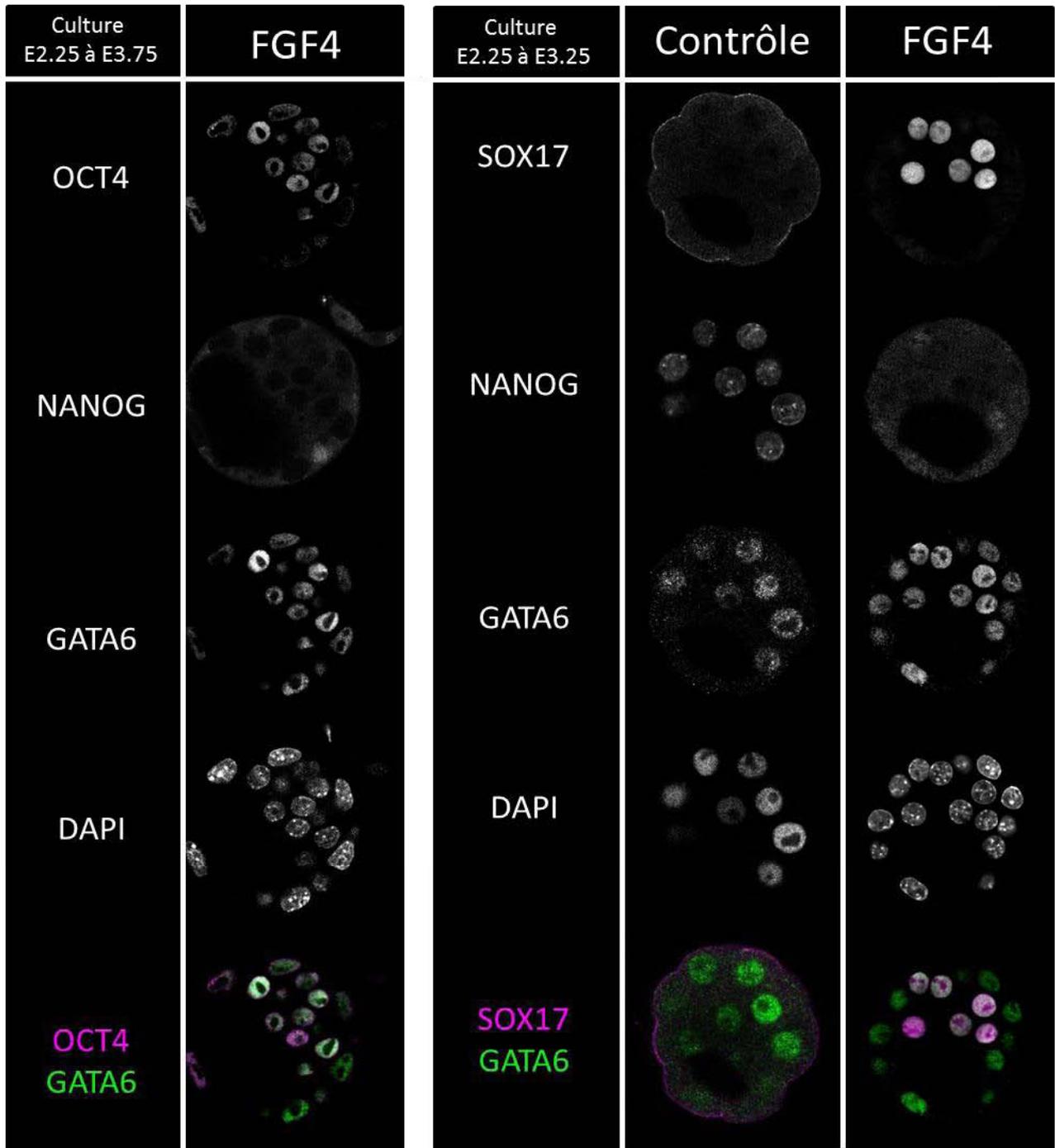


Figure 40 : Expression protéique de SOX17 et OCT4 après un traitement au FGF4 exogène. Immunomarquage sur des embryons cultivés en milieu contrôle ou en milieu avec traitement FGF4. SOX17 est présent dès le stade E3,25 après un traitement au FGF4 exogène. OCT4 reste nucléaire après un traitement au FGF4 exogène. La MCI de l'embryon est délimitée par des pointillés.

La diminution de l'expression nucléaire de SOX2 et son expression cytoplasmique ont été observées dans tous les génotypes testés : embryons sauvages et embryons hétérozygotes *Nanog*^{+/-}, embryons hétérozygotes *Gata6*^{+/-} et embryons *Nanog*^{-/-}. Cela signifie que l'expression exogène de FGF4 entraîne un export du noyau et donc une expression cytoplasmique de SOX2, ceci indépendamment de *Nanog*.

Ces résultats m'ont amené à poser l'hypothèse suivante. Dans les embryons traités au FGF4 exogène, il pourrait exister une compétition entre les membres de la famille SOX. En effet, SOX2 et SOX17 entrent en compétition pour s'associer avec OCT4 (Aksoy *et al.*, 2013). La présence de SOX17 dans les embryons traités au FGF4 pourrait entraîner une dissociation du couple OCT4/SOX2 et donc une expulsion de SOX2 hors du noyau. Comme le marquage cytoplasmique n'est pas présent dans toutes les cellules de la MCI, cela signifierait alors qu'une fois exportée du noyau, la protéine serait détruite.

2. L'expression de SOX17 et OCT4 est nucléaire lors du traitement des embryons avec du FGF4

Pour vérifier mon hypothèse, j'ai, dans un premier temps, vérifié que SOX17 et OCT4 sont présents dès le stade E3.25 au niveau nucléaire lors d'un traitement au FGF4. Pour ce faire, des immunomarquages ont été réalisés après culture des embryons avec du FGF4 exogène.

Les embryons cultivés avec du FGF4 exogène gardent une expression nucléaire d'OCT4 dans les cellules de la MCI (Fig. 40). Ce n'est donc pas une expulsion d'OCT4 du noyau qui est responsable de l'expulsion de SOX2 et donc qu'OCT4 peut s'associer à d'autres membres de la famille SOX.

De plus, les embryons traités au FGF4 exogène montrent une expression plus précoce de SOX17. En effet, au stade E3.25 SOX17 n'est pas présent dans les

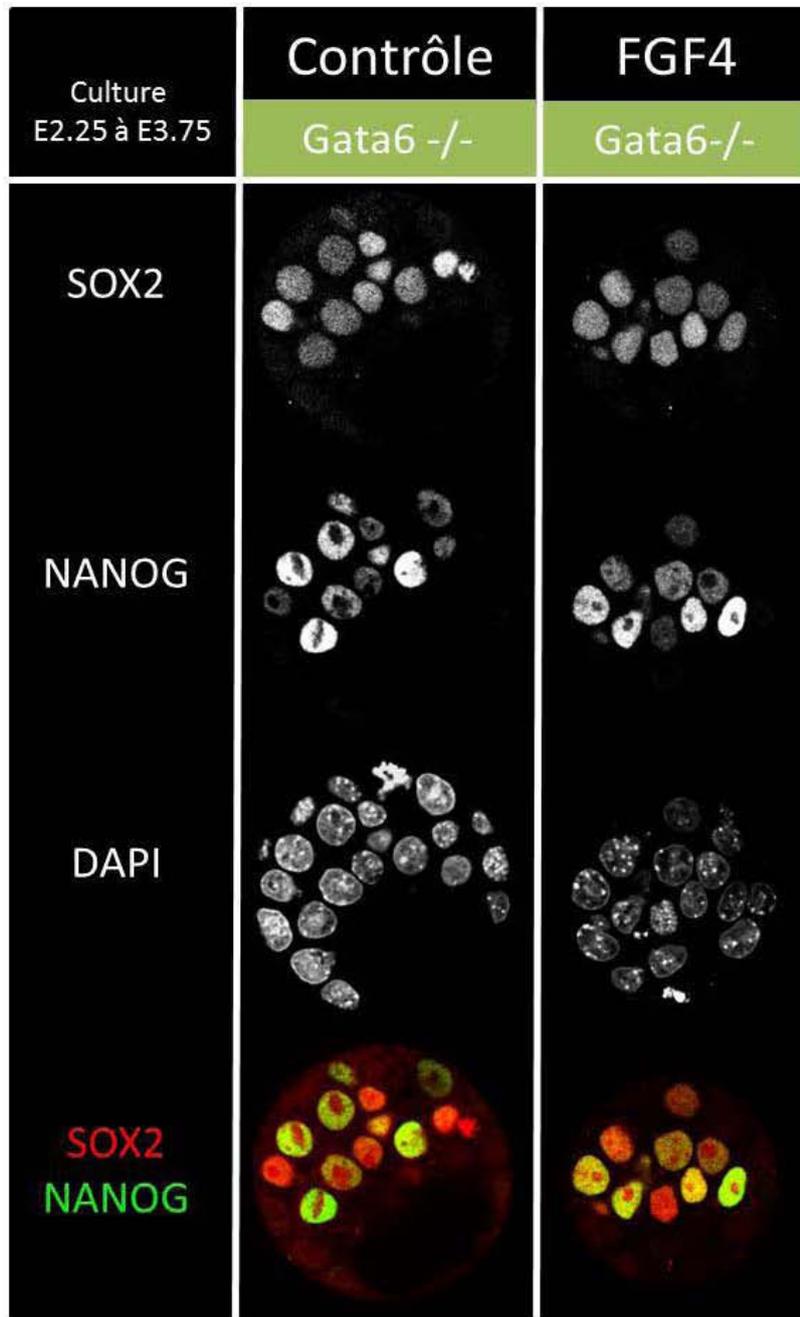


Figure 41 : Expression protéique de SOX2 et NANOG dans les embryons simples mutants *Gata6*^{-/-} après un traitement au FGF4 exogène.

Immunomarquage sur des embryons cultivés en milieu contrôle ou en milieu avec traitement FGF4. NANOG reste présent dans les embryons simples mutants *Gata6*^{-/-} après traitement au FGF4 exogène ce qui va favoriser le maintien de l'expression de SOX2. La MCI de l'embryon est délimitée par des pointillés.

embryons cultivés en milieu contrôle (Fig. 40). Dans les embryons traités au FGF4 exogène, SOX17 est déjà présent dans un grand nombre de cellules à ce stade (Fig. 40). De fait, la présence d'une quantité importante de FGF4 permet une expression nucléaire de SOX17 plus précoce.

En conclusion, dans les embryons traités au FGF4 exogène, SOX17 et OCT4 sont présents au niveau nucléaire. Favorisant mes hypothèses, ils pourraient donc s'associer préférentiellement et entraîner une expulsion de SOX2 hors du noyau.

3. Nanog reste exprimé dans les embryons *Gata6*^{-/-} traités au *Egf4*

Pour tester mon hypothèse, j'ai utilisé des embryons *Gata6*^{-/-}. En effet, dans ces embryons, l'absence de *Gata6* entraîne une absence de SOX17 même en présence de FGF4 exogène (Schrode *et al.*, 2014; Bessonard *et al.*, 2014). Par conséquent, si les effets du FGF4 exogène sur SOX2 passent par une association d'OCT4 avec SOX17, en l'absence de ce dernier, SOX2 sera nucléaire. En revanche, si l'effet du FGF4 exogène est indépendant de SOX17, alors les embryons *Gata6*^{-/-} traités au FGF4 auront le même phénotype que les autres embryons, c'est-à-dire la présence de SOX2 cytoplasmique.

Les embryons *Gata6*^{-/-} ont été traités du stade E2.25 au stade E3.75 avec du FGF4 exogène et j'ai observé l'expression de SOX2 par immunomarquage. En traitant les embryons *Gata6*^{-/-} à partir de ce stade, aucune cellule de la MCI n'exprime NANOG (Bessonard *et al.*, 2014).

Les embryons *Gata6*^{-/-} cultivés en milieu contrôle présentent une expression de NANOG et de SOX2 dans tous les noyaux des cellules de la MCI (Fig. 41). De manière surprenante, ces embryons traités avec du FGF4 exogène, présentent également un marquage de NANOG dans toutes les cellules de la MCI (Fig. 41). Ces résultats vont à l'encontre de ceux obtenus précédemment dans notre équipe, qui

montrent que les embryons *Gata6*^{-/-} traités au FGF4 précocement n'expriment plus NANOG (Bessonard *et al.*, 2014). A l'inverse, cela va dans le sens de travaux réalisés dans une autre équipe dans lesquels, un traitement au FGF4 exogène sur les embryons *Gata6*^{-/-}, n'entraîne pas de perte d'expression de NANOG (Schrode *et al.*, 2014). Cette différence dans les traitements pourrait provenir d'un problème de fond génétique des souris ou d'un problème de lot de FGF4.

Or, j'ai précédemment montré qu'au stade E3.75, NANOG a une influence sur l'expression de SOX2. La présence de SOX2 au niveau nucléaire dans toutes les cellules de la MCI des embryons *Gata6*^{-/-} traités au FGF4 pourrait donc être due à la présence de NANOG dans ces cellules.

Différentes période de culture (à partir du stade E1.5 et E0.5) en vue d'inhiber l'expression de NANOG par l'administration de FGF4, ont été testées. A aucun moment l'expression de NANOG n'a été inhibée dans les embryons *Gata6*^{-/-} traités au FGF4.

Il est donc impossible de vérifier mon hypothèse en utilisant les embryons *Gata6*^{-/-}. Il faut donc effectuer ces expériences sur des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} dans lesquels *Gata6* et donc *Sox17* sont absents mais également *Nanog*.

4. Expression de SOX2 dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} traités avec du FGF4 exogène

J'ai donc mis en culture avec du FGF4 exogène des embryons issus de croisements entre doubles hétérozygotes *Nanog*^{+/-} ; *Gata6*^{+/-}. Puis j'ai observé l'expression de SOX2 par immunomarquage. Toutefois, je n'ai pas à l'heure actuelle réussi à obtenir d'embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} traités avec FGF4.

Discussion

Discussion

Les études que j'ai conduites, mettent en évidence qu'il existe toujours une hétérogénéité cellulaire au sein de la MCI des embryons, malgré l'absence de *Nanog*, de *Gata6* et d'activation de la voie FGF/MAPK. En effet, l'expression de SOX2 reste hétérogène dans les embryons en l'absence de ces facteurs.

A. Développement des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}

1. Développement morphologique

Il a été montré précédemment que les embryons *Nanog*^{-/-} et *Gata6*^{-/-} possèdent un phénotype particulier à partir des stades E3.5 et meurent peu après l'implantation (Mitsui *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2008; Frankenberg *et al.*, 2011; Schrode *et al.*, 2014; Bessonard *et al.*, 2014). Les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} (embryons doubles mutants) ne sont pas viables, puisque dans les portées issues de croisements entre souris doubles hétérozygotes *Nanog*^{+/-} ; *Gata6*^{+/-}, aucun animal double mutant *Nanog*^{-/-}, *Gata6*^{-/-} n'a été produit.

Aucune différence de morphologie chez les embryons simples mutants n'a été notée jusqu'à présent (Messerschmidt & Kemler, 2010; Frankenberg *et al.*, 2011; Schrode *et al.*, 2014; Bessonard *et al.*, 2014). Au cours de ce travail, j'ai observé un décalage de croissance entre les différents génotypes (Fig.20). Ainsi, les embryons *Gata6*^{-/-} ont tendance à être retardés au stade E3.75 (et également au stade E4.5). Toutefois, ces décalages n'affectent pas tous les embryons. Cette différence pourrait provenir du fond génétique des souris. Cela indique également que la période étudiée est hautement variable.

Les embryons doubles mutants se développent jusqu'au stade E3.75 mais montrent un retard de croissance. Il semble que leur développement soit ralenti à partir du stade E3.5 (Fig. 20) montrant que la présence de *Nanog* et *Gata6* est nécessaire pour le bon développement du blastocyste.

2. Expression des marqueurs du TE

Le profil d'expression observé dans les embryons sauvages, pour les marqueurs du TE, *Cdx2*, *Gata3* et *Id2* est similaire à celui observé lors d'étude sur cellule unique (Guo *et al.*, 2010). Les facteurs *Cdx2*, *Gata3* et *Id2* se comportent de la même manière dans les MCI simples mutantes *Nanog*^{-/-} et *Gata6*^{-/-} mais leur expression diffère dans les MCI doubles mutantes (Fig.22).

Concernant *Cdx2*, son expression est plus élevée en absence de *Nanog* mais ne varie pas en présence ou en absence de *Gata6*. Cela montre que l'expression de *Cdx2* est inhibée par *Nanog* mais indépendante de *Gata6*. Etant donné que la voie FGF/MAPK n'est pas active en absence de *Nanog*, cela pourrait signifier que la régulation de l'expression de *Cdx2* passe par une autre voie.

A l'inverse, l'expression d'*Id2* est fortement diminuée en absence de *Gata6*. Son expression pourrait donc être maintenue par *Gata6*.

Enfin, l'expression de *Gata3* est similaire dans les embryons doubles mutants et les embryons sauvages tandis qu'elle est plus forte dans les embryons *Nanog*^{-/-} et plus faible dans les embryons *Gata6*^{-/-}. Cela suggère que la présence de *Gata6* favorise l'expression de *Gata3* alors que la présence de *Nanog* l'inhibe, ce qui permet un équilibre d'expression de *Gata3*.

En conclusion, dans la MCI *Nanog* et *Gata6* réguleraient les marqueurs du TE. Cependant l'absence de ces deux marqueurs n'entraîne pas les cellules de la MCI vers un destin de TE.

3. Expression de Nanog et Gata6

L'expression de *Nanog* en amont de la cassette, est faible en absence de *Nanog* (Fig. 25), suggérant que l'absence de *Nanog* entraîne une diminution de son expression. Cela signifie qu'il permet son maintien et qu'il ne s'auto-réprime pas comme cela a été constaté en cellules ES (Navarro *et al.*, 2012; Fidalgo *et al.*, 2012). Enfin l'absence de *Nanog* entraînant une baisse de sa propre expression, suggérant plutôt un effet auto-activateur.

De plus, la présence ou l'absence de *Gata6* ne modifie pas la transcription de *Nanog* : *Gata6* n'inhibe pas la transcription de *Nanog*. En cela mes résultats diffèrent des résultats de Wamaitha *et al* qui montrent qu'une induction de *Gata6* en cellules ES entraîne une diminution de la transcription de *Nanog* et que *Gata6* peut se fixer directement sur *Nanog* (Wamaitha *et al.*, 2015).

Il convient toutefois de rappeler que l'expression de *Nanog* dans les embryons sauvages est diluée par la présence des cellules de l'EPr qui n'expriment pas *Nanog*, ce qui n'est pas le cas des cellules dans les embryons *Gata6*^{-/-}. Il sera donc utile de regarder l'expression de *Nanog* en cellule unique pour confirmer ces résultats et outrepasser ce biais.

L'expression de *Gata6* diminue au stade E3.75 chez les embryons simples mutants *Nanog*^{-/-} et *Gata6*^{-/-} (Fig. 25). En effet, dans les embryons *Nanog*^{-/-}, l'absence de FGF4 entraîne une diminution de la transcription de *Gata6*. Cela a également été montré dans les embryons *Fgf4*^{-/-}, dans lesquels le maintien de l'expression de GATA6 nécessite la présence de FGF4 (Kang *et al.*, 2013; Krawchuk *et al.*, 2013).

Dans les embryons *Gata6*^{-/-}, l'expression de *Gata6* en amont des sites *Lox*, est induite au stade E3.25 mais n'est pas maintenue, certainement à cause de la présence de *Nanog* qui le réprime à partir de E3.25 (Frankenberg *et al.*, 2011). Cela signifie que *Gata6* n'est pas nécessaire pour sa propre induction, comme cela a été

montré dans les embryons *Gata6*^{H2B-Venus/H2B-Venus} (Freyer *et al.*, 2015). La présence de *Nanog* dans toutes les cellules de la MCI entraîne une inhibition de la transcription de *Gata6* au stade E3.75. Dans les cellules ES, il a été prouvé que *Nanog* pouvait se fixer directement sur *Gata6* pour l'inhiber (Singh *et al.*, 2007), il est donc possible que le même mécanisme soit présent dans l'embryon.

Dans les embryons doubles mutants, la transcription de *Gata6* en amont des sites *Lox*, est plus élevée que dans les embryons sauvages (bien que l'expression de *Gata6* soit diluée du fait de la présence de cellules EPI dans ces MCI) (Fig. 25). Il est possible que l'absence d'inhibition par *Nanog* favorise l'expression de *Gata6*. De plus, l'induction de *Gata6* passe par d'autres régulateurs en amont qui ne dépendent ni de *Nanog*, ni de *Gata6*.

En conclusion, il semblerait que *Nanog* ne possède pas d'effet auto-represseur *in vivo* et que *Gata6*, réprimé par *Nanog*, ne soit pas nécessaire pour sa propre induction.

4. Expression des marqueurs de l'EPI et de l'EPr

La présence de *Nanog* ne semble pas indispensable à l'expression des marqueurs de l'EPI comme *Pecam1* ou *Cripto1*. Toutefois sa présence pourrait avoir une influence sur l'expression de *Pecam1* (Fig. 26). Ici encore, l'expression des marqueurs de l'EPI n'est présente que dans 50% des cellules de la MCI des embryons sauvages. Les résultats obtenus dans ces embryons sont donc dilués, et rendent difficile la comparaison de l'expression de ces marqueurs entre embryons sauvages et embryons simples mutants. L'analyse de ces marqueurs en cellule unique est donc indispensable.

Nous pouvons néanmoins conclure que *Nanog* est nécessaire pour l'expression de BMP4 au sein de l'EPI, car il est très peu exprimé en l'absence de *Nanog* et à l'inverse, fortement exprimé dans les embryons *Gata6*^{-/-} (Fig. 26).

Dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, l'expression de ces marqueurs reste stable entre les stades E3.25 et E3.75 (Fig. 26). Nous avons également observé ce maintien d'expression entre les deux stades pour la plupart des marqueurs testés en RT-qPCR, comme *Cdx2*, *Id2*, *Oct4*, *Hhex*, *Rex1*, *Essrβ*, *Fgf4*, *Fgfr2*, *Dusp4*. Ainsi, l'absence de *Nanog* et de *Gata6* ne permettant pas d'enclencher leur spécification, les cellules de la MCI des embryons doubles mutants resteraient bloquées au stade E3.25.

En ce qui concerne les marqueurs de l'EPr, les résultats obtenus confirment que l'expression de *Gata6* et de *Nanog*, par le biais de l'expression de FGF4, est nécessaire pour la spécification de l'EPr (Fig.27) (Frankenberg *et al.*, 2011; Schrode *et al.*, 2014; Bessonard *et al.*, 2014).

En conclusion, les cellules de la MCI des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} ne se différencient ni en TE, ni en EPI, ni en EPr. Leur développement semble figé entre les stades E3.0 et E3.25. Elles ressemblent donc davantage à des cellules non spécifiées du stade E3.25. Si c'est le cas, il sera difficile de les comparer à des cellules spécifiées du stade E3.75 que ce soit dans les embryons simples mutants ou sauvages. Pour résoudre cette difficulté, il est désormais indispensable de définir plus finement l'identité de ces cellules. Un séquençage sur l'ARN de cellule unique issue de la MCI à différents stades et pour différents génotypes permettra de mieux caractériser ces cellules et d'identifier de nouveaux marqueurs exprimés de manière hétérogène dans ces cellules.

Par la suite, il serait intéressant de pouvoir dériver les cellules de la MCI de ces embryons *in vitro*. Si celle-ci sont bloquées à un stade plus précoce du développement, elles pourraient permettre l'analyse de l'état « MCI » de manière plus aisée.

B. Expression hétérogène de SOX2 au sein des embryons

Au stade E3.25, quel que soit le génotype observé et la présence ou non de traitement inhibiteurs de la voie FGF/MAPK, j'ai montré que l'expression de SOX2 reste constamment hétérogène dans les cellules de la MCI (Fig. 31 et 36). De plus, pour chacun des génotypes étudiés avec ou sans traitement, près de la moitié des cellules de la MCI expriment SOX2, comme montré par Wicklow *et al* dans les embryons sauvages (Wicklow *et al.*, 2014). Cela montre que l'initiation de SOX2 ne dépend ni de *Nanog*, ni de *Gata6*, ni de la voie FGF/MAPK.

Cependant, les expériences sur l'ARN en cellule unique n'ont pas mis en évidence d'hétérogénéité aux stades E3.25 (Fig. 9 A) (Guo *et al.*, 2010), suggérant que cette hétérogénéité d'expression proviendrait d'une régulation post-transcriptionnelle.

Au stade E3.75, dans les embryons sauvages, l'expression de SOX2 est restreinte à l'EPI (Fig. 33). Ce marquage a déjà été mis en évidence (Wicklow *et al.*, 2014). Cet article montre également qu'il existe, au stade E3.5, des cellules SOX2 positives et NANOG négatives et concluent que SOX2 devient spécifique de l'EPI après NANOG. J'ai montré qu'en l'absence de *Nanog*, l'expression de SOX2 est hétérogène et similaire au profil d'expression des cellules au stade E3.25. De plus, le traitement des embryons avec des inhibiteurs de la voie FGF/MAPK ou l'absence de *Gata6* n'entraîne pas de différence d'expression (Fig. 33 et Fig. 37). L'absence d'interaction entre GATA6 et Sox2 observées par CHIP, appuie ce résultat (Wamaitha *et al.*, 2015).

Le maintien de l'expression de SOX2 ne dépend donc ni de *Gata6*, ni de la voie FGF/MAPK au stade E3.75. Toutefois, l'absence de *Nanog* entraîne une diminution de l'intensité d'expression de SOX2 ainsi qu'une diminution de l'expression des transcrits (Fig. 30 et 34). En effet, dans les embryons doubles mutants, la transcription de *Sox2* diminue fortement au stade E3.75, cependant la

protéine reste visible à ce stade. Cela pourrait être dû à une durée de vie assez longue de la protéine SOX2 (Avilion, 2003).

Au stade E3.75, la présence de *Nanog* favorise le maintien de l'expression de SOX2. Ceci a également été montré dans les cellules ES où NANOG peut se fixer sur Sox2 et où une déplétion de *Nanog* induit une diminution de l'expression de Sox2 (Loh *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'étendue des valeurs d'intensité de SOX2 est plus faible en absence de *Nanog* (Fig. 34). L'hétérogénéité d'expression dans les cellules qui expriment SOX2 au niveau nucléaire est donc restreinte, ce qui suggère que la présence de NANOG favoriserait l'hétérogénéité d'expression de SOX2.

Finalement, il semble que l'hétérogénéité d'expression de SOX2 ne corresponde pas au poivre et sel de NANOG et GATA6. En effet, dans les embryons sauvages au stade E3.25, certaines cellules de la MCI sont marquées par SOX2 mais pas par NANOG et d'autres sont marquées par NANOG mais pas par SOX2 (Fig. 29). Ce dernier marquage n'avait jamais été observé auparavant et montre que ces deux marqueurs sont indépendants au stade E3.25. De plus, NANOG est exprimé dans les embryons *Sox2*^{-/-} (Wicklow *et al.*, 2014). Il s'agit donc bien ici de deux hétérogénéités différentes mais qui pourraient agir en parallèle pour la spécification des cellules.

En conclusion, des facteurs indépendants de *Nanog*, de *Gata6* et de la voie de signalisation FGF/MAPK vont initier l'expression de SOX2 entre les stades E3.0 et E3.25. Cette expression semble être régulée de manière post-traductionnelle, de sorte que SOX2 est hétérogène au sein des cellules de la MCI. Puis, durant la spécification des cellules, l'expression de SOX2 va être influencée par l'expression de *Nanog* et va donc finir par se restreindre aux cellules EPI au stade E3.75.

La présence d'une expression hétérogène de SOX2 indépendante des régulateurs connus de la spécification pose de nouvelles questions, et notamment

celle de savoir quelle voie de signalisation est responsable de cette expression hétérogène. Une des hypothèses possibles serait la voie de signalisation Hippo. En effet, Wicklow *et al* ont montré que cette voie est responsable de la restriction de SOX2 au sein des cellules internes de l'embryon (Wicklow *et al.*, 2014). Ainsi, l'inhibition de la voie Hippo entraîne une perte d'expression de SOX2 dans les cellules externes. Il serait donc intéressant d'explorer l'activation de cette voie au sein de la MCI, de rechercher si certaines cellules n'ont pas encore activé la voie Hippo au sein de la MCI et de suivre l'expression de SOX2 dans celles-ci. Des expériences d'inhibition de la voie Hippo au sein de la MCI pourraient également permettre de vérifier si cette voie est responsable de l'hétérogénéité de SOX2. En effet, il a été montré qu'une inhibition de *Tead4* par shARN entraîne une spécification des cellules plutôt vers un destin d'EPI (Mihajlović, Thamodaran, & Bruce, 2015). Il est donc possible que la voie Hippo joue également un rôle dans la spécification des cellules et donc sur l'expression de SOX2.

C. Expression des acteurs de la voie de signalisation FGF/MAPK

1. Expression de *Fgf4*

Dans les embryons sauvages, le profil d'expression de *Fgf4* que nous avons montré est similaire au profil d'expression déjà mis en évidence lors d'études en cellule unique jusqu'au stade E3.25 (Fig. 35) (Guo *et al.*, 2010; Ohnishi *et al.*, 2013). Toutefois, au stade E3.75, ces deux équipes mettent en évidence une augmentation de l'expression de *Fgf4* dans les cellules de l'EPI tandis que mes résultats montrent une expression identique au stade E3.25. Cette différence d'expression provient probablement du fait que nous travaillons sur les MCI des embryons. L'augmentation d'expression du *Fgf4* dans les cellules EPI pourrait être masquée par la présence des cellules de l'EPr. Il est donc important pour valider nos résultats, de réaliser une étude de ce facteur sur cellule unique.

L'expression importante de *Fgf4* présente dans les embryons *Gata6*^{-/-} pourrait s'expliquer par le fait que la MCI de ces embryons est entièrement constituée de cellules EPI qui vont donc transcrire *Fgf4* (Fig. 34). L'expression de *Fgf4* est nulle dans les embryons *Nanog*^{-/-} comme notre équipe l'avait précédemment montré (Frankenberg *et al.*, 2011). Enfin dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}, *Fgf4* est exprimé au même niveau qu'au stade E3.25 révélant un effet répresseur de *Gata6* sur l'expression de *Fgf4*.

En conclusion, *Nanog* a un effet activateur sur l'expression de *Fgf4*, à l'inverse *Gata6* a un effet inhibiteur. Dans les embryons sauvages, l'équilibre entre ces deux facteurs permet alors une expression correcte de *Fgf4*. En l'absence de ces deux facteurs, il existe alors un niveau basal de *Fgf4*.

Dans ces conditions, l'expression de *Fgf4* est probablement induite par SOX2 et OCT4. En effet, il a été montré dans les cellules ES que le couple OCT4/SOX2 se fixe à *Fgf4* pour favoriser sa transcription (Yuan *et al.*, 1995; Ambrosetti *et al.*,

2000). De plus, il a été montré que l'expression de *Fgf4* est diminuée de 30% dans les embryons *Sox2*^{-/-} (Wicklow *et al.*, 2014) et est également diminuée voir absente dans les embryons *Oct4*^{-/-} (Nichols *et al.*, 1998). Ces deux facteurs étant toujours présents dans les embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-}. Ils pourraient être responsables de l'expression résiduelle de *Fgf4* dans ces embryons. Cette théorie est aussi avancée par Guo *et al* qui suggèrent qu'une augmentation d'expression de *Sox2* de manière asynchrone au sein de la MCI pourrait être à l'origine de l'hétérogénéité d'expression de *Fgf4* (Guo *et al.*, 2010). Pour confirmer cette hypothèse il serait intéressant d'étudier, en cellule unique, l'expression de *Fgf4* en absence de *Sox2*, *Nanog* et *Gata6* au stade E3.25, afin de s'affranchir des éventuels effets de chacun de ces acteurs.

2. Expression de *Fgfr2*

Dans les embryons sauvages, l'expression de *Fgfr2* est stable jusqu'au stade E3.25 puis augmente au stade E3.75 (Fig. 35). Cette augmentation pourrait être due à une augmentation de l'expression dans les cellules de l'EPr. Ce même profil d'expression a déjà été observé lors d'études en cellules uniques avec une augmentation de l'expression dans les cellules de l'EPr au stade E3.5 (Guo *et al.*, 2010; Ohnishi *et al.*, 2013). Pour ce récepteur, une étude en cellule unique est indispensable pour confirmer nos résultats.

L'expression de *Fgfr2* est très faible dans les embryons *Gata6*^{-/-}, ce qui signifie que *Gata6* a un effet sur le maintien de l'expression de *Fgfr2*. En effet, il a été montré par CHIP que GATA6 peut se fixer sur le promoteur de *Fgfr2* (Wamaitha *et al.*, 2015). Dans les embryons *Nanog*^{-/-}, l'absence de *Nanog* seul n'a aucun effet sur l'expression de *Fgfr2*. Ainsi, l'effet potentiel de *Nanog* pourrait être masqué par la présence de *Gata6*. En effet, NANOG peut également se fixer à *Fgfr2* (Ma *et al.*, 2011).

Le maintien de l'expression de *Fgfr2* dans les embryons doubles mutants, montre effectivement que *Nanog* et *Gata6* possèdent un effet répresseur et inducteur respectivement sur ce récepteur. Toutefois, les effets de *Gata6* seraient plus forts que les effets de *Nanog*.

Pour finir, le facteur *Fgfr2* ne possède pas le même profil d'expression que les marqueurs de l'EPr puisqu'il est toujours présent dans les embryons *Nanog*^{-/-}. Son expression est donc indépendante de FGF4.

3. Expression de *Dusp4*

Dusp4 est un témoin de l'activation de la voie de signalisation MAPK (Lanner & Rossant, 2010). Dans les embryons sauvages, il est exprimé au stade E1.5, probablement en réponse à la quantité importante de FGF4 présente à ce moment-là. Puis, il augmente de nouveau au stade E3.75 (Fig. 35), ici encore en réponse à la quantité de FGF4 plus importante. Cette expression de DUSP4 a également été mise en évidence par immunomarquage dans notre équipe (résultats non montrés).

Dans tous les autres génotypes, *Dusp4* reste très peu exprimé entre les stades E3.25 et E3.75 (Fig. 35). La voie FGF/MAPK n'est donc pas suffisamment active pour permettre l'expression de *Dusp4*. Dans les embryons *Nanog*^{-/-}, il s'agit d'un manque de transcription de *Fgf4*. Dans les embryons *Gata6*^{-/-}, il s'agit d'une diminution d'expression de *Fgfr2*. Dans les embryons doubles mutants, ces deux acteurs étant relativement présents, il pourrait s'agir d'une dilution du signal. En effet, le seuil d'activation de la voie FGF/MAPK dans une cellule dépend de la quantité de FGF4 qui se fixe sur son récepteur (Kang *et al.*, 2013). Or, dans les embryons doubles mutants la quantité globale de FGF4 est plus faible que dans les embryons sauvages. De plus, dans ces derniers, l'hétérogénéité de *Nanog* au sein de la MCI concentre localement les quantités de FGF4. La quantité de FGF4 présente dans les

embryons doubles mutants pourrait donc être insuffisante pour activer la voie FGF/MAPK.

En conclusion, les acteurs de la voie FGF sont encore exprimés dans les embryons doubles mutants toutefois, la voie de signalisation FGF/MAPK n'est pas activée.

Dans l'embryon il a déjà été démontré l'importance d'avoir une diffusion hétérogène de *Fgf4* dans la MCI (Krupa *et al.*, 2014; Bessonard *et al.*, 2014). Cette hétérogénéité va permettre la mise en place du poivre et sel dans les cellules de la MCI.

Le premier facteur favorisant ce poivre et sel reste *Nanog*. Cependant, le déclencheur de la différence d'expression de *Nanog* dans quelques cellules est encore inconnu.

Une des hypothèses avancées est que l'hétérogénéité de *Fgf4* permettrait l'initiation de la spécification. Il serait intéressant de savoir si l'expression de celui-ci reste hétérogène dans les embryons doubles mutants. Pour cela, une étude des transcrits de *Fgf4* sur cellule unique permettra de vérifier si ces cellules expriment toutes *Fgf4* à des taux similaires. Si tel était le cas, cela signifierait que l'augmentation de *Nanog* dans certaines cellules au début de la spécification serait due à un autre facteur encore indéterminé.

La question se poserait alors de savoir si la présence d'une autre hétérogénéité au sein des cellules de la MCI, différente de celle portée par *Nanog* et *Gata6*, ou similaire à celle-ci mais présente plus en amont, est à l'origine de la variation d'expression de *Nanog*.

Nous avons mis en évidence la présence d'une nouvelle hétérogénéité portée par SOX2 au sein des cellules de la MCI. Cette hétérogénéité, différente de l'expression en « poivre et sel », renforce alors l'hypothèse d'une variation stochastique de l'expression de *Nanog*.

Conclusion

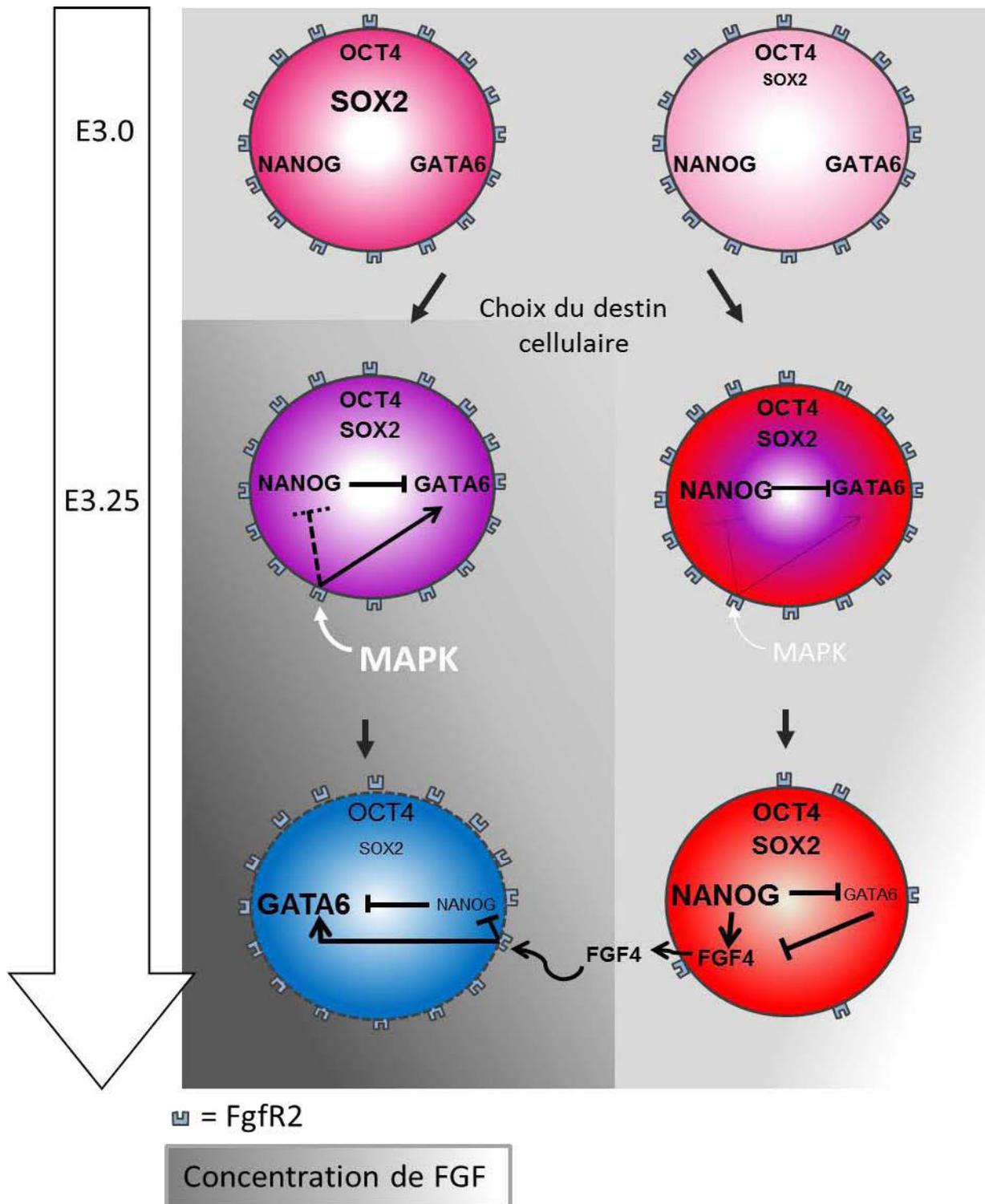


Figure 42 : Modèle de la spécification dans l'embryon pré-implantatoire.

Une diminution du signal MAPK ainsi que la perte de l'équilibre entre NANOG et GATA6 va entrainer dans certaines cellules de la MCI un déséquilibre d'expression en faveur de NANOG qui va en retour inhiber l'expression de *Gata6*. Cela permet la spécification de certaines cellules en EPI et donc la sécrétion par ces cellules de FGF4. Celui-ci va se fixer sur les cellules voisines ce qui va permettre la spécification de celles-ci en Epr en favorisant le maintien de *Gata6* et l'inhibition de *Nanog*.

Conclusion

Mes résultats ont permis de faire évoluer le modèle d'étude établi par l'équipe.

Tout d'abord, il existe une hétérogénéité plus précoce que la mise en place du poivre et sel de *Nanog* et *Gata6*. Toutefois celle-ci ne correspond pas à l'hétérogénéité d'expression de *Nanog* et est indépendante de *Nanog*, de *Gata6* et de la voie de signalisation FGF/MAPK. Cette hétérogénéité est portée par SOX2 qui est le premier marqueur restreint aux cellules de la MCI.

Au moment de la spécification, *Nanog* reste le facteur qui augmente en premier dans certaines cellules. Cela entraîne à la fois une inhibition de *Gata6* et la sécrétion de FGF4 qui va pouvoir s'accumuler et se fixer sur les cellules voisines. Le maintien de *Gata6* et l'inhibition de *Nanog* sont ainsi favorisés dans ces cellules. L'expression de *Gata6* va entraîner une inhibition de l'expression de *Fgf4* dans les cellules (Fig. 42).

Mon travail a permis de mettre en évidence une nouvelle hétérogénéité au sein des cellules de la MCI, portée par le facteur de transcription SOX2.

Matériel et Méthodes

Matériels et Méthodes

A. Obtention des embryons

Les embryons CD1 sont obtenus par croisement naturel. Après croisement de souris $Gata6^{tm1Sad}$ (Sodhi, Li, & Duncan, 2006) et $Nanog^{tm1 Yam}$ (Mitsui *et al.*, 2003) sous fond génétique CD1, les souris doubles hétérozygotes issues de ces portées sont mises en accouplement pour obtenir les embryons doubles mutants homozygotes.

Le génotypage des souris est réalisé en coupant la phalange distale. Les échantillons sont digérés toute une nuit à 55°C dans 300µl de tampon de lyse (Tris HCl pH=9,0 100mM ; EDTA 5mM ; 0,2% SDS ; NaCl 20mM ; Protéinase K 100 µg/ml (P6556, Sigma Aldrich)) sans agitation. Ils sont centrifugés 9 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est collecté et l'ADN est précipité dans 1 mL d'éthanol absolu froid puis centrifugé 1 minute à 13000 rpm. Le culot est séché puis repris dans 100µl de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA).

L'ADN d'embryon est extrait dans 10µl de tampon de lyse (KCl 50mM ; Tris pH=8,3 10mM ; MgCl₂ 2mM ; Gélatine 0,1mg/ml ; NP-40 0,45% ; Tween-20 0,45%, Protéinase K 100µg/ml) pendant 2 heures à 55°C sans agitation. La protéinase K est inactivée 10 minutes à 94°C.

Les PCR sont réalisées avec la Taq Polymerase (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant pour les allèles *Nanog* sauvages et mutants et l'allèle *Gata6* muté ; et à l'aide de la Taq Goldstar (Eurogentec) selon les recommandations du fournisseur pour l'allèle *Gata6* sauvage. Les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose 1,5%.

Les amorces utilisées sont $Gata6^{Del-F}$: 5' – AGTCTCCCTGTCATTCTTCCTGCTC – 3' associé à $Gata6^{Del-R}$: 5' – TGATCAAACCTGGGTCTACACTCCTA – 3' pour l'allèle mutant et $Gata6^{WT-F}$: 5' – GTGGTTGTAAGGCGGTTTGT – 3' et $Gata6^{WT-R}$: 5' – ACGCGAGCTCCAGAAAAAGT – 3' pour l'allèle *Gata6* sauvage. Les allèles *Nanog* sont génotypés à l'aide de l'amorce IntAS3 : 5' – CAGAATGCAGACAGGTCTACAGCCCG – 3' combinée avec l'amorce β Geo 5' – AATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTT – 3' pour l'allèle mutant et avec l'amorce IntF 5' – GGCCCAGCTGTGTGCACTCAA – 3' pour l'allèle sauvage.

B. Culture d'embryons ex vivo

Les embryons sont collectés en fonction du stade voulu à différentes heures, à savoir : 9h pour des embryons aux stades E2.25 ou E3.25, 18h pour des embryons aux stades E2.75 ou E3.75 et 14h pour des embryons aux stades E2.5 ou E3.5.

Les embryons sont collectés dans le milieu M2 (m7167, Sigma Aldrich) et sont cultivés avec la zone pellucide dans le milieu KSOM (MR-121-D, Millipore) ou le milieu G2 (10132, Vitrolife).

La culture des embryons en FGF4 est réalisée en présence de la protéine recombinante FGF4 (235-F4-025/CF, R&D Systems) à une concentration de 1 μ g/ml et avec de l'héparine (H3149, Sigma Aldrich) à une concentration de 1 μ g/ml. Les embryons contrôles sont cultivés en milieu G2 seul.

La culture des embryons en iRTK est réalisée en présence des inhibiteurs des récepteurs FGFR (PD173074, P2499, Sigma Aldrich) à 100nM et de MEK (PD0325901, PZ0162, Sigma Aldrich) à 500nM (Nichols *et al.*, 2009; Yamanaka, Lanner, & Rossant, 2010; Frankenberg *et al.*, 2011). Les embryons contrôles sont cultivés en milieu KSOM seul.

Anticorps primaires	Dilution	Fournisseur	Référence
Chèvre anti-PDGFR α	1/50	R et D systems	AF1062
Chèvre anti-SOX17	1/50	R et D systems	AF1924
Chèvre anti-SOX2	1/50	SANTA CRUZ	sc-17320
Lapin anti-GATA6	1/50	SANTA CRUZ	sc-9055
Lapin anti-NANOG	1/50	ABCAM	ab80892
Lapin anti-OCT4	1/400	SANTA CRUZ	sc-9081
Souris anti-CDX2	1/1	ABCAM	ab86949
Souris anti-SOX2	1/300	R et D systems	MAB2018

Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés lors de l'étude.

C. Immunofluorescence

Les embryons sont fixés entre 2 heures et une nuit dans une solution de paraformaldéhyde 4% diluée dans du PBS 1X à 4°C, puis ils sont rincés dans du PBS-Triton 0,1% (Triton X-100) trois fois pendant 5 minutes. Ils sont perméabilisés 5 minutes dans une solution de PBS-Triton 0,5% et sont ensuite incubés dans la solution de blocage PBS-Triton 0,1%- Sérum de veau foetal 10% pendant 30 minutes minimum. Les embryons sont incubés toute la nuit à 4°C en présence des anticorps primaires. Les anticorps utilisés sont regroupés dans le tableau 3.

Les embryons sont lavés dans la solution de PBS-Triton 0,1% (une fois 5 minutes, une fois 10 minutes et deux fois 15 minutes), et incubés pendant une heure et 30 minutes à température ambiante sous agitation avec les anticorps secondaires (488, Cy3 et Cy5, Jackson Immunoresearch) et avec le DAPI (Sigma-Aldrich). Les embryons sont visualisés avec le microscope confocal Leica SPE et sont analysés à l'aide des logiciels ImageJ (NIH) et Imaris (Bitplane).

Les comptages cellulaires sont réalisés manuellement et de manière semi-automatique à l'aide du logiciel Imaris. Le nombre de cellules marquées SOX2 ne prend en compte que les cellules pour lesquelles le marquage est visiblement nucléaire. Le calcul du nombre de cellules de la MCI est réalisé par soustraction des cellules marquées CDX2 au nombre de cellules totales présentes dans l'embryon.

D. Calcul de l'intensité des cellules

Le logiciel Imaris fournit, pour chaque cellule, les valeurs de l'intensité pour chacun des fluorochromes étudiés. A cette valeur est soustraite la valeur moyenne du bruit de fond (récupérée à partir de l'intensité dans les noyaux du TE). Les valeurs alors obtenues sont rapportées à la valeur du DAPI pour chaque cellule. La valeur obtenue est donc un rapport d'intensité.

E. Analyses statistiques

Les tests statistiques sont réalisés grâce au logiciel Prism6 (Graphpad). Les résultats ne suivant pas la loi Normale ont été analysés par un test non paramétrique de Mann-Withney ou par un test ANOVA à deux facteurs non paramétriques suivi de la correction de Dunn's. Les variations sont considérées comme statistiquement différentes (significatives) à un seuil de 5% ($P \leq 0,05$).

F. Analyse RT qPCR sur la MCI

L'immunochirurgie est réalisée après retrait de la zone pellucide par passage dans deux bains d'acide tyrode (T1788, Sigma Aldrich). Les cellules du TE sont retirées par aspirations et refoulements après un traitement de 10 minutes dans du sérum de lapin anti-souris (M5774, Sigma Aldrich) à 37°C puis 30 minutes dans du complément de cochon d'Inde (S1639, Sigma Aldrich) à 37°C.

Les MCI sont transférés dans 10 μ l de tampon d'extraction et incubés 30 minutes au bain marie à 42°C. Les lysats sont ensuite stockés à -80°C.

L'extraction d'ARN est réalisée à l'aide d'un kit d'extraction sur colonne « Arcturus® PicoPur ®» (Applied Biosystems) suivant les instructions du fournisseur (kit0204, Excilone).

La réverse transcription est réalisée à l'aide d'une SuperScript® III Reverse Transcriptase (P/N 56575, Invitrogene) suivant les instructions du fournisseur. La RT négative est réalisée avec 1 μ l d'eau à la place de 1 μ l de SuperScript®.

Pour réaliser la pré-amplification, l'ADNc est dilué au 1/8^{ème}. Chaque échantillon d'ADNc est pré-amplifié à l'aide du Taqman preAmp Master mix (4391128, Applied Biosystems) avec l'ensemble des amorces des gènes à analyser (tableau 4) diluées à 5 μ M suivant les instructions du fournisseur. La pré-amplification est réalisée grâce

à un programme PCR de 16 cycles (95°C durant 15 secondes puis 60°C durant 4 minutes), d'après les publications de Tang et al. et de Ralston et al. (Ralston *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010).

Les embryons sont génotypés à partir des cellules du TE qui sont récupérées et amplifiées à l'aide du kit REPLI-g (150025, Qiagen) (technique WGA : Whole Genome Amplification) suivant les instructions du fournisseur. Le génotypage est réalisé comme décrit auparavant.

Pour les qPCR, le LightCycler®480 SYBR Green I Master (Roche) est utilisé dans les conditions préconisées par le fournisseur et dans un volume réactionnel final de 10µL. L'amplification des produits PCR visible grâce à la fluorescence est réalisée par le LightCycler®480 (Roche).

Après une pré-incubation de 5 minutes à 95°C, la PCR se déroule en 40 cycles d'amplification comportant trois phases: 12 secondes à 95°C, 12 secondes à 62°C et 12 secondes à 72°C, suivie d'un cycle de 5 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C puis 5 acquisitions par seconde à 97°C.

Les RT-qPCR réalisées ici sont semi-quantitatives : l'expression de chaque transcrit est normalisée par rapport à la moyenne géométrique des gènes de référence Rps17 et RPLP0.

L'expression relative de chaque gène est ensuite rapportée à son expression au stade E3.0 dans les embryons sauvages.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- ABBOUD, N., MORRIS, T.M.-, HIRIART, E., YANG, H., BEZERRA, H., GUALAZZI, M.-G., STEFANOVIC, S., GUÉNANTIN, A.-C., EVANS, S.M. & PUCÉAT, M. (2015) A cohesin–OCT4 complex mediates Sox enhancers to prime an early embryonic lineage. *Nature Communications* **6**, 6749.
- ABRANCHES, E., GUEDES, A.M.V., MORAVEC, M., MAAMAR, H., SVOBODA, P., RAJ, A. & HENRIQUE, D. (2014) Stochastic NANOG fluctuations allow mouse embryonic stem cells to explore pluripotency. *Development* **141**, 2770–2779.
- AJDUK, A., BISWAS SHIVHARE, S. & ZERNICKA-GOETZ, M. (2014) The basal position of nuclei is one pre-requisite for asymmetric cell divisions in the early mouse embryo. *Developmental Biology* **392**, 133–140.
- AKSOY, I., GIUDICE, V., DELAHAYE, E., WIANNY, F., AUBRY, M., MURE, M., ET AL. (2014) Klf4 and Klf5 differentially inhibit mesoderm and endoderm differentiation in embryonic stem cells. *Nature Communications* **5**.
- AKSOY, I., JAUCH, R., CHEN, J., DYLA, M., DIVAKAR, U., BOGU, G.K., TEO, R., NG, C.K.L., HERATH, W., LILI, S. & OTHERS (2013) Oct4 switches partnering from Sox2 to Sox17 to reinterpret the enhancer code and specify endoderm. *The EMBO journal* **32**, 938–953.
- AMBROSETTI, D.-C., SCHOLER, H.R., DAILEY, L. & BASILICO, C. (2000) Modulation of the Activity of Multiple Transcriptional Activation Domains by the DNA Binding Domains Mediates the Synergistic Action of Sox2 and Oct-3 on the Fibroblast Growth Factor-4Enhancer. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 23387–23397.
- ANANI, S., BHAT, S., HONMA-YAMANAKA, N., KRAWCHUK, D. & YAMANAKA, Y. (2014) Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. *Development* **141**, 2813–2824.
- ARMAN, E., HAFFNER-KRAUSZ, R., CHEN, Y., HEATH, J.K. & LONAI, P. (1998) Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 5082–5087.
- ARTUS, J., KANG, M., COHEN-TANNOUJJI, M. & HADJANTONAKIS, A.-K. (2013) PDGF signaling is required for primitive endoderm cell survival in the inner cell mass of the mouse blastocyst: PDGF in PrE Cell Survival. *STEM CELLS* **31**, 1932–1941.
- ARTUS, J., PANTHIER, J.-J. & HADJANTONAKIS, A.-K. (2010) A role for PDGF signaling in expansion of the extra-embryonic endoderm lineage of the mouse blastocyst. *Development* **137**, 3361–3372.
- ARTUS, J., PILISZEK, A. & HADJANTONAKIS, A.-K. (2011) The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: Sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Developmental Biology* **350**, 393–404.

- AVILION, A.A. (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development* **17**, 126–140.
- BALTUS, G.A., KOWALSKI, M.P., ZHAI, H., TUTTER, A.V., QUINN, D., WALL, D. & KADAM, S. (2009) Acetylation of Sox2 Induces its Nuclear Export in Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **27**, 2175–2184.
- BARCROFT, L.C., MOSELEY, A.E., LINGREL, J.B. & WATSON, A.J. (2004) Deletion of the Na/K-ATPase α 1-subunit gene (*Atp1a1*) does not prevent cavitation of the preimplantation mouse embryo. *Mechanisms of Development* **121**, 417–426.
- BEDZHOV, I., GRAHAM, S.J.L., LEUNG, C.Y. & ZERNICKA-GOETZ, M. (2014) Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **369**, 20130538–20130538.
- 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.
- BIASE, F.H., CAO, X. & ZHONG, S. (2014) Cell fate inclination within 2-cell and 4-cell mouse embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Genome Research* **24**, 1787–1796.
- BLIJ, S., FRUM, T., AKYOL, A., FEARON, E. & RALSTON, A. (2012) Maternal Cdx2 is dispensable for mouse development. *Development* **139**, 3969–3972.
- BOER, B., KOPP, J., MALLANNA, S., DESLER, M., CHAKRAVARTHY, H., WILDER, P.J., BERNADT, C. & RIZZINO, A. (2007) Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2:Oct-3/4 target genes. *Nucleic Acids Research* **35**, 1773–1786.
- BOROVIAK, T., LOOS, R., LOMBARD, P., OKAHARA, J., BEHR, R., SASAKI, E., NICHOLS, J., SMITH, A. & BERTONE, P. (2015) Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. *Developmental Cell* **35**, 366–382.
- BOYER, L.A., LEE, T.I., COLE, M.F., JOHNSTONE, S.E., LEVINE, S.S., ZUCKER, J.P., GUENTHER, M.G., KUMAR, R.M., MURRAY, H.L., JENNER, R.G., GIFFORD, D.K., MELTON, D.A., JAENISCH, R. & YOUNG, R.A. (2005) Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* **122**, 947–956.
- 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., AHLRLUND-RICHTER, L., PEDERSEN, R.A. & VALLIER, L. (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**, 191–195.
- BURTON, A., MULLER, J., TU, S., PADILLA-LONGORIA, P., GUCCIONE, E. & TORRES-PADILLA, M.-E. (2013) Single-Cell Profiling of Epigenetic Modifiers Identifies PRDM14 as an Inducer of Cell Fate in the Mammalian Embryo. *Cell Reports* **5**, 687–701.
- CAI, K.Q., CAPO-CHICHI, C.D., RULA, M.E., YANG, D.-H. & XU, X.-X. (2008) Dynamic GATA6 expression in primitive endoderm formation and maturation in early mouse embryogenesis. *Developmental Dynamics* **237**, 2820–2829.

- CAMPOLO, F., GORI, M., FAVARO, R., NICOLIS, S., PELLEGRINI, M., BOTTI, F., ROSSI, P., JANNINI, E.A. & DOLCI, S. (2013) Essential Role of Sox2 for the Establishment and Maintenance of the Germ Cell Line. *STEM CELLS* **31**, 1408–1421.
- CAMUS, A., PEREA-GOMEZ, A., MOREAU, A. & COLLIGNON, J. (2006) Absence of Nodal signaling promotes precocious neural differentiation in the mouse embryo. *Developmental Biology* **295**, 743–755.
- CAO, Z., CAREY, T.S., GANGULY, A., WILSON, C.A., PAUL, S. & KNOTT, J.G. (2015) Transcription factor AP-2 induces early Cdx2 expression and represses HIPPO signaling to specify the trophectoderm lineage. *Development* **142**, 1606–1615.
- CAPO-CHICHI, C.D., RULA, M.E., SMEDBERG, J.L., VANDERVEER, L., PARMACEK, M.S., MORRISEY, E.E., GODWIN, A.K. & XU, X.-X. (2005) Perception of differentiation cues by GATA factors in primitive endoderm lineage determination of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* **286**, 574–586.
- CHAMBERS, I., COLBY, D., ROBERTSON, M., NICHOLS, J., LEE, S., TWEEDIE, S. & SMITH, A. (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643–655.
- CHAMBERS, I., SILVA, J., COLBY, D., NICHOLS, J., NIJMEIJER, B., ROBERTSON, M., VRANA, J., JONES, K., GROTEWOLD, L. & SMITH, A. (2007) Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**, 1230–1234.
- CHAWENGSAKSOPHAK, K., DE GRAAFF, W., ROSSANT, J., DESCHAMPS, J. & BECK, F. (2004) Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 7641–7645.
- CHAZAUD, C., YAMANAKA, Y., PAWSON, T. & ROSSANT, J. (2006) Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Developmental Cell* **10**, 615–624.
- CHENG, A.M., SAXTON, T.M., SAKAI, R., KULKARNI, S., MBAMALU, G., VOGEL, W., TORTORICE, C.G., CARDIFF, R.D., CROSS, J.C., MULLER, W.J. & OTHERS (1998) Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell* **95**, 793–803.
- CHEN, L., YABUUCHI, A., EMINLI, S., TAKEUCHI, A., LU, C.-W., HOCHEDLINGER, K. & DALEY, G.Q. (2009) Cross-regulation of the Nanog and Cdx2 promoters. *Cell research* **19**, 1052–1061.
- CHEN, X., XU, H., YUAN, P., FANG, F., HUSS, M., VEGA, V.B., ET AL. (2008) Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell* **133**, 1106–1117.
- CHEW, J.-L., LOH, Y.-H., ZHANG, W., CHEN, X., TAM, W.-L., YEAP, L.-S., LI, P., ANG, Y.-S., LIM, B., ROBSON, P. & NG, H.-H. (2005) Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 6031–6046.
- COUCOUVANIS, E. & MARTIN, G.R. (1995) Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* **83**, 279–287.

- DAILEY, L., YUAN, H. & BASILICO, C. (1994) Interaction between a novel F9-specific factor and octamer-binding proteins is required for cell-type-restricted activity of the fibroblast growth factor 4 enhancer. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 7758–7769.
- DAS, S., JENA, S. & LEVASSEUR, D.N. (2011) Alternative Splicing Produces Nanog Protein Variants with Different Capacities for Self-renewal and Pluripotency in Embryonic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 42690–42703.
- DIETRICH, J.-E. & HIIRAGI, T. (2007) Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development* **134**, 4219–4231.
- DO, D.V., UEDA, J., MESSERSCHMIDT, D.M., LORTHONGPANICH, C., ZHOU, Y., FENG, B., GUO, G., LIN, P.J., HOSSAIN, M.Z., ZHANG, W., MOH, A., WU, Q., ROBSON, P., NG, H.H., POELLINGER, L., KNOWLES, B.B., SOLTER, D. & FU, X.-Y. (2013) A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes & Development* **27**, 1378–1390.
- ELATMANI, H., DORMOY-RACLET, V., DUBUS, P., DAUTRY, F., CHAZAUD, C. & JACQUEMIN-SABLON, H. (2011) The RNA-Binding Protein Unr Prevents Mouse Embryonic Stem Cells Differentiation Toward the Primitive Endoderm Lineage. *STEM CELLS* **29**, 1504–1516.
- EMA, M., MORI, D., NIWA, H., HASEGAWA, Y., YAMANAKA, Y., HITOSHI, S., ET AL. (2008) Krüppel-like factor 5 Is Essential for Blastocyst Development and the Normal Self-Renewal of Mouse ESCs. *Cell Stem Cell* **3**, 555–567.
- EVANS, M.J. & KAUFMAN, M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–156.
- FELDMAN, B., POUHEYMIROU, W., PAPAIOANNOU, V.E., DECHIARA, T.M. & GOLDFARB, M. (1995) Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science (New York, N.Y.)* **267**, 246–249.
- FIDALGO, M., FAIOLA, F., PEREIRA, C.-F., DING, J., SAUNDERS, A., GINGOLD, J., SCHANIEL, C., LEMISCHKA, I.R., SILVA, J.C.R. & WANG, J. (2012) Zfp281 mediates Nanog autorepression through recruitment of the NuRD complex and inhibits somatic cell reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 16202–16207.
- FIORENZANO, A., PASCALE, E., D'ANIELLO, C., ACAMPORA, D., BASSALERT, C., RUSSO, F., ANDOLFI, G., BIFFONI, M., FRANCESCANGELI, F., ZEUNER, A., ANGELINI, C., CHAZAUD, C., PATRIARCA, E.J., FICO, A. & MINCHIOTTI, G. (2016) Cripto is essential to capture mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell pluripotency. *Nature Communications* **7**, 12589.
- FLEMING, T.P. (1987) A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Developmental Biology* **119**, 520–531.
- FRANKENBERG, S., GERBE, F., BESSONNARD, S., BELVILLE, C., POUCHIN, P., BARDOT, O. & CHAZAUD, C. (2011a) Primitive Endoderm Differentiates via a Three-Step Mechanism Involving Nanog and RTK Signaling. *Developmental Cell* **21**, 1005–1013.
- FRANKENBERG, S., GERBE, F., BESSONNARD, S., BELVILLE, C., POUCHIN, P., BARDOT, O. & CHAZAUD, C. (2011b) Primitive Endoderm Differentiates via a Three-Step Mechanism Involving Nanog and RTK Signaling. *Developmental Cell* **21**, 1005–1013.

- FREYER, L., SCHRÖTER, C., SAIZ, N., SCHRODE, N., NOWOTSCHIN, S., MARTINEZ-ARIAS, A. & HADJANTONAKIS, A.-K. (2015) A loss-of-function and H2B-Venus transcriptional reporter allele for Gata6 in mice. *BMC Developmental Biology* **15**.
- FRUM, T., HALBISEN, M.A., WANG, C., AMIRI, H., ROBSON, P. & RALSTON, A. (2013) Oct4 Cell-Autonomously Promotes Primitive Endoderm Development in the Mouse Blastocyst. *Developmental Cell* **25**, 610–622.
- FUJIKURA, J., YAMATO, E., YONEMURA, S., HOSODA, K., MASUI, S., NAKAO, K., MIYAZAKI, J. & NIWA, H. (2002) Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes & development* **16**, 784–789.
- FUJIMORI, T. (2003) Analysis of cell lineage in two- and four-cell mouse embryos. *Development* **130**, 5113–5122.
- GAO, Z., COX, J.L., GILMORE, J.M., ORMSBEE, B.D., MALLANNA, S.K., WASHBURN, M.P. & RIZZINO, A. (2012) Determination of Protein Interactome of Transcription Factor Sox2 in Embryonic Stem Cells Engineered for Inducible Expression of Four Reprogramming Factors. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 11384–11397.
- GERBE, F., COX, B., ROSSANT, J. & CHAZAUD, C. (2008) Dynamic expression of Lrp2 pathway members reveals progressive epithelial differentiation of primitive endoderm in mouse blastocyst. *Developmental Biology* **313**, 594–602.
- GHIMIRE, S., HEINDRYCKX, B., VAN DER JEUGHT, M., NEUPANE, J., O'LEARY, T., LIERMAN, S., DE VOS, W.H., CHUVA DE SOUSA LOPES, S., DEROO, T. & DE SUTTER, P. (2015) Inhibition of Transforming Growth Factor β Signaling Promotes Epiblast Formation in Mouse Embryos. *Stem Cells and Development* **24**, 497–506.
- GOLDIN, S.N. & PAPAIOANNOU, V.E. (2003) Paracrine action of FGF4 during periimplantation development maintains trophectoderm and primitive endoderm. *genesis* **36**, 40–47.
- GOOLAM, M., SCIALDONE, A., GRAHAM, S.J.L., MACAULAY, I.C., JEDRUSIK, A., HUPALOWSKA, A., VOET, T., MARIONI, J.C. & ZERNICKA-GOETZ, M. (2016) Heterogeneity in Oct4 and Sox2 Targets Biases Cell Fate in 4-Cell Mouse Embryos. *Cell* **165**, 61–74.
- GRABAREK, J.B., ZYZYNSKA, K., SAIZ, N., PILISZEK, A., FRANKENBERG, S., NICHOLS, J., HADJANTONAKIS, A.-K. & PLUSA, B. (2012) Differential plasticity of epiblast and primitive endoderm precursors within the ICM of the early mouse embryo. *Development* **139**, 129–139.
- GRAHAM, S.J.L., WICHER, K.B., JEDRUSIK, A., GUO, G., HERATH, W., ROBSON, P. & ZERNICKA-GOETZ, M. (2014) BMP signalling regulates the pre-implantation development of extra-embryonic cell lineages in the mouse embryo. *Nature Communications* **5**, 5667.
- GRANIER, C., GURCHENKOV, V., PEREA-GOMEZ, A., CAMUS, A., OTT, S., PAPANAYOTOU, C., IRANZO, J., MOREAU, A., REID, J., KOENTGES, G., SABÉLAN-DJONEIDI, D. & COLLIGNON, J. (2011) Nodal cis-regulatory elements reveal epiblast and primitive endoderm heterogeneity in the peri-implantation mouse embryo. *Developmental Biology* **349**, 350–362.
- GUO, G., HUSS, M., TONG, G.Q., WANG, C., LI SUN, L., CLARKE, N.D. & ROBSON, P. (2010) Resolution of Cell Fate Decisions Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst. *Developmental Cell* **18**, 675–685.

- HAFFNER-KRAUSZ, R., GORIVODSKY, M., CHEN, Y. & LONAI, P. (1999) Expression of Fgfr2 in the early mouse embryo indicates its involvement in preimplantation development. *Mechanisms of Development* **85**, 167–172.
- HAUB, O. & GOLDFARB, M. (1991) Expression of the fibroblast growth factor-5 gene in the mouse embryo. *Development* **112**, 397–406.
- HILLMAN, N., SHERMAN, M.I. & GRAHAM, C. (1972) The effect of spatial arrangement on cell determination during mouse development. *Development* **28**, 263–278.
- HIRATE, Y., COCKBURN, K., ROSSANT, J. & SASAKI, H. (2012) Tead4 is constitutively nuclear, while nuclear vs. cytoplasmic Yap distribution is regulated in preimplantation mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E3389–E3390.
- HIRATE, Y., HIRAHARA, S., INOUE, K., SUZUKI, A., ALARCON, V.B., AKIMOTO, K., HIRAI, T., HARA, T., ADACHI, M., CHIDA, K., OHNO, S., MARIKAWA, Y., NAKAO, K., SHIMONO, A. & SASAKI, H. (2013) Polarity-Dependent Distribution of Angiomotin Localizes Hippo Signaling in Preimplantation Embryos. *Current Biology* **23**, 1181–1194.
- HOME, P., RAY, S., DUTTA, D., BRONSHTEYN, I., LARSON, M. & PAUL, S. (2009) GATA3 Is Selectively Expressed in the Trophectoderm of Peri-implantation Embryo and Directly Regulates Cdx2 Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 28729–28737.
- JEDRUSIK, A., BRUCE, A.W., TAN, M.H., LEONG, D.E., SKAMAGKI, M., YAO, M. & ZERNICKA-GOETZ, M. (2010) Maternally and zygotically provided Cdx2 have novel and critical roles for early development of the mouse embryo. *Developmental Biology* **344**, 66–78.
- JEDRUSIK, A., COX, A., WICHER, K.B., GLOVER, D.M. & ZERNICKA-GOETZ, M. (2015) Maternal-zygotic knockout reveals a critical role of Cdx2 in the morula to blastocyst transition. *Developmental Biology* **398**, 147–152.
- JEON, H., WAKU, T., AZAMI, T., KHOA, L.T.P., YANAGISAWA, J., TAKAHASHI, S. & EMA, M. (2016) Comprehensive Identification of Krüppel-Like Factor Family Members Contributing to the Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells and Cellular Reprogramming. *PLOS ONE* **11**, e0150715.
- JERABEK, S., MERINO, F., SCHÖLER, H.R. & COJOCARU, V. (2014) OCT4: Dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1839**, 138–154.
- JIANG, J., CHAN, Y.-S., LOH, Y.-H., CAI, J., TONG, G.-Q., LIM, C.-A., ROBSON, P., ZHONG, S. & NG, H.-H. (2008) A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* **10**, 353–360.
- JOHNSON, M.H. & MCCONNELL, J.M.L. (2004) Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **15**, 583–597.
- JOHNSON, M.H. & ZIOMEK, C.A. (1981) The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* **24**, 71–80.
- KANEKO, K.J. & DEPAMPHILIS, M.L. (2013) TEAD4 establishes the energy homeostasis essential for blastocoel formation. *Development* **140**, 3680–3690.

- KANG, M., PILISZEK, A., ARTUS, J. & HADJANTONAKIS, A.-K. (2013) FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Development* **140**, 267–279.
- KELLY, S.J. (1977) Studies of the developmental potential of 4-and 8-cell stage mouse blastomeres. *Journal of Experimental Zoology* **200**, 365–376.
- KERAMARI, M., RAZAVI, J., INGMAN, K.A., PATSCH, C., EDENHOFER, F., WARD, C.M. & KIMBER, S.J. (2010) Sox2 Is Essential for Formation of Trophectoderm in the Preimplantation Embryo. *PLoS ONE* **5**, e13952.
- KO, L.J. & ENGEL, J.D. (1993) DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Molecular and cellular biology* **13**, 4011–4022.
- KOMATSU, K. & FUJIMORI, T. (2015) Multiple phases in regulation of Nanog expression during pre-implantation development. *Development, Growth & Differentiation* **57**, 648–656.
- KOPP, J.L., ORMSBEE, B.D., DESLER, M. & RIZZINO, A. (2008) Small Increases in the Level of Sox2 Trigger the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **26**, 903–911.
- KOUTSOURAKIS, M., LANGEVELD, A., PATIENT, R., BEDDINGTON, R. & GROSVELD, F. (1999) The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development* **126**, 723–732.
- KRAWCHUK, D., HONMA-YAMANAKA, N., ANANI, S. & YAMANAKA, Y. (2013) FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst. *Developmental Biology* **384**, 65–71.
- KRUPA, M., MAZUR, E., SZCZEPAŃSKA, K., FILIMONOW, K., MALESZEWSKI, M. & SUWIŃSKA, A. (2014) Allocation of inner cells to epiblast vs primitive endoderm in the mouse embryo is biased but not determined by the round of asymmetric divisions (8→16- and 16→32-cells). *Developmental Biology* **385**, 136–148.
- KUNATH, T. (2005) Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development* **132**, 1649–1661.
- KUNATH, T., SABA-EL-LEIL, M.K., ALMOUSAILLEAKH, M., WRAY, J., MELOCHE, S. & SMITH, A. (2007) FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* **134**, 2895–2902.
- KUO, C.T., VESELITS, M.L., BARTON, K.P., LU, M.M., CLENDENIN, C. & LEIDEN, J.M. (1997) The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis. *Genes & development* **11**, 2996–3006.
- KURIMOTO, K. (2006a) An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Research* **34**, e42–e42.
- KURIMOTO, K. (2006b) An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Research* **34**, e42–e42.
- LANNER, F. & ROSSANT, J. (2010) The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* **137**, 3351–3360.

- LAVIAL, F., BESSONNARD, S., OHNISHI, Y., TSUMURA, A., CHANDRASHEKRAN, A., FENWICK, M.A., TOMAZ, R.A., HOSOKAWA, H., NAKAYAMA, T., CHAMBERS, I., HIIRAGI, T., CHAZAUD, C. & AZUARA, V. (2012) Bmi1 facilitates primitive endoderm formation by stabilizing Gata6 during early mouse development. *Genes & Development* **26**, 1445–1458.
- LE BIN, G.C., MUNOZ-DESCALZO, S., KUROWSKI, A., LEITCH, H., LOU, X., MANSFIELD, W., ETIENNE-DUMEAU, C., GRABOLE, N., MULAS, C., NIWA, H., HADJANTONAKIS, A.-K. & NICHOLS, J. (2014) Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst. *Development* **141**, 1001–1010.
- LEUNG, C.Y. & ZERNICKA-GOETZ, M. (2013) Angiomotin prevents pluripotent lineage differentiation in mouse embryos via Hippo pathway-dependent and -independent mechanisms. *Nature Communications* **4**.
- LIAN, I., KIM, J., OKAZAWA, H., ZHAO, J., ZHAO, B., YU, J., CHINNAIYAN, A., ISRAEL, M.A., GOLDSTEIN, L.S.B., ABUJAROUR, R., DING, S. & GUAN, K.-L. (2010) The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & Development* **24**, 1106–1118.
- LI, J., PAN, G., CUI, K., LIU, Y., XU, S. & PEI, D. (2007) A Dominant-negative Form of Mouse SOX2 Induces Trophectoderm Differentiation and Progressive Polyploidy in Mouse Embryonic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 19481–19492.
- LIN, S.-C.J., WANI, M.A., WHITSETT, J.A. & WELLS, J.M. (2010) Klf5 regulates lineage formation in the pre-implantation mouse embryo. *Development* **137**, 3953–3963.
- LOH, Y.-H., WU, Q., CHEW, J.-L., VEGA, V.B., ZHANG, W., CHEN, X., ET AL. (2006) The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics* **38**, 431–440.
- LORTHONGPANICH, C., MESSERSCHMIDT, D.M., CHAN, S.W., HONG, W., KNOWLES, B.B. & SOLTER, D. (2013) Temporal reduction of LATS kinases in the early preimplantation embryo prevents ICM lineage differentiation. *Genes & development* **27**, 1441–1446.
- MACPHEE, D.J., JONES, D.H., BARR, K.J., BETTS, D.H., WATSON, A.J. & KIDDER, G.M. (2000) Differential Involvement of Na⁺,K⁺-ATPase Isozymes in Preimplantation Development of the Mouse. *Developmental Biology* **222**, 486–498.
- MADAN, P., ROSE, K. & WATSON, A.J. (2007) Na/K-ATPase beta1 Subunit Expression Is Required for Blastocyst Formation and Normal Assembly of Trophectoderm Tight Junction-associated Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 12127–12134.
- MAÎTRE, J.-L., NIWAYAMA, R., TURLIER, H., NÉDÉLEC, F. & HIIRAGI, T. (2015) Pulsatile cell-autonomous contractility drives compaction in the mouse embryo. *Nature Cell Biology* **17**, 849–855.
- MAÎTRE, J.-L., TURLIER, H., ILLUKKUMBURA, R., EISMANN, B., NIWAYAMA, R., NÉDÉLEC, F. & HIIRAGI, T. (2016) Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification. *Nature* **536**, 344–348.
- MARTIN, G.R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**, 7634–7638.

- MASUI, S., NAKATAKE, Y., TOYOOKA, Y., SHIMOSATO, D., YAGI, R., TAKAHASHI, K., OKOCHI, H., OKUDA, A., MATOBA, R., SHAROV, A.A., KO, M.S.H. & NIWA, H. (2007) Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* **9**, 625–635.
- MA, Z., SWIGUT, T., VALOUEV, A., RADA-IGLESIAS, A. & WYSOCKA, J. (2011) Sequence-specific regulator Prdm14 safeguards mouse ESCs from entering extraembryonic endoderm fates. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**, 120–127.
- MCCONNELL, J., PETRIE, L., STENNARD, F., RYAN, K. & NICHOLS, J. (2005) Eomesodermin is expressed in mouse oocytes and pre-implantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* **71**, 399–404.
- MEILHAC, S.M., ADAMS, R.J., MORRIS, S.A., DANCKAERT, A., LE GARREC, J.-F. & ZERNICKA-GOETZ, M. (2009) Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. *Developmental Biology* **331**, 210–221.
- MERIKA, M. & ORKIN, S.H. (1993) DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Molecular and cellular biology* **13**, 3999–4010.
- MESSERSCHMIDT, D.M. & KEMLER, R. (2010) Nanog is required for primitive endoderm formation through a non-cell autonomous mechanism. *Developmental Biology* **344**, 129–137.
- MIHAJLOVIĆ, A.I., THAMODARAN, V. & BRUCE, A.W. (2015) The first two cell-fate decisions of preimplantation mouse embryo development are not functionally independent. *Scientific Reports* **5**, 15034.
- MITSUI, K., TOKUZAWA, Y., ITOH, H., SEGAWA, K., MURAKAMI, M., TAKAHASHI, K., MARUYAMA, M., MAEDA, M. & YAMANAKA, S. (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *cell* **113**, 631–642.
- MIYANARI, Y. & TORRES-PADILLA, M.-E. (2012) Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of Nanog. *Nature* **483**, 470–473.
- MOLKENTIN, J.D. (2000) The Zinc Finger-containing Transcription Factors GATA-4, -5, and -6: UBIQUITOUSLY EXPRESSED REGULATORS OF TISSUE-SPECIFIC GENE EXPRESSION. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 38949–38952.
- MOLKENTIN, J.D., LIN, Q., DUNCAN, S.A. & OLSON, E.N. (1997) Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes & development* **11**, 1061–1072.
- MOORE, R., CAI, K.Q., ESCUDERO, D.O. & XU, X.-X. (2009) Cell adhesive affinity does not dictate primitive endoderm segregation and positioning during murine embryoid body formation. *genesis* **47**, 579–589.
- MORGANI, S.M. & BRICKMAN, J.M. (2015) LIF supports primitive endoderm expansion during pre-implantation development. *Development* **142**, 3488–3499.
- MORRIS, S.A., GRAHAM, S.J.L., JEDRUSIK, A. & ZERNICKA-GOETZ, M. (2013) The differential response to Fgf signalling in cells internalized at different times influences lineage segregation in preimplantation mouse embryos. *Open Biology* **3**, 130104–130104.

- MORRIS, S.A., GUO, Y. & ZERNICKA-GOETZ, M. (2012) Developmental Plasticity Is Bound by Pluripotency and the Fgf and Wnt Signaling Pathways. *Cell Reports* **2**, 756–765.
- MORRIS, S.A., TEO, R.T.Y., LI, H., ROBSON, P., GLOVER, D.M. & ZERNICKA-GOETZ, M. (2010) Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 6364–6369.
- MOTOSUGI, N., BAUER, T., POLANSKI, Z., SOLTER, D. & HIRAGI, T. (2005) Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes & development* **19**, 1081–1092.
- NAKAGAWA, M., KOYANAGI, M., TANABE, K., TAKAHASHI, K., ICHISAKA, T., AOI, T., OKITA, K., MOCHIDUKI, Y., TAKIZAWA, N. & YAMANAKA, S. (2007) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology* **26**, 101–106.
- NAVARRO, P., FESTUCCIA, N., COLBY, D., GAGLIARDI, A., MULLIN, N.P., ZHANG, W., KARWACKI-NEISIUS, V., OSORNO, R., KELLY, D., ROBERTSON, M. & OTHERS (2012) OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells. *The EMBO journal* **31**, 4547–4562.
- NIAKAN, K.K., JI, H., MAEHR, R., VOKES, S.A., RODOLFA, K.T., SHERWOOD, R.I., YAMAKI, M., DIMOS, J.T., CHEN, A.E., MELTON, D.A., MCMAHON, A.P. & EGGAN, K. (2010) Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. *Genes & Development* **24**, 312–326.
- NICHOLS, J., SILVA, J., ROODE, M. & SMITH, A. (2009a) Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development* **136**, 3215–3222.
- NICHOLS, J., SILVA, J., ROODE, M. & SMITH, A. (2009b) Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development* **136**, 3215–3222.
- NICHOLS, J. & SMITH, A. (2009) Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell* **4**, 487–492.
- 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.
- NISHIOKA, N., INOUE, K., ADACHI, K., KIYONARI, H., OTA, M., RALSTON, A., YABUTA, N., HIRAHARA, S., STEPHENSON, R.O., Ogonuki, N., MAKITA, R., KURIHARA, H., MORINKENSICKI, E.M., NOJIMA, H., ROSSANT, J., NAKAO, K., NIWA, H. & SASAKI, H. (2009) The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass. *Developmental Cell* **16**, 398–410.
- NISHIOKA, N., YAMAMOTO, S., KIYONARI, H., SATO, H., SAWADA, A., OTA, M., NAKAO, K. & SASAKI, H. (2008) Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mechanisms of Development* **125**, 270–283.

- NIWA, H., MIYAZAKI, J. & SMITH, A.G. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics* **24**, 372–376.
- NIWA, H., TOYOOKA, Y., SHIMOSATO, D., STRUMPF, D., TAKAHASHI, K., YAGI, R. & ROSSANT, J. (2005) Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophectoderm Differentiation. *Cell* **123**, 917–929.
- OHNISHI, Y., HUBER, W., TSUMURA, A., KANG, M., XENOPOULOS, P., KURIMOTO, K., OLEŚ, A.K., ARAÚZO-BRAVO, M.J., SAITOU, M., HADJANTONAKIS, A.-K. & HIIRAGI, T. (2013) Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages. *Nature Cell Biology* **16**, 27–37.
- OKUMURA-NAKANISHI, S., SAITO, M., NIWA, H. & ISHIKAWA, F. (2005) Oct-3/4 and Sox2 Regulate Oct-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 5307–5317.
- ORNITZ, D.M. (2000) FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* **22**, 108–112.
- PALMIERI, S.L., PETER, W., HESS, H. & SCHÖLER, H.R. (1994) Oct-4 Transcription Factor Is Differentially Expressed in the Mouse Embryo during Establishment of the First Two Extraembryonic Cell Lineages Involved in Implantation. *Developmental Biology* **166**, 259–267.
- PARISI, S., PASSARO, F., ALOIA, L., MANABE, I., NAGAI, R., PASTORE, L. & RUSSO, T. (2008) Klf5 is involved in self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Science* **121**, 2629–2634.
- PESCE, M. & SCHÖLER, H.R. (2001) Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem cells* **19**, 271–278.
- PIOTROWSKA-NITSCHKE, K. & ZERNICKA-GOETZ, M. (2005) Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo. *Mechanisms of Development* **122**, 487–500.
- PIRAS, V., TOMITA, M. & SELVARAJOO, K. (2014) Transcriptome-wide Variability in Single Embryonic Development Cells. *Scientific Reports* **4**, 7137.
- PLACHTA, N., BOLLENBACH, T., PEASE, S., FRASER, S.E. & PANTAZIS, P. (2011) Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo. *Nature Cell Biology* **13**, 117–123.
- PLUSA, B. (2005) Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *Journal of Cell Science* **118**, 505–515.
- PLUSA, B., PILISZEK, A., FRANKENBERG, S., ARTUS, J. & HADJANTONAKIS, A.-K. (2008) Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* **135**, 3081–3091.
- RALSTON, A., COX, B.J., NISHIOKA, N., SASAKI, H., CHEA, E., RUGG-GUNN, P., GUO, G., ROBSON, P., DRAPER, J.S. & ROSSANT, J. (2010) Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development* **137**, 395–403.

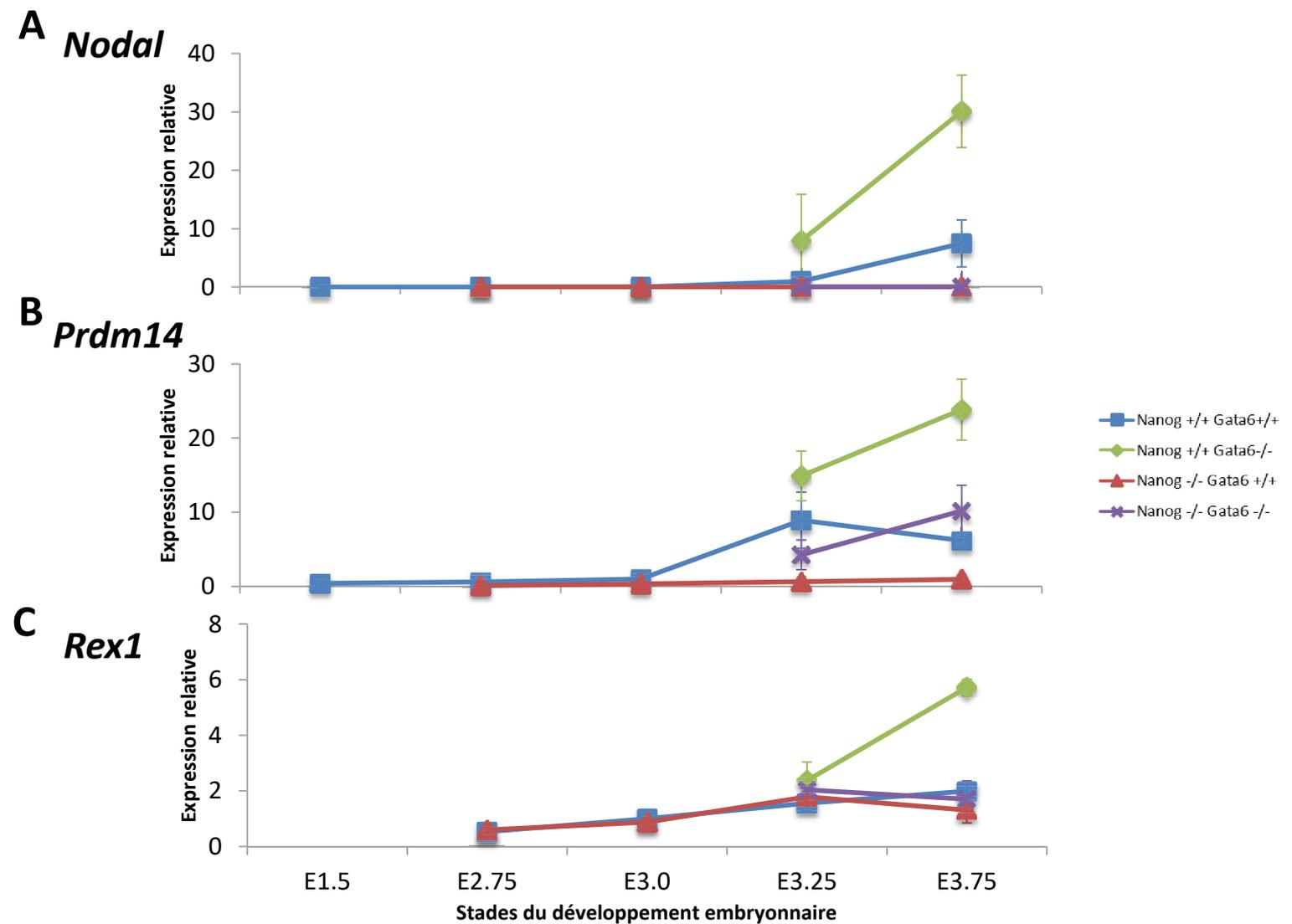
- RALSTON, A. & ROSSANT, J. (2008) Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophoctoderm fate in the early mouse embryo. *Developmental Biology* **313**, 614–629.
- RAPPOLEE, D.A., PATEL, Y. & JACOBSON, K. (1998) Expression of fibroblast growth factor receptors in peri-implantation mouse embryos. *chemistry* **254**.
- RAYON, T., MENCHERO, S., NIETO, A., XENOPOULOS, P., CRESPO, M., COCKBURN, K., CAÑON, S., SASAKI, H., HADJANTONAKIS, A.-K., DE LA POMPA, J.L., ROSSANT, J. & MANZANARES, M. (2014) Notch and Hippo Converge on Cdx2 to Specify the Trophoctoderm Lineage in the Mouse Blastocyst. *Developmental Cell* **30**, 410–422.
- RIZZINO, A. & WUEBBEN, E.L. (2016) Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1859**, 780–791.
- ROBSON, P., STEIN, P., ZHOU, B., SCHULTZ, R.M. & BALDWIN, H.S. (2001) Inner Cell Mass-Specific Expression of a Cell Adhesion Molecule (PECAM-1/CD31) in the Mouse Blastocyst. *Developmental Biology* **234**, 317–329.
- RODDA, D.J. (2005) Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 24731–24737.
- ROSSANT, J. & LIS, W.T. (1979) Potential of isolated mouse inner cell masses to form trophoctoderm derivatives in vivo. *Developmental Biology* **70**, 255–261.
- RUGG-GUNN, P.J., COX, B.J., LANNER, F., SHARMA, P., IGNATCHENKO, V., McDONALD, A.C.H., GARNER, J., GRAMOLINI, A.O., ROSSANT, J. & KISLINGER, T. (2012) Cell-Surface Proteomics Identifies Lineage-Specific Markers of Embryo-Derived Stem Cells. *Developmental Cell* **22**, 887–901.
- RUSS, A.P., WATTLER, S., COLLEDGE, W.H., APARICIO, S.A., CARLTON, M.B., PEARCE, J.J., BARTON, S.C., SURANI, M.A., RYAN, K., NEHLS, M.C. & OTHERS (2000) Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* **404**, 95–99.
- 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. *Development* **140**, 4311–4322.
- SAKAKI-YUMOTO, M. (2006) The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development* **133**, 3005–3013.
- SCHRODE, N., SAIZ, N., DI TALIA, S. & HADJANTONAKIS, A.-K. (2014) GATA6 Levels Modulate Primitive Endoderm Cell Fate Choice and Timing in the Mouse Blastocyst. *Developmental Cell* **29**, 454–467.
- SCHRÖTER, C., RUE, P., MACKENZIE, J.P. & MARTINEZ ARIAS, A. (2015) FGF/MAPK signaling sets the switching threshold of a bistable circuit controlling cell fate decisions in embryonic stem cells. *Development* **142**, 4205–4216.
- SEGRE, J.A., BAUER, C. & FUCHS, E. (1999) Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nature genetics* **22**, 356–360.

- SHIMOSATO, D., SHIKI, M. & NIWA, H. (2007) Extra-embryonic endoderm cells derived from ES cells induced by GATA Factors acquire the character of XEN cells. *BMC Developmental Biology* **7**, 80.
- SILVA, J., NICHOLS, J., THEUNISSEN, T.W., GUO, G., VAN OOSTEN, A.L., BARRANDON, O., WRAY, J., YAMANAKA, S., CHAMBERS, I. & SMITH, A. (2009) Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell* **138**, 722–737.
- SINGH, A.M., HAMAZAKI, T., HANKOWSKI, K.E. & TERADA, N. (2007) A Heterogeneous Expression Pattern for Nanog in Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **25**, 2534–2542.
- SMITH, A.G., HEATH, J.K., DONALDSON, D.D., WONG, G.G., MOREAU, J., STAHL, M. & ROGERS, D. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688–690.
- SMITH, R. & MCLAREN, A. (1977) Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele. *Development* **41**, 79–92.
- SODHI, C.P., LI, J. & DUNCAN, S.A. (2006) Generation of mice harbouring a conditional loss-of-function allele of Gata6. *BMC developmental biology* **6**, 19.
- STEFANOVIC, S., ABOUD, N., DÉSILETS, S., NURY, D., COWAN, C. & PUCÉAT, M. (2009) Interplay of Oct4 with Sox2 and Sox17: a molecular switch from stem cell pluripotency to specifying a cardiac fate. *The Journal of Cell Biology* **186**, 665–673.
- STEPHENSON, R.O., YAMANAKA, Y. & ROSSANT, J. (2010) Disorganized epithelial polarity and excess trophoblast cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin. *Development* **137**, 3383–3391.
- STRUMPF, D. (2005) Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst. *Development* **132**, 2093–2102.
- TABANSKY, I., LENARCIC, A., DRAFT, R.W., LOULIER, K., KESKIN, D.B., ROSAINS, J., RIVERA-FELICIANO, J., LICHTMAN, J.W., LIVET, J., STERN, J.N.H., SANES, J.R. & EGGAN, K. (2013) Developmental Bias in Cleavage-Stage Mouse Blastomeres. *Current Biology* **23**, 21–31.
- TANAKA, S., KUNATH, T., HADJANTONAKIS, A.K., NAGY, A. & ROSSANT, J. (1998) Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science (New York, N.Y.)* **282**, 2072–2075.
- TANG, F., BARBACIORU, C., NORDMAN, E., LI, B., XU, N., BASHKIROV, V.I., LAO, K. & SURANI, M.A. (2010) RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nature Protocols* **5**, 516–535.
- TARKOWSKI, A.K., SUWIŃSKA, A., CZOŁOWSKA, R. & OŹDŹEŃSKI, W. (2010) Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice. *Developmental Biology* **348**, 190–198.
- TOLKUNOVA, E., CAVALERI, F., ECKARDT, S., REINBOLD, R., CHRISTENSON, L.K., SCHÖLER, H.R. & TOMILIN, A. (2006) The Caudal-Related Protein Cdx2 Promotes Trophoblast Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **24**, 139–144.

- TORRES-PADILLA, M.-E., PARFITT, D.-E., KOUZARIDES, T. & ZERNICKA-GOETZ, M. (2007) Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* **445**, 214–218.
- VELKEY, J.M. & O'SHEA, K.S. (2003) Oct4 RNA interference induces trophoblast differentiation in mouse embryonic stem cells. *genesis* **37**, 18–24.
- VIOLETTE, M.I., MADAN, P. & WATSON, A.J. (2006) Na⁺/K⁺-ATPase regulates tight junction formation and function during mouse preimplantation development. *Developmental Biology* **289**, 406–419.
- WAMAITHA, S.E., DEL VALLE, I., CHO, L.T., WEI, Y., FOGARTY, N.M., BLAKELEY, P., SHERWOOD, R.I., JI, H. & NIAKAN, K.K. (2015) Gata6 potentially initiates reprogramming of pluripotent and differentiated cells to extraembryonic endoderm stem cells. *Genes & development* **29**, 1239–1255.
- WATANABE, T., BIGGINS, J.S., TANNAN, N.B. & SRINIVAS, S. (2014) Limited predictive value of blastomere angle of division in trophoblast and inner cell mass specification. *Development* **141**, 2279–2288.
- WICKLOW, E., BLIJ, S., FRUM, T., HIRATE, Y., LANG, R.A., SASAKI, H. & RALSTON, A. (2014) HIPPO Pathway Members Restrict SOX2 to the Inner Cell Mass Where It Promotes ICM Fates in the Mouse Blastocyst. *PLoS Genetics* **10**, e1004618.
- WILDER, P.J., KELLY, D., BRIGMAN, K., PETERSON, C.L., NOWLING, T., GAO, Q.S., MCCOMB, R.D., CAPECCHI, M.R. & RIZZINO, A. (1997) Inactivation of the FGF-4 gene in embryonic stem cells alters the growth and/or the survival of their early differentiated progeny. *Developmental Biology* **192**, 614–629.
- WILLIAMS, R.L., HILTON, D.J., PEASE, S., WILLSON, T.A., STEWART, C.L., GEARING, D.P., WAGNER, E.F., METCALF, D., NICOLA, N.A. & GOUGH, N.M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684–687.
- WINGER, Q. (2006) Analysis of Transcription Factor AP-2 Expression and Function During Mouse Preimplantation Development. *Biology of Reproduction* **75**, 324–333.
- WU, G., GENTILE, L., FUCHIKAMI, T., SUTTER, J., PSATHAKI, K., ESTEVES, T.C., ARAUZO-BRAVO, M.J., ORTMEIER, C., VERBERK, G., ABE, K. & SCHOLER, H.R. (2010) Initiation of trophoblast lineage specification in mouse embryos is independent of Cdx2. *Development* **137**, 4159–4169.
- XENOPOULOS, P., KANG, M., PULIAFITO, A., DI TALIA, S. & HADJANTONAKIS, A.-K. (2015) Heterogeneities in Nanog Expression Drive Stable Commitment to Pluripotency in the Mouse Blastocyst. *Cell Reports* **10**, 1508–1520.
- YADAV, N., LEE, J., KIM, J., SHEN, J., HU, M.C.-T., ALDAZ, C.M. & BEDFORD, M.T. (2003) Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 6464–6468.
- YAGI, R., KOHN, M.J., KARAVANOVA, I., KANEKO, K.J., VULLHORST, D., DEPAMPHILIS, M.L. & BUONANNO, A. (2007) Transcription factor TEAD4 specifies the trophoblast lineage at the beginning of mammalian development. *Development* **134**, 3827–3836.

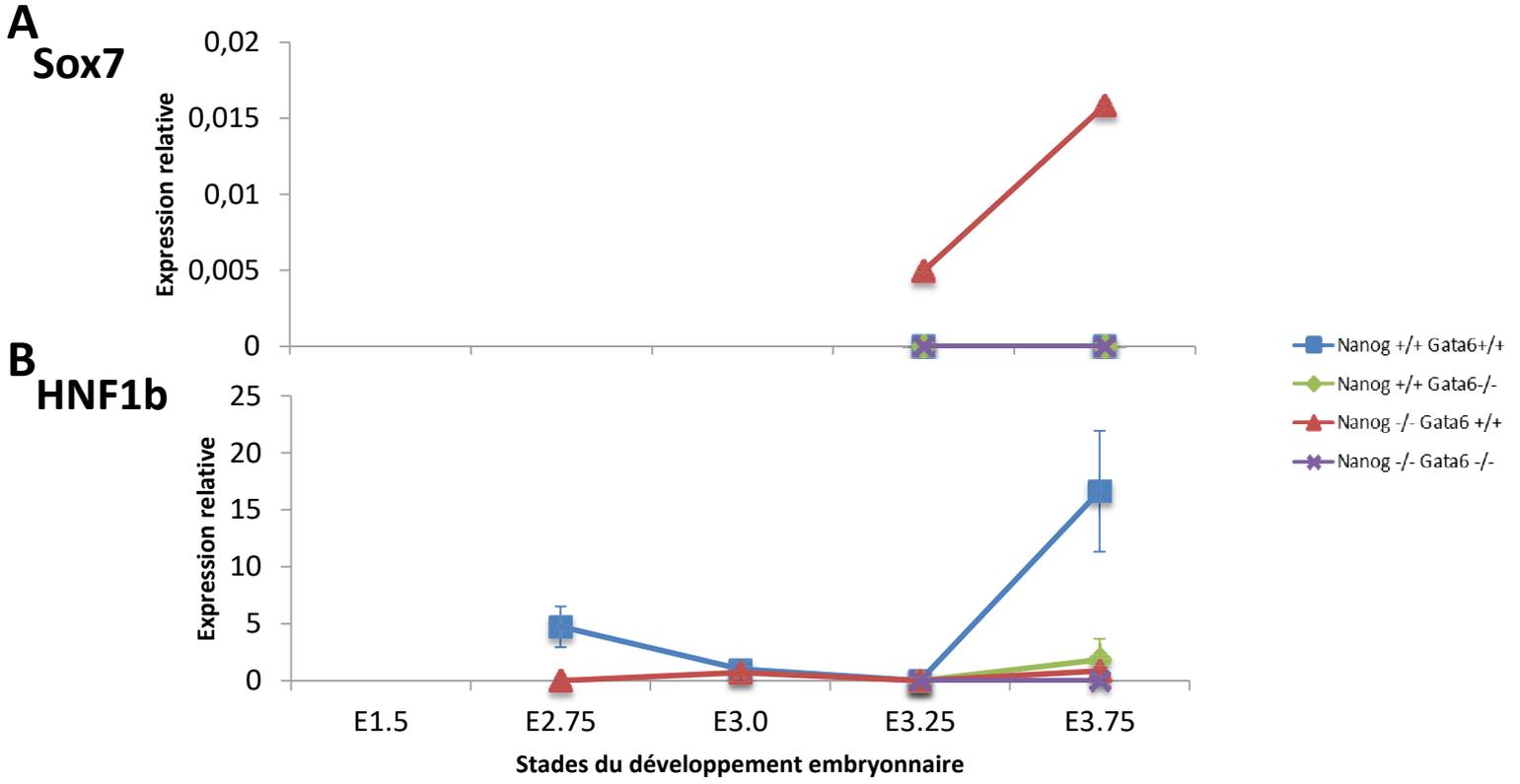
- YAMAJI, M., SEKI, Y., KURIMOTO, K., YABUTA, Y., YUASA, M., SHIGETA, M., YAMANAKA, K., OHINATA, Y. & SAITOU, M. (2008) Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nature Genetics* **40**, 1016–1022.
- YAMANAKA, Y., LANNER, F. & ROSSANT, J. (2010) FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development* **137**, 715–724.
- YANG, D.-H., CAI, K.Q., ROLAND, I.H., SMITH, E.R. & XU, X.-X. (2007) Disabled-2 Is an Epithelial Surface Positioning Gene. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 13114–13122.
- YING, Q.-L., NICHOLS, J., CHAMBERS, I. & SMITH, A. (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281–292.
- YUAN, H., CORBI, N., BASILICO, C. & DAILEY, L. (1995) Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes & development* **9**, 2635–2645.
- YU, F.-X. & GUAN, K.-L. (2013) The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & Development* **27**, 355–371.
- YURI, S., FUJIMURA, S., NIMURA, K., TAKEDA, N., TOYOOKA, Y., FUJIMURA, Y.-I., ABURATANI, H., URA, K., KOSEKI, H., NIWA, H. & NISHINAKAMURA, R. (2009) *Sall4* Is Essential for Stabilization, But Not for Pluripotency, of Embryonic Stem Cells by Repressing Aberrant Trophoctoderm Gene Expression. *Stem Cells* **27**, 796–805.
- ZHANG, J., TAM, W.-L., TONG, G.Q., WU, Q., CHAN, H.-Y., SOH, B.-S., LOU, Y., YANG, J., MA, Y., CHAI, L., NG, H.-H., LUFKIN, T., ROBSON, P. & LIM, B. (2006) *Sall4* modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of *Pou5f1*. *Nature Cell Biology* **8**, 1114–1123.
- ZHAO, T., LIU, C. & CHEN, L. (2015) Roles of Klf5 Acetylation in the Self-Renewal and the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *PloS one* **10**, e0138168.
- ZHONG, W., WANG, Q.T., SUN, T., WANG, F., LIU, J., LEACH, R., JOHNSON, A., PUSCHECK, E.E. & RAPPOLEE, D.A. (2006) FGF Ligand Family mRNA Expression Profile for Mouse Preimplantation Embryos, Early Gestation Human Placenta, and Mouse Trophoblast Stem Cells. *Molecular Reproduction and Development* **73**, 540–550.
- ZIOMEK, C.A. & JOHNSON, M.H. (1980) Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell* **21**, 935–942.

Annexes



Annexe 1 : Quantification de l'expression ARN de différents gènes de l'EPI au cours du développement embryonnaire.

Expression de *Nodal* (A), *Prdm14* (B), *Rex1* (C) au sein des cellules de la MCI en fonction du stade de développement et du génotype.



Annexe 2 : Quantification de l'expression ARN de différents gènes de l'EPr au cours du développement embryonnaire.

Expression de Sox7 (normalisation uniquement avec les gènes de ménages) (A), et Hnf1b(B) au sein des cellules de la MCI en fonction du stade de développement et du génotype.

A	MCI \pm SEM	Nanog+/+ ; Gata6+/+	Nanog+/+ ; Gata6-/-	Nanog-/- ; Gata6+/+	Nanog-/- ; Gata6-/-
E3.25		13,5 \pm 0,4	16,7 \pm 1,0	15,2 \pm 2,1	17,2 \pm 2,0
E3.75		31,0 \pm 1,9	22,2 \pm 3,4	26,6 \pm 2,7	22,5 \pm 3,5

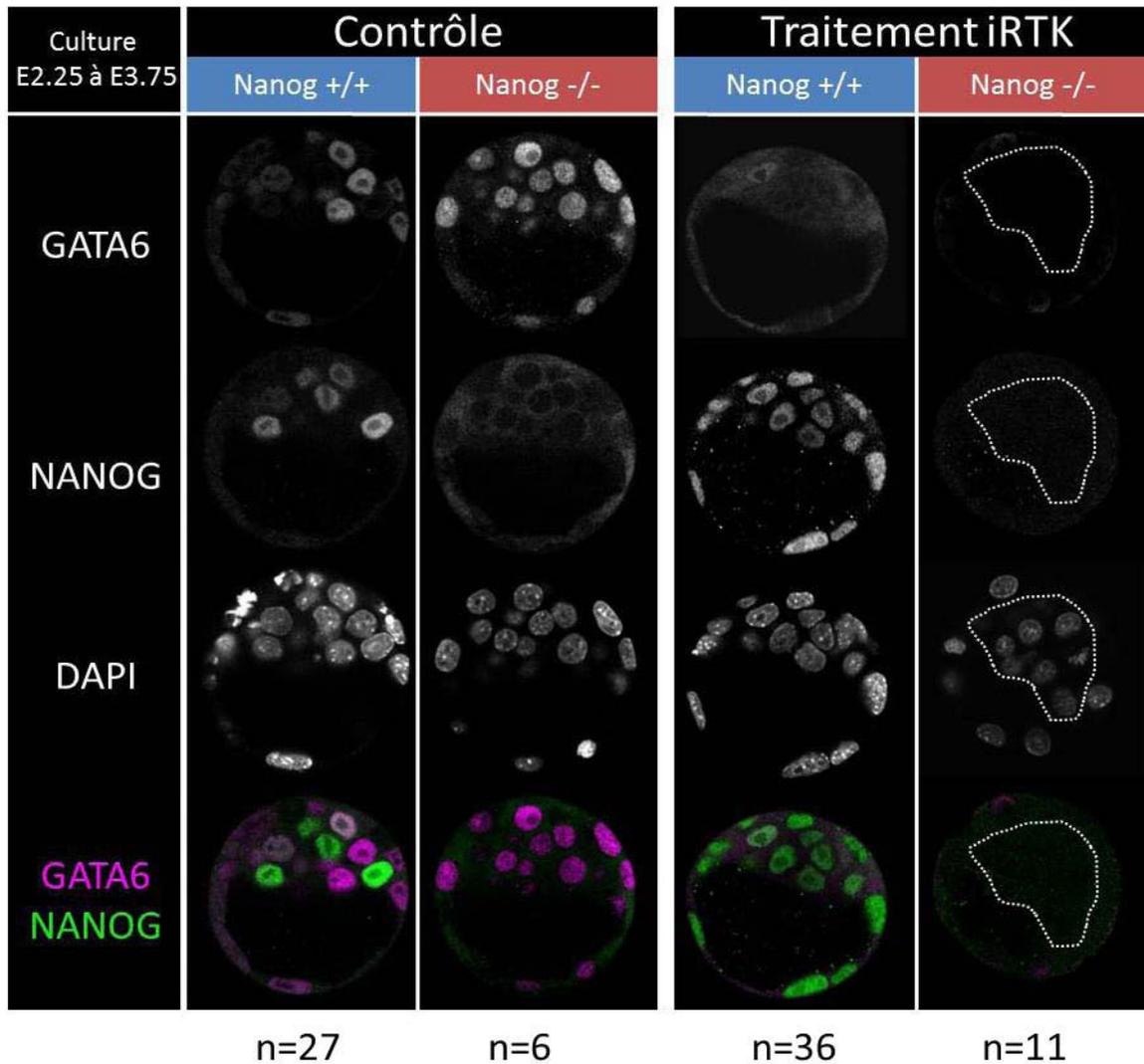
B	P-value du stade E3.25	Nanog+/+ ; Gata6+/+	Nanog+/+ ; Gata6-/-	Nanog-/- ; Gata6+/+	Nanog-/- ; Gata6-/-
	Nanog+/+ ; Gata6+/+		>0,99	0,69	>0,99
	Nanog+/+ ; Gata6-/-			>0,99	>0,99
	Nanog-/- ; Gata6+/+				>0,99
	Nanog-/- ; Gata6-/-				

C	P-value du stade E3.75	Nanog+/+ ; Gata6+/+	Nanog+/+ ; Gata6-/-	Nanog-/- ; Gata6+/+	Nanog-/- ; Gata6-/-
	Nanog+/+ ; Gata6+/+		>0,99	0,29	0,99
	Nanog+/+ ; Gata6-/-			>0,99	>0,99
	Nanog-/- ; Gata6+/+				>0,99
	Nanog-/- ; Gata6-/-				

Annexe 3 : Moyenne du nombre de noyaux dans les MCI des embryons en fonction de leur génotype et de leur stade.

A : Nombre de noyaux dans la MCI des embryons collectés au stade E3.25 et au stade E3.75.

B - C : P-value issues du test statistique de Dunn's de comparaison de la taille des MCI des différents génotypes pour les stades E3.25 (B) et E3.75 (C).



Annexe 4 : Expression protéique de NANOG et GATA6 après culture avec un traitement aux inhibiteurs de la voie FGF/MAPK en fonction du génotype des embryons.

Immunomarquage sur des embryons cultivés en milieu contrôle ou en milieu avec traitement inhibiteur de la voie FGF/MAPK (iRTK). GATA6 est absent des embryons simples mutants *Nanog*^{-/-} traités aux iRTK. La MCI de l'embryon est délimitée par des pointillés.

A

Génotypage	Contrôle		traitement iRTK	
	Nanog+/+	Nanog-/-	Nanog+/+	Nanog-/-
Culture de E2.25 à E3.25 MCI ± SEM	19,7 ± 4,77	16,9 ± 1,4	18,5 ± 1,2	18,6 ± 1,2
Culture de E2.25 à E3.75 MCI ± SEM	25,6 ± 0,8	25,9 ± 1,2	31 ± 0,6	28,7 ± 1,6

B

	P-value de la culture de E2.25 à E3.25	Contrôle		Traitement iRTK	
		Nanog+/+	Nanog-/-	Nanog+/+	Nanog-/-
Contrôle	Nanog+/+		>0,99	0,69	>0,99
	Nanog-/-			>0,99	>0,99
Traitement iRTK	Nanog+/+				>0,99
	Nanog-/-				

C

	P-value de la culture de E2.25 à E3.75	Contrôle		Traitement iRTK	
		Nanog+/+	Nanog-/-	Nanog+/+	Nanog-/-
Contrôle	Nanog+/+		0,83	0,22	0,19
	Nanog-/-			0,07	0,43
Traitement iRTK	Nanog+/+				0,34
	Nanog-/-				

D

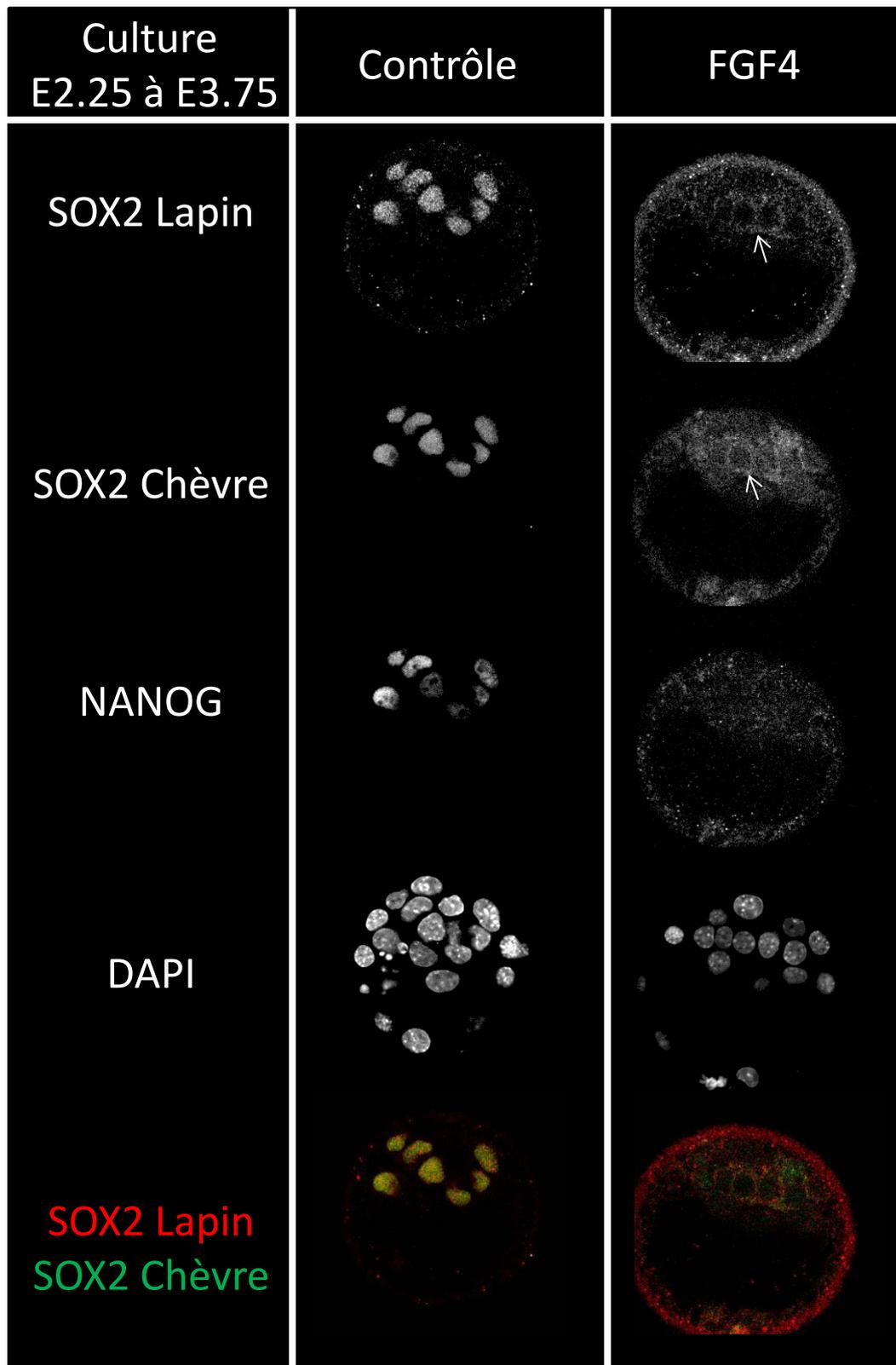
	Contrôle	Traitement FGF4
MCI ± SEM	25,6 ± 0,8	23,9 ± 1,0

Annexe 5 : Moyenne du nombre de noyaux dans les MCI des embryons en fonction de leur génotype, du traitement et de leur stade.

A : Nombre de noyaux dans la MCI des embryons contrôles ou traités aux iRTK du stade E2.25 au stade E3.25 ou du stade E2.25 au stade E3.75.

B - C : P-value issues du test statistique de Student de comparaison de la taille des MCI des différents génotypes traités aux inhibiteurs de RTK ou non pour les cultures du stade E2.25 au stade E3.25 (B) ou du stade E2.25 au stade E3.75 (C).

D : Nombre de noyaux dans la MCI des embryons contrôles ou traités avec du FGF4 exogène du stade E2.25 au stade E3.75. Le nombre de cellules au sein de la MCI ne varie pas entre les embryons cultivés en milieu contrôle et les embryons cultivés en FGF4 (p=0.81, test de Student).



Annexe 6 : Expression protéique de SOX2 avec deux anticorps différents après un traitement au FGF4 exogène jusqu'au stade E3.75.

Immunomarquage sur des embryons cultivés en milieu contrôle ou en milieu avec traitement FGF4. SOX2 possède un marquage cytoplasmique plus intense pour certaines cellules lors du traitement au FGF4 avec les deux anticorps testés.

Résumé

Lors de la formation du blastocyste, l'embryon de souris est constitué d'un épithélium externe, le trophoctoderme (TE), et d'une masse cellulaire interne (MCI). L'épiblaste (EPI) et l'endoderme primitif (EPr) se spécifient au sein de la MCI sous un patron de « sel et poivre » caractérisé par l'expression complémentaire de NANOG, marqueur de l'EPI et de GATA6, marqueur de l'EPr. *Nanog* est nécessaire pour l'acquisition d'une identité EPI et *Gata6* induit le devenir en EPr. La voie FGF/MAPK joue un rôle critique dans l'acquisition de l'identité EPr et la perturbation de son activité impacte directement sur le ratio EPr/EPI dans la MCI.

Je recherche des facteurs qui seraient exprimés de manière hétérogène avant la spécification des cellules internes et pourraient faire pencher la balance vers un destin ou l'autre. Pour cela, j'ai disséqué l'évolution des cellules de la MCI au sein des embryons *Nanog*^{-/-} et *Gata6*^{-/-}.

Ces embryons forment correctement le TE et la MCI qui ne se spécifie ni en EPI ni en EPr. En effet, les cellules internes des embryons *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} restent bloquées autour du stade E3.25. De manière étonnante, dans les cellules de la MCI, le facteur de transcription SOX2 est présent et ce, de manière hétérogène. De plus, grâce à des traitements inhibiteurs de la voie FGF/MAPK, je montre que cette voie n'est pas responsable de l'hétérogénéité d'expression de SOX2. Ainsi, l'expression hétérogène de SOX2 dans les cellules internes des embryons est donc indépendante de *Nanog*, de *Gata6* et de la voie FGF/MAPK.

Abstract

During mouse blastocyst formation, the embryo consists of an outer epithelium, the trophoctoderm (TE), and the inner cell mass (ICM). The epiblast (EPI) and the primitive endoderm (PrE) are specified within the MCI in a "salt and pepper" pattern characterized by the complementary expression of NANOG, marker of EPI and *gata6*, marker of PrE. *Nanog* is mandatory to acquire an EPI identity and *Gata6* induces the PrE identity. FGF /MAPK pathway plays a critical role in the acquisition of a PrE identity and disruption of its activity directly impacts the PrE/Epi ratio within the ICM.

I'm looking for factors that would be expressed heterogeneously before the specification of internal cells and might tilt the balance towards one fate or the other. For this, I dissected the evolution of ICM cells within *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} embryos.

These embryos form properly the TE and MCI that specifies neither EPI nor PrE. Indeed, the internal cells of *Nanog*^{-/-} ; *Gata6*^{-/-} embryos remain stuck around the stage of E3.25. Surprisingly, in the MCI cells, the transcription factor SOX2 is present and this, heterogeneously. Moreover, using inhibitors treatments of the FGF/MAPK pathway, I show that this pathway is not responsible for the heterogeneity of expression of SOX2.

Thus, the heterogeneous expression of SOX2 in the inner cells of the embryos is therefore independent of *Nanog*, *Gata6* and the FGF/MAPK pathway.