



HAL
open science

Déchiffrer le continuum de pluripotence dans l'embryon pré-implantatoire de lapin

Wilhelm Bouchereau

► **To cite this version:**

Wilhelm Bouchereau. Déchiffrer le continuum de pluripotence dans l'embryon pré-implantatoire de lapin. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1302 . tel-03736226

HAL Id: tel-03736226

<https://theses.hal.science/tel-03736226>

Submitted on 22 Jul 2022

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.



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1302

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
BMIC – Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie cellulaire
Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Soutenue publiquement le 17/12/2021, par :
Mr. Wilhelm Bouchereau

**Déchiffrer le continuum de pluripotence
dans l'embryon pré-implantatoire de lapin**

Sous la direction de :

Dr. BEAUJEAN Nathalie Directrice de recherche INRAE Lyon

Directrice de thèse

Devant le jury composé de :

Dr. COHEN-TANNOUJDI Michel Directeur de recherche CNRS Paris

Rapporteur

Dr. FRANCASTEL Claire Directrice de recherche INSERM Paris

Rapporteuse

Pr. LAMARTINE Jérôme Professeur Université Lyon 1

Examineur

Dr. ACLOQUE Hervé Directeur de recherche INRAE Toulouse

Examineur

Dr. BEAUJEAN Nathalie Directrice de recherche INRAE Lyon

Examinatrice

Dr. SAVATIER Pierre Directeur de recherche INSERM Lyon

Invité

Dr. AFANASSIEFF Marielle Chargé de recherche INRAE Lyon

Invité

INSERM U1208, Institut Cellules Souches et Cerveau (SBRI), 18 avenue du Doyen Jean Lépine, 69 500, BRO

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Titre

Déchiffrer le continuum de pluripotence dans l'embryon pré-implantatoire de lapin.

Résumé

Les cellules souches pluripotentes (PSC) sont caractérisées par leurs capacités à s'autorenouveler et à pouvoir se différencier dans tous les types cellulaires somatiques. De nombreuses lignées de PSC ont été dérivées chez les mammifères, dans différents milieux de culture et issues de différentes espèces. Elles s'autorenouvèlent cependant dans différents états de pluripotence, chacun ayant ces propres caractéristiques. Afin de mieux comprendre cette variabilité d'une lignée de PSC à l'autre, il est nécessaire de se pencher sur la source de la pluripotence : l'embryon péri-implantatoire. Les cellules pluripotentes embryonnaires progressent le long d'un continuum de pluripotence, dont les caractéristiques évoluent au cours du développement. Les nombreux processus impliqués dans la régulation de la pluripotence *in vivo* sont communs aux PSC *in vitro*.

Chez le lapin, différentes lignées de PSC sont accessibles à différents niveaux de pluripotence. De plus, les cellules embryonnaires pluripotentes de lapin sont facilement accessibles du fait de l'implantation tardive chez le lapin et du grand nombre d'embryons produits par lapine. Enfin, le lapin est proche phylogénétiquement des rongeurs et des primates et son développement embryonnaire présente peu de particularités par rapport aux autres mammifères étudiés. Cependant, les caractéristiques des différents processus régulant la pluripotence au cours du développement embryonnaire pré-implantatoire du lapin sont relativement peu connus par rapport à ceux de la souris et des primates.

C'est pourquoi j'ai réalisé différentes analyses transcriptomiques sur l'embryon pré-implantatoire de lapin, complétées par des analyses moléculaires sur le métabolisme et l'épigénome. Grâce à ces données, j'ai pu décrire la ségrégation des premiers lignages embryonnaires, ainsi que les processus régulant le continuum de pluripotence dans l'embryon de lapin. Ces résultats montrent que le continuum de pluripotence chez le lapin est très similaire à celui des autres espèces de mammifères euthériens, là où celui de la souris possède de nombreuses particularités. Ces informations offrent également de nouvelles pistes dans l'étude de la pluripotence *in vitro*. L'hétérochromatine et le cycle cellulaire semblent ainsi être des cibles prometteuses dans la manipulation de PSC de lapin. J'ai pu réaliser des expériences préliminaires à l'aide d'inhibiteurs ciblant les enzymes favorisant la formation de l'hétérochromatine sur des embryons en culture. J'ai également utilisé ces inhibiteurs sur une lignée de PSC *in vitro*. Dans les deux cas, ces inhibiteurs ont permis de manipuler l'état de pluripotence des cellules traitées.

Mots clés

Cellules souches pluripotentes ; développement embryonnaire ; épigénétique ; cycle cellulaire ; lapin

Titre

Deciphering the pluripotency continuum in the rabbit pre-implantation embryo.

Abstract

Pluripotent stem cells (PSC) are characterized by their abilities to self-renew and to differentiate into any somatic cell type. Many kinds of PSC have been derived from different mammalian species and using various culture conditions. However, they self-renew in different states of pluripotency, each with its own specificities. To better understand those differences, from one PSC line to another, it is necessary to look at the root of pluripotency: the peri-implantation embryo. Pluripotent embryonic cells go through a pluripotency continuum, the characteristics of which change during development. The various processes involved in the regulation of pluripotency *in vivo* are shared by PSC *in vitro*.

In the rabbit, different PSC lines are available and self-renew at different levels of pluripotency. Rabbit pluripotent embryonic cells are easily accessible since implantation occurs lately in rabbits. Moreover, a great number of embryos can be harvested from a single rabbit. Rabbits are also phylogenetically close to rodents and primates. Finally, rabbit early embryonic development does not have many unique features compared to other studied mammals. However, the characteristics of the different processes regulating pluripotency during the pre-implantation development are relatively poorly defined compared to those of mice and primates.

To fill this gap, I performed several transcriptomic analyses on rabbit pre-implantation embryos, completed by molecular analysis of their metabolism and epigenome. Thanks to those data, I could decipher the first embryonic lineages segregations, as well as the processes regulating the pluripotency continuum in the rabbit embryo. Those results show that the rabbit continuum of pluripotency is fairly similar to that of other eutherian mammals, while the mouse one has diverged a lot. That information also offers new avenues for the study of pluripotency *in vitro*. Heterochromatin and the cell-cycle seem to be promising targets to manipulate rabbit PSC. I conducted preliminary experiments using inhibitors of enzymes promoting the formation of heterochromatin on cultured rabbit embryos. I also used the same inhibitors on a rabbit PSC line *in vitro*. In both cases, those inhibitors had an impact on the pluripotency state of the treated cells.

Key words

Pluripotent stem cell ; embryonic development ; epigenetics ; cell-cycle ; rabbit

Table des matières

Abbréviations	3
Introduction.....	7
Première partie – Le continuum de pluripotence <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	8
I. Une galaxie de pluripotence – les différents modèles de cellules souches pluripotentes	8
II. A la source de la pluripotence – le développement embryonnaire péri-implantatoire chez les mammifères euthériens	16
Deuxième partie – Dynamiques des mécanismes régulant la pluripotence	38
I. Les réseaux de régulation génique de la pluripotence	38
II. Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la pluripotence	44
III. Epigénome et pluripotence	56
V. Régulation du cycle cellulaire et sortie de la pluripotence	70
Problématique.....	75
Résultats	79
Résultats première partie – analyse de la ségrégation des lignages et caractérisation du continuum de pluripotence	80
I. Caractérisation transcriptomique, épigénétique et métabolique du continuum de pluripotence dans l’embryon pré-implantatoire du lapin	80
Article 1	83
II. Données complémentaires à l’article 1	132
Deuxième partie – Impact de l’inhibition de l’hétérochromatine sur la pluripotence	140
I. Hétérochromatine et état naïf	140
II. Hétérochromatine, cycle cellulaire et cellules souches pluripotentes amorcées.....	152
Discussion	159
Partie 1 – Vers la capture de l’état naïf chez le lapin : perspectives à court et moyen termes.....	160
Partie 2 – Comparaison des continuums de pluripotence chez les mammifères euthériens.....	161
I. L’unicité des mécanismes du développement embryonnaire	161
II. Divergence dans la mise en route du génome embryonnaire et destin cellulaire	163
III. Divergence des voies permettant l’autorenouveaulement à l’état basal de pluripotence chez la souris	163
IV. Les autres voies de signalisation soutenant la pluripotence naïve chez les espèces non-murines.....	164
V. Implantation et apparition de la lignée germinale : un exemple de robustesse et de diversité de régulation	165
VI. Comparaison des continuums de pluripotence : bilan	165
Conclusion générale	169
Matériels et méthodes	171

Bibliographie	175
Annexes	215

Abbréviations

ACVR : activin A receptor
AMOT : angiomotine
AMOTL : angiomotin like
APC : adenomatous polyposis coli protein
APC : anaphase promoting complex
AVE : anterior visceral endoderm
BLIMP1 : B-lymphocyte-induced maturation protein 1, aussi appelé PR/SET domain 1 (PRDM1)
BMI1 : B lymphoma mo-MLV insertion region 1 homolog
BMP : bone morphogenetic protein
BMPR : BMP receptor
BRAF : B-raf proto oncogene, serine/threonine kinase
CDK : cyclin-dependent kinase
CDKN : cyclin-dependent kinase inhibitor
CDX : caudal type homeobox
CER1 : cerberus 1
CHD : chromodomain helicase DNA binding protein
CREBBP : CREB binding protein, aussi appelé lysine acetyltransferase 3A (KAT3A)
DAG : diacylglycerol
DE : definitive endoderm
DKK1 : dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1
DLL : delta like canonical Notch ligand
DNMT : DNA-methyltransferase
DPPA3 : developmental pluripotency associated 3, aussi appelé STELLA
DVE : distal visceral endoderm
DVL : dishevelled, DSH homolog
ECC : embryonic carcinoma cell
ECM : extra-cellular matrix
EED : embryonic ectoderm development
EGA : embryo genome activation
EHMT1 et 2 : euchromatic histone lysine methyltransferase 1 and 2, aussi appelés respectivement G9A-like protein 1 (GLP) et G9A
EMT : epithelio-mesenchymal transition
EOMES : eomesodermin
EP300 : E1A binding protein P300
EpiLC : epiblast-like cell
EpiSC : epiblast stem cells
ERK : extra-cellular signal-regulated kinase
ESC : embryonic stem cell
ESRRB : estrogen related receptor beta
ETV : ETS variant transcription factor
ExE : ectoderme extra-embryonnaire
FABP3 : fatty acid binding protein 3
FCS : fetal bovine serum
FGF : fibroblast growth factor

FGFR : FGF receptor
FOXA2 : forkhead box A2, aussi appelé hepatocyte nuclear factor 3 beta (HNF3B)
FSC : formative stem cell
FUCCI : fluorescent, ubiquitination-based cell cycle indicator
FZD : frizzled class receptor
GADD45A : growth arrest and DNA damage inducible alpha
GBX2 : gastrulating brain homeobox 2
GDF3 : growth differentiation factor 3
GREM1 : gremlin 1
GSK3 : glycogen synthase kinase-3
HAT : histone acetyl-transferase
hCDT1 : human chromatin licensing and DNA replication factor 1
HDAC : histone deacetylase
hGMNN : human geminin DNA replication inhibitor
HIF1A : hypoxia inducible factor 1 subunit alpha
HSP90AA1 : heat shock protein 90 alpha family class A member 1
ICM : inner cell mass
ID : inhibitor of differentiation
IGF : insulin growth factor
IL : interleukine
IL6ST : interleukine 6 cytokine family signal transducer, aussi appelée membrane glycoprotein 130 (GP130) ou antigène CD130
IP3 : inositol triphosphate
iPSC : induced pluripotent stem cells
JAG1 : jagged canonical Notch ligand 1
JAK : Janus kinase
JARID2 : jumonji and AT-rich interaction domain containing 2
JUNK1, 2, 3 : JUN N-terminal kinase 1, 2, 3, aussi connu sous les noms de MAPK8, 9 et 10
KAT6B : lysine acetyltransferase 6B, aussi appelé MOZ, YBF2/SAS3, SAS2 and TIP60 protein 4 (MYST4)
KAT7 : lysine acetyltransferase 7, aussi appelé MOZ, YBF2/SAS3, SAS2 and TIP60 protein 2 (MYST2)
KD : knock-down
KDM1A : lysine demethylase 1A, aussi appelée lysine-specific histone demethylase 1 (LSD1)
KDM3 : lysine demethylase 3, aussi appelées jumonji domain containing 1 (JMJD1) ou jmjC domain-containing histone demethylase 2 (JHDM2)
KDM4 : lysine demethylase 4, aussi appelées jumonji domain containing 2 (JMJD2) ou jmjC domain-containing histone demethylase 3 (JHDM3)
KDM5B : lysine demethylase 5B, aussi appelé Jumonji, AT rich interactive domain 1B (JARID1B)
KEGG : kyoto encyclopedia of genes and genomes
KLF : kruppel like factor
KMT2A : lysine methyltransferase 2A, aussi appelée myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL1)
KO : knock-out
KOSR : knock-out serum replacement
KRT : kératine
LATS : large tumor suppressor
LEFTY : left-right determination factor
LIF : leukemia inhibitory factor

LRP : LDL receptor related protein
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MBD : methyl binding domain
MEF : mouse embryonic fibroblast
MEK : MAPK/ERK activator kinase, aussi appelé mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K)
MIXL1 : mix paired-like homeobox
NICD : notch intra-cellular domain
NROB1 : nuclear receptor subfamily 0 group B member 1, aussi connu sous le nom de DSS-AHC critical region on the X chromosome protein 1 (DAX1)
NR5A2 : nuclear receptor subfamily 5 group A member 2
NuRD : nucleosome remodeling deacetylase
OCT : octamer-binding transcription factor 4
OOEP : oocyte expressed protein
OTX : orthodenticle homeobox
OXPHOS : oxidative phosphorylation
PARD : Partitioning defective homolog, aussi appelé par family cell polarity regulator (PAR)
ParE : parietal endoderm
PCP : planar cell polarity
PDGFRA : platelet derived growth factor receptor alpha
PE : primitive endoderm
PGC : primordial germ cell
PI3K : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase
POU5F : POU class 5 homeobox
PRC : polycomb repressor complex
PRDM14 : PR/SET domain 14
PRKCA : protein kinase C alpha, aussi appelé atypical protéine kinase C (aPKC)
PSC : pluripotent stem cell
qPCR : quantitative polymerase chain reaction
RB : rétinoblastome
RBPJ : recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
RHO : Ras homolog
RNA-FISH : RNA-fluorescence in situ hybridization
ROCK : Rho associated coiled-coil containing protein kinase
RSC : rosette stem cell
SALL : spalt like transcription factor
SCNT : somatic cell nuclear transfer
scRNA-seq : single-cell RNA-sequencing
SETD1A : SET domain containing histone methyltransferase 1A, aussi appelée lysine N-methyltransferase 2 F (KMT2F)
SETD7 : SET domain containing histone methyltransferase 1A, aussi appelée SET7, SET9 et lysine N-methyltransferase 7 (KMT7)
SETDB1 : SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1, , aussi appelé ERG-associated protein with a SET domain (ESET), ou lysine N-methyltransferase 1E (KMT1E)
SFRP : secreted frizzled related protein
SOX : SRY-box transcription factor
SRC : SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
STAT : signal transducer and activator of transcription

SUV39H : suppressor of variegation 3-9 homolog
SWI/SNF : switch mutants – sucrose non-fermenting
TAZ : transcriptional co-activator with PDZ-binding motif aussi appelé WW Domain containing transcription regulator 1 (WWTR1)
TBX3 : T-box transcription factor 3
TBXT : T-box transcription factor T, aussi connu sous les noms de T et de Brachyury
TCF7L1 : transcription factor 7 like 1, aussi appelé transcription factor 3 (TCF3)
TDGF1 : teratocarcinoma-derived growth factor 1
TE : trophoctoderm
TEAD : TEA domain transcription factor
TET : ten-eleven translocation
TFAP2 : transcription factor AP-2, aussi appelé activator protein 2 (AP2)
TFCP2L1 : transcription factor CP2 like 1
TGF β : transforming growth factor family beta
TOR : target of rapamycin
UMAP : uniform manifold approximation and projection
VisE : visceral endoderm
WNT : wingless integration
YAP : Yes1 associated transcriptional regulator
YWHAQ/Z : tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein theta and zeta
ZFP281 : Zinc finger protein 281
ZFP36 : zinc finger protein 36
ZFP42 : zinc finger protein 42, aussi appelé REX1

Introduction

Première partie – Le continuum de pluripotence *in vitro* et *in vivo*

I. Une galaxie de pluripotence – les différents modèles de cellules souches pluripotentes

A. Introduction à la pluripotence

La pluripotence décrit la capacité d'une cellule à produire une descendance différenciée dans tous les types cellulaires somatiques d'un organisme. Cette caractéristique est propre aux cellules embryonnaires de la masse cellulaire interne (ICM) puis de l'épiblaste (Fig. I1). Elle débute au moment des premières ségrégations entre les lignées précurseurs des annexes embryonnaires et celles qui formeront l'embryon proprement dit. La pluripotence se termine lors de la différenciation de ces dernières dans l'un des trois feuillets primordiaux germinaux : l'ectoderme, précurseur des lignages neuraux et de la peau ; le mésoderme, précurseur des lignages musculaires et osseux ; et l'endoderme, précurseur des lignages du système digestif et des glandes annexes telles que le pancréas. De nombreux types de cellules pluripotentes ont également pu être dérivées *in vitro*. A l'origine, les premières cellules pluripotentes dérivées étaient les ECC. Ces dernières sont des cellules dérivées de tératocarcinomes, des tumeurs contenant des cellules dérivées des trois feuillets germinaux embryonnaires, ectoderme, mésoderme et endoderme. Les tératocarcinomes se développent soit à partir des cellules souches testiculaires, soit dans l'utérus à partir d'embryons ayant dégénérés en tumeur. Tout comme les tératomes dont elles sont issues, les ECC sont capables de se différencier dans tous les types cellulaires somatiques, même si cette différenciation se fait de manière aléatoire et chaotique. Des chercheurs sont parvenus à les faire proliférer en culture indéfiniment et à les maintenir dans un état indifférencié, préservant leur capacité à générer des tératomes (Stevens, 1967 ; Kleinsmith and Pierce, 1964 ; Martin, 1975). Par la suite, il a été montré qu'on pouvait produire des tératomes en implantant des cellules d'embryons péri-implantatoires, et des ECC peuvent être dérivées à partir de ces tératomes (Stevens, 1970). Certaines ECC sont capables de coloniser des embryons pré-implantatoires de souris. Ces embryons sont alors aptes à se développer en souris chimères, et le génome des cellules injectées de se transmettre à leur descendance (Illmensee and Mintz, 1976). Les ECC sont cultivées sur des cellules nourricières, à savoir des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), dont la prolifération est arrêtée par traitement inactivant la mitose. Ces cellules permettent le maintien des ECC dans un état indifférencié. Ce sont ces conditions de culture qui ont permis la dérivation des premières lignées de cellules souches pluripotentes (PSC) embryonnaires.

ICM : *inner cell mass*

ECC : *embryonic carcinoma cell*

MEF : *mouse embryonic fibroblast*

PSC : *pluripotent stem cell*

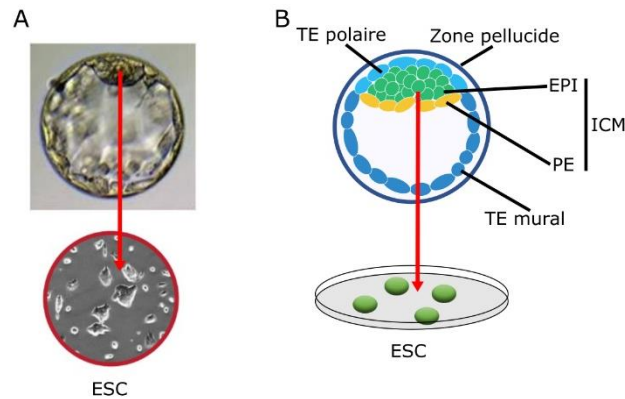


Figure 11 : Description d'un embryon pré-implantatoire de souris – le blastocyste. (A) Photo en lumière blanche d'un blastocyste de souris pré-implantatoire. (B) Schéma représentant un blastocyste de souris, chaque couleur correspondant à un tissu différent. Les ESC sont dérivées à partir de l'ICM du blastocyste. TE : trophoctoderme ; EPI : épiblaste ; PE : endoderme primitif ; ICM : masse cellulaire interne.

B. Dérivation des premières cellules souches embryonnaires murines

Evans et Kaufman ainsi que Martin sont parvenu à dériver des cellules embryonnaires pluripotentes directement à partir d'embryons pré-implantatoires de souris (Evans and Kaufman, 1981 ; Martin et al., 1981). Ces cellules, appelées ESC, possèdent les propriétés des ECC. Elles sont capables : 1. de s'autorenouveler en culture indéfiniment, sans avoir nécessité d'être immortalisées ou de subir de mutations cancéreuses ; 2. de former des tératomes lorsqu'elles sont injectées dans des souris immunodéprimées ; 3. de former des cellules de tous les lignages somatiques ; 4. de coloniser des embryons et de contribuer à tous les lignages somatiques et germinaux, ce qui facilite grandement la production de lignées d'organismes génétiquement modifiés (Fig. 12). Les ESC ont d'abord été obtenues à partir de la souche murine consanguine 129. Cette souche est connue pour développer spontanément

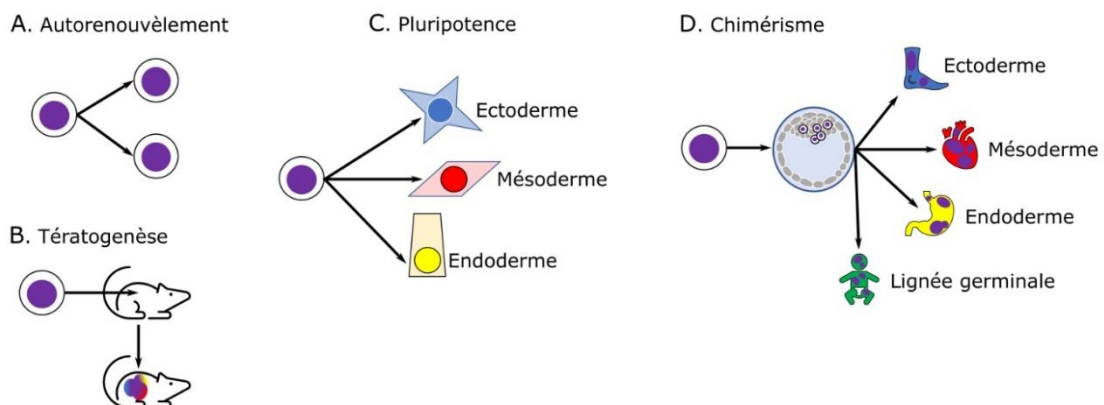


Figure 12 : Caractéristiques définissant les ESC de souris. Schémas représentant les quatre caractéristiques définissant les ESC de souris. (A) Schéma représentant la capacité des ESC à s'autorenouveler. (B) Schéma représentant la capacité des ESC à créer des tératomes lorsqu'elles sont injectées dans des souris immunodéficiente. (C) Schéma représentant la capacité des ESC à générer *in vitro* des cellules appartenant aux trois feuillets germinaux. (D) Schéma représentant la capacité des ESC à coloniser l'ICM d'un blastocyste et à participer à la formation de tous les tissus somatiques et germinaux.

ESC : *embryonic stem cell*

des tératocarcinomes, ce qui expliquerait la facilité avec laquelle des ESC ont pu en être dérivées. Les autres souches de souris sont en effet apparues comme étant réfractaire à la dérivation de ESC (Gardner and Brook, 1997).

Les ESC ont commencé par être cultivées dans les mêmes conditions que les ECC sur MEF et avec du sérum de veau fœtal (FCS ; voir Fig. 13). Lorsque les ESC étaient mises en culture sans MEF elles finissaient par se différencier. L'ajout de milieu conditionné par des cellules de foie de rat permettait de bloquer cette différenciation. Des chercheurs ont identifié et purifié le facteur sécrété par les cellules de foie de rat qui bloquait la différenciation des ESC : le LIF (Smith et al., 1988). Le LIF est une cytokine qui, dans les ESC, active le facteur de transcription Stat3 afin de soutenir l'autorenouveau et d'inhiber la différenciation (Matsuda et al., 1999). Néanmoins, les ESC cultivées en condition LIF/FCS sont plus instables que celles cultivées sur MEF. La privation de sérum entraîne la différenciation des ESC en dérivés des lignages neuronaux. Les protéines Bmp sont des ligands de la famille TGF β qui inhibent la formation des lignages neuroectodermiques par l'activation des facteurs de transcription Id (Ying et al., 2003). L'utilisation de Bmp4 permet ainsi de maintenir les ESC en culture en présence de LIF et en absence de FCS et de MEF (Ying et al., 2003). Par la suite, il a été montré que la signalisation autocrine par le Fgf4 entraînait la différenciation spontanée des ESC en culture (Kunath et al., 2007 ; Ying et al., 2008). Ainsi, des ESC mutées pour le gène *Erk* (Kunath et al., 2007) ou cultivées en présence d'inhibiteur des récepteurs au Fgf ou de Mek1 et 2, les kinases phosphorylant Erk1 et Erk2 (Ying et al., 2008), peuvent s'autorenouveler en présence de LIF et en absence de FCS ou de Bmp4. De la même façon, il a été montré que l'inhibition de Gsk3 en présence de LIF permet l'autorenouveau des ESC (Ying et al., 2008). Gsk3 est une kinase qui inhibe la voie Wnt. L'utilisation combinée d'inhibiteurs de Gsk3 et de Mek permet de maintenir l'autorenouveau des ESC sans ajout de LIF, de Bmp4 ou de FCS. Ces conditions ont même permis de dériver des ESC à partir de souches de souris réfractaires (Ying et al., 2008 ; Nichols et al., 2009b ; Fig. 13). Ce milieu a également abouti à la dérivation de ESC de rat capables de produire des chimères germinales (Buehr et al., 2008 ; P. Li et al., 2008) et de ESC de mulot compétentes pour produire des chimères somatiques (Czechanski et al., 2014). Les ESC maintenues dans ce milieu sans facteurs extrinsèques s'autorenouveau à l'état dit « basal » de pluripotence.

FCS : fetal bovine serum

LIF : leukemia inhibitory factor

STAT : signal transducer and activator of transcription

BMP : bone morphogenetic protein

TGF β : transforming growth factor family beta

ID : inhibitor of differentiation

FGF : fibroblast growth factor

ERK : extra-cellular signal-regulated kinase

MEK : MAPK/ERK activator kinase, aussi appelé mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K)

MAPK : mitogen-activated protein kinase

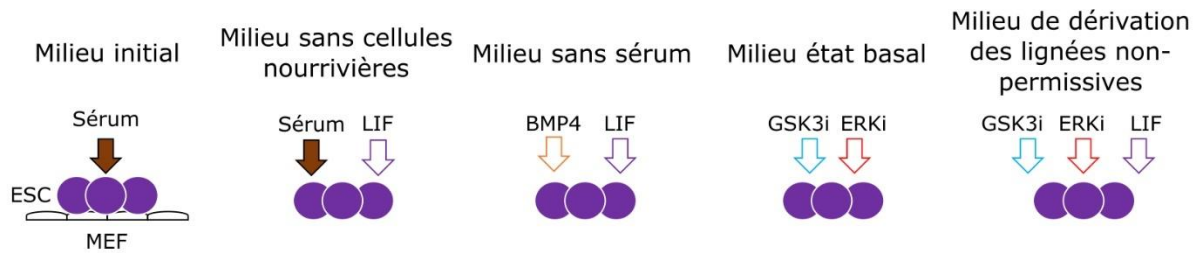


Figure 13 : Les différents milieux de dérivation et de maintien des ESC de souris. Schéma représentant les différents milieux développés pour dériver et maintenir des ESC en culture, dans l'ordre chronologique de publication.

C. Les cellules souches embryonnaires chez les primates, le lapin et les cellules souches épiblastiques

Des ESC ont été dérivées chez d'autres espèces, l'Homme (Thomson et al., 1998), les primates non-humains (Thomson et al., 1996 ; Suemori et al., 2001 ; Mitalipov et al., 2006 ; Wianny et al., 2008 ; Simerly et al., 2009), et le lapin (Wang et al., 2007 ; Honda et al., 2008 ; Osteil et al., 2013) et le bovin (Bogliotti et al., 2018). Ces ESC partagent les caractéristiques cardinales de la pluripotence, à savoir : l'autorenouveau et la stabilité en culture, la capacité à produire des tératomes quand elles sont injectées dans des souris immunodéficientes, et la capacité à se différencier dans des cellules des trois feuillets germinaux primordiaux. Cependant, ces cellules sont incapables de coloniser un blastocyste et de former des chimères (Tachibana et al., 2012 ; Osteil et al., 2013 ; Aksoy et al., 2021). Ces cellules diffèrent également par leur condition de culture et leur dépendance aux différentes voies de signalisation régulant la pluripotence. En effet, aussi bien chez l'Homme que chez le lapin, l'ajout ou la privation de LIF n'a pas d'effet sur leur autorenouveau (Thomson et al., 1998 ; Honda et al., 2009). En revanche, elles sont dépendantes de l'activité de la voie ACTIVINE/NODAL qui inhibe la différenciation neuronale. Elles sont également dépendantes de la voie FGF-ERK qui, à l'inverse des ESC de souris, protège les ESC humaines et de lapin de la différenciation (Vallier et al., 2005 ; Honda et al., 2008 ; Honda et al., 2009).

GSK3 : *glycogen synthase kinase-3*

WNT : *wingless integration*

Les ESC de rongeur apparaissent ainsi comme une exception parmi les cellules pluripotentes obtenues chez les autres mammifères. En 2007, la dérivation de cellules d'embryons post-implantatoires de souris, appelées EpiSC, a permis d'éclaircir la situation (Brons et al., 2007 ; (Brons et al., 2007 ; Tesar et al., 2007 ; Fig. I4). De plus, elles sont incapables de coloniser des blastocystes (Tesar et al., 2007). Du point de vue transcriptomique, les EpiSC sont également plus proche de l'épiblaste post-implantatoire, et expriment des gènes impliqués dans la gastrulation tel que *EOMES*, tandis que les ESC sont plus proches de l'épiblaste pré-implantatoire (Tesar et al., 2007 ; Fig. I2, I4). De même, tout comme dans l'épiblaste post-implantatoire, « l'enhancer » proximal du gène *Pou5f1*, codant pour le facteur de transcription Oct4, est plus actif que l'enhancer distal alors que c'est l'inverse dans les cellules ESC et l'épiblaste pré-implantatoire (Yeom et al., 1996 ; Tesar et al., 2007). Cette proximité entre EpiSC et épiblaste post-implantatoire d'un côté, et entre ESC et épiblaste pré-implantatoire de l'autre, se traduit également par leurs potentiels de colonisation. Les EpiSC peuvent coloniser les embryons post-implantatoires de souris mais sont incapables de coloniser les embryons pré-implantatoires, alors qu'on observe l'inverse avec les ESC (Huang et al., 2012).

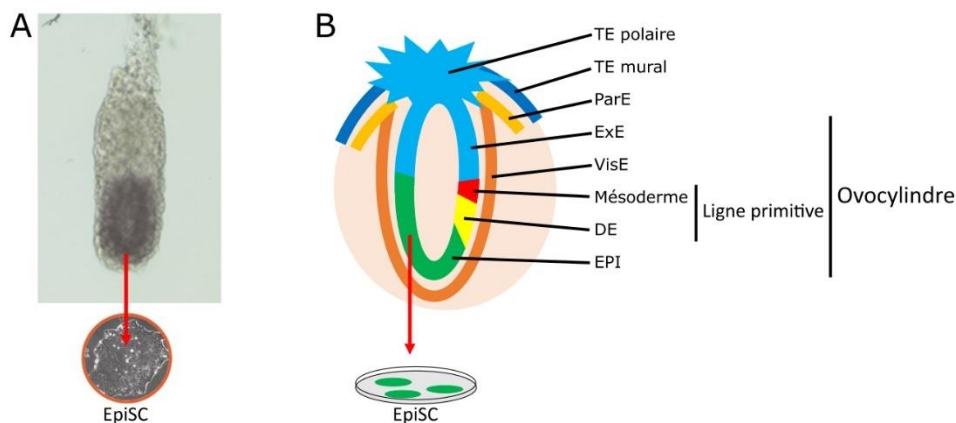


Figure I4 : Description de l'ovocylindre post-implantatoire de souris. (A) Photo en lumière blanche d'un ovocylindre de souris post-implantatoire. (B) Schéma représentant un ovocylindre de souris, chaque couleur correspondant à un tissu différent. Les EpiSC sont dérivées à partir de l'épiblaste post-implantatoire. EPI : épiblaste ; ParE : endoderme pariétal ; ExE : ectoderme extra-embryonnaire ; VisE : endoderme viscéral ; DE : endoderme définitif.

D. Définition des différents états de pluripotence

A partir de cette découverte, Nichols et Smith (Nichols and Smith, 2009) ont défini l'existence de deux états de pluripotence différents : l'état naïf de pluripotence, qui caractérise les ESC de souris, et qui est un état de la pluripotence très immature correspondant aux cellules pluripotentes de l'épiblaste pré-implantatoire ; et l'état amorcée de pluripotence, qui caractérise les ESC d'autres

EpiSC : *epiblast stem cells*

EOMES : *eomesodermin*

POU5F : *POU class 5 homeobox*

OCT : *octamer-binding transcription factor 4*

espèces ainsi que les EpiSC de souris, et qui est un état de pluripotence plus avancé, proche des cellules pluripotentes d'épiblastes post-implantatoires. En 2011, Hayashi et al. (Hayashi et al., 2011) sont parvenus à générer des cellules germinales à partir de PSC de souris *in vitro*. Dans ce but, ils ont cultivé des ESC en présence d'Activine A, de FGF bovin et 1% de KOSR pendant 2-3 jours, afin de les faire sortir de l'état naïf et de les amener progressivement vers l'état amorcé. La logique de cette expérience est que l'épiblaste murin n'est capable de générer des cellules germinales primordiales (PGC) que pendant une courte période, entre les jours 5.5 et 6.5 du développement (Ohinata et al., 2009). Les EpiSC et leurs équivalents *in vivo* sont ainsi inefficaces pour produire des cellules PGC. Les ESC étant elles aussi incompetentes pour produire des PGC, il faut donc les faire progresser dans le continuum de pluripotence afin qu'elles deviennent permissives à l'induction de PGC, avant de rejoindre l'état amorcé de pluripotence. Les cellules ainsi obtenues, appelées EpiLC, présentent des caractéristiques épigénétiques et transcriptomiques intermédiaires entre celles des états naïf et amorcé, et sont proches de l'épiblaste post-implantatoire au jour 5.75 (Hayashi et al., 2011). Par la suite, en étudiant la sortie de l'état naïf, il a été démontré que les ESC de souris passent par un état de pluripotence intermédiaire, proche du point de vue transcriptionnel des EpiLC et de l'épiblaste post-implantatoire murin au jour 5.5 (Kalkan et al., 2017). Austin Smith a ainsi émis l'hypothèse de l'existence d'un troisième état de pluripotence, entre les états naïf et amorcé, appelé état formatif. Ce dernier se distinguerait principalement par sa capacité à pouvoir générer des PGC, à l'image de l'épiblaste post-implantatoire précoce dont il serait l'équivalent, ainsi que par des caractéristiques intermédiaires entre celles des PSC dans les états naïf et amorcé (Smith, 2017).

Cependant, les EpiLC ne s'autorenouvèlent pas en culture et n'existent donc que transitoirement. Diverses PSC ont été dérivées dans des états intermédiaires de pluripotence, sans qu'aucune n'atteigne un état correspondant à la pluripotence formative. Des auteurs sont parvenus à bloquer des ESC murines dans des états plus avancés de pluripotence (Tsukiyama and Ohinata, 2014 ; Neagu et al., 2020). Ces cellules, cultivées à partir de ESC en présence d'activateurs de la voie Wnt, de Fgf et d'Activine A, soit en présence de Lif et d'inhibiteurs de Wnt et de Mek, restent capables de coloniser des blastocystes et de faire des chimères germinales. De plus, bien que présentant certaines caractéristiques amorcées, elles restent très proches transcriptionnellement et épigénétiquement des ESC à l'état naïf. Elles exprimaient encore notamment les facteurs de transcription régulant l'état naïf. Parmi elles, les cellules appelées RSC peuvent être en plus facilement reconverties en ESC par la levée de l'inhibition de Wnt (Neagu et al., 2020). Elles ne représentent donc pas véritablement des cellules à l'état formatif, mais plutôt des cellules proches de l'état naïf de pluripotence. A l'inverse, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie WNT permet la stabilisation de PSC humaines et murines amorcées (Kim et al., 2013 ; Kurek et al., 2015 ; Wu et al., 2015). Ces dernières ont en effet tendance à se différencier spontanément en culture, résultat de l'activation autocrine de la voie WNT. L'inhibition de WNT

KOSR : *knock-out serum replacement*

PGC : *primordial germ cell*

EpiLC : *epiblast-like cell*

RSC : *rosette stem cell*

permet ainsi d'empêcher cette différenciation (Kim et al., 2013 ; Kurek et al., 2015).

Les cellules obtenues, bien qu'étant considérées dans l'état amorcé, présentent quelques caractères intermédiaires entre les états naïf et amorcé, et seraient l'équivalent de l'épiblaste en pré-gastrulation. Récemment, des PSC murines s'autorenouvelant véritablement à l'état formatif ont pu être maintenues en culture. Ces dernières, appelées FSC, sont dérivées d'épiblaste à jour 5.5 ou de ESC après culture dans un milieu contenant des inhibiteurs de Wnt et du récepteur à l'acide rétinoïque ainsi que de faibles concentrations d'Activine A. Elles sont capables de produire des PGC *in vitro*, et présentent une faible capacité à former des chimères après colonisation des blastocystes. Elles de plus des caractéristiques épigénétiques et transcriptomiques plus proches de l'état amorcé que les RSC, et ne peuvent pas être converties à l'état naïf. Ces différences se traduisent notamment par l'extinction de l'expression des gènes régulant la pluripotence naïve, ainsi que par la dépendance vis-à-vis du facteur de transcription Otx2 pour leur autorenouvellement. Elles ne sont également pas interconvertibles avec les EpiSC, qui ne peuvent pas servir à produire des FSC. Enfin, les FSC ont un transcriptome plus proche de celui de l'épiblaste entre les jours 5 et 6, contrairement à celui des EpiSC (Kinoshita et al., 2021).

E. Une galaxie de cellules pluripotentes

La définition des trois états de pluripotence repose sur des caractéristiques transcriptomiques, épigénétiques et métaboliques, sur la dépendance vis-à-vis de différentes voies de signalisation, ainsi que sur diverses capacités fonctionnelles telles que la capacité à se différencier dans la lignée germinale ou à coloniser l'ICM d'un blastocyste. Cependant, il existe un grand nombre de publications faisant état de PSC dérivées chez différentes espèces, dans différentes conditions de culture, et qui sont à la frontière entre les différents états de pluripotence (Fig. I5). Chez le lapin par exemple, selon les conditions de culture et de dissociation, les ESC présentent des transcriptomes différents (Osteil et al., 2016). De même, les cellules souches pluripotentes induites (iPSC), obtenues par reprogrammation de fibroblastes de lapin présentent des caractéristiques plus naïves que les ESC de cette même espèce (Osteil et al., 2013). Chez l'Homme, un grand nombre de publications font état de la conversion de PSC de l'état amorcé à l'état naïf (Gafni et al., 2013 ; Chan et al., 2013 ; Takashima et al., 2014 ; Theunissen et al., 2014 ; Chen et al., 2015 ; Qin et al., 2016 ; Yang et al., 2017). Ces cellules se différencient les unes des autres par leurs transcriptomes qui sont plus ou moins proche de celui des épiblastes pré- et post-implantatoires d'embryons de macaque cynomolgus et humain (Nakamura et al., 2016 ; Stirparo et al., 2018 ; Molè et al., 2021 ; Fig. I5). La diversité des PSC, ainsi que la difficulté de les dériver à l'état naïf chez les espèces non- rongeurs posent la question de la définition des différents états de pluripotences. Afin de répondre à cette question, il est essentiel de s'intéresser à la source de la pluripotence, c'est-à-dire le développement embryonnaire précoce.

FSC : *formative stem cell*

OTX : *orthodenticle homeobox*

iPSC : *induced pluripotent stem cells*

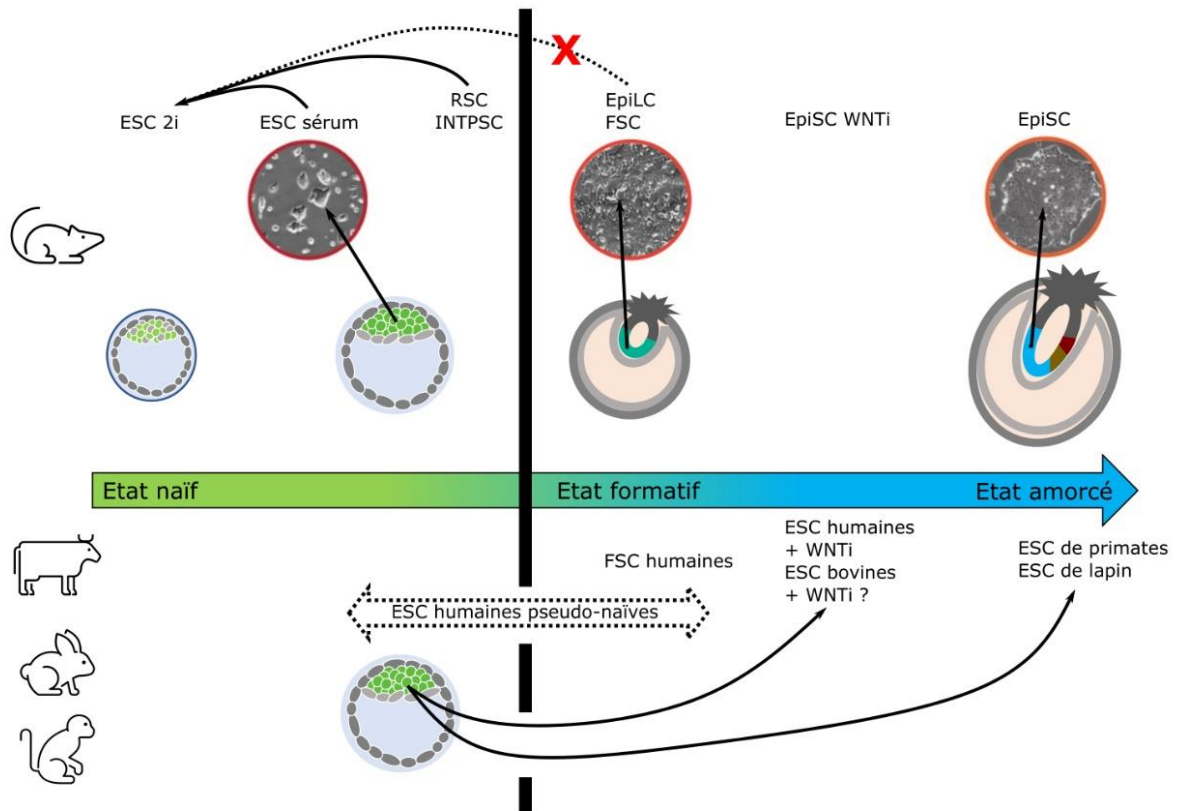


Figure 15 : Le continuum de pluripotence *in vitro*. Schéma situant les différentes PSC dérivées chez la souris (partie haute de la figure) ou chez les autres espèces (partie basse de la figure) sur le continuum de pluripotence. Les différentes ESC s'autorenouvèlent à l'état naïf peuvent être converties à l'état basal. En revanche, les cellules aux états formatifs et amorcés non. Ces cellules correspondent à l'épiblaste post-implantatoire. Chez les autres mammifères, la plupart des PSC dérivées s'autorenouvèlent à l'état amorcé. Malgré l'existence de nombreuses méthodes de conversion des ESC humaines à l'état naïf, leur position sur le continuum de pluripotence fait encore l'objet de débat.

II. A la source de la pluripotence – le développement embryonnaire péri-implantatoire chez les mammifères euthériens

Au cours du développement, les cellules embryonnaires passent d'une potentialité totale et non-restreinte, ou chaque cellule peut reconstituer un organisme complet, à une restriction progressive de cette potentialité. Cette réduction se fait au fur et à mesure des divisions cellulaires et des ségrégations : d'abord entre les lignages qui formeront l'embryon à proprement parler et ceux à l'origine des annexes extra-embryonnaires, puis entre les précurseurs de la lignée germinale et des trois feuillets embryonnaires. Entre la première ségrégation dans l'embryon et la différenciation des cellules de l'épiblaste dans l'un des trois feuillets, les cellules embryonnaires sont dites pluripotentes. Dans les prochains paragraphes, je m'attacherai à décrire les différentes étapes conduisant à l'apparition, la progression puis la disparition des cellules pluripotentes embryonnaires dans les embryons de différentes espèces de mammifères euthériens, ainsi que les différents mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation du continuum de pluripotence.

A. Description comparative du développement embryonnaire précoce chez les mammifères euthériens

Le développement embryonnaire commence par la fécondation et la fusion des gamètes. Par la suite, l'embryon, nommé zygote à ce stade, se divise rapidement pour former un amas de cellules, appelé morula. Les cellules composant cette morula s'appellent des blastomères. C'est au cours de ces premières divisions que débute la transcription du génome de l'embryon (EGA). Avant cela, l'embryon est dépendant des ARN maternels présents dans l'ovocyte, qui sont progressivement dégradés à la suite de l'EGA. Chez les rongeurs, celle-ci débute très précocement au stade 2-cellules (Seshagiri et al., 1992 ; Zernicka-Goetz 1994 ; Aoki et al., 1997). Chez le porc et le lapin, celle-ci commence au stade 4-cellules (Christians et al., 1994 ; Maddox-Hyttel et al., 2001), tandis que chez le bovin, elle a lieu entre les stades 8- et 16-cellules (Meirelles et al., 2004). Chez les primates, l'EGA commence au stade 8-cellules (Tesarik et al., 1987 ; X. Wang et al., 2017 ; Boroviak et al., 2018 ; Fig. I6). Le second événement embryonnaire est la compaction de la morula qui instaure une dualité entre les cellules internes, qui donneront l'ICM, et les cellules externes, qui donneront le trophoctoderme (TE).

Elle a lieu dès le stade 8-cellules chez la souris (Reeve and Ziomek, 1981) et au stade 16/32-cellules chez les autres mammifères (Ziomek et al., 1990 ; Reima et al., 1993 ; Koyama et al., 1994 ; Edwards et al., 1996 ; Steptoe et al., 1971 ; Fig. I6). Suite à la compaction, une cavité commence à se former : le blastocœle. L'embryon résultant est appelé blastocyste. Il est constitué de l'ICM, formant un amas de cellules adjacentes au blastocœle, et du TE entourant l'ICM et le blastocœle. Dans l'ICM, les cellules précurseurs de l'endoderme primitif (PE) et de l'épiblaste vont se distinguer, ségréger et s'épithélialiser. Le PE, situé entre l'épiblaste et le blastocœle, va s'étendre jusqu'à entourer l'intégralité

EGA : *embryo genome activation*

PE : *primitive endoderm*

de la cavité. C'est à ce moment-là, chez la souris et les primates, que l'embryon s'implante par le TE adjacent à l'épiblaste, appelé TE polaire (Norwitz et al., 2001 ; Bazer et al., 2009 ; Fig. 16). Chez la souris, la cavitation de l'épiblaste a lieu conjointement à celle du TE polaire. Les cavités fusionnent entre elles, avec d'un côté l'épiblaste et de l'autre l'ectoderme extra-embryonnaire (ExE). Chez un grand nombre d'espèces, dont le lapin, le bovin et le porc, l'embryon ne s'implante qu'au moment où la gastrulation débute. Chez ces espèces, le trophoctoderme polaire, appelé membrane de Rauber, disparaît pour laisser l'épiblaste à nu (Van Leeuwen et al., 2020).

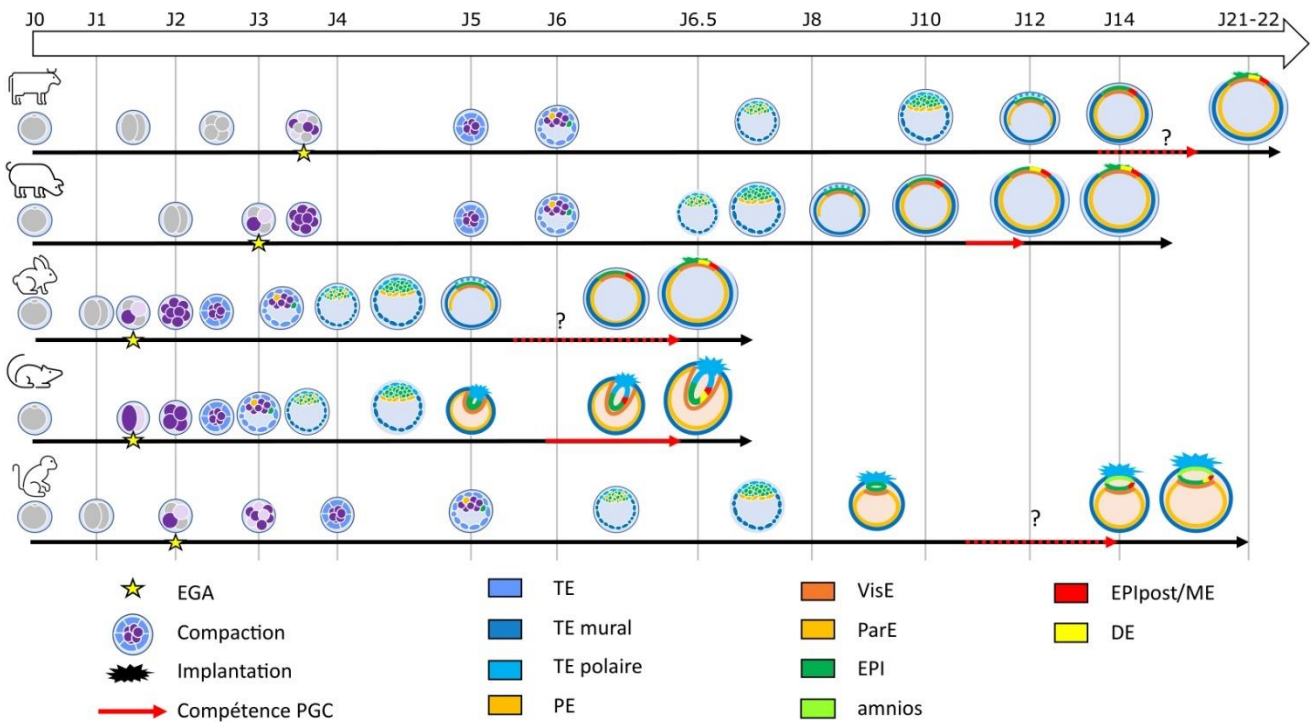


Figure 16 : Comparaison du développement embryonnaire péri-implantatoire chez les mammifères. Schéma comparatif du développement embryonnaire chez le bovin (*Bos taurus*), le porc (*Sus scrofa*), le lapin (*Oryctolagus cuniculus*), la souris (*Mus musculus*), et le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*). En haut l'échelle mesurant le temps de développement en nombre de jours post-fécondation. Les points d'interrogations indiquent que la position et la durée de la compétence de l'embryon à générer des PGC est inconnue.

Suite à son extension autour du blastocœle, le PE se divise en endoderme viscéral (VisE) sous l'épiblaste et en endoderme pariétal (ParE) accolé au TE. A partir de l'endoderme viscéral émerge alors en son centre l'endoderme viscéral distal (DVE). En migrant, ce dernier induit la polarisation de l'endoderme viscéral et forme alors l'endoderme viscéral antérieur (AVE). L'AVE à son tour induit la polarisation de l'épiblaste en induisant l'apparition des épiblastes antérieur et postérieur. Au niveau de l'épiblaste postérieur, les cellules effectuent la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et

VisE : *visceral endoderm*

ParE : *parietal endoderm*

DVE : *distal visceral endoderm*

AVE : *anterior visceral endoderm*

EMT : *epithelio-mesenchymal transition*

l'endoderme définitif (DE) au niveau de la partie antérieure de la ligne primitive. Chez les mammifères présentant une membrane de Rauber, l'implantation a lieu à ce moment-là, au jour 6.5 chez le lapin, forment les précurseurs du mésoderme (Fig. I6). L'épiblaste postérieur s'invagine pour former la ligne primitive qui va peu à peu s'étendre vers le pôle antérieur de l'embryon. L'invagination de la ligne primitive a lieu entre les jours 21 et 22 chez le bovin et entre les jours 13 et 18 chez le porc (revue dans Madeja et al., 2019 ; Fig. I6). A l'opposé, l'épiblaste antérieur s'engage dans la différenciation en neuroectoderme. C'est au cours de ces différentes étapes du développement précoce que les cellules embryonnaires acquièrent, puis perdent leur pluripotence.

B. L'émergence de la pluripotence et la première ségrégation : TE et ICM

Le début de la pluripotence commence avec la première ségrégation entre, d'un côté le TE à l'origine de certaines annexes extra-embryonnaires comme le placenta, et l'ICM à l'origine des autres lignages extra-embryonnaires et des lignages embryonnaires. Certaines publications font remonter l'origine de cette ségrégation aux premiers stades embryonnaires. En effet, les blastomères ne sont pas égaux entre eux au niveau transcriptomique et épigénétique. L'asymétrie de l'expression de certains gènes marqueurs de lignage comme CDX2 dans les blastomères murins et humains, ou encore d'enzymes régulant la chromatine, biaise en effet les blastomères vers une contribution au TE ou à l'ICM (Jedrusik, 2008 ; Torres-Padilla, 2007a ; Chavez, 2014). Cependant, ce biais ne signifie pas un engagement vers un lignage, car peu de blastomères contribue exclusivement au TE ou à l'ICM (Chavez, 2014).

Chez la souris, la ségrégation entre le TE et les premières cellules pluripotentes de l'ICM commence au moment de la compaction et de la polarisation des blastomères. La polarisation des blastomères entraîne la formation du domaine apical dans les cellules externes de la morula (Fig. I7A). La polarisation et la compaction sont indépendantes : en effet, la perturbation de la compaction n'empêche ni la polarisation, ni l'émergence du TE (Vinot et al., 2005 ; Stephenson et al., 2010 ; Korotkevich et al., 2017). Les kératines 8 et 18 (KRT8 et 18) sont des éléments du cytosquelette interagissant avec le domaine apical. Il a été récemment publié que leur expression variable dans les blastomères dès le stade 8-cellules permet l'héritabilité du domaine apical pendant les divisions cellulaires successives (Lim et al., 2020 ; Fig. I7A-B). En effet, le domaine apical n'est pas maintenu pendant la division cellulaire (Zenker et al., 2018), tandis que les Krt8 et 18 conservent leur position (Lim et al., 2020). Le domaine apical est constitué de protéines membranaires Pard3, Pard6, Prkca et d'éléments du cytosquelette qui séquestrent les protéines angiomotines (Amot et Amotl2) au pôle

DE : *definitive endoderm*

CDX : *caudal type homeobox*

KRT : *keratin*

PARD : *Partitioning defective homolog*, aussi appelé *par family cell polarity regulator* (PAR)

PRKCA : *protein kinase C alpha*, aussi appelé *atypical protein kinase C* (aPKC)

AMOT : *angiomotin*, AMOTL : *angiomotin like*

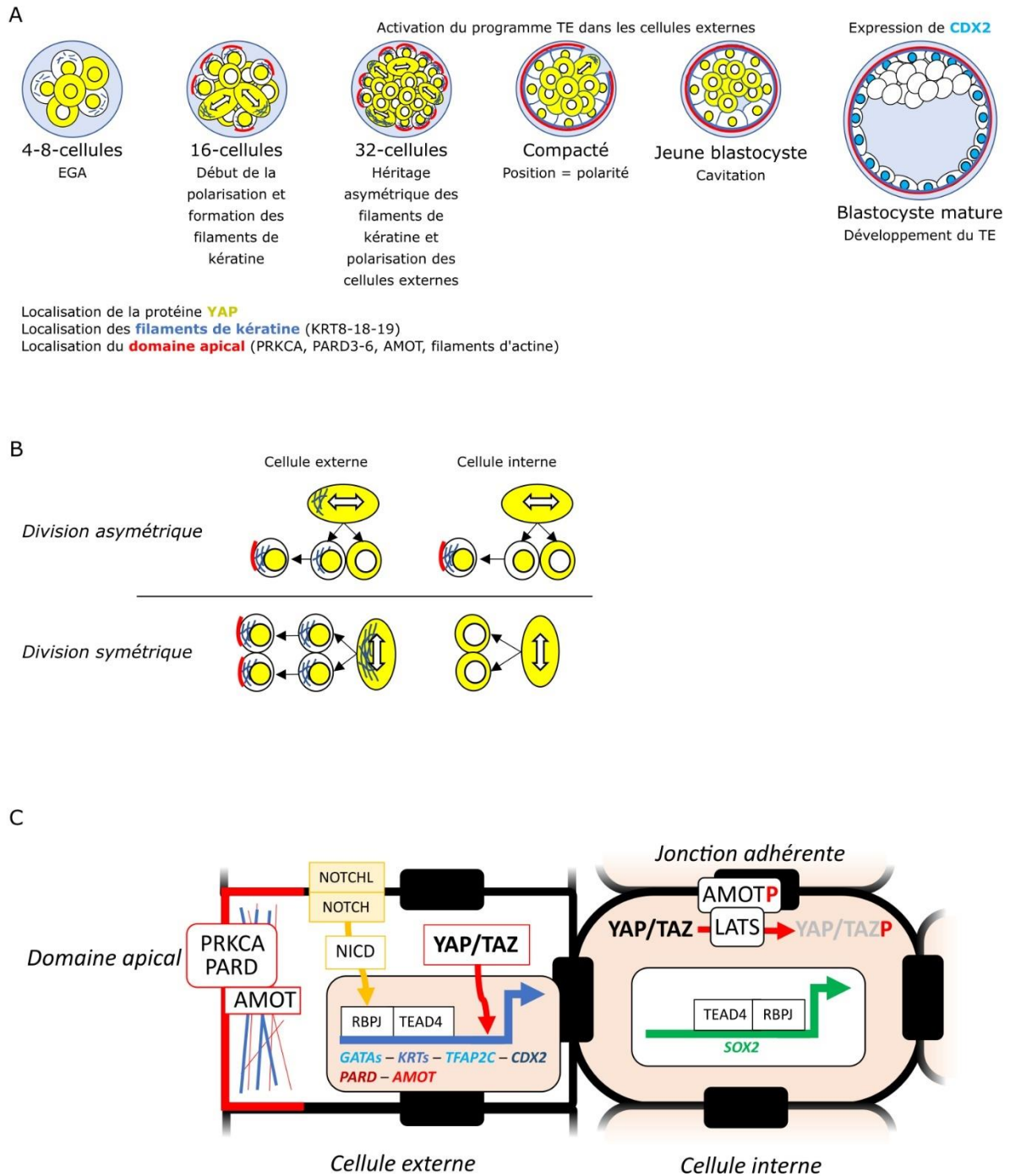


Figure 17 : Mécanismes régulant la ségrégation entre le TE et l'ICM. (A) Schéma du développement embryonnaire chez les mammifères euthériens du stade 4-cellules jusqu'au stade blastocyste. (B) Schéma représentant les différentes possibilités résultant de la division d'une cellule au stade morula. (C) Schéma représentant la régulation de la voie HIPPO-NOTCH dans l'engagement des blastomères dans le TE ou l'ICM. En rouge claire la localisation des protéines YAP et TAZ (nucléaire ou cytoplasmique). La formation du domaine apical permet la ségrégation progressive entre l'ICM et le TE en modulant l'activité de la voie HIPPO.

apical des blastomères (Plusa et al., 2004 ; Vinot et al., 2005 ; Fig. I7A, C). Cette séquestration empêche leur localisation aux jonctions adhérentes, où elles sont normalement phosphorylées et servent

d'ancrage aux kinases Lats, activant ainsi la voie HIPPO (Nishioka et al., 2009 ; Fig. I7C). Les kinases Lats peuvent à leur tour phosphoryler le facteur de transcription Yap et son homologue Taz, bloquant leur entrée dans le noyau et favorisant ainsi leur dégradation par le protéasome. Yap peut également être directement lié par les protéines Amot phosphorylées et être retenu dans le cytoplasme (Hirate et al., 2013 ; Leung and Zernicka-Goetz, 2013). Dans les cellules externes, la présence du domaine apical permet ainsi la translocation nucléaire de Yap et Taz (Fig. I7C). Ces derniers, en coopération avec les effecteurs de la voie Notch Rbpj et le fragment du récepteur Notch NICD (Rayon et al., 2014), se lient au facteur de transcription Tead4. L'ensemble de ces facteurs de transcription active l'expression des gènes permettant la détermination du TE (Nishioka et al., 2009 ; Posfai et al., 2017). Parmi ces gènes, on retrouve les facteurs de transcription Gata2, Gata3, Tfp2a, Tfp2c, et Cdx2, ainsi que les protéines du cytosquelette Krt8 et Krt18 et les protéines constituant le domaine apical comme Amotl2 et Pard6b (Posfai et al., 2017). A l'inverse, les facteurs de transcription Yap et Tead4 répriment l'expression du facteur de transcription Sox2, un facteur clé dans le maintien de la pluripotence *in vivo* (Wicklow et al., 2014) et *in vitro* (Masui et al., 2007), et permettent ainsi sa restriction à l'ICM (Fig. I7C).

Chez l'Homme et le bovin, YAP, TAZ, KRT18 et GATA3 sont co-exprimés dans les cellules externes de la morula compactée. YAP, TAZ et GATA3 sont co-localisés dans les noyaux et cette co-localisation est observée également dans les cellules du TE (Gerri et al., 2020). Comme chez la souris, la présence du domaine apical et le maintien de son intégrité permet l'inactivation de la voie HIPPO et la ségrégation TE/ICM. En effet, l'inhibition de la formation du domaine apical entraîne la perte de l'expression des gènes du TE dans les cellules externes, ainsi que des défauts de cavitation, tandis que le domaine d'expression des gènes régulant la pluripotence s'étend à ces cellules (Gerri et al., 2020). Ainsi, l'inactivation de la voie HIPPO permet de programmer les cellules externes de la morula en TE, tandis que celles internes conservent leur état indifférencié tout en progressant dans le développement pour former l'ICM.

Avant de transiter vers le continuum de pluripotence, les blastomères existent dans un état de totipotence. Ce dernier a deux définitions. La plus stricte définit la capacité d'une seule cellule à s'auto-organiser pour former un organisme complet. Cette capacité est celle du zygote et des premiers stades de clivage. Chez la souris et le rat, les blastomères de l'embryon 2-cellules ont encore la possibilité de créer un individu viable une fois séparés (Tarkowski, 1959 ; Matsumoto et al., 1989). Chez les autres espèces, cette perte de totipotence stricte se produit entre les stades 4- et 8-cellules (Moore, 1968 ;

LATS : *large tumor suppressor*

YAP : *Yes1 associated transcriptional regulator*

TAZ : *transcriptional co-activator with PDZ-binding motif* aussi appelé *WW Domain containing transcription regulator 1* (WWTR1)

RBPJ : *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*

NICD : *notch intra-cellular domain*

TEAD : *TEA domain transcription factor*

SOX : *SRY-box transcription factor*

TFAP2 : *transcription factor AP-2*, aussi appelé *activator protein 2* (AP2)

Johnson, 1995 ; Mitalipov, 2002). Il semblerait que le démarrage de l'EGA entraîne une restriction de la totipotence stricte. La deuxième définition de la totipotence est la capacité d'une cellule à se différencier en cellules correspondant à tous les lignages embryonnaires et extra-embryonnaires. Lorsqu'on dissocie des embryons de souris au stade 16-cellules et que l'on reconstitue des embryons avec uniquement des cellules externes ou uniquement des cellules internes, on observe que les deux types d'embryons ainsi reconstitués sont capables de reformer tous les lignages et de produire des blastocystes normaux (Suwiska et al., 2008 ; Posfai et al., 2017). Les cellules sont donc capables de se reprogrammer afin de régénérer les cellules externes et internes. A l'inverse, les cellules d'embryons reconstitués à partir des deux types de cellules mélangées ne se reprogramment pas, mais se réordonnent afin de retourner à leurs positions originelles (Suwiska et al., 2008 ; Posfai et al., 2017). Les cellules externes, à l'origine du TE, perdent leur totipotence à partir du stade 32-cellules, tandis que les cellules internes à l'origine de l'ICM deviennent incapables de produire du TE entre les stades 32- et 64-cellules (Posfai et al., 2017 ; Fig. I8).

Chez l'homme, lorsqu'on dissocie et mélange des cellules de jeunes blastocystes au jour 5, les embryons constitués uniquement de cellules externes ou internes se développent normalement. Lorsque des cellules du TE sont injectés dans l'ICM, elles sont capables de se reprogrammer et de se fondre parmi ces dernières (De Paepe et al., 2013). Une autre publication montre que des ICM d'embryons humain isolés aux jours 6 et 7 sont capable de générer du TE en culture (Guo et al., 2021 ; Fig. I8).

Chez le bovin, l'injection de cellules du TE au jour 7 dans des morulas conduit à ce qu'un tiers de ces cellules participent à la formation de l'ICM. Au jour 14, les cellules du TE ont perdu cette capacité (Berg et al., 2011 ; Fig. I8). De plus, lorsque l'ICM de blastocyste au jour 6.5 est isolé, il est capable de régénérer un blastocyste complet pour donner un veau nouveau-né. Chez la souris, bien que certains ICM isolés au jour 3.5 soient capables de régénérer des blastocystes, aucun n'a pu aboutir à une naissance viable (Kohri et al., 2019).

Capacité de l'ICM puis de l'EPI à générer du TE

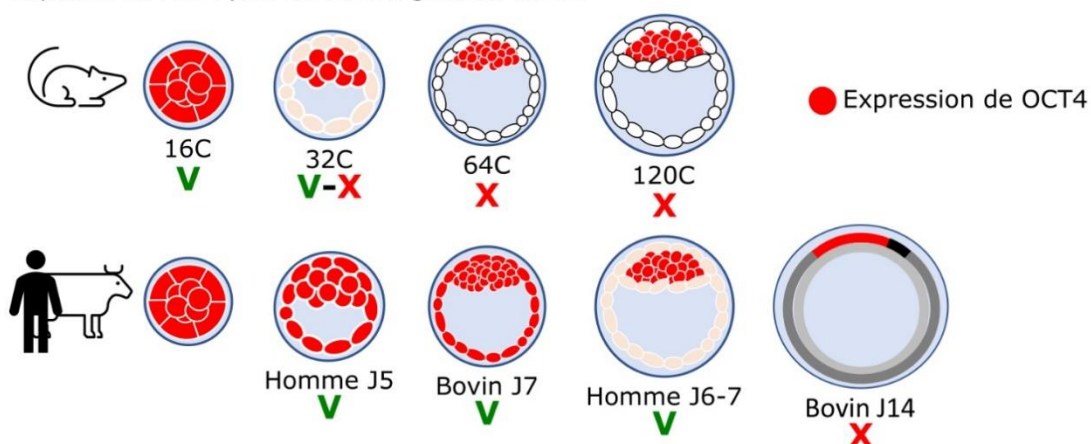


Figure I8 : Comparaison de la plasticité de l'ICM entre la souris d'une part et l'Homme et le bovin d'autre part. Schéma représentant des embryons du stade compaction de la morula jusqu'au stade blastocyste tardif chez la souris, puis chez l'Homme et le bovin. Les marques vertes indiquent que les cellules de l'ICM sont encore capables de former du TE, les croix rouges qu'elles ne le sont plus. L'ICM de la souris perd rapidement la capacité à former du TE, ce qui n'est pas le cas chez l'Homme et le bovin.

Ces différences pourraient être dues à des régulations divergentes de CDX2 et OCT4 entre les mammifères. En effet, chez la souris, la répression de Oct4 ou la surexpression de Cdx2 suffit à induire la différenciation des ESC en cellules du TE (Niwa et al., 2005). De la même manière, Cdx2 est essentiel pour la restriction de l'expression de Nanog et Oct4 dans l'ICM (Strumpf et al., 2005). Cependant, la présence de Cdx2 n'est pas essentielle à la cavitation et à l'apparition du TE (Strumpf et al., 2005 ; Wu et al., 2010). De plus, il a été montré que l'expression d'un transgène GFP sous le contrôle du promoteur du gène OCT4 bovin ne s'éteint pas dans le TE de l'embryon de souris (Berg et al., 2011). Cette particularité est liée à l'absence de locus de liaison aux protéines TFAP2 dans le promoteur du gène *OCT4* chez le bovin. En effet, les protéines TFAP2 sont capables de réprimer l'expression du gène OCT4 par ce domaine de liaison, qui est également absent sur les gènes humain, porcin et de lapin (Berg et al., 2011). Ainsi, la souris aurait acquis une répression du gène de pluripotence *Pou5F1/Oct4* par les facteurs de transcription du TE, tandis que ces derniers sont eux-mêmes réprimés par Oct4 (Niwa et al., 2005 ; Strumpf et al., 2005). Cela expliquerait la restriction rapide de l'expression du gène *Oct4* à l'ICM chez la souris (Niwa et al., 2005). Chez les autres mammifères, l'expression de CDX2 est plus tardive, et la protéine CDX2 est co-localisée pendant un temps avec OCT4 (Chen et al., 2012 ; Bou et al., 2015 ; Liu et al., 2017 ; Simmet et al., 2018). Il est possible que CDX2 soit également capable de réprimer l'expression du gène OCT4 chez les espèces non-murines, mais son expression tardive ainsi que l'absence de co-répression par d'autres facteurs de transcription spécifiques du TE expliqueraient cette co-localisation. L'engagement tardif du TE induit par CDX2 permettrait ainsi une plus grande plasticité entre les lignages chez les espèces non-murines.

Pour conclure, la ségrégation entre le TE et l'ICM a lieu très tôt dans le développement embryonnaire. Le moteur de cette ségrégation est la polarisation des blastomères et l'inactivation subséquente de la voie HIPPO dans les cellules externes de la morula, tandis que dans les cellules internes l'activation de la voie HIPPO permet l'engagement vers l'ICM. Cependant, cet engagement ne devient définitif que plus tard dans le développement embryonnaire. Chez la souris, il a lieu dès la formation du blastocyste, alors que chez les autres espèces cette restriction est décalée dans le temps. Ainsi, malgré un programme commun de ségrégation entre TE et ICM, la dérive entre les développements embryonnaires chez les différentes espèces de mammifères entraîne des divergences dans l'évolution de la potentialité et du transcriptome des cellules embryonnaires.

C. L'apparition de l'état naïf in vivo et la seconde ségrégation de lignage : PE et épiblaste

Suite à la ségrégation entre TE et ICM, les cellules embryonnaires pluripotentes doivent effectuer un deuxième choix de destin cellulaire, cette-fois ci entre le PE qui donnera naissance au sac vitellin et participera également à la formation du DE, et l'épiblaste à l'origine de l'embryon. Chez la souris, il y a d'abord co-expression dans la morula, puis l'ICM, des facteurs de transcription impliqués dans la pluripotences comme Nanog et Sox2 et du marqueur de l'endoderme primitif Gata6 (Plusa et al., 2008 ; Guo et al., 2010 ; Saiz et al., 2016 ; Fig. I9A-B). Par la suite, ce stock de cellules exprimant à la fois Nanog et Gata6 disparaît peu à peu pour faire place à un mélange en « poivre-et-sel » de cellules exprimant uniquement Gata6 ou Nanog, qui seront les précurseurs respectivement du PE et de l'épiblaste (Saiz et al., 2016 ; Kang et al., 2017). Les cellules exprimant Gata6 présentent peu à peu d'autres facteurs de spécification du PE tels que Gata4, Sox17 et Pdgfra, et perdent l'expression de gènes de pluripotence tels que Sox2 et Fgf4 (Guo et al., 2010 ; Ohnishi et al., 2014). L'expression du gène *Oct4* n'est cependant éteinte qu'au jour 4.5 dans le PE, sa présence étant nécessaire auparavant afin d'induire l'expression initiale des gènes de spécification du PE (Aksoy et al., 2013 ; Le Bin et al., 2014). Les cellules exprimant Nanog, quant à elles, maintiennent l'expression des gènes de pluripotence jusqu'à l'implantation (Guo et al., 2010 ; Ohnishi et al., 2014).

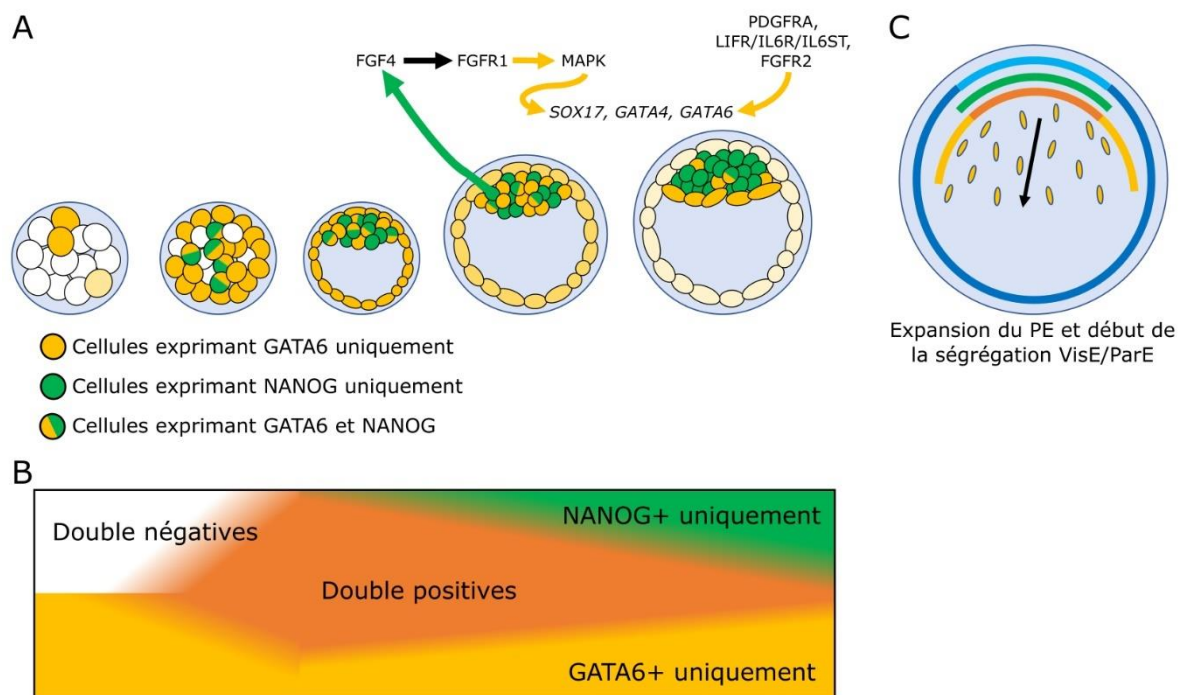


Figure 19 : Mécanismes régulant la ségrégation entre le PE et l'épiblaste. (A) Schéma représentant l'expression de GATA6 et de NANOG dans des embryons du stade morula à blastocyste. (B) Schéma représentant le nombre de cellules exprimant GATA6, NANOG ou les deux au cours du développement embryonnaire. (C) Embryon au stade blastocyste tardif. Les cellules exprimant à la fois GATA6 et NANOG s'engagent peu à peu soit dans le PE soit dans l'épiblaste, et n'expriment plus qu'un seul des deux facteurs de transcription. Par la suite, l'activation de la voie FGF permet la maturation du PE.

PDGFRA : *platelet derived growth factor receptor alpha*

Nanog et Gata6 sont les protéines maîtresses régulant la ségrégation épiblaste/PE chez la souris. En effet, si le gène *Gata6* est supprimé, toutes les cellules de l'ICM expriment Nanog et aucun autre marqueur du PE n'est exprimé (Schrode et al., 2014). A l'inverse, dans les embryons où le gène *Nanog* est inactivé, toutes les cellules de l'ICM expriment Gata6, mais ne sont pas capables d'engager le programme transcriptomique du PE et n'activent pas ou peu les gènes *Sox17* et *Gata4* (Frankenberg et al., 2011). Par la suite, les cellules de l'épiblaste et du PE se séparent pour former un épithélium bilaminaire grâce à une combinaison de mouvements cellulaires, de gain de polarité et d'ancrage des cellules du PE à la surface de l'ICM, qui s'accompagne de l'apoptose des cellules ne s'étant pas correctement différenciées ou localisées (Meilhac et al., 2009 ; Saiz et al., 2013 ; Hashimoto et al., 2019).

Chez les autres espèces, la dynamique de l'expression des protéines GATA6 et NANOG est similaire, avec comme différence le fait que GATA6 reste également présente dans le TE après la cavitation. Ainsi, chez les primates, on observe également une diminution progressive du nombre de cellules exprimant à la fois NANOG et GATA6 et leur ségrégation en poivre-et-sel dans l'ICM, tandis que l'expression de GATA6 dans le TE ne diminue que dans les blastocystes tardifs (Roode et al., 2012 ; Niakan et al., 2013 ; Boroviak et al., 2015 ; Nakamura et al., 2016). C'est aussi le cas chez le porc, le bovin et le lapin (Kuijk et al., 2008 ; Roode et al., 2012 ; Piliszek et al., 2017 ; Ramos-Ibeas et al., 2019).

La co-expression initiale de GATA6 et NANOG nécessite l'implication d'un troisième acteur permettant la rupture de l'équilibre de cette co-localisation et l'engagement dans l'une des deux voies possibles, épiblaste ou PE. Le facteur manquant est l'activation de la voie FGF-ERK dans les cellules du PE. Il a été en effet montré chez la souris, que l'addition de Fgf4 dans le milieu de culture des embryons induit la formation de PE dans l'ICM et ce proportionnellement à la dose utilisée (Yamanaka et al., 2010 ; Fig. I10B). Fgf4 est un ligand de la famille Fgf exprimé spécifiquement dans les cellules pluripotentes de l'ICM précoce, puis de l'épiblaste en même temps que Nanog (Guo et al., 2010 ; Ohnishi et al., 2014). L'addition de Fgf4 sur des embryons dépourvus de Nanog induit l'activation des gènes *Sox17* et *Gata4* dans les cellules exprimant Gata6 (Frankenberg et al., 2011 ; Fig. I9A). De plus, les embryons dans lesquels le gène *Fgf4* a été inactivé par KO perdent progressivement l'expression du gène *Gata6*, dont l'activation est d'abord indépendante du Fgf, puis devient dépendante de ce ligand. L'ajout du ligand Fgf permet de corriger l'expression du gène *Gata6*, jusqu'au point d'obtenir un ICM ne contenant que des cellules exprimant fortement Gata6 (Nichols et al., 2009a ; Kang et al., 2013). A l'inverse, l'ajout d'inhibiteur des récepteurs au Fgf (Fgfr) ou de Mek provoque la disparition des cellules exprimant Gata6 dans l'ICM, résultant en un ICM constitué exclusivement de cellules exprimant Nanog (Chazaud et al., 2006 ; Kang et al., 2017 ; Molotkov et al., 2017 ; Fig I10C).

KO : *knock-out*

PI3K : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase

ETV : *ETS variant transcription factor*

FGFR : *FGF receptor*

Il existe deux Fgfr exprimés dans l'ICM : Fgfr1, qui est exprimé dans toutes les cellules, et Fgfr2, qui n'est exprimé que dans les cellules du PE, de manière anti-corrélé à Fgf4 (Guo et al., 2010 ; Ohnishi et al., 2014). Le fait que Fgfr2 soit exclusivement exprimé dans les cellules précurseurs du PE pourrait laisser penser que c'est son activation qui déclencherait l'engagement des cellules de l'ICM dans le lignage du PE. Cependant, des études basées sur l'inactivation des gènes Fgfr1 et Fgfr2 dans des embryons de souris montrent que c'est l'activation de Fgfr1 par Fgf4 et non celle de Fgfr2 qui permet l'activation de la voie ERK et la mise en route du programme PE dans les cellules exprimant Gata6 de l'ICM (Kang et al., 2017 ; Molotkov et al., 2017 ; Molotkov and Soriano, 2018). Fgfr2 quant à lui régule la survie des cellules du PE, probablement par la voie PI3K (Molotkov and Soriano, 2018). Les cellules précurseurs de l'épiblaste parviennent à échapper à l'induction du lignage PE par Fgfr1 en exprimant des régulateurs négatifs de la voie FGF-ERK en réponse à l'activation de celle-ci, notamment les gènes *Etv4* et 5 (Kang et al., 2017).

La régulation de la ségrégation PE/épiblaste par la voie FGF n'est pas identique chez les différentes espèces de mammifères. Chez le bovin et le marmouset, le traitement par un inhibiteur de MEK provoque également une diminution du nombre de cellules exprimant GATA6, sans pour autant entraîner leur disparition totale même à forte concentration (Kuijk et al., 2012 ; Boroviak et al., 2015). C'est aussi le cas chez le porc, où on observe une diminution mais pas une disparition des cellules exprimant GATA4 (Rodriguez et al., 2012 ; Fig. I10C). En revanche, chez l'Homme le traitement par un inhibiteur de MEK n'a pas d'effet sur le nombre de cellules exprimant GATA6 et GATA4, mais entraîne une réduction de la taille de l'ICM de manière globale (Kuijk et al., 2012 ; Roode et al., 2012 ; Molè et al., 2021). C'est aussi le cas chez le lapin, où l'inhibiteur de MEK n'a pas d'effet sur le nombre de cellules

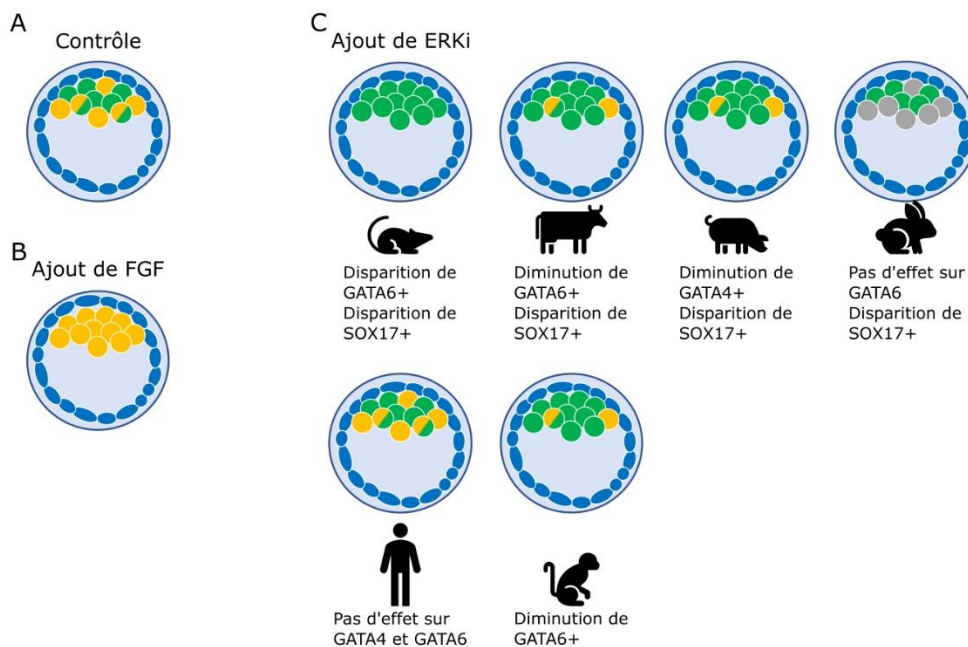


Figure I10 : Comparaison de l'impact de la voie FGF-ERK sur la ségrégation entre le PE et l'épiblaste chez différents mammifères. Schéma représentant (A) un blastocyste normal ; (B) un blastocyste après traitement au FGF ; (C) des blastocystes de différents mammifères après traitement avec un inhibiteur de ERK. En jaune les cellules du PE, en vert les cellules de l'épiblaste. Dans toutes les espèces où l'analyse a été réalisée, l'addition de FGF entraîne la différenciation de toutes les cellules de l'ICM en PE. En revanche, l'inhibition de la voie ERK a des effets plus ou moins délétère sur le PE selon l'espèce considérée.

exprimant GATA6 (Piliszek et al., 2017). Chez le bovin, le porc et le lapin, le traitement par l'inhibiteur de MEK entraîne la disparition des cellules exprimant SOX17 (McLean et al., 2014 ; Piliszek et al., 2017 ; Ramos-Ibeas et al., 2019). A l'inverse, chez ces mêmes espèces, l'ajout de FGF4 provoque une différenciation des cellules de l'ICM en PE, jusqu'au point où l'ICM n'est plus constitué que de cellules du PE, comme chez la souris (Kuijk et al., 2012 ; Rodriguez et al., 2012 ; Piliszek et al., 2017 ; Fig. I10B).

Cela ne semble pas être le cas chez les primates. En effet, même si on observe l'expression de FGF4 de manière spécifique dans les progéniteurs de l'épiblaste l'expression de FGFR1 et 2 dans l'ICM (Nakamura et al., 2016 ; Boroviak et al., 2018 ; Stirparo et al., 2018), l'ajout des ligands FGF2/4 sur des embryons humains aux jours 6 à 8 n'entraîne pas de déplétion de l'épiblaste et d'invasion du PE. Au contraire, cet ajout semble réduire l'hétérogénéité du nombre de cellules de l'épiblaste et du PE habituellement observée dans les embryons (Molè et al., 2021). Il est possible cependant qu'à ce stade les cellules de l'épiblaste ne soient plus sensibles à l'activation de la voie FGF, la phase de ségrégation entre le PE et l'épiblaste s'étendant chez l'Homme entre les jours 4 à 7 environ (Wamaitha and Niakan, 2018). Il est donc possible qu'il existe une conservation de l'induction du PE par l'activation de la voie FGF-ERK chez toutes les espèces.

En effet, chez la souris, l'expression initiale de Gata6 n'est pas sous le contrôle de la voie Fgf. Ainsi il se pourrait que, chez les autres espèces, l'expression de Gata6 et le déclenchement du programme PE soient moins dépendants de la voie FGF, et davantage portés par d'autres voies impliquées dans la régulation du PE, telles que les voies BMP, PDGFRA ou IL6/LIF-STAT3 (Artus et al., 2013 ; Graham et al., 2014 ; Morgani et al., 2015). D'autres voies de signalisation pourraient également avoir un effet sur la ségrégation du PE et de l'épiblaste chez les espèces non-murines. Il a été montré que l'inhibition de la voie WNT chez le marmouset entraîne des perturbations dans la restriction de l'expression des gènes régulant l'engagement dans les différents lignages (Boroviak et al., 2015). L'inhibition de la voie ACTIVINE/NODAL chez le porc et le marmouset entraîne également une réduction du nombre de cellules exprimant NANOG, tandis que chez l'homme cela entraîne l'ablation de l'ICM (Boroviak et al., 2015 ; Blakeley et al., 2015 ; Ramos-Ibeas et al., 2019).

De manière intéressante, les cellules du PE et de l'épiblaste finissent par devenir peu à peu insensibles aux modulations de la voie Fgf (Saiz et al., 2016 ; Kang et al., 2017). Cette insensibilité coïncide avec la perte de la capacité des cellules de l'épiblaste et du PE à contribuer aux trois lignages embryonnaires quand elles sont injectées dans des embryons murins au stade 8-cellules. On observe également la restriction de l'expression du facteur de transcription Oct4 à l'épiblaste à ces stades (Grabarek et al., 2012). Ainsi, la perte de potentialité est corrélée à la restriction progressive de l'expression de Oct4 au lignage pluripotent, aussi bien pour la ségrégation TE/ICM que PE/épiblaste. Si la disparition progressive de Oct4 dans les lignages extra-embryonnaires peut expliquer directement la perte de potentialité, quand est-il des lignages pluripotents ? Il semblerait qu'il y est un lien entre activation de la voie Fgf et restriction de potentialité. Lorsqu'on isole des cellules de l'ICM au stade 32-

IL : *interleukine*

cellules, elles sont capables de reformer du TE autour d'elles (Wigger et al., 2017). Nous avons pu voir précédemment qu'elles n'ont pas encore perdu leur compétence à former du TE. Dans les stades plus tardifs, l'ICM ne peut plus produire du TE lorsqu'il est isolé, et s'entoure à la place de PE. En revanche, lorsqu'on soumet ces ICM à des inhibiteurs de Mek, ils regagnent leur capacité à former du TE. Ainsi, l'acquisition de la sensibilité à la voie Fgf, permettant la ségrégation entre PE et épiblaste, est lié à la perte de potentialité à former le TE (Wigger et al., 2017).

En conclusion, la restriction progressive de l'expression du gène OCT4 sous l'effet de l'engagement des cellules embryonnaires vers le TE, puis du PE, entraîne une diminution de la potentialité des cellules. Ce phénomène semble partagé par toutes les espèces de mammifères, bien que des études supplémentaires, notamment chez le lapin et les primates, soient nécessaires pour pouvoir conclure. De plus, le lien entre potentialité des cellules embryonnaires et expression du gène OCT4 n'a pas encore été directement établi, d'autant que les cellules pluripotentes de l'embryon voient leur potentialité se réduire malgré l'expression continue de OCT4. L'expression des différents acteurs de la voie FGF-ERK est commune, mais chaque espèce réagit de manière différente aux modulations de cette voie. Ce phénomène peut être expliqué par la dérive génétique, qui conduit à une modification des affinités entre récepteurs-ligands et à des variations dans le panel de gènes dont l'expression est activée par diverses voies de signalisation, comme c'est le cas pour la régulation de l'expression de OCT4 par le facteur de transcription TFAP2. Ces différences interspécifiques dans la ségrégation précoce des lignages exercent une influence sur la régulation du continuum de pluripotence précoce, et doivent donc être prises en compte dans la recherche de la capture *in vitro* de l'état naïf de pluripotence chez les espèces non-murines.

D. Progression de l'épiblaste dans le continuum de pluripotence et sortie de l'état naïf

Chez la souris, au moment de l'implantation l'épiblaste se contracte, cavite et forme un épithélium autour de cette cavité. En parallèle, une partie du TE polaire va également caviter, et les cavités formées par les des deux tissus fusionnent entre-elles pour former la cavité pré-amniotique. Le PE crée une niche en sécrétant des protéines de la matrice extra-cellulaire (ECM), qui servira de membrane basale pour la polarisation et l'épithélialisation de l'épiblaste au moment de l'implantation. Ce stade précédent la cavitation de l'épiblaste est appelé stade rosette (Bedzhov and Zernicka-Goetz, 2014). C'est à ce moment qu'à lieu la sortie de l'état naïf dans l'embryon de souris. Chez les primates, un phénomène de cavitation se produit également au moment de l'implantation. Cependant, contrairement à la souris, seul l'épiblaste cavite. La partie accolée au TE de l'épiblaste cavité formera par la suite l'amnios. Chez la plupart des mammifères cependant, l'implantation a lieu plus tardivement, au moment où l'épiblaste entre en gastrulation. Chez ces mammifères, le TE polaire est dégradé avant l'implantation, mettant l'épiblaste à nu. Les auteurs de cette étude ont démontré que la disparition du TE polaire chez le bovin permet d'empêcher ce dernier de perturber la polarisation

ECM : *extra-cellular matrix*

de l'embryon (Van Leeuwen et al., 2020). En effet, un contact direct entre l'épiblaste et le TE polaire entraîne des malformations de l'axe antéro-postérieur. Les auteurs spéculent que l'absence de disparition du TE polaire serait dû à un décalage de l'implantation chez les mammifères s'implantant précocement. En effet, chez le lapin et la souris, la gastrulation commence au jour 6.5. Cependant, l'embryon de souris s'implante au jour 5.0, alors que celui du lapin s'implante au jour 6.5. Au jour 5.0, le TE polaire est encore présent chez le lapin, et ce n'est qu'après que sa dégradation commencera. Chez les primates et les rongeurs, la cavitation de l'épiblaste serait apparue de manière indépendante comme mécanisme compensant le décalage de l'implantation. Cette hypothèse est étayée par l'absence de cavitation précoce de l'épiblaste et la présence d'une dégradation du TE polaire chez les rongeurs et les primates les plus basaux dans l'arbre phylogénétique de ces clades (respectivement chez les écureuils et les Tarsiers) (Van Leeuwen et al., 2020 ; Fig. I11).

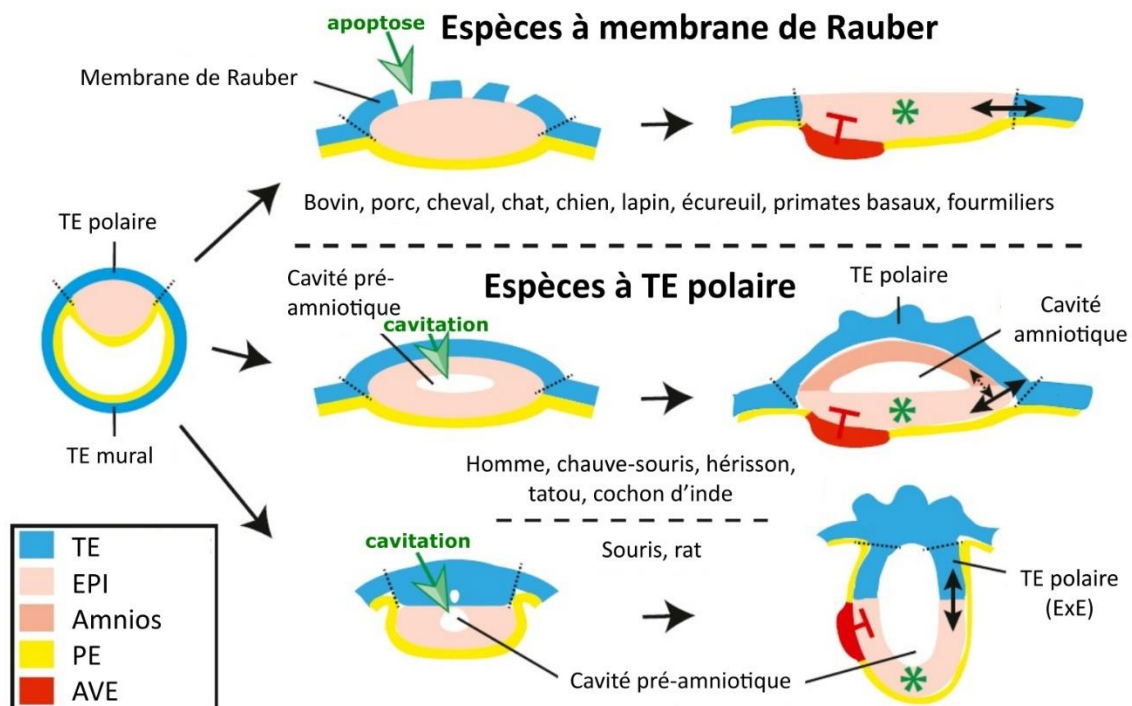


Figure I11 : Comparaison des stratégies restreignant l'interaction entre le TE et l'épiblaste à la bordure de ce dernier. Les flèches vertes indiquent le mécanisme employé pour séparer le TE polaire de l'EPI et empêcher leur interaction (double-flèches noires). Les astérisques verts indiquent le centre de l'EPI, dénué de signaux. Dans les espèces à membrane de Rauber, telles que le lapin, le TE polaire entre en apoptose et l'EPI est ainsi mis à nu. Dans les espèces à TE polaire, l'épiblaste s'invagine pour former la cavité pré-amniotique, le séparant ainsi du TE polaire. Adapté d'après Van Leeuwen et al., 2020. EPI : épiblaste.

Chez la souris, il existe un mécanisme permettant de bloquer la sortie de l'état naïf. Ce mécanisme, appelé diapause embryonnaire, consiste en l'arrêt transitoire du développement embryonnaire (Renfree and Fenelon, 2017). La diapause est déclenchée par la production d'hormones dans l'utérus due à l'allaitement de la portée précédente. Ces hormones déclenchent l'entrée en quiescence du blastocyste au stade équivalent au jour 4.5 (Mantalenakis and Ketchel, 1966 ; Yoshinaga

and Adams, 1966). Après plusieurs jours, le développement reprend et l'embryon de souris s'implante. Cet état peut être provoqué par l'utilisation d'inhibiteurs de la voie Tor (Bulut-Karsliogu et al., 2016). La plupart des autres espèces de mammifères n'ont pas de diapause embryonnaire (Renfree and Fenelon, 2017).

La sortie de l'état naïf chez la souris s'accompagne d'une diminution de l'expression de *Nanog* qui finit par disparaître complètement, comme celle d'autres gènes impliqués dans la pluripotence naïve tels que *Esrrb*, *Zfp42* et *Klf4* (Mohammed et al., 2017 ; Shahbazi et al., 2017 ; Kalkan et al., 2017 ; Neagu et al., 2020 ; Fig. I12). D'autres facteurs de transcription comme *Otx2* et *Oct6* commencent à être exprimés (Mohammed et al., 2017 ; Kalkan et al., 2017 ; Fig. I12). Ces derniers permettent le maintien de l'identité de l'épiblaste plus tard dans le développement embryonnaire en interagissant avec *Sox2* et *Oct4* (Iwafuchi-Doi et al., 2012). En parallèle, les cellules de l'épiblaste remodelent leur chromatine et les marques épigénétiques répressives s'accumulent. Dans l'épiblaste, au moment de l'implantation, l'expression des ADN-méthyltransférases de novo *Dnmt3A* et *B* augmente. Cette augmentation corrèle avec l'élévation de la méthylation de l'ADN dans l'épiblaste, ainsi qu'avec la diminution de l'expression de l'ADN-déméthylase *Tet2* (Auclair et al., 2014 ; Kalkan et al., 2017 ; Neagu et al., 2020 ; Fig. I12). Un autre exemple d'accumulation de marques répressives au moment de l'implantation est l'inactivation aléatoire de l'un des chromosomes X dans les cellules de l'épiblaste d'embryons femelles (Lyon, 1961 ; Okamoto et al., 2004 ; Mohammed et al., 2017). Ainsi, le remodelage du réseau de transcription régulant la pluripotence s'accompagne de l'accumulation d'hétérochromatine lors de la sortie de l'état naïf dans l'épiblaste péri-implantatoire.

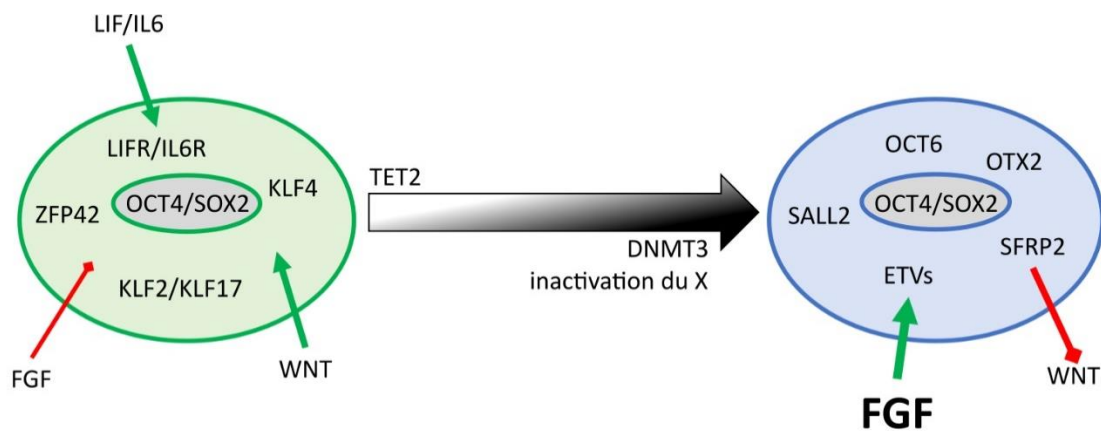


Figure I12 : La sortie de l'état naïf. Schéma représentant les changements dans les réseaux de gène et les voies de signalisation soutenant la pluripotence à la sortie de l'état naïf. La flèche indique le gain progressif d'hétérochromatine.

TOR : *target of rapamycin*

ESRRB : *estrogen related receptor beta*

ZFP42 : *zinc finger protein 42*, aussi appelé REX1

KLF : *kruppel like factor*

DNMT : *DNA-methyltransferase*

TET : *ten-eleven translocation*

La voie Fgf chez la souris ne restreint la potentialité des cellules embryonnaires qu'au moment de la ségrégation PE/épiblaste. En effet, la délétion du gène *Fgfr1* dans l'ICM entraîne la surexpression de Nanog jusqu'au jour 4.5 dans l'ICM (Nichols et al., 2009a ; Kang et al., 2017 ; Molotkov et al., 2017). Or, à ce moment-là les cellules pluripotentes de l'embryon de souris commencent à réprimer l'expression de Nanog avant l'implantation (Chambers et al., 2003). Les ESC dérivées d'épiblastes n'exprimant pas *Fgfr1* ont en plus des difficultés à se différencier dans les lignages neuronaux, ectodermique non-neuronal, et mésodermiques (Molotkov et al., 2017). L'inhibition de Mek entraîne également l'arrêt du développement de l'épiblaste, en empêchant sa cavitation, et la répression de Nanog et Klf4 (Neagu et al., 2020 ; Fig. I13). La voie Fgf-Erk n'est pas la seule influençant la transition entre pluripotences naïve et amorcée. L'inhibition de la voie Wnt ou la délétion du facteur de transcription Tct7l1, un effecteur de la voie Wnt, provoque la formation prématurée de rosettes, ainsi que l'expression précoce du gène *Otx2* (Neagu et al., 2020). *Otx2* est un facteur de transcription essentiel dans la polarisation et la cavitation de l'épiblaste (Shahbazi et al., 2017). Sa surexpression permet la formation de rosette même en absence d'activation de la voie Wnt (Neagu et al., 2020).

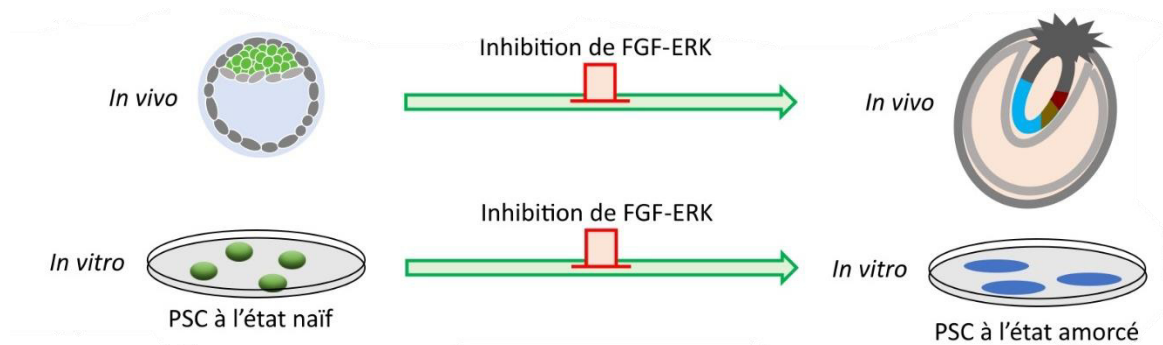


Figure I13 : La sortie de l'état naïf et la voie FGF. Schéma représentant le blocage de la progression du continuum de pluripotence *in vitro* et *in vivo* par l'inhibition de la voie FGF-ERK.

TCF7L1 : *transcription factor 7 like 1*, aussi appelé *transcription factor 3* (TCF3)

Chez les primates, humains et non-humains, la difficulté d'obtention d'embryons aux stades péri-implantatoires explique le manque de connaissance sur ces derniers. Néanmoins, le développement récent de techniques de culture d'embryons aux stades post-implantatoires a permis d'en apprendre plus sur la transition naïve-amorcée chez les primates. Contrairement à la souris, le gène *NANOG* n'est jamais réprimé dans l'épiblaste chez les primates (Nakamura et al., 2016 ; Niu et al., 2019 ; Ma et al., 2019 ; Xiang et al., 2020 ; Molè et al., 2021). Les gènes régulant la pluripotence naïve, quant à eux, sont réprimés au moment de l'implantation, avec quelques différences par rapport à la souris. *ESRRB* est réprimé plus précocement, dès la formation de l'épiblaste. De plus, les gènes spécifiques de l'ICM et de l'épiblaste précoce murin, *KLF2*, *BMP4* et *NROB1*, ne sont jamais exprimés (Blakeley et al., 2015 ; Mohammed et al., 2017 ; Boroviak et al., 2018 ; Xiang et al., 2020). A l'inverse, *KLF17*, *TFAP2C*, et *IL6R* sont exprimés dans l'épiblaste précoce chez les primates mais pas chez la souris (Blakeley et al., 2015 ; Boroviak et al., 2018 ; Xiang et al., 2020). Parmi les gènes dont l'expression augmente au moment de la transition de l'épiblaste, *OTX2* n'est exprimé que très faiblement chez le macaque et l'Homme (Zhou et al., 2019 ; Niu et al., 2019 ; Ma et al., 2019 ; Molè et al., 2021). Chez le porc, une récente analyse a montré que *KLF17* et *IL6R* sont également exprimés dans l'épiblaste précoce avant d'être réprimés, tandis que l'expression de *KLF2* n'est pas détectée (Ramos-Ibeas et al., 2019). De la même manière, *OTX2* est très faiblement exprimé dans l'épiblaste de l'embryon de porc, même si cela pourrait être dû au fait que son expression augmente à des stades plus tardifs (Ramos-Ibeas et al., 2019).

Ces observations illustrent une divergence entre la souris et les autres mammifères dans l'expression des gènes régulant la pluripotence *in vivo*. En revanche, les gènes associés à la sortie de la pluripotence naïve, tels que *SALL2*, *SOX11*, et *SFRP2*, ainsi que les *DNMT3A* et *B*, sont sur-exprimés dans l'épiblaste tardif aussi bien chez les primates que chez le porc (Nakamura et al., 2016 ; Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Xiang et al., 2020 ; Molè et al., 2021). Malgré ces différences, il n'est pas impossible qu'il existe une conservation des mécanismes de sortie de la pluripotence naïve. En effet, les *FGFR* sont surexprimés dans l'épiblaste post-implantatoire chez l'homme et le porc (Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Molè et al., 2021), ainsi que leurs cibles en aval de la voie ERK, *ETV1* et *ETV4* chez les primates (Nakamura et al., 2016 ; Boroviak et al., 2018). *TCF7L1* est également surexprimé dans l'épiblaste tardif chez les primates (Nakamura et al., 2016 ; Molè et al., 2021). Enfin, *SFRP2*, un inhibiteur de la voie WNT, est surexprimé dans l'épiblaste tardif aussi bien chez la souris que chez les autres espèces (Nakamura et al., 2016 ; Mohammed et al., 2017 ; Molè et al., 2021).

De plus, il semble y avoir un programme épigénétique commun à la sortie de pluripotence naïves chez les mammifères. L'inactivation du chromosome X chez le porc, l'Homme et le lapin suit une cinétique similaire à celle de la souris, malgré des divergences dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des chromosomes X avant leur inactivation entre ces espèces. Bien qu'il existe des

NROB1 : nuclear receptor subfamily 0 group B member 1, aussi connu sous le nom de *DSS-AHC critical region on the X chromosome protein 1* (DAX1)

SALL : spalt like transcription factor

SFRP : secreted frizzled related protein

divergences dans les moments stades d'implantation, qui a lieu plus tardivement chez le lapin et le porc par rapport aux primates et aux rongeurs, l'inactivation aléatoire de l'un des chromosomes X dans les embryons femelles se produit progressivement et se termine à des stades équivalents à l'épiblaste post-implantatoire chez la souris (Okamoto et al., 2011 ; Petropoulos et al., 2016 ; Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Zhou et al., 2019). De même, comme souligné précédemment, chez tous les mammifères dont le transcriptome de l'épiblaste est connu au moment de la sortie de l'état naïf, on constate la surexpression des *DNMT3A* et *B* (Mohammed et al., 2017 ; Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Neagu et al., 2020 ; Molè et al., 2021), associée à l'augmentation de la méthylation de l'ADN chez la souris et l'homme (Auclair et al., 2014 ; Zhou et al., 2019).

E. Polarisation de l'épiblaste et ségrégation des lignages germinaux

Suite à l'implantation, l'épiblaste commence à se régionaliser pour pouvoir ensuite former la lignée germinale, ainsi que les précurseurs des trois feuilletts embryonnaires. Cette régionalisation débute par la formation de l'axe antéro-postérieur, qui sépare d'un côté l'épiblaste antérieur à l'origine du neuro-ectoderme, et de l'autre l'épiblaste postérieur à l'origine de la lignée germinale, du mésoderme et de l'endoderme. La polarisation de l'épiblaste est induite par le VisE, issu de la maturation du PE sous-jacent. Le reste du PE adjacent au TE devient quant à lui le ParE, et forme un épithélium tout autour du blastocœle. Chez la souris, suite à l'implantation, le VisE va couvrir l'épiblaste ainsi que l'ExE, issu du TE polaire. L'ensemble VisE, ExE et épiblaste est appelé ovocylindre. L'Exe sécrète des ligands de la famille Bmp, qui permettent l'expression et la sécrétion de Nodal par l'épiblaste adjacent, qui lui-même stimule de manière réciproque stimuler l'expression de Bmp dans l'ExE (Brennan et al., 2001 ; Ben-Haim et al., 2006 ; Fig. I14A). La sécrétion de Bmp inhibe la formation du DVE (Brennan et al., 2001 ; Soares et al., 2005 ; Rodriguez et al., 2005 ; Yamamoto et al., 2009). La prolifération de l'épiblaste et du VisE entraîne l'élongation de l'ovocylindre, ce qui crée un gradient de Bmp4. Cela permet l'apparition du DVE à la pointe la plus distal du VisE (Fig. I14A).

Les cellules du DVE sécrètent alors les inhibiteurs des voies Wnt et Nodal, Cerberus (CER1), Lefty, et Dkk1, puis commencent à migrer (Yamamoto et al., 2004 ; Torres-Padilla et al., 2007b ; Morris et al., 2012 ; Fig. I14A). Le DVE est alors appelé AVE, et la migration cellulaire marque la polarisation du VisE. Les inhibiteurs des voies Wnt et Nodal par l'AVE entraîne la polarisation de l'épiblaste, et l'activation de ces voies dans l'épiblaste postérieur entraîne l'expression de Tbx3 et Eomes (Thomas et al., 1998 ; Rivera-Perez et al., 2005 ; Tam and Loebel, 2007). Tbx3 et Eomes répriment le programme transcriptomique de la pluripotence et de la différenciation en neuroectoderme, entraînant la sortie de la pluripotence et l'engagement de l'épiblaste postérieur dans les lignages de la lignée germinale, du mésoderme et du DE (Tosic et al., 2019). La polarisation de l'épiblaste, en entraînant également la

CER1 : *cerberus 1*

LEFTY : *left-right determination factor*

DKK1 : *dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1*

TBXT : *T-box transcription factor T*, aussi connu sous les noms de T et de Brachyury

surexpression de ligands des voies Wnt, Bmp, Nodal et Fgf dans l'épiblaste postérieur, conduit à l'activation de ces différentes voies de signalisation conduit à la sortie graduelle de l'épiblaste postérieur de la pluripotence et à la génération des précurseurs de la lignée germinale, puis lors de la gastrulation du mésoderme et du DE (Tam and Loebel, 2007).

Chez les autres mammifères euthériens, ce mécanisme semble être conservé chez un grand nombre d'espèces. En effet, il a été montré chez le lapin, le porc et la musaraigne que la sécrétion de ligands BMP par les tissus adjacents à l'épiblaste et au VisE entraîne l'apparition du DVE au cœur du VisE (Hopf et al., 2011 ; Yoshida et al., 2016 ; Fig. I14C). Le déplacement de l'AVE et sa sécrétion des inhibiteurs de CER1, DKK1 et LEFTY conduit à la polarisation de l'expression de TBXT chez ces mêmes espèces (Hopf et al., 2011 ; Yoshida et al., 2016) et chez le bovin (Van Leeuwen et al., 2015). Chez le lapin, l'ablation du VisE dans des embryons de 6 jours en culture entraîne l'expression aberrante de TBXT (Idkowiak et al., 2004a). Chez l'Homme, CER1 est exprimé dans le DVE des embryons péri-

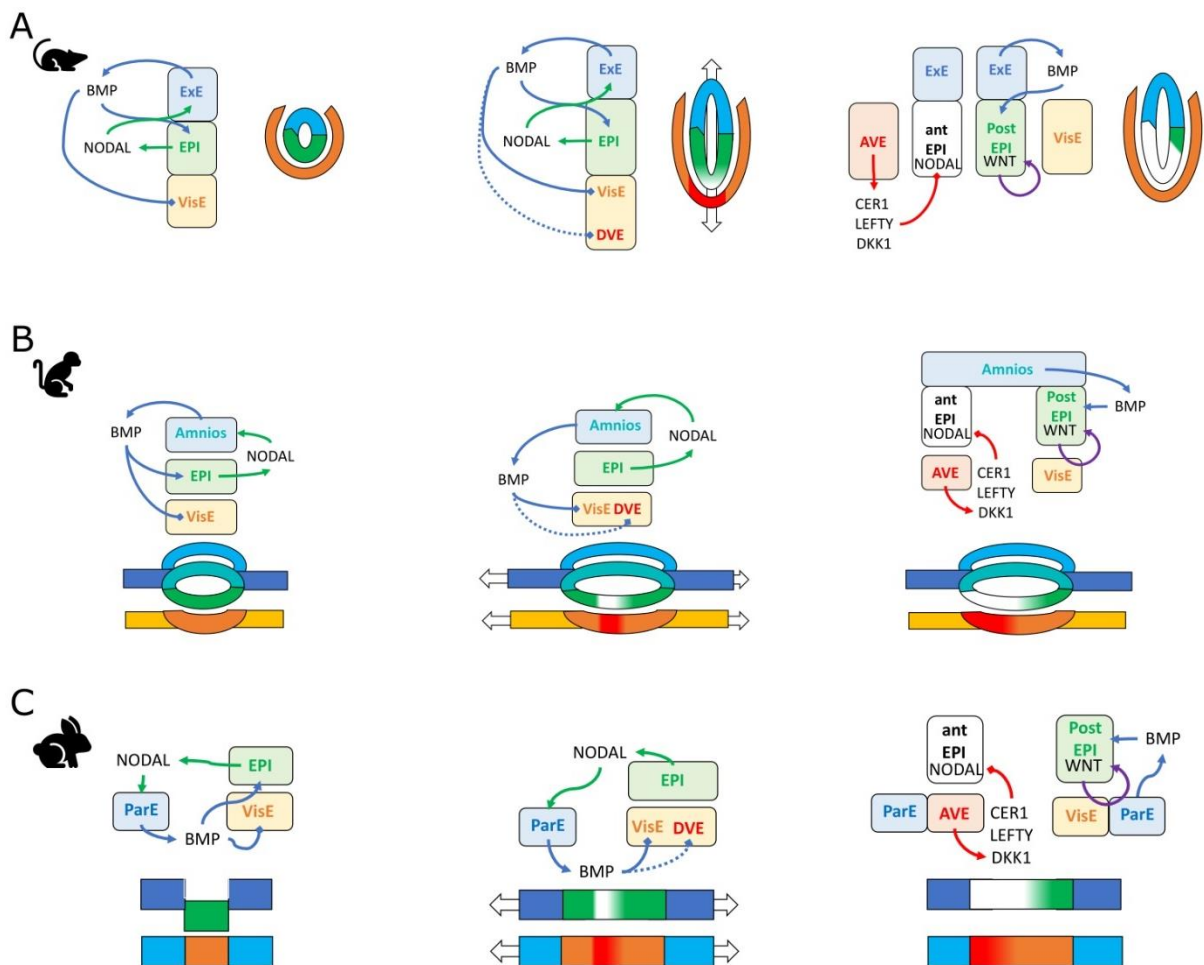


Figure I14 : Comparaison de l'acquisition de l'axe antéro-postérieur. Schéma représentant la polarisation de l'EPI en trois étapes : 1 – Les tissus extra-embryonnaires stimulent la production de NODAL par l'EPI. NODAL va ensuite stimuler l'expression de BMP, qui inhibe l'apparition du DVE. 2 – la croissance de l'embryon entraîne l'étirement de l'épiblaste et du VisE. Cela éloigne le centre du VisE de la zone d'activité de BMP, ce qui permet l'apparition du DVE. 3 – Le DVE migre d'un côté de l'embryon et sécrète des inhibiteurs des voies NODAL, BMP et WNT. Cela restreint l'activité de ces voies dans l'EPI à l'opposé de l'AVE, zone qui devient l'EPI postérieur, chez la souris (A), les primates (B) et les espèces à membrane de Rauber, comme le lapin (C). En bleu les tissus extra-embryonnaires adjacents à l'EPI, en vert l'EPI, en orange le VisE, et en rouge le DVE puis l'AVE. EPI : épiblaste.

implantatoires, puis son expression se polarise dans le VisE (Xiang et al., 2020 ; Molè et al., 2021). CER1 est co-exprimé avec divers inhibiteurs des voies WNT, NODAL et BMP (Molè et al., 2021). Chez le macaque, CER1 est lui aussi exprimé dans le VisE, et son expression se polarise au fur et à mesure du développement. La polarisation de l'expression de CER1 et de DKK1 coïncide avec l'expression de BMP4 par l'amnios (Fig. 14B, 15B). La polarisation de l'épiblaste suit celle du VisE, avec l'expression dans l'épiblaste postérieur de BMP4, MIXL1, EOMES et NODAL (Sasaki et al., 2016).

Suite à la polarisation de l'épiblaste, l'épiblaste postérieur passe par une période transitoire de permissivité à la formation de la ligné germinale. Chez la souris, la sécrétion de Bmp par l'ExE entraîne la formation d'un gradient proximo-distal dans l'épiblaste. Autour du jour 5.5, l'apparition du DVE puis sa migration pour former l'AVE entraîne la sécrétion d'inhibiteurs de Wnt et Bmp, ce qui restreint leur action à l'épiblaste postérieur. L'action combinée de Wnt3, produit par l'épiblaste postérieur, et d'un niveau élevé de Bmp produit par l'ExE, entraîne la production de cellules germinales primordiales (PGC) (Ohinata et al., 2009 ; Fig. 115) et l'expression consécutive de Blimp1, Prdm14, et Tfap2c (Ohinata et al., 2005 ; Yamaji et al., 2008 ; Weber et al., 2010 ; Ohinata et al., 2009). Les PGC expriment également des facteurs de transcription régulant la pluripotence, dont Oct4, Sox2 et Nanog (Kurimoto et al., 2008). L'activation des gènes de pluripotence, ainsi que d'autres régulateurs, permet la reprogrammation épigénétique des cellules de l'épiblaste postérieur (Seki et al., 2007). Cette période de permissivité de production de PGC par l'épiblaste a été testé *in vivo* chez la souris et dure du jour 5.5 jusqu'au jour 6.5, au moment où commence la gastrulation (Ohinata et al., 2009).

L'activation des voies Wnt et Bmp induit également la différenciation de l'épiblaste en mésoderme (Morgani et al., 2018), il y a donc un changement dans la réponse à ces voies de signalisation dans l'épiblaste postérieur au moment où débute la gastrulation. Les mécanismes entraînant ce changement sont encore aujourd'hui inconnus. Chez les autres mammifères, on sait relativement peu de chose sur l'apparition de la ligné germinale et sur la durée de la période de compétence de l'épiblaste à générer des PGC, étant donné la difficulté d'obtenir des embryons dans les stades péri- et post-implantatoire précoce. Chez le macaque cynomolgus, une étude montre que les PGC sont originaires de l'amnios dorsal puis postérieur, et qu'elles migrent ensuite vers l'épiblaste postérieur au moment où débute la gastrulation. Cette étude n'exclue cependant pas la potentielle participation de l'épiblaste postérieur à la lignée germinale (Sasaki et al., 2016). De manière intéressante, au moment où les premières PGC apparaissent dans l'amnios, ce dernier est similaire à l'épiblaste postérieur de la souris : il exprime les protéines OCT4, NANOG, TBXT, BMP4 et WNT3A, mais pas SOX2. Au moment de la spécification des PGC et de leur migration postérieure, l'amnios perd l'expression de OCT4, NANOG et TBXT, et celle de BMP4 se restreint à la partie postérieure de l'amnios. En même temps, l'épiblaste commence à exprimer TBXT dans sa partie postérieure (Sasaki et al., 2016).

MIXL1 : *mix paried-like homebox 1*

BLIMP1 : *B-lymphocyte-induced maturation protein 1*, aussi appelé *PR/SET domain 1* (PRDM1)

PRDM14 : *PR/SET domain 14*

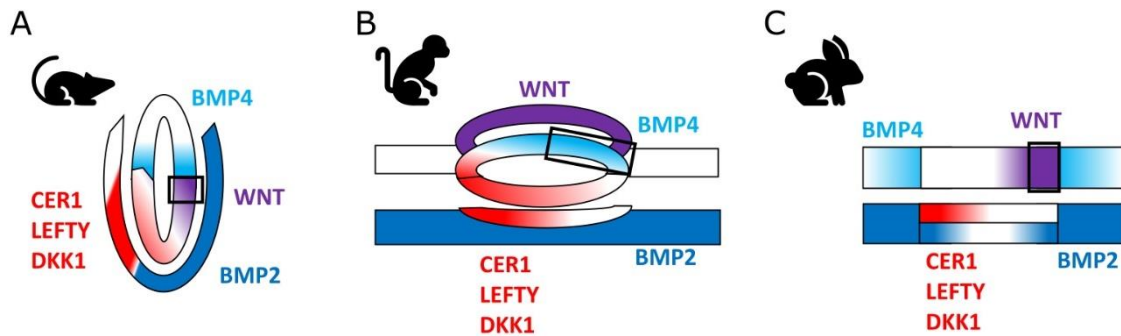


Figure I15 : Création de la niche permettant l'apparition de la lignée germinale. Schéma représentant la localisation de l'activité des différentes voies de signalisation contrôlant l'apparition de la lignée germinale, chez les rongeurs (A), les primates (B), et les espèces à membrane de Rauber (C). Les rectangles noirs représentent la zone où les PGC peuvent apparaître, soit en présence d'une forte concentration des ligands BMP2, BMP4 et WNT.

Chez le porc et le lapin, les PGC apparaissent comme chez la souris dans la partie la plus postérieure de l'épiblaste (Hopf et al., 2011 ; Kobayashi et al., 2017 ; Fig. I15). Chez le porc et les primates, les PGC expriment *SOX17* à la place de *SOX2* (Irie et al., 2015 ; Sasaki et al., 2016 ; Kobayashi et al., 2017). *SOX17* est exprimé avant *BLIMP1* chez ces espèces, alors que chez la souris *BLIMP1* précède l'expression de *SOX2* (Campolo et al., 2013 ; Irie et al., 2015 ; Kobayashi et al., 2017). Chez le lapin, il est possible que *SOX17* joue aussi un rôle dans l'apparition des PGC. En effet, des cellules exprimant *SOX17* sont détectées dans la partie la plus postérieure de l'épiblaste dès le jour 6.25 (Hassoun et al., 2009). C'est également autour des jours 6.25 et 6.5 qu'apparaissent les premières PGC exprimant *BLIMP1* au même emplacement (Hopf et al., 2011). Chez toutes ces espèces, les PGC apparaissent dans une niche environnementale où il existe une forte présence des ligands BMP et WNT (Hopf et al., 2011 ; Sasaki et al., 2016 ; Kobayashi et al., 2017 ; Fig. I15). Chez le porc, il a été démontré que l'épiblaste postérieur est compétent pour former la lignée germinale entre les jours 11 et 12 sous l'induction de BMP. L'utilisation d'inhibiteur de WNT ou de BMP bloque cette induction (Kobayashi et al., 2017). Chez l'Homme et le macaque cynomolgus, un modèle *in vitro* d'épiblaste en gastrulation montre un pic de compétence à la formation de PGC suite à une induction par BMP réalisée 12h après l'activation des voies WNT et NODAL dans des PSC à l'état amorcé. Passé ce temps, l'induction par BMP entraîne la formation de mésoderme, tandis que l'activine A et un inhibiteur de BMP entraîne leur différenciation en DE (Kobayashi et al., 2017). Ces différentes études révèlent un programme commun d'induction de la lignée germinale à partir d'un tissu qui a déjà commencé à sortir de la pluripotence (amnios ou épiblaste postérieur ; voir Fig. I15).

F. Ségrégation des feuillet germinaux et sortie de la pluripotence

Entre les jours 6.25 et 6.5, l'activation de *Fgfr1* entraîne l'invagination de l'épiblaste et la formation de la ligne primitive chez la souris (Deng et al., 1994). L'expression de *Nodal* se restreint alors à la partie antérieure de la ligne primitive, qui devient le nœud de Hensen. Cette restriction est due à l'inhibition de l'expression de *Nodal* par les ligands *Bmp* produits par l'ExE dans la partie la plus postérieure de l'épiblaste (Pereira et al., 2012). L'activation de *Nodal* entraîne l'expression d'inhibiteurs des voies *Wnt*, *Nodal* et *Bmp* dans le nœud de Hensen. Ceux-ci vont : 1. Participer à la restriction de l'activité de la voie de signalisation *Nodal* au nœud de Hensen et créer un gradient de *Nodal* ; et 2. Créer un gradient d'activation des voies *Bmp* et *Wnt* (Morgani et al., 2018 ; Pijuan-Sala et al., 2019 ; Morgani and Hadjantonakis, 2020 ; Fig. I16). Les progéniteurs du DE sont issus de la partie antérieure de la ligne primitive, là où la signalisation *Nodal* est la plus forte (Conlon et al., 1994 ; Brennan et al., 2001 ; Morgani et al., 2018). A l'inverse, les progéniteurs du mésoderme sont issus de la partie postérieure de la ligne primitive, là où les signaux *Wnt* et *Bmp* sont les plus forts (Morgani et al., 2018). Dans l'épiblaste antérieur, la faiblesse des signaux *Nodal*, *Bmp*, *Wnt* et *Fgf* permet le maintien de la pluripotence plus tardivement par rapport à l'épiblaste postérieur qui s'engage dans la différenciation préférentielle en neuro-ectoderme (Iwafuchi-Doi et al., 2012). De manière étonnante, une publication récente a montré que les cellules embryonnaires pluripotentes empruntent par défaut l'engagement dans la direction du neuro-ectoderme (Argelaguet et al., 2019), ce qui corrobore la différenciation *in vitro* des ESC murines vers le neuro-ectoderme (Tropepe et al., 2001). L'engagement dans la différenciation en DE ou en mésoderme nécessite un remodelage de la chromatine et une dé-répression des *enhancers* activant le transcriptome du DE et du mésoderme, tandis que les *enhancers* contrôlant le transcriptome de l'ectoderme sont déjà accessibles dans l'épiblaste pluripotent (Argelaguet et al., 2019).

Chez le porc, le lapin, la musaraigne et le bovin, l'expression de *CER1* se restreint à la partie antérieure de la ligne primitive après la polarisation de l'épiblaste et l'apparition de l'épiblaste postérieur exprimant *TBXT* (Van Leeuwen et al., 2015 ; Yoshida et al., 2016). Chez le lapin et le porc, d'autres gènes marqueurs de l'endoderme sont co-exprimés avec *CER1*, tels que *SOX17* et *FOXA2* (Hassoun et al., 2009 ; Hassoun et al., 2009 ; Yoshida et al., 2016). A nouveau chez le porc, le lapin, la musaraigne et le bovin, l'expression de *NODAL* est restreinte à l'épiblaste postérieur (Hassoun et al., 2009 ; Van Leeuwen et al., 2015 ; Yoshida et al., 2016 ; Plöger and Viebahn, 2018). De plus chez le lapin, l'expression de *NODAL* est par la suite restreinte à la partie antérieure de la ligne primitive, ce qui ne semble pas être le cas chez les autres espèces (Yoshida et al., 2016 ; Plöger and Viebahn, 2018). Chez le lapin, le porc et la musaraigne, l'épiblaste antérieur ainsi que la partie antérieure de la ligne primitive expriment également *OTX2* (Yoshida et al., 2016). Chez les primates, la difficulté d'obtention et d'accès aux embryons post-implantatoires fait que la ségrégation des trois-feuillet embryonnaires reste très mal connue *in vivo*. Cependant, de récents jeux de données de séquençage ARN sur cellules uniques (scRNA-seq) chez le macaque cynomolgus et chez l'Homme permettent d'avoir des indices sur les prémices de cette ségrégation. Dans ces études, une partie des cellules de l'épiblaste en gastrulation exprime *NODAL* et *GDF3*, tandis que l'autre partie active des gènes marqueurs du mésoderme précoce tels que *GATA6*, *PDGFRA* ou *WNT5A*, indiquant un début de ségrégation entre le mésoderme et le DE (Zhou et al., 2019 ; Ma et al., 2019). Un très récent jeu de données de scRNA-seq sur un embryon

humain post-implantatoire en gastrulation a permis d'identifier la ségrégation de l'ectoderme, du DE et du mésoderme à partir de l'épiblaste qui est encore en partie pluripotent (Tyser et al., 2021). Ce dernier exprime *OTX2*, ce qui n'est pas le cas dans les autres analyses sur des embryons étudiés à des stades plus précoces. Il est donc possible que, par rapport aux autres espèces, l'expression de *OTX2* apparaisse plus tardivement dans l'épiblaste des primates (Zhou et al., 2019 ; Niu et al., 2019 ; Ma et al., 2019 ; Molè et al., 2021 ; Tyser et al., 2021). *In vitro*, des cultures de ESC humaines sont utilisées comme modèle de gastrulation. Ces modèles ont montré que l'activation des voies BMP, NODAL et WNT permettent la différenciation des trois feuillet embryonnaires (Warmflash et al., 2014 ; Kobayashi et al., 2017 ; Martyn et al., 2019 ; Chhabra et al., 2019).

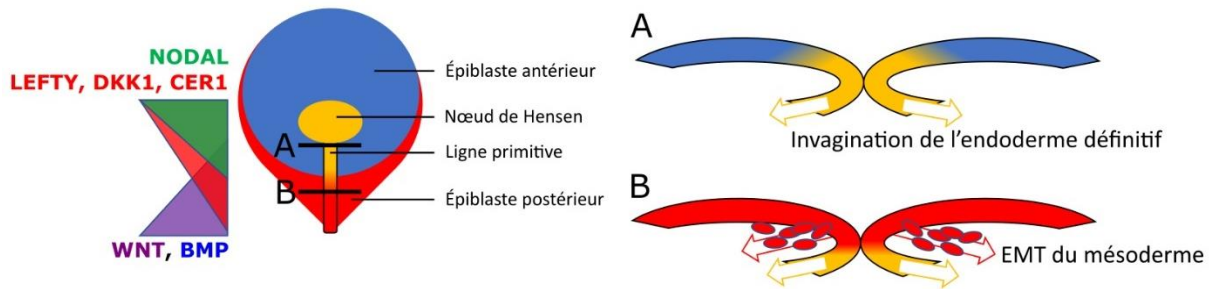


Figure 116 : Ségrégation des lignages somatiques. Schéma représentant l'épiblaste de lapin tardif, au début de la gastrulation. A gauche est indiqué les gradients des voies de signalisation selon l'axe antéro-postérieur. (A) coupe sagittale de l'épiblaste au niveau de la partie antérieure de la ligne primitive où se forme le DE ; (B) coupe sagittale de l'épiblaste au niveau de la partie postérieure de la ligne primitive où se forme le mésoderme.

Malgré une grande variabilité dans les cinétiques d'implantation et de gastrulation, ainsi que dans les adaptations fonctionnelles de ce derniers, le programme de sortie de la pluripotence est conservé chez les mammifères euthériens. L'épiblaste antérieur progresse vers l'engagement dans les lignages neuro-ectodermiques, tandis que l'épiblaste postérieur produit de manière successive la lignée germinale, le mésoderme et l'endoderme sous l'action des voies de signalisation NODAL, BMP et WNT. La dynamique des gradients d'inhibiteurs et d'activateurs permet de régionaliser l'épiblaste postérieur et de produire les différents feuillet embryonnaires. Cependant, des différences existent dans la régulation de ces voies. Les tissus producteurs de ligands, les cinétiques d'établissement des différents gradients ainsi que certains gènes clés diffèrent d'une espèce à l'autre. De manière générale, les diverses étapes de restriction de la potentialité des cellules embryonnaires se suivent et obéissent aux mêmes mécanismes d'une espèce à l'autre, mais diffèrent cependant la mise en place et le maintien de ces mécanismes diffèrent sensiblement entre espèces. La souris apparait notamment comme ayant un développement divergent des autres espèces sur de nombreux points.

FOXA2 : *forkhead box A2*, aussi appelé *hepatocyte nuclear factor 3 beta* (HNF3B)

scRNA-seq : *single-cell RNA-sequencing*

GDF3 : *growth differentiation factor 3*

Deuxième partie – Dynamiques des mécanismes régulant la pluripotence

Le maintien de la pluripotence est régulé par de nombreux processus cellulaires. Les différentes voies de signalisation viennent irriguer ou démanteler les réseaux de facteurs de transcription maintenant la pluripotence, tandis que ces derniers vont remanier la chromatine autour des *enhancers* et des promoteurs spécifiques aux différents états de pluripotence et aux différents lignages. L'épigénome interagit également avec le métabolisme, qui lui-même influence l'épigénome. Enfin, la régulation du cycle cellulaire détermine la sensibilité des cellules pluripotentes aux signaux de différenciation. Dans cette seconde partie de l'introduction, je vais passer en revue ces principaux mécanismes régulateurs de la pluripotence un par un, bien qu'ils soient interconnectés de manière complexe.

I. Les réseaux de régulation génique de la pluripotence

A. Le cœur de la pluripotence

La régulation de la pluripotence passe par l'organisation de réseaux de facteurs de transcription qui vont interagir entre eux, et avec la chromatine, afin de maintenir la potentialité des cellules embryonnaires pendant le développement. Ces réseaux évoluent au cours du continuum de pluripotence et seront déstabilisés ou au contraire renforcés au cours des différentes ségrégations de lignages. Au centre de ces réseaux, trois gènes, *OCT4*, *SOX2* et *NANOG*, constitue le noyau de pluripotence.

OCT4, aussi connu sous le nom de *POU5F1* est un facteur de transcription clé dans la régulation de la pluripotence. Au cours du développement embryonnaire chez la souris, sa délétion entraîne la disparition de l'ICM, en perturbant à la fois l'émergence du PE et l'autorenouveau des cellules embryonnaires pluripotentes. Chez la souris, *Oct4* est nécessaire à la restriction de *Cdx2* dans le TE, bien que cela se fasse indépendamment de la ségrégation ICM/TE (Nichols et al., 1998 ; Niwa et al., 2000 ; Wu et al., 2013 ; Frum et al., 2013). Dans les ESC murines et humaines, sa délétion ou sa répression par ARN-interférent (KD) entraîne leur différenciation en cellules du TE (Nichols et al., 1998 ; Niwa et al., 2000 ; Chew et al., 2005). Cependant, l'expression de *Oct4* nécessite d'être régulé finement pour soutenir la pluripotence, car sa surexpression entraîne la différenciation *in vitro* des ESC murines vers les lignages endodermiques et mésodermiques (Niwa et al., 2000).

OCT4 n'est pas seulement important pour la maintenance des cellules pluripotentes, mais participe également à la gastrulation. En effet, *in vivo* il s'exprime dans l'épiblaste (Downs et al., 2008 ; Iwafuchi-Doi et al., 2012), et il a été démontré *in vitro* que le maintien de l'expression de *OCT4* dans des EpiSC ou des ESC humaines promeut leur différenciation vers les lignages mésodermique et endodermique (Thomson et al., 2011). Ainsi, *OCT4* peut également induire la sortie de la pluripotence si son niveau est trop élevé. Une étude a même montré que la réduction du niveau de *Oct4* améliore l'état de

KD : *knock-down*

pluripotence des ESC murines (Karwacki-Neisius et al., 2013). OCT4 agit comme un facteur de transcription pionnier, en interagissant avec des protéines de complexes régulant la chromatine tels que NuRD, SWI-SNF, ou avec les protéines de remodelage de la chromatine CHD (Loh et al., 2006 ; Sharov et al., 2008 ; Pardo et al., 2010 ; Van den Berg et al., 2010 ; King et al., 2017). Parmi les régulateurs épigénétiques interagissant avec OCT4, on retrouve notamment la méthyltransférase d'H3K9 SETDB1. Cette méthyltransférase permet, avec OCT4, la répression du programme de transcription du TE (Yuan et al., 2009). OCT4 interagit également avec d'autres facteurs de pluripotence, dont SOX2 et NANOG, avec qui il partage de nombreuses cibles (Chew et al., 2005 ; Boyer et al., 2005 ; Loh et al., 2006).

SOX2 est également un gène clé dans le maintien de la pluripotence. Dans l'embryon de souris, il est l'un des premiers gènes restreints aux cellules internes de la morula au moment de la ségrégation entre l'ICM et le TE (Guo et al., 2010). Cette restriction est contrôlée par la voie HIPPO (Wicklow et al., 2014) et l'absence de Sox2 ne perturbe pas cette première ségrégation. En revanche, Sox2 est nécessaire, en coopération avec Oct4, pour l'expression de Fgf4, et ainsi participer indirectement à la maturation du PE (Wicklow et al., 2014). Sox2 ne devient indispensable au maintien de l'épiblaste qu'après cette seconde ségrégation ; son absence provoquant l'arrêt de l'autorenouveau des cellules de l'épiblaste qui finit par disparaître (Avilion et al., 2003 ; Wicklow et al., 2014). Tout comme Oct4, sa répression entraîne la différenciation des ESC (Chew et al., 2005). La surexpression de Sox2 a aussi un effet délétère sur la pluripotence, entraînant la différenciation des ESC (Boer et al., 2007 ; Kopp et al., 2008). Dans les EpiSC et ESC humaines, SOX2 permet la différenciation en neuro-ectoderme et inhibe la différenciation en mésoderme et en endoderme, agissant de manière opposée à OCT4 (Thomson et al., 2011). SOX2 interagit aussi avec de nombreuses protéines régulant la pluripotence, protéines qui interagissent également avec OCT4 et NANOG (Chew et al., 2005 ; Boyer et al., 2005 ; Sharov et al., 2008 ; Liu et al., 2008 ; Van den Berg et al., 2010 ; Gao et al., 2012).

NANOG est souvent considéré comme le troisième gène clé dans la régulation de la pluripotence. Ainsi, sa surexpression permet l'autorenouveau des ESC murines en absence de LIF (Chambers et al., 2003 ; Mitsui et al., 2003), ainsi que la conversion des EpiSC ou des ESC humaines à l'état naïf (Silva et al., 2009 ; Takashima et al., 2014 ; Theunissen et al., 2014). Chez la souris, la délétion de *Nanog* empêche l'apparition de cellules de l'épiblaste dans l'ICM, tandis que les ESC se différencient en PE (Mitsui et al., 2003). Une étude plus récente montre que l'absence de *Nanog* n'empêche pas l'autorenouveau des ESC murines, bien qu'elles soient plus instables (Chambers et al., 2007). Dans ces dernières, l'expression de *Nanog* est par ailleurs hétérogène : les cellules *Nanog*^{-/-} sont prêtes à se différencier mais ne sont pas engagées dans la différenciation. Lorsque les ESC *Nanog*^{-/-} sont injectées dans des blastocystes, elles participent à tous les tissus, à l'exception de la lignée germinale (Chambers

NuRD : *nucleosome remodeling deacetylase*

SWI-SNF : *switch mutants – sucrose non-fermenting*

CHD : *chromodomain helicase DNA binding protein*

SETDB1 : *SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1*, , aussi appelé *ERG-associated protein with a SET domain* (ESET), ou *lysine N-methyltransferase 1E* (KMT1E)

et al., 2007).

B. Les réseaux étendus de pluripotence

Les gènes *OCT4*, *SOX2* et *NANOG* régulent leur propre expression, en plus d'autres gènes régulant la pluripotence (Chew et al., 2005 ; Boyer et al., 2005 ; Whyte et al., 2013). Ainsi *in vitro*, ils forment des boucles d'autorégulation et permettent le maintien de la pluripotence. C'est pour cette raison qu'ils sont qualifiés de « réseau central de la pluripotence » (*core pluripotency network*). Ils co-régulent également d'autres facteurs de transcription qui viennent à leur tour soutenir l'expression de ces trois gènes. Chez la souris, il s'agit notamment de *Esrrb*, *klf2*, *Klf4*, *Tfcp2l1*, *Gbx2* et *Tbx3*. La dérégulation de *Esrrb* par l'activation de la voie Wnt est l'effet majeur de l'inhibition de *Gsk3* pour soutenir l'autorenouveau des ESC murines (Martello et al., 2012). La surexpression de *Esrrb* permet de soutenir la pluripotence de ces cellules en l'absence de *Lif*. Cependant, contrairement à *Nanog*, cet effet n'est que de courte durée, et les ESC finissent par se différencier en dépit de la surexpression de *Esrrb* (Zhang et al., 2008). La surexpression de *Tfcp2l1*, *Gbx2*, *Klf2* et *Klf4* permet le soutien de la pluripotence en absence d'activation de la voie *Lif* (Niwa et al., 2009 ; Ye et al., 2013 ; Tai and Ying, 2013 ; Martello et al., 2013). La surexpression de *Klf2* permet quant à elle de compenser l'absence d'inactivation de la voie *Erk* (Yeo et al., 2014 Cell stem cell). De plus, la surexpression de *Tfcp2l1*, *Gbx2*, *Klf2* et *Klf4* permet la conversion des EpiSC à l'état naïf (Hall et al., 2009 ; Ye et al., 2013 ; Tai and Ying, 2013 ; Martello et al., 2013 ; Qiu et al., 2015). D'autres gènes comme *Stat3*, *Prdm14* ou *Nr5a2* permettent également la reprogrammation à l'état naïf des EpiSC (Yang et al., 2010 ; Guo et al., 2010 ; Okashita et al., 2016). Ces gènes forment ensemble le « réseau étendu de la pluripotence » (*extended pluripotency network*) chez la souris.

Chez les autres mammifères, ces gènes sont exprimés dans les cellules pluripotentes à l'état naïf *in vivo* (Blakeley et al., 2015 ; Mohammed et al., 2017 ; Boroviak et al., 2018 ; Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Xiang et al., 2020). Il a par ailleurs été montré que la surexpression de *KLF2* et *KLF4* permet la conversion des ESC de primate et de lapin de l'état amorcé à un état pseudo-naïf (Hanna et al., 2010 ; Takashima et al., 2014 ; Theunissen et al., 2014 ; Tapponier et al., 2017 – article 2). De plus, dans les ESC humaines converties à l'état naïf, le KD de *KLF4* ou *TFCP2L1* suffit à induire la différenciation des cellules ; et le KD de *TFCP2L1* peut être restauré par la surexpression de *ESRRB*. Ces données suggèrent que le réseau étendu de pluripotence est également présent chez les autres espèces et que son rôle est conservé. Cependant, le gène *Klf2* n'est exprimé à l'état naïf que chez la souris, bien que sa surexpression permette la conversion vers des états pseudo-naïf chez les primates et le lapin (Hanna et al., 2010 ; Takashima et al., 2014 ; Theunissen et al., 2014 ; Tapponier et al., 2017 – article 2). De plus, le gène *TFAP2C*, régulant la formation du TE chez la souris, joue également un rôle dans le

TFCP2L1 : transcription factor CP2 like 1

GBX2 : gastrulating brain homeobox 2

TBX3 : T-box transcription factor 3

NR5A2 : nuclear receptor subfamily 5 group A member 2

maintien de la pluripotence naïve chez les primates (Pastor et al., 2018). Du fait de ces différences, il est difficile de savoir dans quelle mesure le réseau étendu de pluripotence est conservé en dehors du modèle murin, d'autant plus qu'il existe de nombreux gènes, interagissant avec les noyaux étendu et central, qui régulent aussi la pluripotence et dont l'action bien que non indispensable à l'autorenouveau, participe également au contrôle de la pluripotence (Niakan et al., 2006 ; Zhang et al., 2006 ; Ivanova et al., 2006 ; Jiang et al., 2008 ; Yuri et al., 2009 ; Qin et al., 2016). A la sortie de l'état naïf, les gènes formant le réseau étendu de pluripotence changent et les protéines ZIC, ETV ou encore OTX2 viennent soutenir l'expression de *OCT4* et *SOX2*, puis de *NANOG*, dans les cellules à l'état amorcé. Chez la souris, l'expression de *Otx2*, induite par *Oct4*, permet par exemple la redirection de ce dernier vers de nouveaux *enhancers* supportant le réseau de pluripotence amorcée (Yang et al., 2014 ; Buecker et al., 2014 ; Acampora et al., 2016). La surexpression de *Otx2* provoque ainsi la sortie de l'état naïf, et son absence perturbe cette transition (Shabazi et al., 2017 ; Neagu et al., 2020 ; Kinoshita et al., 2021). Cependant, la présence de *Otx2* n'est pas strictement nécessaire à l'autorenouveau des EpiSC murines, bien que son absence les rende instables et entraîne leur différenciation vers les lignages neuronaux (Acampora et al., 2013). OTX2 cible également les promoteurs de *OCT4*, *SOX2* et *NANOG*, aussi bien dans les ESC humaines que les EpiSC murines (Acampora et al., 2016). Concernant les protéines Etv4 et 5, il a été récemment montré que leur absence empêche la dérivation de PSC à l'état amorcé chez la souris, sans pour autant empêcher la dérivation de PSC à l'état formatif. Par contre la présence de *Otx2* est essentielle pour la dérivation et le maintien de PSC à l'état formatif (Kalkan et al., 2019 ; Kinoshita et al., 2021). Les facteurs de transcription Zic et 3 permettent également le maintien de la pluripotence à la sortie de l'état naïf (Yang et al., 2019). Ils permettent la répression de l'endoderme (Lim et al., 2007 ; Iwafuchi-Doi et al., 2012), et Zic3 participe au remodelage du réseau de transcription lors du passage de l'état naïf à l'état amorcé (Yang et al., 2019). *Zfp281* fait partie des gènes cibles de Zic2, et interagit avec ce dernier pour permettre la sortie de l'état naïf et l'expression du réseau de pluripotence amorcée (Mayer et al., 2019). Il a été démontré que les facteurs de transcription Zic, *Otx2*, *Sox2*, *Oct4* et *Oct6* (aussi appelé *Pou3f1*) participaient à l'autorenouveau de l'épiblaste post-implantatoire et des EpiSC chez la souris (Iwafuchi-Doi et al., 2012). En plus de ces facteurs de transcription, on retrouve également parmi les cibles de *Oct4* les *Dnmt3a* et *b*, ainsi que des gènes des complexes répresseurs Polycomb (PRC). L'activation de l'expression de ces gènes permet la transition épigénétique vers des états plus restreints en termes de potentialité (Sharov et al., 2008 ; Pardo et al., 2010). Chez les autres mammifères, la plupart de ces gènes sont également exprimés dans les cellules pluripotentes à l'état amorcé *in vitro* et *in vivo*, ce qui suggérerait une fonction conservée (Nakamura et al., 2016 ; Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Xiang et al., 2020 ; Molè et al., 2021).

Le maintien de la pluripotence lors de la sortie de l'état naïf est permis par le réarrangement du réseau de régulation génique. Bien que le réseau de facteurs de transcription soutenant la pluripotence naïve soit bien établi, ce n'est pas le cas pour ceux des états formatifs et amorcés. Peu

ZFP281 : Zinc finger protein 281

PRC : polycomb repressor complex

d'études se sont penchées sur l'analyse du réseau étendu de pluripotence existant aux états formatifs et amorcés chez la souris, et encore moins chez d'autres modèles. De plus, d'un point de vue transcriptomique, les mêmes facteurs de transcription régulant la pluripotence sont exprimés dans à l'état formatif et amorcé. Une différence majeure est le début de l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des trois feuilletts germinaux, tels que *Foxa2*, *Eomes* ou *Tbxt* dans les PSC à l'état amorcé. L'état formatif pourrait être considéré comme faisant partie d'un continuum de pluripotence amorcé, tout en représentant la partie la plus immature de cet état (Fig. I17). A l'inverse, les cellules classiquement considérées comme amorcées seraient dans un état beaucoup plus avancé dans le développement, et seraient donc plus sensibles à la différenciation et à l'effondrement des réseaux de pluripotence central et étendu. Cela se traduit par la plus grande rapidité des EpiSC à s'engager dans la différenciation par rapport au PSC à l'état formatif. Ces réseaux de soutien de la pluripotence sont également sous le contrôle de différentes voies de signalisation, dont l'activation ou la répression permet de moduler les différents états de pluripotence.

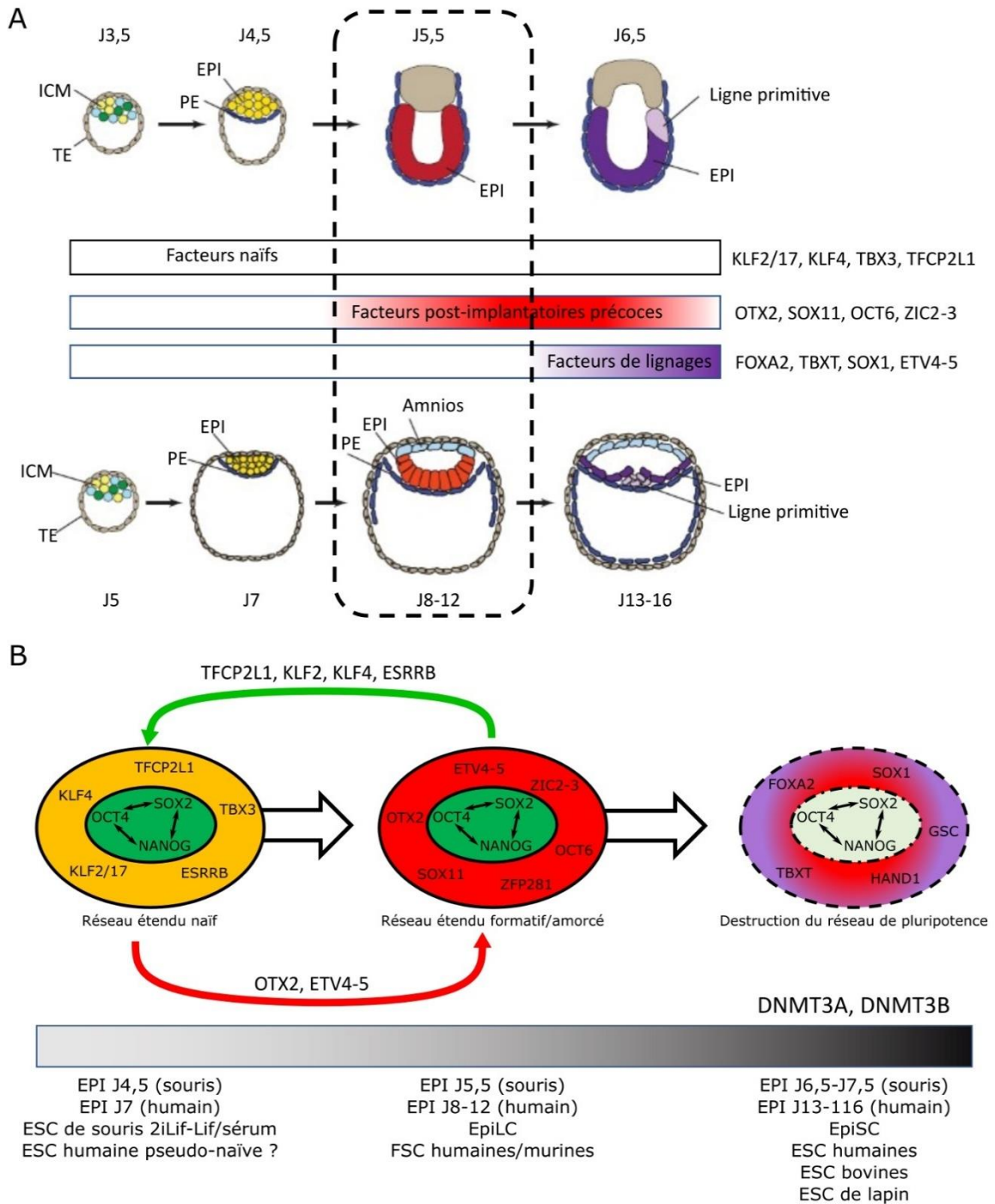


Figure I17 : Transition des cellules embryonnaires pluripotentes dans le continuum de pluripotence. (A) Schéma représentant les développements embryonnaires murin (en haut) et humain (en bas). Les barres horizontales représentent l'expression des facteurs de transcription régulant la pluripotence. Adapté de Smith et al., 2017. (B) Schéma représentant les changements du réseau de facteurs de transcription le long du continuum de pluripotence *in vivo* et *in vitro*. La flèche rouge indique la capacité des facteurs de transcription à reprogrammer les PSC de l'état naïf à amorcé ; la flèche verte indique la capacité des facteurs de transcription à reprogrammer les PSC de l'état amorcé à naïf. EPI : épiblaste.

II. Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la pluripotence

A. La voie LIF/IL6

A l'état naïf ou amorcé les réseaux de pluripotence central et étendu interagissent avec différentes voies de signalisation. Parmi celles-ci, la voie LIF-STAT3 joue un rôle clé dans la régulation de la pluripotence naïve. La stimulation des récepteurs IL6R, LIFR et IL6ST, par les cytokines LIF et IL6 entraîne l'activation de trois voies de signalisation (Fig. I18) : la voie ERK, qui dans les ESC de souris est pro-différenciation ; la voie PI3K qui soutient la survie et la prolifération des ESC ; et enfin la voie STAT3, qui supporte l'autorenouveau. Dans l'embryon, l'addition de LIF ou d'IL6 améliore le développement en culture chez la souris, l'homme, le porc et le bovin (Dunlison et al., 1996 ; Morgani and Brickman, 2015 ; Wooldridge et al., 2019 ; Ramos-ibeas et al., 2019). Chez la souris, la stimulation de la voie Lif conduit aussi à l'expansion du PE (Morgani and Brickman, 2015). De la même manière, chez le bovin, la stimulation par le LIF entraîne l'augmentation du nombre de cellules exprimant SOX17 et NANOG, ainsi que la co-expression de ces deux protéines (Canizo et al., 2019). Malgré cela, l'absence de Il6st ou de Lifr n'empêche pas le développement embryonnaire jusqu'aux stades post-implantatoires chez la souris (Ware et al., 1995 ; Yoshida et al., 1996). Leur présence devient essentielle à l'autorenouveau des cellules de l'épiblaste murin pendant la diapause (Nichols et al., 2001). L'activation de la voie LIF dans l'utérus permet également l'implantation du trophoctoderme chez la souris et chez l'homme (Takahashi et al., 2003 ; Liu et al., 2014 ; Ahn et al., 2015).

D'un autre côté, l'inhibition des JAK, une famille de kinases impliquées dans la voie LIF, entraîne la disparition de l'ICM chez la souris, le bovin et le porc (Morgani and Brickman, 2015 ; Cheng et al., 2016 ; Ramos-ibeas et al., 2019 ; Wooldridge et al., 2019). De même, le KO de Stat3 empêche l'apparition de l'ICM dans les embryons de souris (Do et al., 2013). Il est donc possible que d'autres récepteurs activent la voie JAK-STAT, essentielle à la survie de l'ICM. Malgré ces similitudes entre les différents modèles, l'ICM chez les primates et le porc n'exprime pas LIFR mais IL6R (Ramos-ibeas et al., 2019 ;

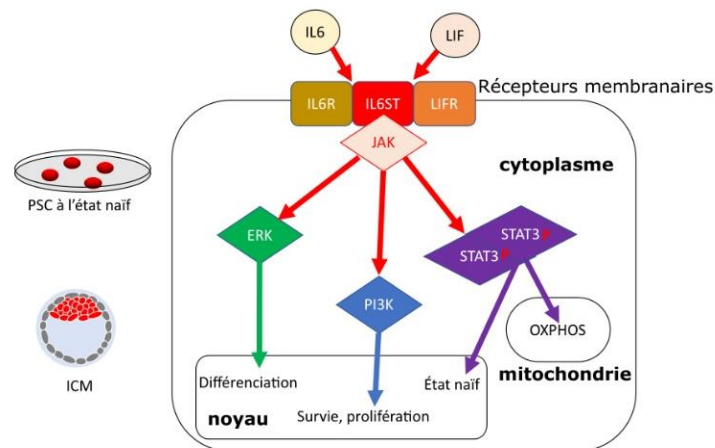


Figure I18 : La voie IL6/LIF. Schéma représentant l'activation des différents composants de la voie IL6/LIF.

IL6ST : *interleukine 6 cytokine family signal transducer*, aussi appelée *membrane glycoprotein 130* (GP130) ou antigène CD130

JAK : *Janus kinase*

Bourillot et al., 2020). Il est vrai que IL6R active les mêmes voies que LIFR (Gearing et al., 1991 ; Heinrich et al., 1998). Cependant, la différence entre ces deux récepteurs dans la pluripotence et le développement embryonnaire précoce n'a jamais été étudiée dans le détail.

Dans les ESC murines, l'activation de la voie LIF-Stat3 permet leur autorenouveaulement, notamment en activant l'expression des gènes du réseau étendu de pluripotence (Niwa et al., 1998 ; Matsuda et al., 1999 ; Niwa et al., 2009 ; Hall et al., 2009 ; Bourillot et al., 2009 ; Do et al., 2013 ; Jin et al., 2016). La voie Pi3k fait aussi partie des cibles activées par le LIF. Si elle est moins essentielle à l'autorenouveaulement des ESC murines, elle promeut leur survie et leur prolifération (Takahashi et al., 2003 ; Paling et al., 2004 ; Niwa et al., 2009). La voie LIF coopère également avec la voie Wnt pour maintenir l'autorenouveaulement (Hao et al., 2006 ; Ye et al., 2016). Ces différentes voies de signalisation maintiennent ainsi l'autorenouveaulement de manière redondantes les unes avec les autres. Ceci est illustré par le fait que l'utilisation des inhibiteurs de Erk et de Gsk3 β permet de remplacer l'addition de LIF (Ying et al., 2008). La voie LIF-Stat3 a aussi un effet sur le métabolisme. La translocation de la forme phosphorylée de Stat3 dans la mitochondrie permet la surexpression de son génome et l'augmentation de la phosphorylation oxydative (OXPHOS), ce qui stimule la prolifération. L'activation de l'OXPHOS par LIF est d'ailleurs essentielle à la conversion à l'état naïf (Carbognin et al., 2016).

Les PSC à l'état amorcé chez la souris, le primate et le lapin ne sont pas dépendantes de la voie LIF-STAT3 (Sumi et al., 2004 ; Dahéron et al., 2004 ; Brons et al., 2007 ; Tesar et al., 2007 Nature ; Honda et al., 2009 ; Osteil et al., 2016). En revanche, la suractivation de STAT3 permet la conversion des ESC humaines et murines à l'état naïf, et les rend dépendantes de cette voie de signalisation pour leur autorenouveaulement (Yang et al., 2010 ; Van Oosten et al., 2012 ; Chen et al., 2015). La surexpression des cibles de STAT3, GBX2, TFCP2L1, SP5 et KLF4, permet également la conversion de l'état amorcé à naïf chez la souris, l'homme et le lapin (Niwa et al., 2009 ; Hall et al., 2009 ; Guo et al., 2009 ; Hanna et al., 2010 ; Ye et al., 2013 ; Tai and Ying, 2013 ; Martello et al., 2013 ; Takashima et al., 2014 ; Theunissen et al., 2014 ; Yeo et al., 2014 ; Qiu et al., 2015 ; Ye et al., 2016 ; Tapponier et al., 2017 – article 2). De plus, tous les milieux de conversion à l'état naïf utilisés chez les primates, le porc et le lapin utilisent du LIF (revue dans Bourillot et al., 2020). Certains auteurs ont même prouvé que les cellules ainsi reprogrammées devenaient dépendantes de l'activation de la voie JAK-STAT3 (Gafni et al., 2013 ; Chan et al., 2013 ; Chen et al., 2015). La voie LIF-JAK-STAT3 permet donc le soutien de la pluripotence naïve de manière conservée chez les différents mammifères modèles. Cependant, l'activation de la voie LIF ne suffit pas à stabiliser la pluripotence naïve. L'activation ou l'inhibition d'autres voies de signalisation régulant la pluripotence sont également nécessaires.

OXPHOS : *oxidative phosphorylation*

B. La voie WNT

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la voie WNT joue de nombreux rôles au cours du développement embryonnaire précoce. Son effet varie selon l'espèce et le stade embryonnaire étudiés. L'action de la voie WNT dans la polarisation de l'épiblaste, l'émergence des PGC et la gastrulation est bien décrite chez de nombreux mammifères. Cependant, son effet sur les premières ségrégations des lignages embryonnaires et sur la sortie de la pluripotence naïve n'est pas encore bien comprise dans tous les modèles. La fixation des ligands WNT sur les récepteurs LRP5/6 et FZD entraîne l'activation de DVL (Fig. I19). Ce dernier va permettre la séparation des protéines du complexe de destruction de la β -caténine, GSK3B, AXIN et APC. La β -caténine n'est alors plus dégradée et peut agir dans le noyau en tant que facteur de transcription, activant notamment les gènes de la famille TCF/LEF. Les ligands WNT peuvent également activer d'autres voies dites non-canoniques (Fig. I19) :

- la voie WNT – PCP. Dans ce cas, les ligands WNT ne vont pas se fixer au co-récepteur LRP mais à d'autres co-récepteurs. Cela entraîne l'activation des voies MAPK et RHO – ROCK régulant le cytosquelette.
- la voie WNT/calcium. Dans ce cas, les ligands WNT ne se fixent qu'au récepteur FZD. La fixation des ligands WNT conduit à l'activation de la voie DAG-IP3, qui permet le relargage de calcium par la mitochondrie et la régulation du cytosquelette.

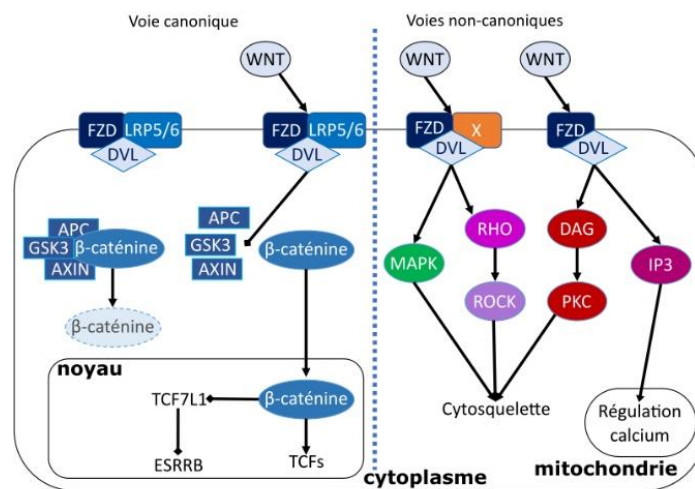


Figure I19 : La voie WNT. Schéma représentant l'activation des différents composants des voies WNT canonique et non-canoniques.

LRP : LDL receptor related protein

FZD : frizzled class receptor

DVL : dishevelled, DSH homolog

APC : adenomatous polyposis coli protein

PCP : planar cell polarity

RHO : Ras homolog

ROCK : Rho associated coiled-coil containing protein kinase

DAG : diacylglycerol

IP3 : inositol triphosphate

Chez la souris, de nombreux composants de la voie Wnt sont exprimés dans l'ICM, bien que celle-ci ne soit pas active (Ohsugi et al., 1996 ; Na et al., 2007 ; Boroviak et al., 2015). En effet, dans l'ICM il n'y a pas de β -caténine nucléaire et la délétion des composants de la voie Wnt n'a pas d'effet sur le développement pré-implantatoire des embryons murins (Huelsen et al., 2000 ; Kemler et al., 2004 ; De Vries et al., 2004 ; Na et al., 2007 ; Xie et al., 2008). On peut noter cependant la présence de β -caténine nucléaire dans le TE (Xie et al., 2008). Les voies Wnt et HIPPO interagissent en effet entre-elles (Fig. I20) : Taz se lie à la β -caténine et entraîne sa séquestration dans le cytoplasme lorsque la voie HIPPO est active, et à l'inverse favorise son entrée dans le noyau lorsqu'elle est inactive, comme c'est le cas dans le TE (Varelas et al., 2010 ; Azzolin et al., 2012 ; Azzolin et al., 2014). La voie HIPPO permettrait ainsi l'inhibition de la voie Wnt dans l'ICM. L'ajout d'inhibiteurs de la voie WNT a un effet délétère sur le TE chez la souris, l'homme et le bovin, alors que son activation a un effet bénéfique (Xie et al., 2008 ; Denicol et al., 2013 ; Denicol et al., 2014 ; Krivega et al., 2015). Chez l'homme, une publication récente montre également que l'utilisation d'inhibiteurs de la voie WNT sur des ESC converties à l'état naïf bloque également leur différenciation en TE (Guo et al., 2021). Dans des embryons en culture par contre, l'inactivation artificielle de la voie WNT n'a pas d'effet sur l'ICM, du fait de son absence d'activité dans ces cellules. Cela a pu être démontré chez la souris, l'homme, le bovin et le porc (Xie et al., 2008 ; Denicol et al., 2013 ; Denicol et al., 2014 ; Krivega et al., 2015).

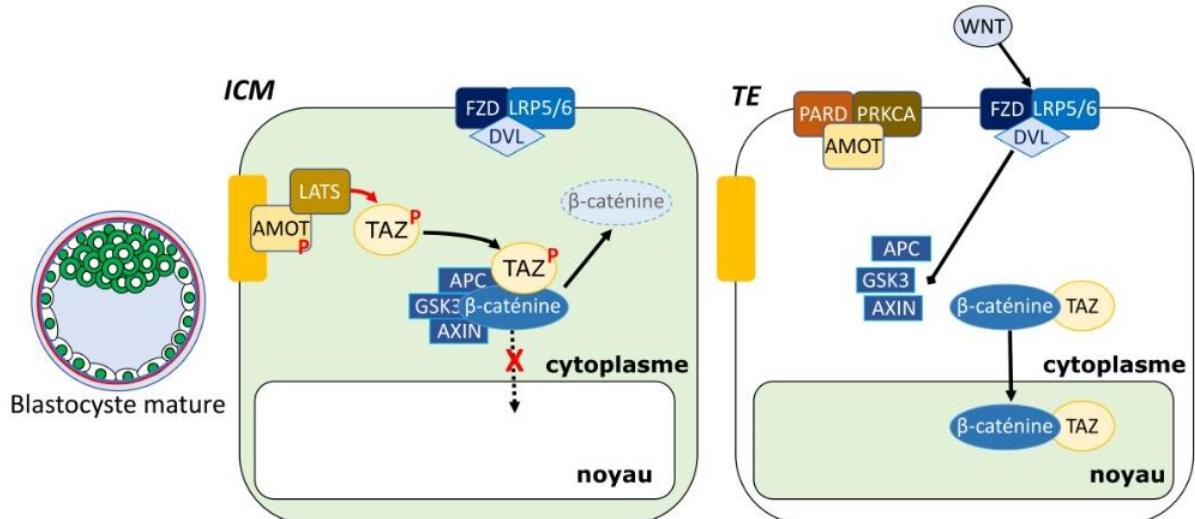


Figure I20 : Interaction entre les voies WNT et HIPPO. Schéma représentant l'interaction entre les voies WNT et HIPPO lorsqu'elles sont inactivées ou activées. Lorsque la voie HIPPO est activée, TAZ phosphorylé lie le complexe de destruction de la β -caténine et promeut sa séquestration dans le cytoplasme et sa dégradation. Lorsque la voie HIPPO est inactivée, TAZ est translocalisée dans le noyau et libère la β -caténine, qui peut elle aussi passer dans le noyau.

Ce fait est corrélé avec l'expression de *DKK1*, un inhibiteur de la voie WNT, dans l'ICM chez les primates et la souris (Boroviak et al., 2015). Chez le marmouset, l'inactivation de la voie WNT a en plus un effet positif sur l'épiblaste. L'inhibition de la voie WNT conduit à l'augmentation de l'expression de *NANOG*, et à l'inverse réduit le nombre de cellules exprimant *GATA6* (Boroviak et al., 2015). Chez le bovin, l'activation de la voie WNT a également un effet délétère sur l'ICM, mais ce n'est pas le cas chez l'Homme (Denicol et al., 2013 ; Krivega et al., 2015). Il a été récemment montré que l'activation de la

voie WNT dans des embryons de souris empêche la progression des cellules de l'épiblaste murin au stade rosette, et le maintien de l'expression de gènes du réseau de pluripotence naïf *Esrrb* et *Klf4* (Fan et al., 2020 ; Neagu et al., 2020). Cette fonction pourrait être conservée chez le porc et les primates, puisque l'expression de *SFRP2*, un inhibiteur de la voie WNT, augmente au fur et à mesure du développement, et à l'inverse, diminue dans les cellules qui entrent en gastrulation (Nakamura et al., 2016 ; Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Niu et al., 2019 ; Molè et al., 2021). L'inactivation de la voie WNT serait ainsi nécessaire à la progression de l'épiblaste dans le développement, avant que son activation n'entraîne la polarisation de ce dernier (Fig. I21). A l'inverse, l'activation de la voie WNT participe au développement du TE, de manière conservée chez de nombreux mammifères.

Dans les ESC murines, l'activation de la voie Wnt permet leur autorenouveaulement (Doble et al., 2007 ; Ying et al., 2008 ; Wray et al., 2010). Cet effet passe notamment par la répression de *Tcf7l1*, qui lève son inhibition de l'expression de *Esrrb*, et permet ainsi le soutien de la pluripotence naïve (Wray et al., 2011 ; Martello et al., 2012). De plus, la β -caténine peut également se lier directement à Oct4 et stimuler son expression, ainsi que celles de *Nanog* et *Tbx3* (Wagner et al., 2010 ; Kelly et al., 2011). Comme au cours du développement embryonnaire, l'activation de la voie Wnt empêche la progression des PSC murines à l'état naïf vers l'état amorcé (Berge et al., 2011 ; Kalkan et al., 2019). A l'inverse, l'inhibition de la voie WNT dans des PSC humaines, murines et bovines à l'état amorcé permet leur stabilisation, en réprimant leur différenciation vers les lignages mésodermiques et endodermiques induite par l'activation autocrine de la voie WNT (Kim et al., 2013 ; Kurek et al., 2015 ; Wu et al., 2015 ; Zhou et al., 2017 ; Bogliotti et al., 2018 ; Rostovskaya et al., 2019).

Cependant, il a aussi été montré chez l'Homme que l'activation de la voie WNT induit la différenciation de PSC à l'état naïf et que son activation est même inutile au maintien de l'autorenouveaulement de PSC humaines à l'état naïf (Guo et al., 2017 ; Rostovskaya et al., 2019). En revanche, l'inhibition de la voie WNT ainsi que la délétion de la β -caténine favorisent au contraire l'autorenouveaulement et la stabilité de ces cellules (Guo et al., 2017 ; Rostovskaya et al., 2019 ; Bayerl et al., 2021). Ces différences seraient dues à l'absence de TCF7L1 et de sa cible ESRRB dans les cellules naïves humaines, aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Boroviak et al., 2018 ; Rostovskaya et al., 2019). L'absence de ces deux facteurs expliquerait le fait que l'activation de la voie WNT n'est pas nécessaire au maintien de la pluripotence naïve par l'inactivation de TCF7L1 chez l'Homme, contrairement à la souris.

Il existe cependant une incohérence dans les résultats obtenus chez la souris. En effet, malgré la présence de *Tcf7l1* et de *Esrrb* dans l'ICM et l'effet positif de l'activation de la voie Wnt sur la pluripotence naïve *in vitro*, la voie Wnt est inactivée dans l'ICM, puis l'épiblaste (Fig. I21). Comment expliquer cette dualité entre inactivation de la voie Wnt *in vivo* et activation *in vitro* ? De récentes études ont montré que l'activation de la voie Wnt est nécessaire au maintien de l'autorenouveaulement de l'épiblaste lors de la diapause (Fig. I21). L'inactivation de la voie Wnt après plusieurs jours de diapause corrèle avec la cavitation de l'épiblaste et la répression de l'expression de *Esrrb* (Fan et al., 2020). Tout comme la voie Lif-Stat3, la voie Wnt chez la souris est nécessaire à l'autorenouveaulement de l'épiblaste uniquement dans les embryons en diapause. Cela expliquerait également le fait que l'activation de la voie Wnt et l'expression de *Esrrb* ne sont pas strictement nécessaires au maintien de

la pluripotence naïve. Ainsi, malgré une relative conservation des effets de la voie Wnt au cours du développement embryonnaire, l'existence de la diapause chez la souris entraîne une sensibilité différente à cette voie en culture. Les voies LIF et Wnt utilisées pour maintenir l'autorenouveaulement de l'épiblaste *in vivo* sont ainsi employées pour maintenir les cellules à l'état naïf *in vitro*. Chez les autres mammifères, l'absence de cette diapause change la réactivité des PSC aux voies LIF et WNT, et la capture de l'état naïf *in vitro* nécessite donc d'agir sur d'autres voies de signalisation.

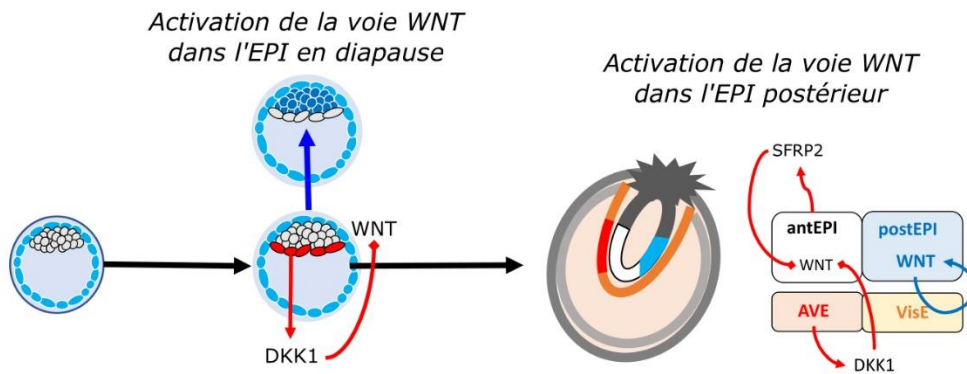


Figure I21 : La voie WNT au cours du développement embryonnaire. Schéma représentant le développement embryonnaire de la souris. La voie WNT est inactivée dans l'ICM, puis dans l'EPI, mais elle est activée dans l'EPI postérieur après l'implantation. Lors de la diapause cependant, la voie WNT est activée afin de maintenir l'EPI. EPI : épiblaste.

C. La voie FGF

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'activation de la voie FGF permet la différenciation du PE dans l'embryon, mais aussi la progression dans le continuum de pluripotence. L'activation des récepteurs FGF entraîne l'activation de quatre voies de signalisation différentes (Fig. I22) : la voie ERK-MAPK, promouvant la prolifération et la différenciation ; la voie PI3K-AKT, stimulant la survie-cellulaire et la prolifération ; la voie JAK-STAT, qui promeut l'autorenouveaulement ; et la voie DAG-IP3, régulant la concentration de calcium et le cytosquelette (revue dans Dailey et al., 2005 et Ornitz et al., 2015). La voie FGF soutient directement l'autorenouveaulement des PSC amorcées. En effet, l'activation des voies PI3K et ERK en aval des récepteurs FGF soutient la prolifération et la survie des PSC, ainsi que leur autorenouveaulement (J. Li et al., 2007 ; Brons et al., 2007 ; Tesar et al., 2007).

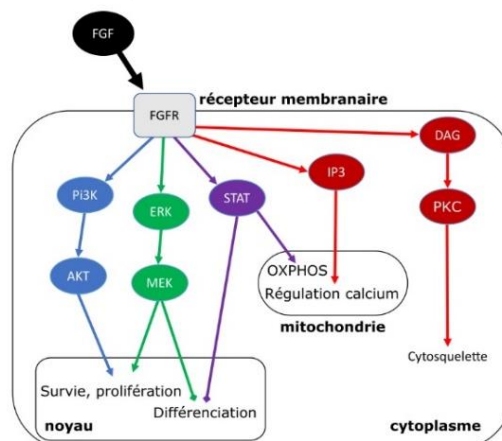


Figure I22 : La voie FGF. Schéma représentant l'activation des différents composants de la voie FGF.

L'activation de ces voies a également un effet indirect sur l'autorenouveau. La stimulation par le FGF de MEF ou des cellules différenciées « fibroblaste-like » à la périphérie des colonies de PSC humaines conduit à l'expression dans ces cellules de cytokines pro-autorenouveau, comme l'IGF, l'ACTIVINE, et le TGF β (Bendall et al., 2007 ; Greber et al., 2007). Le FGF induit également la répression de BMP4 et la production de son inhibiteur GREM1 (Greber et al., 2007). Ce dernier a un effet pro-différenciation sur les PSC à l'état amorcé, alors qu'il promeut au contraire l'autorenouveau des ESC murines en condition de culture Lif-Bmp4 (Na et al., 2010). La voie FGF interagit également avec la voie ACTIVINE /NODAL, entraînant l'expression de *NANOG* (Vallier et al., 2009 ; Greber et al., 2010). Cependant d'autres publications montrent que l'interaction entre les voies FGF et ACTIVINE /NODAL ne soutient pas nécessairement l'autorenouveau. L'activation de la voie ERK entraîne l'activation de la voie WNT et la sur-activation de la voie ACTIVINE/NODAL, ce qui pousse les PSC à se différencier en mésenchyme (Singh et al., 2012 ; Fig. I23). De même, l'inhibition de la voie ACTIVINE /NODAL couplée à la stimulation par le FGF et amplifiée par l'acide rétinoïque, induit la différenciation en neuro-ectoderme (Stavridis et al., 2010 ; Singh et al., 2012 ; Fig. I23). L'activation de la voie PI3K permet au contraire le maintien de l'autorenouveau, en permettant l'inhibition de la voie WNT, et en inhibant partiellement la voie SMAD2/3 (Ding et al., 2010 ; Singh et al., 2012 ; Fig. I23). En conclusion, l'activation de la voie FGF-ERK soutient la pluripotence des PSC à l'état amorcé grâce au maintien d'un équilibre délicat dépendant des autres voies de signalisation.

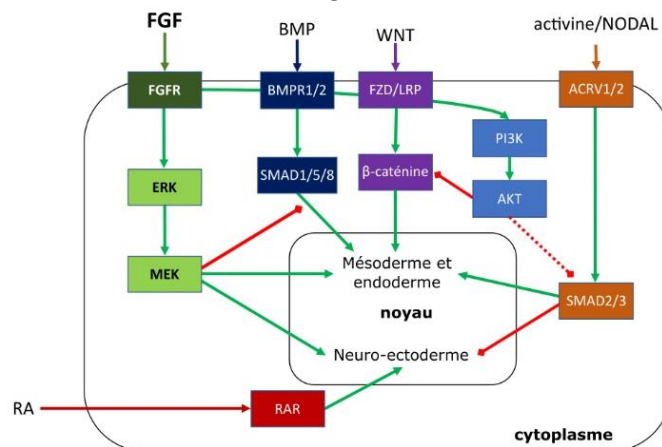


Figure I23 : Interaction entre la voie FGF et les autres voies de signalisation. Schéma représentant l'interaction entre la voie FGF et les voies RA, BMP, WNT, et activine/NODAL. RA : acide rétinoïque. RAR : récepteurs de l'acide rétinoïque.

IGF : *insulin growth factor*

GREM1 : *gremlin 1*

Dans les cellules amorcées de souris, la voie Fgf-Erk empêche leur réversion à l'état naïf (Greber et al., 2010). C'est pour cela que la plupart des milieux de réversion à l'état naïf utilise des inhibiteurs de celle-ci, aussi bien chez la souris que chez les autres mammifères (Ying et al., 2008 ; Fang et al., 2014 ; Chen et al., 2015 ; Liu et al., 2019 ; Fig. I24). Certains milieux de réversion à l'état naïf combinent l'inhibition de différents éléments de la voie Mapk activée par le Fgf, comme les kinases Braf, Src, Junk et p38 (aussi appelé Mapk14), ou l'inhibition des Fgfr (Gafni et al., 2013 ; Theunissen et al., 2014). A l'inverse, la stimulation par le Fgf permet la sortie de l'état naïf de pluripotence, et son inhibition maintient les ESC murines et les cellules de l'épiblastes péri-implantatoire à l'état naïf (Lanner et al., 2010 ; Kalkan et al., 2019 ; Neagu et al., 2020).

A la sortie de l'état naïf, les cellules pluripotentes deviennent dépendantes de la voie FGF-ERK pour leur autorenouveau, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Neagu et al., 2020 ; Fig. I24). Cette dépendance semble être croissante, puisque les cellules pluripotentes à l'état formatif dérivées récemment, bien que dépendante de la voie FGF-ERK, n'ont pas besoin d'ajout de FGF exocrine pour s'autorenouveler, ce qui n'est pas le cas des EpiSC et des autres cellules à l'état amorcé (Brons et al., 2007 ; Tesar et al., 2007 ; Kinoshita et al., 2021). *In vivo*, cette dépendance au FGF dans les cellules à l'état amorcé s'illustre par la surexpression des *FGFR* et des cibles de la voie FGF dans l'épiblaste tardif (Mohammed et al., 2017). Cet effet de la voie FGF semble conservé chez les autres mammifères modèles, puisque qu'on retrouve la surexpression des *FGFR* dans l'épiblaste tardif chez le porc et les primates (Nakamura et al., 2016 ; Boroviak et al., 2018 ; Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Molè et al., 2021). Une étude récente sur des embryons humains en culture a montré que l'inhibition de la voie FGF sur des embryons pré et péri-implantatoires a un effet délétère sur l'ensemble des lignages embryonnaires. L'inhibition de ERK a un effet moins drastique, seul l'ICM voit son nombre de cellules réduit (Molè et al., 2021). On retrouve des résultats similaires *in vitro* : les PSC de lapins sont toutes dépendantes à la voie FGF-ERK pour leur autorenouveau, même dans des états pseudo-naïf (Honda et al., 2009 ; Osteil et al., 2013 ; Osteil

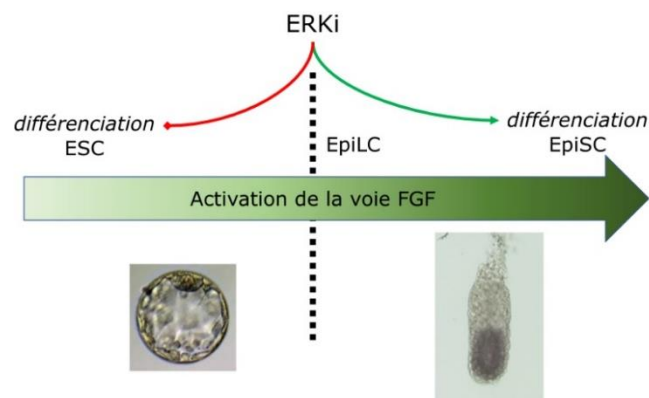


Figure I24 : Impact de la voie FGF sur le continuum de pluripotence. Schéma représentant l'activation croissante de la voie FGF au cours du développement embryonnaire murin. L'inhibition de ERK entraîne soit la répression de la différenciation des ESC soit la différenciation des EpiSC.

BRAF : *B-raf proto oncogene, serine/threonine kinase*

SRC : *SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase*

JUNK1, 2, 3 : *JUN N-terminal kinase 1, 2, 3*, aussi connu sous les noms de MAPK8, 9 et 10

et al., 2016 ; Tapponier et al., 2017 – article 2 ; Liu et al., 2019). Chez le porc, l'absence de lignée stable de PSC ayant toutes les caractéristiques de la pluripotence ne permet pas de savoir leur niveau de dépendance à la voie FGF (Goszczynski et al., 2019). C'était aussi le cas jusqu'à récemment chez le bovin, mais une lignée a pu être stabilisée à l'état de pluripotence amorcée, en présence de FGF et d'un inhibiteur de la voie WNT (Bogliotti et al., 2018).

D. Les voies ACTIVINE/NODAL et BMP

Les voies de signalisation ACTIVINE/NODAL et BMP jouent toutes les deux un rôle crucial dans la polarisation de l'épiblaste et la formation des trois feuilletts embryonnaires. Les ligands de ces deux voies font partie de la super-famille des ligands TGF β . Les ligands ACTIVINE, TGF β et NODAL activent les récepteurs ACVR1 et 2 (Fig. I25). Cela permet en retour la transduction du signal par les SMAD2, 3 et 4, qui vont servir de facteurs de transcription. En plus de cela, NODAL se lie également au co-récepteur TDGF1. NODAL est également inhibé de manière spécifique par LEFTY1 et 2. Les ligands BMP quant à eux fixent les récepteurs BMPR1 et 2, qui activent en retour les SMAD1, 5, 8 et 4 (Hates et al., 2021). Dans le développement embryonnaire murin, bien que Nodal soit exprimé dans l'ICM dès le jour 3.5, sa délétion ne perturbe le développement embryonnaire qu'après l'implantation (Varlet et al., 1997 ; Lu et al., 2004). Cette délétion empêche l'apparition du DVE, ainsi que la polarisation de l'épiblaste (Brennan et al., 2001), qui perd l'expression des gènes de pluripotence comme *Oct4* et *Nanog* et se différencie précocement en neuro-ectoderme (Mesnard et al., 2006 ; Camus et al., 2006). Cette absence d'effet de Nodal avant l'implantation pourrait s'expliquer en partie par l'expression de *Gdf3* dans l'ICM, puis dans l'épiblaste (Chen et al., 2006). En effet, ce dernier serait capable d'activer la voie NODAL. *Gdf3* et *Nodal* agiraient ainsi en synergie l'un avec l'autre. Certains embryons n'exprimant pas *Gdf3* ne parviennent pas à se développer normalement et présentent des phénotypes similaires à ceux porteurs d'une délétion de *Nodal*. La variabilité dans les phénotypes *Gdf3*^{-/-} serait due à l'expression variable de *Nodal*, qui selon son niveau d'expression compenserait plus ou moins l'absence de *Gdf3* (Chen et al., 2006). Cependant, aucune double-délétion *Gdf3/Nodal* n'a encore été tentée pour vérifier cette hypothèse. La double-délétion de *Smad2* et *3* a été étudiée et conduit à des phénotypes plus sévères que celles de seulement *Gdf3* ou de *Nodal* (Senft et al., 2018).

ACVR1/2 : *Activin receptor type 1 and 2*

TDGF1 : *Teratocarcinoma-derived growth factor 1*

BMPR1/2 : *BMP receptor type 1 and 2*

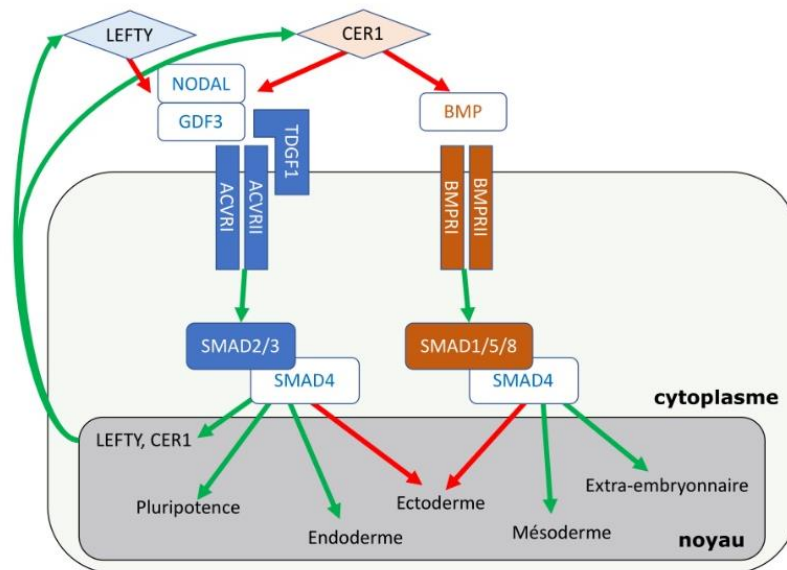


Figure I25 : Les voies NODAL et BMP. Schéma représentant l'activation des différents composants des voies NODAL et BMP.

L'utilisation de *Bmp4* permet la différenciation en TE des ESC murines (Fiorenzano et al., 2016 ; Senft et al., 2018), mais peut aussi en combinaison avec le *Lif* maintenir leur autorenewement (Ying et al., 2003). Au contraire, l'absence de *Tdgf1*, de *Gdf3*, de *Nodal* ou de *Smad2/3* n'empêche pas leur autorenewement, mais perturbe leur capacité à se différencier dans les lignages mésodermiques et endodermiques (Fiorenzano et al., 2016 ; Mulas et al., 2017 ; Senft et al., 2018). De plus, l'inactivité de la voie Activine/Nodal perturbe la sortie de l'état naïf, l'activation de *Smad2/3* étant nécessaire au remodelage du réseau de pluripotence lors de cette transition, en coopération avec *Oct4* et *Otx2* (Fiorenzano et al., 2015 ; Senft et al., 2018). En revanche, à l'état amorcé l'activation de la voie ACTIVINE/NODAL est nécessaire à l'autorenewement chez de nombreuses espèces (Vallier et al., 2005 ; Brons et al., 2007 ; Tesar et al., 2007 ; Honda et al., 2009 ; Alberio et al., 2010 ; Osteil et al., 2016).

A l'état formatif, l'activation de la voie ACTIVINE/NODAL est également nécessaire pour réprimer la différenciation en lignages extra-embryonnaires induite par la voie BMP et pour permettre la capacitation des PSC à se différencier dans les lignages germinaux et somatiques (Fiorenzano et al., 2016 ; Mulas et al., 2017 ; Senft et al., 2018 ; Kinoshita et al., 2021), alors que les cellules murines se différencient au contraire en TE. Cette voie régule directement les gènes du réseau central de pluripotence, notamment *NANOG* (Xu et al., 2008 ; Vallier et al., 2009). Ce dernier permet de moduler les voies FGF et ACTIVINE/NODAL afin d'inhiber la différenciation dans les lignages somatiques (Vallier et al., 2009). Ainsi l'inhibition de la voie ACTIVINE/NODAL conduit à la différenciation des PSC amorcées humaines, murines et porcines en neuro-ectoderme, comme pour leur équivalent *in vivo* chez la souris (Smith et al., 2008 ; Vallier et al., 2009 ; Alberio et al., 2010). A l'inverse, la suractivation de *SMAD2/3* conduit à la différenciation en DE (Vallier et al., 2009 ; Touboul et al., 2010 ; Brown et al., 2011 ; Kinoshita et al., 2021). L'activité de la voie PI3K permet également de restreindre la liaison de *SMAD2/3* aux gènes contrôlant la différenciation en épiblaste postérieur et en DE (Singh et al., 2012). Enfin, la

voie ACTIVINE/NODAL induit également l'expression de ses propres inhibiteurs, *LEFTY1/2* et *CER1* (Vallier et al., 2009). Ainsi, les PSC aux états amorcés et formatifs ont besoin de maintenir un dosage équilibré du niveau d'activation de la voie ACTIVINE/NODAL, qui passe par des boucles de rétrocontrôles négatives. De manière générale dans les PSC *in vitro*, la voie ACTIVINE/NODAL inhibe la voie BMP, qui est source de différenciation (Levine et al., 2006 ; Xiao et al., 2006 ; Wu et al., 2008 ; Fiorenzano et al., 2016 ; Senft et al., 2018).

Bmp4 est uniquement exprimé dans l'ICM murin, en accord avec sa capacité à maintenir l'autorenouveau des ESC de souris. Chez les mammifères non-murins, de nombreux composants de la voie ACTIVINE/NODAL sont surexprimés dans l'ICM et dans l'épiblaste précoce à la place de BMP4 (Blakeley et al., 2015 ; Mohammed et al., 2017 ; Boroviak et al., 2018 ; Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Xiang et al., 2020). L'utilisation d'inhibiteurs de cette voie sur des embryons donne des résultats variables. Chez l'Homme, une première étude montre que l'inhibition de la voie ACTIVINE/NODAL conduit à une augmentation du nombre de cellules exprimant *NANOG* (Van der Jeught et al., 2013). Une deuxième étude utilisant une concentration quatre fois plus élevée du même inhibiteur, montre au contraire la perte quasi-totale de l'ICM, alors que cette même concentration n'a que très peu d'effet chez la souris. En revanche, l'inhibition de cette voie n'a pas d'effet sur le TE (Blakeley et al., 2015). Cette absence d'effet a d'ailleurs pu être confirmée *in vitro*, où l'inhibition de la voie ACTIVINE/NODAL permet la différenciation de PSC humaines à l'état naïf en TE (Osnato et al., 2021 ; Guo et al., 2021). Chez le marmouset, un autre inhibiteur plus puissant a été utilisé sur des embryons, mais à des concentrations plus faibles. Seul, cet inhibiteur n'a aucun effet. En revanche, couplé avec des inhibiteurs de la voie WNT ou ERK, il augmente leurs effets sur les cellules de l'ICM. Ainsi combiné avec l'inhibiteur de WNT, il permet une forte augmentation du nombre de cellules exprimant uniquement et fortement *NANOG*, tandis que combiné avec l'inhibiteur de ERK, il permet une forte diminution du nombre de cellules exprimant uniquement *GATA6* (Boroviak et al., 2015).

Chez le porc, l'inhibition de la voie ACTIVINE/NODAL conduit à une diminution du nombre de cellules exprimant *NANOG*, sans pour autant affecter le nombre de cellules exprimant *SOX17* (Ramos-Ibeas et al., 2019). De manière générale, la voie ACTIVINE/NODAL joue un rôle plus important dans le développement embryonnaire précoce chez les autres mammifères que chez la souris, bien que le rôle exact de cette voie dans la ségrégation entre l'épiblaste, le PE et le TE, ainsi que dans la survie et la prolifération de ces lignages reste incompris. Ainsi de nombreux milieux de conversion à l'état naïf de PSC de primates contiennent de l'ACTIVINE ou sont dépendants de la présence de MEF sécrétant de l'ACTIVINE (Greber et al., 2007 ; Gafni et al., 2013 ; Chan et al., 2013 ; Theunissen et al., 2014 ; Fang et al., 2014 ; Chen et al., 2015). De même, des PSC de lapin reprogrammées dans un état pseudo-naïf restent dépendantes de la voie ACTIVINE/NODAL (Tapponier et al., 2017 – article 2). Enfin, les PSC humaines à l'état naïf, contrairement aux PSC de souris, se différencient en amnios sous l'action de BMP4 (Guo et al., 2021).

En conclusion, les voies IL6/LIF, FGF, WNT et ACTIVINE/NODAL/BMP participent à la fois à l'organisation des différentes étapes de sortie de la pluripotence et à l'engagement dans les différents lignages extra-embryonnaires et embryonnaires. Elles irriguent les nombreux réseaux de soutien de la pluripotence (Fig. I26). La modulation de ces voies a permis la capture d'une grande diversité de cellules pluripotentes *in vitro*, à divers états de pluripotence. Cependant, la recherche sur l'embryon précoce est cruciale au développement de milieux permettant la dérivation de PSC. En effet, bien que la régulation des diverses voies de signalisation du développement embryonnaire soit conservée entre les différentes espèces de mammifères euthériens, de nombreuses variations existent d'une espèce à l'autre en termes de sensibilités aux ligands et à l'activation de ces voies.

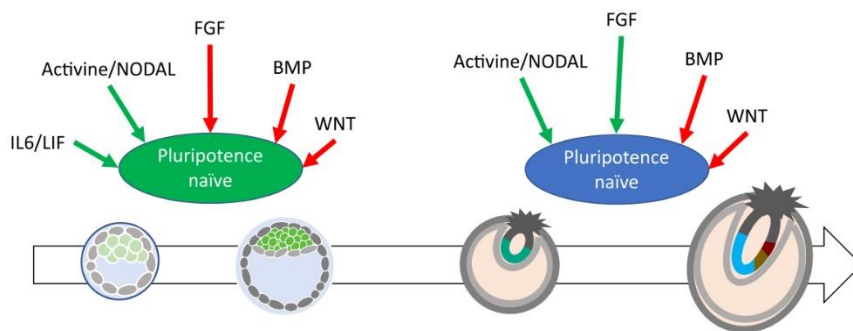


Figure I26 : Régulation de la pluripotence par différentes voies de signalisation. Schéma résumant l'action des voies IL6/LIF, ACTIVINE/NODAL, FGF, BMP et WNT sur les pluripotences naïve et amorcée.

III. Epigénome et pluripotence

L'épigénome d'une cellule est l'ensemble complet des marques épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, le remodelage de la chromatine, les ARN non codants et autres molécules qui peuvent transmettre des informations à travers la mitose en régulant l'expression génique. Cette régulation participe notamment à la mise en place de l'identité cellulaire. Au cours du développement embryonnaire, l'épigénome du zygote doit être « réinitialisé », à partir des cellules hautement spécialisées que sont les gamètes, afin de donner les cellules capables de former tous les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires d'un individu. Conrad H. Waddington a introduit dans les années 40 un modèle de « régulation épigénétique » du développement embryonnaire. Les premières cellules de l'embryon, représentées par une bille au sommet d'une colline, vont peu à peu descendre cette dernière et prendre différents embranchements, symbolisés par des sillons, qui illustrent l'engagement dans les différents lignages. Chaque embranchement est séparé par une colline de plus en plus grande, représentant la restriction de plus en plus forte qui s'exerce sur chaque lignage, empêchant le passage de l'un à l'autre. Cette descente de la colline, entre restriction et engagement dans les différents lignages, est la représentation d'un épigénome de plus en plus figé (Waddington, 1942 ; Fig. I27). Ce modèle illustre le fait que les cellules de l'embryon perdent peu à peu en potentialité. Cette perte de potentialité se traduit par l'établissement progressif d'un épigénome non-permissif à la transcription. On observe notamment l'accumulation de régions génomiques compactées comportant des amoncèlements de complexes répresseurs et de marques épigénétiques réprimant la transcription. A l'inverse, l'euchromatine, moins compacte est caractérisée par la présence de marques épigénétiques permissives à la transcription, où les complexes activateurs de la transcription vont pouvoir se fixer et s'accumuler (Fig. I26). Ainsi, selon ce modèle, les cellules vont progressivement s'engager dans différents lignages, et perdre leur caractère multipotent par répression épigénétique des gènes correspondants.

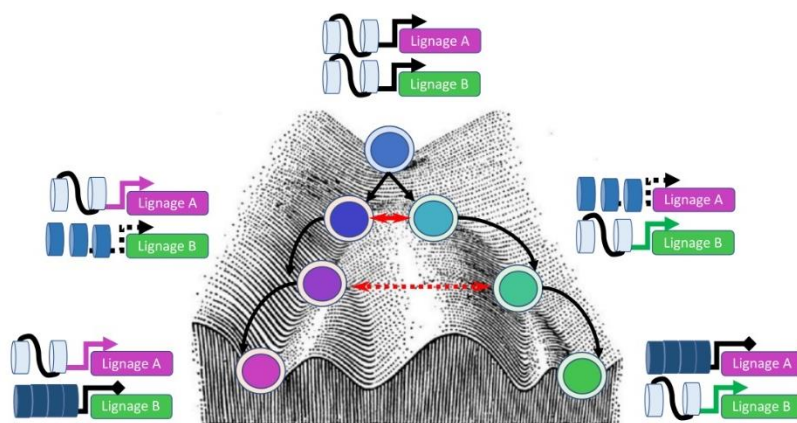


Figure I27 : Le modèle de Waddington. Schéma représentant le modèle de Waddington. Au fur et à mesure que les cellules s'engagent dans un lignage, elles perdent en plasticité. Les gènes spécifiques des autres lignages accumulent ainsi des marques d'hétérochromatine jusqu'à ce qu'ils deviennent non-permissifs à la transcription.

A. Méthylation et déméthylation de l'ADN au cours du continuum de pluripotence

Dans les promoteurs et les *enhancers*, la modification de cytosines, via l'addition d'un groupement méthyle par les DNMT, sert de point d'ancrage aux protéines MBD qui possèdent des domaines de reconnaissance spécifiques. Ces protéines permettent par la suite la fixation de complexes répresseurs. De ce fait, la méthylation des cytosines de l'ADN dans ces régions est considérée comme une marque répressive de la transcription, associée à l'hétérochromatine (Choy et al., 2010). La méthylation de l'ADN est supprimée de deux manières différentes : 1) soit passivement par absence de l'enzyme de maintenance DNMT1, entraînant à chaque phase de réplication de l'ADN une dilution des cytosines modifiées : le niveau de méthylation de l'ADN est alors divisé par deux ; 2) soit activement par l'action des enzymes TET, qui permettent l'oxydation du groupement méthyle en un intermédiaire hydroxyméthyl sur la cytosine (Fig. I28). Cet intermédiaire est ensuite oxydé davantage jusqu'à ce que la cytosine soit excisée et remplacée par une cytosine non-modifiée, ou simplement diluée au cours de la réplication. Les cytosines non-méthylées peuvent également être méthylées de novo par les enzymes DNMT3A et B (Fig. I28).

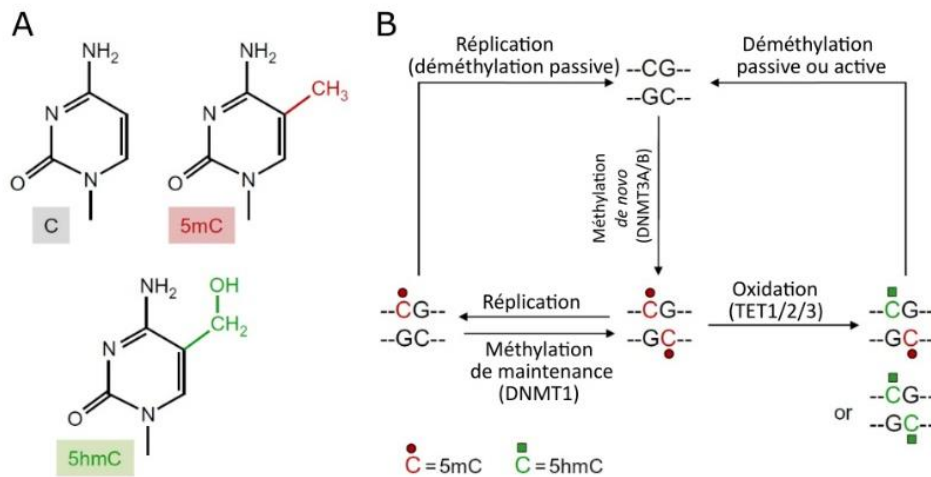


Figure I28 : Les modifications de l'ADN. (A) Schéma représentant l'addition de groupement méthyle et hydroxyméthyle sur une cytosine en position 5. (B) Schéma représentant les différentes étapes de méthylation et déméthylation de l'ADN. Adapté d'après Guibert et Weber, 2013.

La méthylation de l'ADN joue un rôle essentiel dans de nombreux mécanismes, tels que la régulation de l'inactivation du chromosome X, la répression d'éléments répétés et de rétrotransposons, la transmission de la mémoire épigénétique dans les cellules, *etc* ... (Guibert and Weber, 2013). Dans le développement embryonnaire précoce, une vague de déméthylation de l'ADN a lieu à la suite de la fécondation (Fig. I29A). Le génome paternel est alors principalement déméthylé par les enzymes TET, tandis que le génome maternel est surtout déméthylé passivement (Wossidlo et al., 2011 ; Guo et al., 2014 ; Okamoto et al., 2016). Par la suite, le niveau de méthylation de l'ADN reste faible jusqu'au stade blastocyste, essentiellement par déméthylation passive de l'ADN (Von Meyenn et al., 2016), mais aussi par surexpression des enzymes TET1/2, et sous-expression des DNMT3A et B (Salvaing et al., 2016). Ensuite, le niveau de méthylation de l'ADN augmente rapidement dans les cellules de l'épiblaste, notamment au moment de l'implantation (Borgel et al., 2010 ; Auclair et al., 2014 ; Zhou et al., 2019 ; Fig. I29A). Ce gain de méthylation est principalement dû à la surexpression de DNMT3B, bien que DNMT3A joue également un rôle dans ce phénomène (Borgel et al., 2010 ; Auclair et al., 2014). De plus, bien que les DNMT ne soient pas strictement nécessaire au développement embryonnaire précoce, leur délétion entraîne des dommages à l'ADN et de l'apoptose dans l'épiblaste (Sakaue et al., 2010). Par ailleurs, le niveau d'hydroxyméthylation reste élevé dans les cellules de l'épiblaste, la diminution de l'expression de *TET1* et *2* étant compensée par l'augmentation de celle de *TET3* (Dawlaty et al., 2013). De manière étonnante, chez la souris ainsi que pour d'autres mammifères, le TE est hypométhylé par rapport à l'ICM (Dean et al., 2001 ; Santos et al., 2002 ; Beaujean et al., 2004 ; Reis e Silva et al., 2012 ; Fig. I29A). Chez l'homme, il existe une augmentation graduelle de la méthylation de l'ADN au cours du développement dans l'épiblaste, mais également dans le PE et le TE, bien que leurs niveaux restent plus bas que dans l'épiblaste (Zhou et al., 2019 ; Fig. I29A). Par ailleurs, les mécanismes de cette régulation du méthylome de l'ADN au cours du développement embryonnaire péri-implantatoire semblent bien conservés entre les primates et les rongeurs. Les cinétiques d'expression des gènes *DNMT* et *TET* sont équivalentes d'un modèle à l'autre, y compris dans l'épiblaste tardif chez la souris, les primates et le porc (Nakamura et al., 2016 ; Mohammed et al., 2017 ; Boroviak et al., 2018 ; Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Xiang et al., 2020 ; Molè et al., 2021). Cependant, le rôle de ces différences de niveaux de méthylation entre le PE, l'épiblaste et

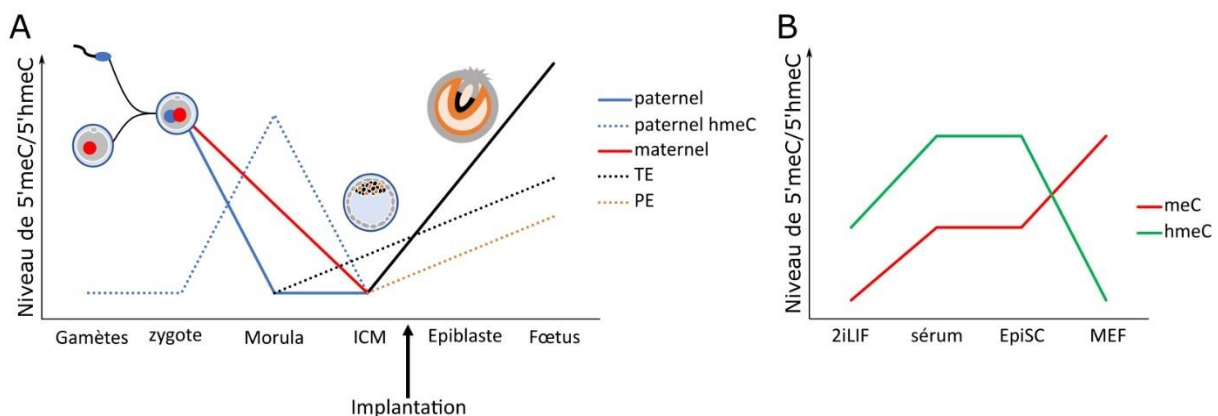


Figure I29 : Dynamique des modifications de l'ADN dans la pluripotence. (A) Schéma de l'évolution des modifications de l'ADN au cours du développement embryonnaire. Adapté d'après Guibert et Weber, 2013. (B) Schéma de la dynamique des modifications de l'ADN dans les PSC de souris s'autorenouvelant dans différents états de pluripotence.

le TE reste incompris aujourd’hui, puisque le KO des gènes *DNMT* ou *TET* n’influence pas la balance des lignages (Sakaue et al., 2010 ; Dawlaty et al., 2013).

La méthylation de l’ADN pourrait jouer un rôle dans la restriction de la pluripotence. Il a été en effet montré que des ESC murines différenciées en mésoderme sont capables de se trans-différencier en endoderme uniquement en absence de méthylation de l’ADN (Oda et al., 2013). Cette perte de potentialité lors de la différenciation serait dictée par l’augmentation du niveau de *Dnmt3* et de méthylation de l’ADN, augmentation qui est cohérente avec celle observée dans l’épiblaste post-implantatoire (Auclair et al., 2014). D’autre part, les *Dnmt3a* et *b* font partie des gènes dont l’expression est activée par *Oct4* (Pardo et al., 2010). En retour, elles permettent la répression de *Oct4* et de *Nanog* au cours de la différenciation (J.-Y. Li et al., 2007 ; Ito et al., 2010). Ainsi, dans l’embryon, *Oct4* induit la méthylation de l’ADN, qui va entraîner sa propre répression plus tard au cours du développement. Par contre, dans l’épiblaste précoce, l’action des *Dnmt3a* et *b* est contrecarrée par l’expression de la protéine *Prdm14*, exprimée spécifiquement à l’état naïf (Habibi et al., 2013 ; Grabole et al., 2013).

In vitro, les PSC murines et humaines à l’état naïf sont globalement hypométhylées, tout comme l’ICM. A l’inverse, les PSC à l’état amorcé sont hyperméthylées (Habibi et al., 2013 ; Hackett et al., 2013 ; Smith et al., 2014 ; Pastor et al., 2016 ; Theunissen et al., 2016 ; Guo et al., 2017). Le passage des ESC murines des conditions de culture 2i à sérum-Lif conduit à une importante reméthylation de l’ADN, dont le niveau est équivalent à celui des EpiSC. Cependant, les EpiSC et les EpiLC ont des niveaux d’hydroxyméthylation moins élevés par rapport aux ESC cultivées en sérum-Lif (Habibi et al., 2013 ; Hackett et al., 2013 ; Fig. I29B). Ces faits sont concordants avec la cinétique des modifications de l’ADN *in vivo* dans l’épiblaste. Cependant, il existe des différences dans les loci méthylés entre les PSC et leurs équivalents embryonnaires (Veillard et al., 2014 ; Pastor et al., 2016), qui pourraient être liées à l’utilisation de milieux de culture non-représentatifs du milieu utérin dans lequel se développent normalement les embryons. La méthylation de l’ADN est en effet très sensible à l’environnement et au milieu de culture, il n’est donc pas étonnant de voir de telles différences entre cellules en culture et cellules embryonnaires (Reis e Silva et al., 2012).

B. Les modifications d’histones et la régulation de la chromatine

Les modifications de l’ADN ne sont pas les seules marques épigénétiques régulant la chromatine pendant le continuum de pluripotence. Les modifications post-traductionnelles des queues d’histones participent également à la régulation de la pluripotence. Celles-ci servent d’ancrage et de signaux de reconnaissance à de nombreux complexes régulant la chromatine en coopération avec les modifications de l’ADN. Parmi les plus étudiées on trouve notamment celles associées à l’euchromatine, telles que les lysines acétylées sur les histones 3 et 4 (Fig. I29). En plus d’interagir avec les complexes favorisant la transcription, l’acétylation des histones a un effet direct sur la transcription. L’accumulation de groupes acétyles sur les histones permet de réduire la charge positive des histones, ce qui réduit leur liaison à l’ADN chargé négativement. Cela a pour effet un relâchement de la chromatine, rendant l’ADN plus accessible aux complexes de transcription. D’autres modifications, comme la méthylation des histones, ne sont pas unilatéralement liées à l’hétérochromatine ou

l'euchromatine (Fig. I30). La méthylation des lysines 9 et 27 de l'histone 3 conduit à la formation d'hétérochromatine, alors que la méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 est associée aux *enhancers* et aux promoteurs actifs.

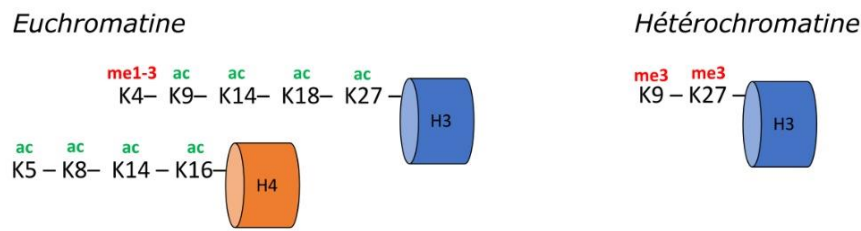


Figure I30 : Le code d'histone. Schéma représentant les principales modifications d'histone étudiées. En rouge les modifications associées à l'hétérochromatine, en vert celles associées à l'euchromatine.

La triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) est apposée par le complexe PRC2 (Fig. I31). Les composants de ce dernier sont vitaux pour le développement embryonnaire, et leur absence conduit à la dégradation de l'épiblaste post-implantatoire (Faust et al., 1998 ; O'Carroll et al., 2001 ; Pasini et al., 2004). Dans les ESC murines, leur présence n'est pas nécessaire à l'autorenouvellement, alors qu'elle l'est dans les PSC amorcées humaines et murines. Aussi bien dans les PSC naïves que amorcées, l'absence d'activité de PRC2 conduit à la dérégulation de gènes régulant le développement et la différenciation en différents lignages (Pasini et al., 2007 ; Chamberlain et al., 2008 ; Shen et al., 2008 ; Collinson et al., 2016 ; Shan et al., 2017 ; Yu et al., 2017). Cette dérégulation est suffisante dans les PSC amorcées pour les déstabiliser et conduire à la différenciation (Collinson et al., 2016 ; Shan et al., 2017 ; Yu et al., 2017). PRC2 agit également en coopération avec PRC1, qui appose la marque répressive de la mono-ubiquitination sur la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub ; voir Fig. I31). Tout comme PRC2, la délétion d'un élément de PRC1 entraîne la mort de l'embryon post-implantatoire (Voncken et al., 2003). Dans les ESC murines, ces deux marques sont co-localisées et la double inactivation des complexes PRC1 et 2 bloque la différenciation des ESC (Leeb et al., 2010).

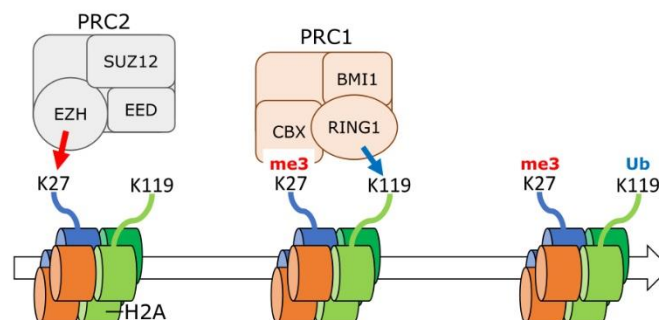


Figure I31 : Les complexes répresseurs polycombs. Schéma représentant les principales protéines des PRC2 et PRC1. Le PRC2 méthyle la lysine 27 de l'histone 3. La protéine CBX reconnaît cette modification d'histone et permet la liaison du PRC1 et par conséquent l'ubiquitination de la lysine 119 de l'histone 2A.

De manière intéressante, la marque H3K27me3 est aussi co-localisée avec la triméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3). Ces marques, dites bivalentes, correspondent à des modifications d'histones respectivement répressive et activatrice présentes sur le même locus et se retrouvent notamment au niveau des promoteurs de gènes de développement (Bernstein et al., 2006). Le nombre

de locii porteurs de marques bivalentes, et notamment de H3K27me3, augmente lors du passage des états naïf à amorcé, *in vivo et in vitro* (Rugg-Gunn et al., 2010 ; Marks et al., 2012 ; Zheng et al., 2016 ; Fig. I32). Étonnement, cette augmentation se traduit dans la majorité des cas par une augmentation de l'expression des gènes cibles, malgré la présence accrue d'H3K27me3 (Marks et al., 2012). A la sortie de la pluripotence, les domaines recouverts de la marque H3K27me3 s'étendent, et les gènes du réseau central de pluripotence sont réprimés par l'apposition de cette marque bivalente (Pan et al., 2007 ; Hawkins et al., 2010). Sur la majorité des gènes cibles, les marques bivalentes se dissipent, entraînant soit leur activation, par la perte de H3K27me3, soit leur inhibition, par perte de la marque H3K4me3 (Fig. I32). Ainsi, les PRC jouent un rôle essentiel à l'état amorcé dans la préparation à la différenciation et dans le maintien de la pluripotence. Leur activité permet la sortie efficace de la pluripotence.

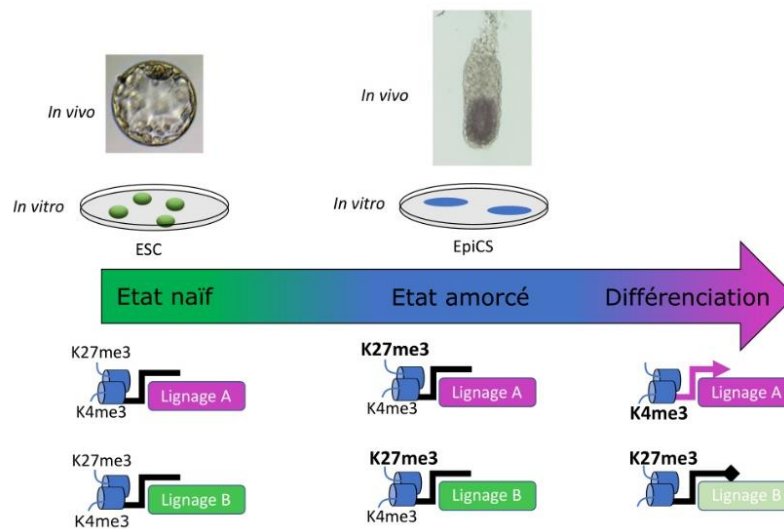


Figure I32 : Dynamique des marques bivalentes le long du continuum de pluripotence. Schéma représentant l'évolution de la présence des marques bivalentes H3K4me3 et H3K27me3 pendant la progression du continuum de pluripotence *in vitro* et *in vivo*. La taille des marques montre leur prédominance.

Une autre marque répressive majeure est la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9me3) dont le niveau est régulé par plusieurs méthyltransférases : EHMT1 et 2, qui catalysent la mono- et di-méthylation d'H3K9, ainsi que SUV39H1 et 2 et SETDB1, qui catalysent la tri-méthylation d'H3K9me2 (Fig. I33). Ces enzymes jouent un rôle important dans la régulation de la pluripotence. Chez la souris, la perte de *Ehmt2* ralentit le développement et le nombre de cellules exprimant *Sox17* (PE), sans pour autant affecter le TE (Zylicz et al., 2018). Au cours du développement embryonnaire, *Ehmt2* participe également à l'inactivation du gène *Oct4* en coopération avec les *Dnmt3a* et *b* (Feldman et al., 2006), tandis que *Ehmt1* coopère avec le réseau de pluripotence amorcé pour conduire à la sortie de l'état naïf (Mayer et al., 2020).

On pourrait penser que l'accumulation d'H3K9me3 et l'expression de ces méthyltransférases est une

EHMT1 et 2 : *euchromatic histone lysine methyltransferase 1 and 2*, aussi appelés respectivement *G9A-like protein 1* (GLP) et G9A

SUV39H : *suppressor of variegation 3-9 homolog*

caractéristique des cellules amorcées et en différenciation. Ce n'est que partiellement vrai. La délétion de *Setdb1*, une autre méthyltransférase, conduit à la perte de l'ICM (Dodge et al., 2004). Cette perte passe par la répression de l'expression de *Oct4* dans l'ICM ainsi que par la dérégulation de gènes de lignage tel que *Cdx2*. *Setdb1* coopère en fait avec *Oct4* afin de réprimer dans les cellules pluripotentes les gènes régulant la progression dans le développement, dont notamment des gènes du réseau de pluripotence amorcé (Bilodeau et al., 2009). H3K9me3 joue ainsi un double rôle dans le continuum de pluripotence : elle permet la progression de ce continuum tout comme la méthylation de l'ADN, mais protège aussi les cellules pluripotentes de la différenciation.

D'autres modifications d'histones ont également des rôles contradictoires dans la régulation de la pluripotence. Par exemple, la méthylation d'H3K4 peut être à la fois pro-autorenouveauement ou pro-différenciation. Plusieurs enzymes sont impliquées dans ces mécanismes :

- *Setd1a* se lie à *Oct4* et permet le maintien de l'expression de ses cibles. *Setd1a* est nécessaire à l'autorenouveauement des cellules pluripotentes de souris à l'état naïf, *in vitro* et *in vivo* (Fang et al., 2016).

- *SETD7* est sur-exprimé lors de la différenciation des ESC murines et humaines (Castano et al., 2016 ; Tuano et al., 2016). Son expression est anti-corrélée avec celles de *OCT4* et *SOX2*, et sa répression conduit à des dérégulations de la transcription au cours de la différenciation (Babaie et al., 2007 ; Castano et al., 2016 ; Tuano et al., 2016).

- *KMT2A*, dont l'inhibition favorise la conversion d'EpiSC à l'état naïf (Zhang et al., 2016).

- *KDM1A*, qui peut déméthyle soit H3K4 soit H3K27, et permet l'inhibition des gènes de développement en coopération avec les marques bivalentes et les facteurs de transcription *OCT4* et *NANOG* dans les ESC humaines (Adamo et al., 2011). Dans les ESC murines, l'absence de *Kdm1a* favorise plutôt l'autorenouveauement et perturbe la différenciation (Whyte et al., 2012).

Enfin concernant l'acétylation des histones, la transition vers des états plus avancés de pluripotence et la différenciation se traduisent par une baisse du niveau d'acétylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9ac) (Hayashi et al., 2008 ; Krejci et al., 2009). Ainsi, dans les ESC, l'inhibition des désacétylases d'histone (HDAC) induit une augmentation de l'acétylation qui favorise la conversion de

KDM3 : lysine demethylase 3, aussi appelées *jumonji domain containing 1* (JMJD1) ou *jmjC domain-containing histone demethylase 2* (JHDM2)

KDM4 : lysine demethylase 4, aussi appelées *jumonji domain containing 2* (JMJD2) ou *jmjC domain-containing histone demethylase 3* (JHDM3)

SETD1A : *SET domain containing histone methyltransferase 1A*, aussi appelée *lysine N-methyltransferase 2 F* (*KMT2F*)

SETD7 : *SET domain containing histone methyltransferase 1A*, aussi appelée *SET7*, *SET9* et *lysine N-methyltransferase 7* (*KMT7*)

KMT2A : *lysine methyltransferase 2A*, aussi appelée *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia* (*MLL1*)

KDM1A : *lysine demethylase 1A*, aussi appelée *lysine-specific histone demethylase 1* (*LSD1*)

HDAC : *histone deacetylase*

l'état amorcé à l'état naïf (Ware et al., 2009 ; Guo et al., 2017). Chez la souris, la double délétion ou la double répression des Hdac1 et 2 empêche la différenciation du TE et de l'ICM, et entraîne l'apoptose des cellules pluripotentes *in vivo* et *in vitro* (Jamaladdin et al., 2014). En effet, en l'absence de Hdac1, les ESC deviennent plus permissives à la différenciation (Dovey et al., 2010). Il a notamment été montré que Hdac1 s'associe à l'histone H3 acétylée au niveau des promoteurs de gènes régulant positivement la pluripotence et servirait à limiter leur expression. A l'opposé, l'utilisation d'un inhibiteur de Hdac conduit à la répression de ces mêmes gènes et à l'expression de gènes de lignages (Kidder and Palmer, 2011). Ainsi, si l'inhibition des Hdac a pour effet une ouverture de la chromatine qui facilite la conversion de PSC à l'état amorcé, cela active également l'expression de gènes de différenciation (Fig. I33). De plus, la perte des Hdac1 et 2 rappelle le phénotype de la délétion de *Ehmt2*, où la dérégulation de la chromatine entraîne une dérégulation du transcriptome et la mort cellulaire (Jamaladdin et al., 2014).

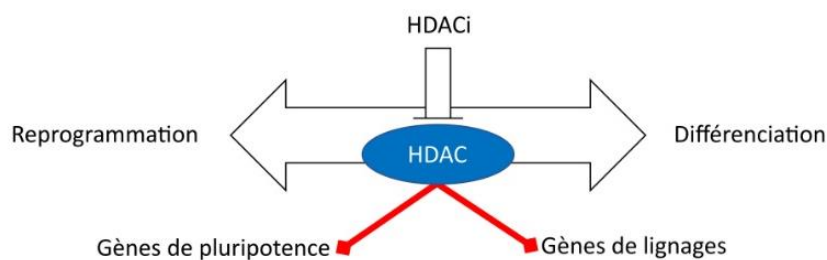


Figure I33 : Impact des inhibiteurs des HDAC sur les PSC. L'utilisation de HDAC permet soit la reprogrammation de PSC en levant la répression des gènes de pluripotence, soit la différenciation des PSC en levant la répression des gènes de lignages.

En conclusion, les cellules pluripotentes ont tendance à accumuler de plus en plus d'hétérochromatine dans leurs noyaux à mesure de leur progression le long du continuum de pluripotence et lorsqu'elles se différencient (Ahmed et al., 2010). Le rôle des différentes modifications d'histone dépend largement de leur loci d'apposition, eux-mêmes variant d'une enzyme à l'autre ou même d'un contexte cellulaire à l'autre.

Ces quelques modifications d'histones présentées ici ne représentent qu'une partie des modifications existantes. Pour la plupart, leur rôle n'a pas encore été beaucoup étudié. De plus, ces études reposent souvent sur le modèle murin, et dans une moindre mesure sur le modèle humain. Les cinétiques d'expression des enzymes régulant ces marques sont à priori similaires d'un modèle à l'autre (Nakamura et al., 2016 ; Mohammed et al., 2017 ; Boroviak et al., 2018 ; Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Xiang et al., 2020 ; Molè et al., 2021). Il n'est cependant pas exclu que, malgré cela, ces enzymes ciblent des régions génomiques différentes d'une espèce à l'autre.

C. L'inactivation du X et la sortie de l'état naïf

L'inactivation du X est également un mécanisme épigénétique qui entre en jeu au cours du développement. Chez les mammifères, la présence de deux chromosomes X chez les individus femelles nécessite un équilibrage du niveau d'expression des gènes présents sur le X. Cet équilibrage se fait par inactivation aléatoire d'un des chromosomes X au cours du développement. L'inactivation du X est un processus épigénétique qui démarre par l'accumulation aléatoire, sur un des deux chromosomes X, du long ARN non-codant *XIST* (Fig. I34A). La présence de *XIST* va permettre l'inactivation des gènes du X par désacétylation des queues d'histone. En parallèle, le complexe PRC1 dépose la marque H2AK119ub dans les régions intergéniques, puis le complexe PRC2 effectue l'apposition de H3K27me3. Ces marques s'étendent ensuite aux gènes inactivés via les HDAC (Zylicz et al., 2019 ; Fig. I34B). D'autres marques répressives s'accumulent enfin sur le X, jusqu'à ce qu'il soit complètement condensé et accolé à la périphérie du noyau, où il forme le corpuscule de Barr (Fig. I34A).

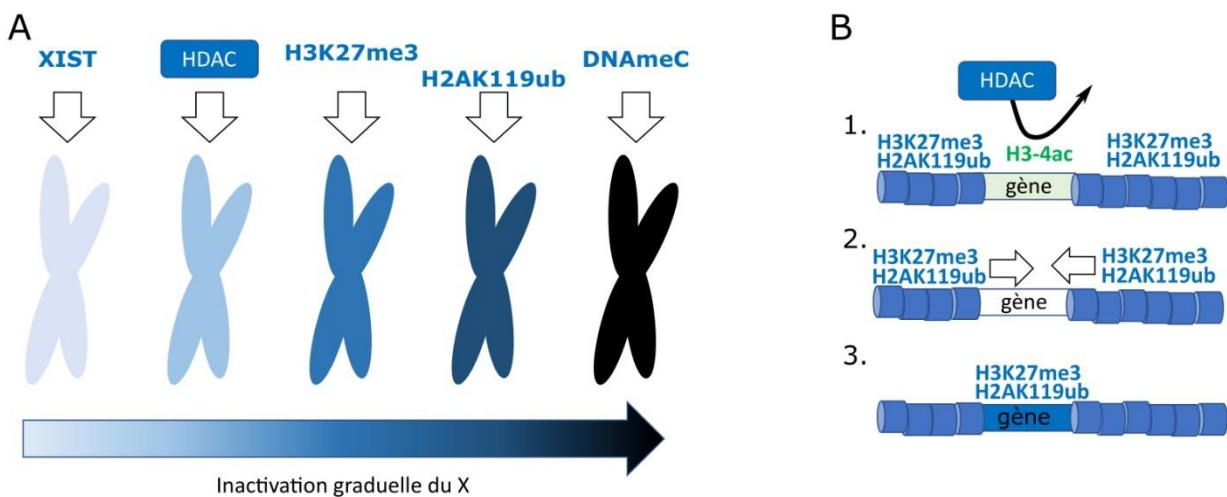


Figure I34 : L'inactivation épigénétique du chromosome X. (A) Schéma représentant l'accumulation progressive d'hétérochromatine sur le chromosome X inactivé. (B) Schéma représentant la diffusion progressive des marques H3K27me3 et H2AK119ub.

Chez la souris, le chromosome X paternel est inactivé au cours du développement pré-implantatoire avant le stade morula (Okamoto et al., 2004). Lors de la formation du blastocyste, le chromosome X paternel est réactivé dans les futures cellules de l'épiblaste, de manière corrélée à l'expression des gènes du réseau étendu de la pluripotence naïve. L'expression de *Oct4* est notamment fortement corrélée à la réactivation du X (Donohoe et al., 2009 ; Navarro et al., 2010 ; Mohammed et al., 2017). A l'inverse, l'expression de *Dnmt3a* corrèle fortement avec le début de l'inactivation du X (Mohammed et al., 2017). En effet, un des chromosomes X est ensuite inactivé de manière aléatoire dans l'épiblaste après l'implantation et, au jour 6.5, l'inactivation du X est totale (Kobayashi et al., 2016 ; Mohammed et al., 2017).

Chez les primates, le lapin, le porc et le bovin, il n'y a pas d'inactivation du chromosome X paternel puis de réactivation dans l'ICM au stade blastocyste. L'expression de *XIST* commence au stade 8-cellules, au moment de l'EGA (Okamoto et al., 2011 ; Petropoulos et al., 2016 ; Ramos-Ibeas et al., 2019

; Zou et al., 2019 ; Yu et al., 2020 ; Cidral et al., 2021). Cependant, la véritable inactivation du X n'a lieu que bien plus tard, après l'implantation chez les primates, au jour 5 chez le lapin et au jour 10 chez le porc (Okamoto et al., 2011 ; Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Zhou et al., 2019).

Avant cela, les stratégies de régulation de l'inactivation du X divergent entre les espèces. Chez les primates et le lapin, *XIST* est exprimé par tous les chromosomes X, aussi bien dans les embryons mâles que femelles (Okamoto et al., 2011), comme dans l'épiblaste murin juste avant l'implantation (Sousa et al., 2018). S'ensuit, chez le lapin, une accumulation progressive de *XIST* et H3K27me3, avec 0 à 2 foyers d'accumulation au jour 4, puis un seul foyer par cellule au jour 5 (Okamoto et al., 2011). Chez l'Homme, il n'y a pas de pré-accumulation d'H3K27me3 aux stades pré-implantatoires analysés (Okamoto et al., 2011). Grâce aux jeux de données de séquençage ARN en cellules uniques sur embryons humains, il a été montré que l'inactivation du X a lieu progressivement et n'est pas encore terminée au jour 12 (Petropoulos et al., 2016 ; Moreira de Mello et al., 2017 ; Zhou et al., 2019). Certains auteurs ont par ailleurs montré qu'il existerait un phénomène « d'étouffement » de l'activation des chromosomes X dans les embryons femelles avant l'inactivation du X (Petropoulos et al., 2016). L'existence de ce phénomène est encore sujette à débat. En effet, une récente publication sur des embryons de marmousets tendrait à prouver le contraire (Moreira de Mello et al., 2017 ; Cidral et al., 2021).

Chez le porc, contrairement au lapin, il n'y a pas de pré-accumulation d'H3K27me3 avant l'inactivation du X, qui a lieu peu de temps avant l'implantation au jour 10. Il n'y a pas non plus de phénomène « d'étouffement » de l'expression du X dans les embryons femelles (Ramos-Ibeas et al., 2019). Enfin, chez le bovin, *XIST* et H3K27me3 s'accumulent rapidement sur un des chromosomes X de façon co-localisée. Cependant cette accumulation précoce n'aboutit pas à l'inactivation du X aux stades analysés (Yu et al., 2020).

Dans les PSC en culture, l'état de l'inactivation du X reflète leur état de pluripotence. Ainsi, dans les lignées femelles de PSC amorcées, un des chromosomes X est inactif, alors qu'à l'état naïf, les PSC de souris présentent deux chromosomes X actifs (Bao et al., 2009 ; Bao et al., 2009 ; Kobayashi et al., 2016 ; Afanassieff et al., 2020 – article 3). Par ailleurs, la réversion d'un état de pluripotence à l'autre entraîne l'inactivation ou la réactivation d'un des deux chromosomes X chez la souris (Bao et al., 2009). De même, chez l'Homme et le lapin, la plupart des conversions à l'état naïf semblent entraîner la réactivation du X, tandis que la réversion à l'état amorcé conduit à son inactivation (Hanna et al., 2010 ; Gafni et al., 2013 ; Theunissen et al., 2014 ; Takashima et al., 2014 ; Jiang et al., 2014 ; Chen et al., 2015 ; Theunissen et al., 2016 ; Guo et al., 2017 ; Afanassieff et al., 2020 – article 3). Il y a cependant beaucoup d'incertitudes quant à l'utilisation de l'inactivation du X pour déterminer l'efficacité de la conversion à l'état naïf chez l'Homme. En effet, certaines études font état d'une réactivation seulement partielle du X et de l'érosion de l'inactivation du X dans les cultures à long terme (Mekhoubad et al., 2012 ; Takashima et al., 2014 ; Chen et al., 2015 ; Panova et al., 2018). De plus, comme *XIST* est exprimé aussi bien à l'état naïf qu'amorcé, sa seule expression ne suffit pas à évaluer l'état de pluripotence des PSC humaines. Par ailleurs, l'inactivation du X lors de la différenciation de PSC humaines naïves ne récapitule pas totalement non-plus l'inactivation du X au cours du développement embryonnaire (Sahakyan et al., 2017 ; Panova et al., 2018).

De manière générale, l'inactivation du X au cours du continuum de pluripotence semble bien conservée entre les différents mammifères modèles (Fig. 135). Cependant, les divergences inter-espèces dans la régulation de cette inactivation doivent être prises en compte dans l'évaluation du degré de réactivation ou d'inactivation du X dans les PSC.

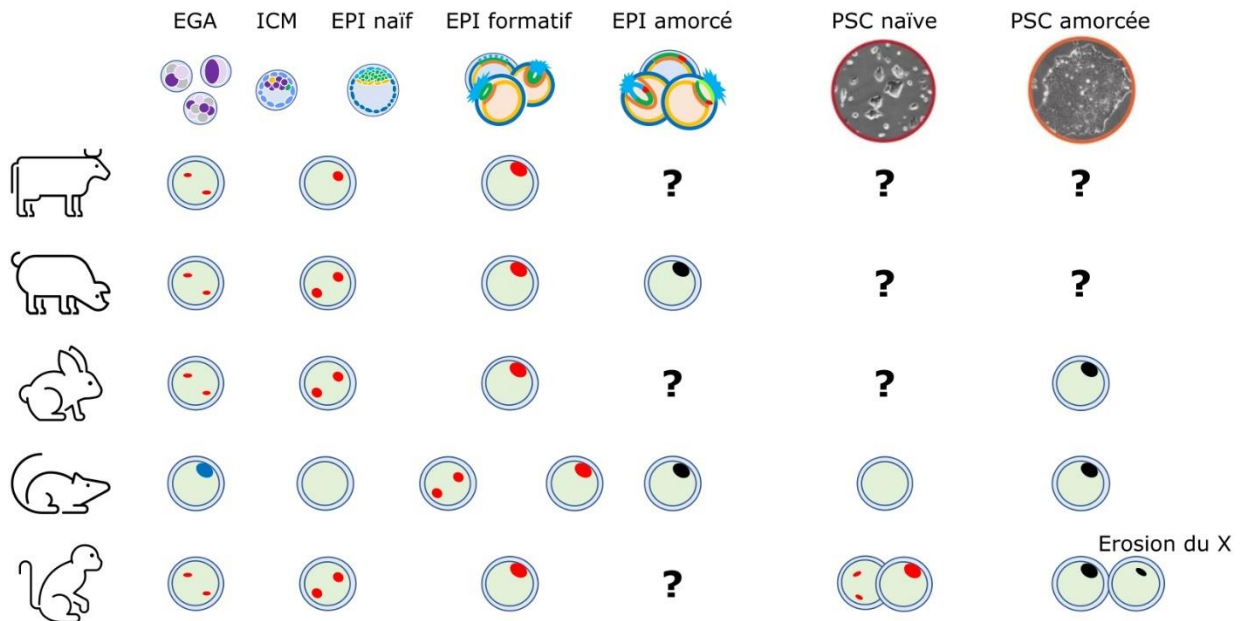


Figure 135 : Comparaison de la dynamique de l'inactivation du chromosome X au cours du développement embryonnaire précoce. Schéma représentant l'inactivation progressive du X au cours du développement embryonnaire chez le bovin, le porc, le lapin, la souris et les primates. Les points d'interrogation représentent les données manquantes. En rouge, l'accumulation plus ou moins forte de marques répressives sur les chromosomes X. En noir, le X complètement inactivé. En bleu, X paternel inactivé dans l'ovocyte de souris.

Au cours du développement, les cellules pluripotentes subissent de nombreux changements épigénétiques, comme le suggérait le modèle de Waddington, ce qui va restreindre leur potentialité. Il y a notamment l'accumulation d'hétérochromatine via la méthylation de l'ADN, l'accumulation de modifications répressives d'histones et l'inactivation aléatoire d'un des chromosomes X dans les embryons femelles. Cependant, l'hétérochromatine est nécessaire, autant que l'euchromatine, au maintien de la pluripotence et à sa déstabilisation. D'une espèce à l'autre, ces mécanismes sont encore une fois de plus globalement similaires, mais il existe en revanche de nombreuses différences dans les détails de leur régulation.

IV. Métabolisme et pluripotence : la balance entre phosphorylation oxydative et glycolyse

Le métabolisme désigne l'ensemble des activités biochimiques permettant à la cellule de produire toutes les molécules, notamment les acides aminés, nécessaires à son fonctionnement. Les divisions rapides et la prolifération des cellules embryonnaires nécessitent une activité métabolique intense, qui va à la fois soutenir la croissance embryonnaire, mais aussi moduler d'autres mécanismes tels que l'épigénome ou les voies de signalisation. L'une des fonctions du métabolisme est de fournir de l'énergie à la cellule, sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Il existe deux grandes voies métaboliques permettant de produire de l'ATP (Fig. I36) :

- La première voie est l'OXPHOS. L'OXPHOS est réalisée dans les membranes des mitochondries par les complexes de la chaîne respiratoire. En hydrolysant l'oxygène, les complexes de la chaîne respiratoire permettent de fournir une grande quantité d'ATP.
- L'autre voie de production de l'ATP est la glycolyse, c'est une suite de réactions enzymatiques qui va permettre de transformer le glucose en pyruvate, générant ainsi de l'ATP. Le pyruvate peut ensuite être décarboxylé de manière irréversible en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), qui entrera alors dans le cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique, où il sera oxydé pour produire du succinate et du nicotinamide adénine dinucléotide H (NADH), qui serviront à alimenter la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'OXPHOS permet la production de grande quantité d'énergie par rapport à la glycolyse et aux autres voies métaboliques telles que la fermentation ou la β -oxydation des acides gras.

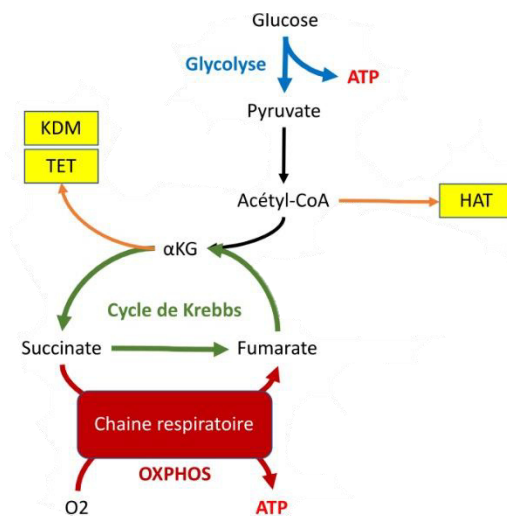


Figure I36 : Métabolisme et pluripotence. Schéma représentant les différentes voies métaboliques impliquées dans la régulation de la pluripotence.

Le métabolisme régule également la pluripotence en interagissant avec la chromatine. En effet, les enzymes acétyl-transférases d'histones (HAT) dépendent de l'acétyl-CoA pour fonctionner, tandis que les déméthylases ont besoin du cofacteur α -cétoglutarate (α KG) pour leur fonction (Fig. I36). De plus, les méthyltransférases ont besoin du S-adénosylméthionine (SAM) pour méthyler leurs cibles (Martinez-Pastor et al., 2013). Dans les ESC humaines, la formation d'acétyl-CoA par la glycolyse

HAT : histone acetyl-transferase

maintient le niveau élevé d'acétylation des histones et inhibe la différenciation (Moussaieff et al., 2015). Dans les ESC murines, c'est la production d' α KG par le cycle de Krebs qui permet le maintien de l'activité des déméthylases de l'ADN et des histones, afin de promouvoir la pluripotence et d'inhiber la différenciation (Carey et al., 2015 ; Hwang et al., 2016). Il a également été montré que les gènes *Oct4*, *Sox2* et *Nanog* du réseau central de pluripotence stimulent la production d' α KG et l'inhibition de cette production conduit à la différenciation (Hwang et al., 2016). L' α KG permet également d'accélérer la différenciation des ESC humaines, soulignant son rôle, via la régulation de l'euchromatine, dans le maintien de la pluripotence mais aussi dans la dérégulation des gènes de lignages (Teslaa et al., 2016).

In vivo, la croissance de l'embryon est, dans un premier temps, totalement indépendante au glucose jusqu'au stade morula. Elle est en revanche dépendante au lactate et au pyruvate, signe d'une activité plutôt OXPHOS (Fig. I37). Par la suite, l'apport de glucose devient nécessaire à la survie et au développement de l'embryon (Brown and Whittingham, 1991), même si une brutale accélération de l'OXPHOS s'opère en parallèle (Houghton et al., 1996 ; Fig. I37). La majorité de l'activité OXPHOS est alors située dans le TE, ce qui lui permet de faire fonctionner les nombreuses pompes ATPase nécessaires à l'agrandissement du blastocœle (Houghton, 2006 ; Fig. I37). Suite à l'implantation, l'activité OXPHOS diminue et atteint de nouveau le niveau existant avant la cavitation (Houghton et al., 1996 ; Fig. I37). Cette diminution s'accompagne de la diminution de l'expression des gènes *Cox* mitochondriaux (Zhou et al., 2012).

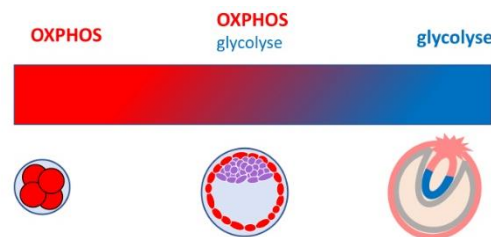


Figure I37 : Evolution du métabolisme au cours du développement. Schéma représentant l'évolution de la prépondérance de la glycolyse et de l'OXPHOS au cours du développement embryonnaire. En rouge les cellules avec une forte activité OXPHOS, en bleu avec une forte activité glycolytique et en violet les cellules effectuant les deux métabolismes.

Chez le bovin, la cinétique métabolique embryonnaire est similaire à celle de la souris (Gopichandran and Leese, 2003). Les études d'analyses transcriptomiques d'embryons ont aussi montré, chez le macaque cynomolgus et chez le porc, l'existence d'une diminution de l'expression de gènes associés à l'OXPHOS (Nakamura et al., 2016 ; Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Niu et al., 2019). Chez le porc, il existe en plus une surexpression progressive des différentes enzymes régulant la glycolyse, dont *HIF1A*, un régulateur important de la réponse à l'hypoxie (Ramos-Ibeas et al., 2019).

En 2012, une étude a montré que lors du passage des états naïf à amorcé, les PSC murines passent d'un métabolisme majoritairement OXPHOS à un métabolisme dépendant de la glycolyse. L'inhibition de la glycolyse dans les PSC amorcées induit leur mort. A l'inverse, l'induction de la glycolyse ou

HIF1A : *hypoxia inducible factor 1 subunit alpha*

l'activation de Hif1a dans les ESC murines naïves conduisent à leur conversion en PSC amorcées (Zhou et al., 2012). Le gène *Lin28* facilite également la conversion à l'état amorcé en inhibant l'expression des gènes de l'OXPPOS (Zhang et al., 2016). Un autre gène exprimé dans les cellules amorcées, *Zic3*, permet aussi la répression de l'OXPPOS. A l'inverse le facteur de transcription du réseau de pluripotence étendu naïf, *Esrrb*, active l'OXPPOS (Sone et al., 2017).

Dans les PSC naïves, la voie Lif interagit directement avec le métabolisme. L'activation de Stat3 entraîne en effet sa translocation dans les mitochondries, ce qui conduit à l'élévation du niveau d'OXPPOS. L'élévation de l'OXPPOS par le Lif est essentielle à la conversion à l'état naïf, et l'activation de l'OXPPOS dans des EpiSC facilite leur réversion (Carbognin et al., 2016). Les PSC humaines converties à l'état naïf par le protocole dit RESET sont également résistantes à l'inhibition de la glycolyse, comme les ESC murines (Takashima et al., 2014). Dans les PSC humaines converties à l'état naïf, les gènes associés à l'OXPPOS sont surexprimés (Lynch et al., 2020).

Il convient cependant de noter qu'il existe des différences entre le métabolisme des cellules pluripotentes *in vivo* et *in vitro*. Une analyse transcriptomique réalisée sur la souris a notamment révélé que la principale source de différence entre les cellules de l'ICM et les ESC concernait des gènes associés au métabolisme (Boroviak et al., 2015). De plus, bien que les ESC *in vitro* peuvent s'autorenouveler en absence de glycolyse, les blastocystes sont eux dépendants au glucose pour leur croissance (Brown and Whittingham, 1991 ; Zhou et al., 2012). Les ESC *in vitro* ont également un métabolisme bivalent : elles sont capables de continuer à s'autorenouveler en absence soit de glycolyse, soit d'OXPPOS (Zhou et al., 2012). Il n'est pas certain que cette capacité existe *in vivo*.

Le métabolisme est un puissant régulateur de l'état cellulaire, mais il est également très sensible à l'environnement. Les PSC *in vitro* se multiplient dans des milieux artificiels, avec des concentrations en CO₂ et O₂ souvent différentes de celles de l'environnement utérin. Même lorsque la concentration de ces gaz est contrôlée, la nécessité de changer le milieu et de manipuler régulièrement les PSC entraîne des modifications brutales de la concentration de ces gaz. Si les PSC *in vitro* ne sont pas forcément équivalentes métaboliquement aux cellules embryonnaires, la régulation du métabolisme reste un outil intéressant dans la recherche de la capture des différents états de pluripotence.

V. Régulation du cycle cellulaire et sortie de la pluripotence

Les cellules souches pluripotentes prolifèrent rapidement en culture. Cette prolifération est permise par une régulation du cycle cellulaire différente de celle des cellules somatiques. Dans les cellules somatiques, le cycle cellulaire est divisé en quatre phases : le premier intervalle (G1), la phase de synthèse de l'ADN (S), le second intervalle (G2) et la mitose (M). La progression d'une phase à l'autre est assurée par la production et la dégradation dynamiquement des complexes cyclines-CDK (Fig. I38). Pendant la phase G1, la synthèse des cyclines de type D (D1, D2 et D3) conduit à l'activation des sous-unités catalytiques CDK4 et CDK6. Les complexes cycline D-CDK4, cycline D-CDK6 et cycline E-CDK2 phosphorylent alors la protéine rétinoblastome (RB) conduisant à son inactivation. L'inactivation de RB permet ensuite l'activation des facteurs de transcription de la famille E2F. Ces facteurs stimulent la synthèse des complexes cycline E-CDK2 qui provoquent alors l'engagement irréversible dans la phase S. Les complexes cycline A-CDK2 régulent la progression dans la phase S. Enfin, pendant la phase G2, la formation des complexes cycline B-CDK1 déclenche la mitose.

Les CDKN permettent au contraire d'empêcher la progression du cycle cellulaire (Fig. I38). Les protéines de la famille INK, p16^{INK4a} et p19^{INK4d} (codées par le gène *CDKN2A*), p15^{INK4b} (codée par le gène *CDKN2B*), et p18^{INK4c} (codée par le gène *CDKN2C*), inhibent les complexes cycline D-CDK4 et cycline D-CDK6 pendant la phase G1. Les protéines de la famille KIP/CIP, p21^{Cip1} (codée par le gène *CDKN1A*), p27^{Kip1} (codée par le gène *CDKN1B*), et p57^{Kip2} (codée par le gène *CDKN1C*) inhibent l'activité des autres complexes, cycline E-CDK2 et cycline A-CDK2, cycline B-CDK1. Enfin, p53 est un régulateur essentiel du cycle cellulaire, qui promeut l'activation de p21, et entraîne l'arrêt en G1 en réponse à des dommages à l'ADN.

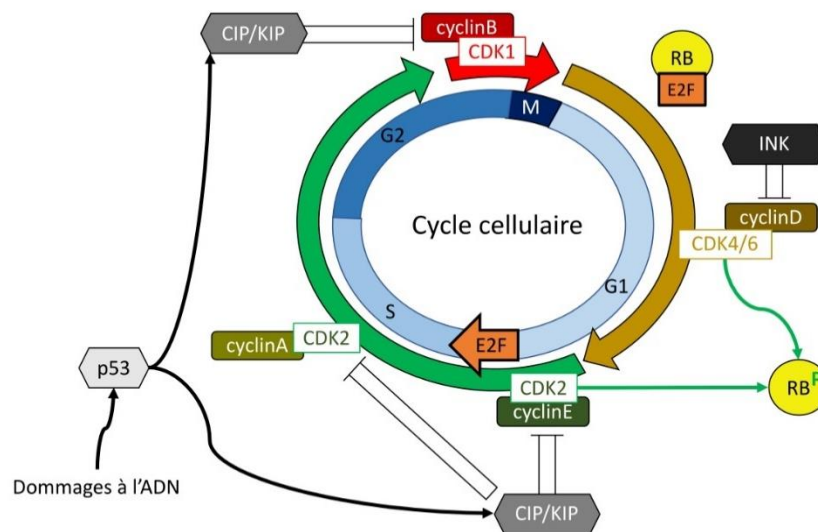


Figure I38 : Régulation du cycle cellulaire et pluripotence. Schéma représentant la régulation de la progression des différentes phases du cycle cellulaire.

CDK : *cyclin-dependent kinase*

APC : *anaphase promoting complex*

CDKN : *cyclin-dependent kinase inhibitor*

Au cours du développement embryonnaire, suite aux premières divisions cellulaires la durée du cycle cellulaire se stabilise au moment de la cavitation et est d'environ 10h (Snow and Bennett, 1978 ; Streffer et al., 1980 ; Molls et al., 1983). Après l'implantation, le cycle cellulaire s'accélère, et les cellules de l'épiblaste antérieur cyclent environ toutes les 7-8 heures, tandis que celle de l'épiblaste postérieur se divisent en seulement 3 à 5 heures environ (Solter et al., 1971 ; Snow and Bennett, 1978 ; Mac Auley et al., 1993). Alors que dans les cellules somatiques les variations du cycle cellulaire dépendent surtout de la longueur de la phase G1, dans l'embryon se sont toutes les phases du cycle cellulaire qui sont raccourcies (Mac Auley et al., 1993). On interprète généralement cette accélération par la nécessité d'accroître très rapidement le nombre de cellules pluripotentes avant le début de la gastrulation.

Les PSC de souris ont un cycle cellulaire d'environ 10h (Stead et al., 2002 ; Sakaue-Sawano et al., 2017), alors qu'il est d'environ 16h dans les PSC de primates (Becker et al., 2006 ; Fluckiger et al., 2006). Cette différence de durée peut avoir au moins deux explications : soit les PSC de primates, qui ont été utilisées dans ces études s'autorenouvèlent, à l'état amorcé et possèdent donc un cycle cellulaire régulé différemment des PSC naïves (voir plus loin), soit le développement embryonnaire des primates étant plus long, les cellules de primates ont un cycle cellulaire plus long.

Tout comme les cellules de l'ICM d'embryons de souris, les PSC murines, humaines et de lapin n'ont pas de point de contrôle du cycle cellulaire en G1, et s'accumulent en phase G2 sous l'effet d'agents génotoxiques provoquant des cassures double-brins de l'ADN (Osteil et al., 2013). Cette absence d'arrêt en G1 pourrait être lié au raccourcissement de cette phase. En effet, les PSC possèdent une protéine RB constitutivement phosphorylée, ce qui lève l'inhibition de l'entrée en phase S (Savatier et al., 1994 ; Stead et al., 2002 ; White et al., 2005 ; Fluckiger et al., 2006 ; Filipczyk et al., 2007 ; Fig. I39). Cette activation constitutive est due à l'activité continue des complexes cyclines E-CDK2 et cyclines A-CDK2 (Stead et al., 2002 ; Filipczyk et al., 2007 ; Fig. I39). Dans les PSC humaines en revanche, les complexes cycline A-CDK2 sont présents uniquement pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire. Il en résulterait une plus grande facilité pour les PSC humaines à inhiber la phosphorylation de RB et à s'arrêter en phase G1 (Filipczyk et al., 2007 ; Sela et al., 2012).

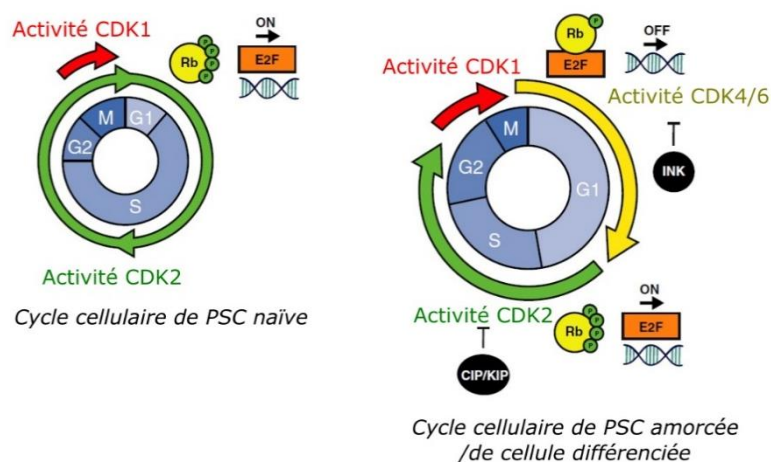


Figure I39 : Régulation du cycle cellulaire et pluripotence. Schéma de l'évolution de la régulation du cycle cellulaire entre l'état naïf d'une part et l'état amorcé et les cellules différenciées d'autre part. Adapté d'après Padgett and Santos, 2020.

En effet, il a été montré que plus les PSC sont dans un état avancé du continuum de pluripotence, plus elles ont une phase G1 rallongée proportionnellement à leur cycle cellulaire (Sela et al., 2012 ; Coronado et al., 2013 ; Fig. I38). Ce rallongement de la phase G1 permettrait une plus grande sensibilité aux signaux de différenciation (Coronado et al., 2013). L'inhibition de CDK2 conduit au ralentissement du cycle cellulaire, au rallongement de la phase G1 et à la différenciation des PSC (Filipczyk et al., 2007 ; Neganova et al., 2009 ; Koledova et al., 2009). Ainsi, au cours du continuum de pluripotence les cellules rallongeraient petit à petit leur phase G1, permettant leur sortie de la pluripotence lors de la gastrulation. Au cours du développement embryonnaire de la souris, la proportion de cellules en phase G1 a été montré comme augmentant avec le temps, ce qui corrobore cette hypothèse (Streffer et al., 1980).

Le maintien d'un cycle cellulaire rapide dans les PSC est essentiel au soutien de leur pluripotence, les régulateurs du cycle cellulaire participant au contrôle des réseaux de pluripotence (Fig. I40). Par exemple, Cdk1 coopère avec Oct4 afin de réprimer la différenciation en TE (L. Li et al., 2012). A l'inverse, p21 et p27 inhibent l'expression de Sox2 (H. Li et al., 2012 ; Angeles Marques-Torrejon et al., 2013), tandis que dans les ESC murines la forte expression de *Nanog* est corrélée à une surexpression des régulateurs du cycle cellulaire. La sous-expression de *Nanog* quant à elle est associée à la surexpression des gènes du PE et des inhibiteurs du cycle cellulaire (Singh et al., 2007). L'expression de la cycline E1 est elle dépendante de Esrrb, Klf4 et Tfcp2l1, et sa surexpression ralentit la différenciation (Gonnot et al., 2019). A l'inverse, la délétion des cyclines E et D induit la différenciation des ESC murines en TE (Liu et al., 2017).

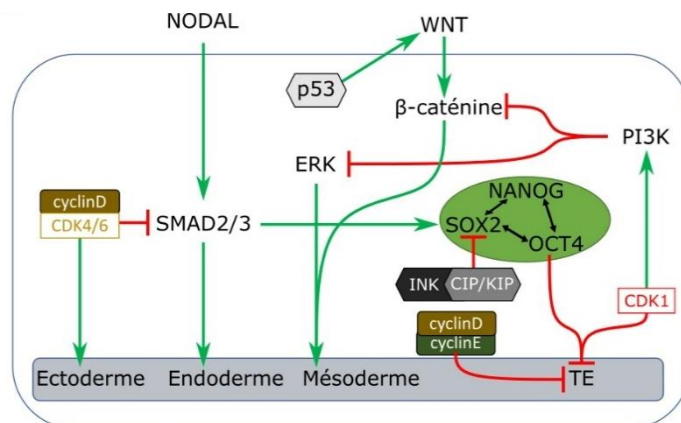


Figure I40 : Interaction entre les régulateurs du cycle cellulaire et de la pluripotence. Interaction entre les protéines régulant le cycle cellulaire et celles régulant la pluripotence.

Les voies de signalisation interagissent aussi avec le cycle cellulaire (Fig. I40). L'activation de la voie Wnt par p53 conduit à la différenciation vers les lignages endodermiques et mésodermiques (Lee et al., 2010 ; Q. Wang et al., 2017 ; De Jaime-Soguero et al., 2017). A l'inverse, les complexes cycline D – Cdk4/6 inhibent la différenciation en endoderme pendant la phase G1 en bloquant l'action de

Smad2/3. Ces complexes stimulent également la différenciation en neuro-ectoderme pendant la phase G1 (Pauklin and Vallier, 2013 ; Pauklin et al., 2016). La voie PI3K-AKT est, elle, activée par CDK1, ce qui permet l'inhibition des voies WNT et ERK dans les PSC humaines (X. Q. Wang et al., 2017). De plus, leur différenciation s'accompagne de la diminution de l'expression de CDK1, ainsi que de l'augmentation de l'expression des cyclines D (Filipczyk et al., 2007 ; X. Q. Wang et al., 2017). Enfin, l'activation de la voie Erk dans les ESC de souris cultivées en sérum-Lif permet également l'inactivation de Rb en le phosphorylant (Ter Huurne et al., 2017).

La régulation du cycle cellulaire est donc étroitement liée à celle du continuum de pluripotence. Cependant, il y a peu d'informations sur la régulation du cycle cellulaire dans les cellules pluripotentes de modèles non-murins et non-primates.

Tous les mécanismes que j'ai décrits, des réseaux de facteurs de transcription à la régulation du cycle cellulaire, permettent la progression des cellules embryonnaires le long du continuum de pluripotence. *In vitro*, leur manipulation permet la capture de PSC s'autorenouvelant dans un état de pluripotence particulier, ou la conversion de PSC d'un état de pluripotence à l'autre. De manière globale, les mécanismes régulant le continuum de pluripotence sont bien conservés d'une espèce à l'autre. Lorsqu'on s'intéresse aux détails de ces mécanismes régulateurs, on se rend compte qu'il y a cependant de nombreuses variations d'une espèce à l'autre dans la cinétique, le contrôle et l'effet de ces processus. Malgré une origine commune, les différentes espèces modèles de mammifères euthériens ont chacune vu leur développement embryonnaire dériver de celui de leur ancêtre commun. Celui de la souris possède notamment de nombreuses caractéristiques uniques. La recherche sur la pluripotence utilise et a utilisé massivement le modèle murin, ce qui pose de nombreux problèmes dans l'extrapolation de ces résultats aux autres espèces. La difficulté de capturer l'état naïf de pluripotence en culture chez les espèces non- rongeurs en est un bon exemple, et cela même chez les primates qui sont pourtant phylogénétiquement proches de la souris et très étudiés. C'est pour ces raisons qu'il est nécessaire d'étudier la pluripotence dans des modèles alternatifs aux rongeurs.

Problématique

Au sein des mammifères euthériens, la régulation du continuum de pluripotence a de nombreuses caractéristiques spécifiques à l'espèce souris. Cela pose un problème, car la souris est le modèle d'étude par excellence de la pluripotence. C'est chez la souris qu'ont été définis les différents états de pluripotence. Nous avons donc besoin d'un nouveau modèle, venant à la fois renforcer les données existantes, et combler les lacunes dues aux particularités de la pluripotence chez les autres modèles étudiés, et notamment chez la souris.

Dans ce contexte, le lapin est un animal domestique, déjà utilisé comme modèle pour les pathologies humaines et pour les tests de toxicités de molécules pharmacologiques, sa physiologie se rapprochant plus de celle de l'homme par rapport à la souris (Madeja et al., 2019). Phylogénétiquement, les Lagomorphes sont quasi-équidistant entre les Primates et les Rongeurs. Le groupe des Glires, clade regroupant les Rongeurs et les Lagomorphes, c'est séparé des Primates il y a 63 à 80 millions d'années. Ce clade c'est par la suite divisé en deux très tôt dans l'évolution, il y a 60 à 70 millions d'années (Wu et al., 2012 ; Fig. I41).

En plus de cette proximité phylogénétique avec les principaux modèles étudiés en laboratoires, le développement embryonnaire du lapin présente un grand nombre de caractères ancestraux partagés avec les autres mammifères euthériens. Le lapin a par exemple une EGA qui se situe entre les stades 4 et 8-cellules, son épiblaste forme un disque embryonnaire, et l'embryon s'implante au moment du début de la gastrulation par le trophoctoderme mural entourant le disque embryonnaire (Madeja et al., 2019).

Cette implantation fait suite à la disparition de la membrane de Rauber, autre nom du trophoctoderme polaire chez les mammifères ne s'implantant pas par ce dernier. A la place, le trophoctoderme polaire disparaît avant l'implantation. Ce mode d'implantation est partagé par un grand nombre de mammifères, incluant les Primates et les Rongeurs les plus basaux – Tarsiers chez les Primates, Ecureuils chez les Rongeurs (Fig. I41). Cette particularité rend l'ensemble du continuum de pluripotence accessible chez ces mammifères, lapin inclus (Van Leeuwen et al., 2020).

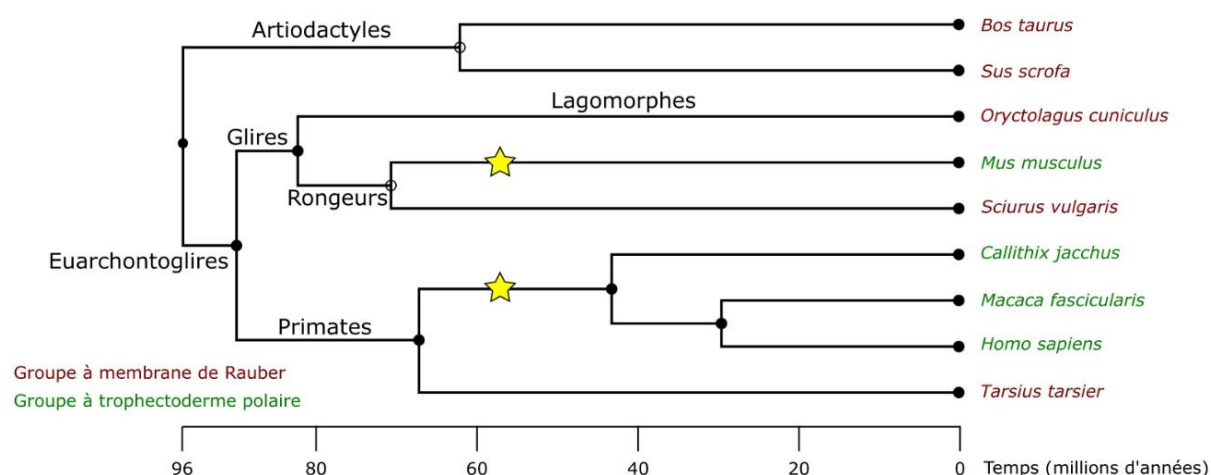


Figure I41 : Phylogénie des mammifères modèles dans l'étude de la pluripotence. Arbre phylogénétique des animaux utilisés comme modèle dans l'étude de la pluripotence. L'arbre a été construit sur le logiciel timetree.org. En vert, espèce où l'implantation se fait par le trophoctoderme polaire. En rouge, espèce où la membrane de Rauber se désagrège avant l'implantation. Les étoiles représentent l'acquisition de l'implantation par le trophoctoderme polaire chez les Rongeurs et les Primates.

Le lapin présente également de nombreux avantages par rapport aux autres animaux d'élevage. La rapidité du cycle de vie du lapin couplé à sa petite taille permet de récolter facilement de grands nombres d'embryons. De plus, des ESC et des iPSC s'autorenouvelant de manière stable ont pu être dérivées chez le lapin. Ces dernières s'autorenouvèlent à l'état amorcé (Osteil et al., 2013 ; Schmaltz-Panneau et al., 2014 ; Afanassieff et al., 2020 – Article 3).

Pour conclure, le lapin se présente comme un bon modèle alternatif d'étude de la pluripotence. Il existe une grande diversité de PSC de lapin dérivées dans des milieux différents, et présentant des caractéristiques plus ou moins éloignées de la pluripotence amorcée. Cela pose la question de la définition des états de pluripotence chez le lapin par rapport à la souris, mais aussi par rapport aux Primates. Ni les milieux de dérivation à l'état naif développés chez les Rongeurs, ni ceux développés chez les Primates, n'ont permis l'obtention de PSC de lapin à l'état naif ou même pseudo-naïf (Afanassieff et al., 2020 – Article 3). Afin de mieux comprendre le continuum de pluripotence chez le lapin, il est donc nécessaire de se pencher sur sa source : les cellules embryonnaires pluripotentes. Il n'existe que quelques études sur le développement embryonnaire précoce du lapin, et aucune analyse transcriptomique comparable à ce qui a été réalisé chez les autres modèles murin et non-murin (Schmaltz-Panneau et al., 2014).

C'est pourquoi j'ai, au cours de ma thèse, chercher à répondre aux questions biologiques suivantes :

1. Décrire et analyser l'apparition et la disparition des cellules pluripotentes dans l'embryon de lapin au cours des différentes ségrégations des lignages embryonnaires. Quelles sont les limites qui définissent le continuum de pluripotence ?
2. Déchiffrer le continuum de pluripotence chez le lapin. Quelles en sont les caractéristiques ? Quelles sont les similarités et les différences avec les autres mammifères modèles ?
3. Peut-on utiliser ces nouvelles données afin de contrôler la pluripotence *in vitro* chez le lapin ?

Pour cela, je me suis lancé dans l'analyse du transcriptome de l'embryon pré-implantatoire de lapin, de la cavitation jusqu'au début de la gastrulation (première partie des résultats). J'ai pu ainsi approfondir les connaissances sur les différentes étapes de ségrégation entre les différents lignages embryonnaire. J'ai aussi développé l'analyse des cellules embryonnaires pluripotentes et pour en disséquer les différents aspects, du métabolisme au cycle cellulaire en passant par l'épigénome et les voies de signalisation. Enfin, je me suis penché sur l'utilisation d'inhibiteurs de la formation d'hétérochromatine dans le but de capturer l'état naif de pluripotence *in vitro* (deuxième partie des résultats).

Résultats

Résultats première partie – analyse de la ségrégation des lignages et caractérisation du continuum de pluripotence

I. Caractérisation transcriptomique, épigénétique et métabolique du continuum de pluripotence dans l'embryon pré-implantatoire du lapin

A. Introduction à l'article 1

La diversité des PSC de lapin en culture pose la question de leur position exacte parmi les différents états de pluripotence. Nous avons donc besoin de définir la pluripotence chez le modèle lapin. C'est nécessaire à l'évaluation des PSC de lapin en culture, ainsi qu'à la découverte de nouvelles pistes de dérivation ou de conversion de PSC à l'état naïf. Une telle étude compléterait également le paysage de la pluripotence *in vivo* chez les mammifères euthériens. Enfin, cela apporterait une meilleure compréhension de la diversité et de l'unicité des mécanismes régulant la pluripotence.

J'ai donc décidé de mener une étude exhaustive sur le développement pré-implantatoire chez le lapin, afin d'étudier les mécanismes régulant la pluripotence, et comment ceux-ci évoluent au cours du développement. J'ai choisi comme fenêtre d'étude les stades embryonnaires entre les jours 2.7 et 6.6. A partir du jour 2.7-3.0 de développement, les embryons de lapin au stade morula se compactent puis cavitent en blastocyste. C'est à ce moment qu'a lieu la première ségrégation entre lignage embryonnaire et extra-embryonnaire, correspondant au passage de la totipotence à la pluripotence. Au jour 6.5-6.6 de développement, les embryons de lapin commencent la gastrulation, marquant la fin de la pluripotence *in vivo*. C'est également à ce moment que les embryons de lapin s'implantent. Cette particularité par rapport à la souris et aux primates assure un accès aisé à l'ensemble du continuum de pluripotence *in vivo*.

J'ai réalisé une étude du transcriptome des embryons de lapin en utilisant trois techniques complémentaires. La première technique utilisée est une analyse de séquençage d'ARN sur des embryons entiers groupés ensemble aux stades précoces, puis sur des tissus disséqués puis regroupés aux stades plus tardifs. Cette analyse a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Véronique Duranthon (INRAE Jouy-en-Josas). La deuxième technique utilisée est un séquençage ARN en cellule unique utilisant la technique 10x Chromium. Bien que cette technique perde en profondeur de séquençage par rapport à la précédente, elle a l'avantage de permettre l'analyse d'un très grand nombre d'échantillons en cellule-unique. Enfin, j'ai complété ces analyses par l'utilisation de qPCR en cellule-unique Biomark. Cette technique permet d'étudier l'expression au niveau cellulaire d'un panel de gènes déterminé. En plus des analyses transcriptomiques, j'ai également réalisé des immunofluorescences sur des marqueurs membranaires et nucléaires de pluripotence, ainsi que sur des modifications de la chromatine. J'ai également réalisé des tests de fluorescence pour évaluer le métabolisme. Enfin, j'ai comparé nos résultats transcriptomiques à deux études de séquençage ARN en cellule-unique sur des embryons pré- et post-implantatoires, l'une sur des embryons de macaque cynomolgus (*Macaca mulata*) et l'autre sur des embryons de souris (*Mus musculus*).

qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*

Cet article est divisé en deux parties : une première partie sur l'identification et la ségrégation des différents lignages embryonnaires, et une deuxième partie sur l'analyse du continuum de pluripotence *in vivo* sur différents aspects, transcriptomiques, épigénétiques et métaboliques. L'article est en cours de soumission. Du fait des contraintes imposées par l'éditeur auquel est soumis le papier, certains résultats n'ont pas pu être inclus à l'article. Ils présentent néanmoins un intérêt dans le cadre de cette thèse, et ont donc été ajoutés à la suite de cet article.

Article 1

Transcriptomic, epigenetic and metabolic characterization of the pluripotency continuum in rabbit preimplantation embryos

Wilhelm Bouchereau¹, Luc Jouneau^{2,3}, Catherine Archilla^{2,3}, Irène Aksoy¹, Anaïs Moulin¹, Nathalie Daniel^{2,3}, Nathalie Peynot^{2,3}, Sophie Calderari^{2,3}, Thierry Joly^{4,5}, Murielle Godet¹, Yan Jaszczyszyn⁶, Marine Pratlong^{7,8}, Dany Severac^{7,8}, Pierre Savatier^{1,9}, Véronique Duranthon^{2,3,9}, Marielle Afanassieff^{1,9}, Nathalie Beaujean^{1,9,10*}.

¹ Univ Lyon, Université Lyon 1, INSERM, Stem Cell and Brain Research Institute U1208, INRAE USC 1361, F-69500 Bron, France

² Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, 78350, Jouy-en-Josas, France

³ Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, 94700, Maisons-Alfort, France

⁴ ISARA-Lyon, F-69007 Lyon, France

⁵ VetAgroSup, UPSP ICE, F-69280 Marcy l'Etoile, France

⁶ Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France

⁷ Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier France

⁸ Montpellier GenomiX, France Génomique, Montpellier, France

⁹ Senior authors

¹⁰ Lead contact

***Correspondence:**

Nathalie Beaujean (nathalie.beaujean@inserm.fr)

INSERM U1208

18 Avenue du Doyen Lépine

F-69675 Bron Cedex

France

Summary

Despite the growing interest in the rabbit model for developmental and stem cell biology, the characterization of embryos at the molecular level is still poorly documented. We conducted a transcriptome analysis of rabbit pre-implantation embryos from E2.7 (morula stage) to E6.6 (early primitive streak stage) using bulk and single-cell RNA-sequencing, and single-cell Biomark qPCR. In parallel, we studied oxidative phosphorylation and glycolysis and analyzed active and repressive epigenetic modifications during blastocyst formation and expansion. We generated a transcriptomic, epigenetic, and metabolic map of the pluripotency continuum in rabbit preimplantation embryos and identified novel markers of naïve pluripotency that might be instrumental for deriving naïve pluripotent stem cell lines. Although the rabbit is evolutionarily closer to mice than to primates, we found that the transcriptome of rabbit epiblast cells shares common features with that of humans and non-human primates.

Keywords: Rabbit preimplantation embryo, pluripotency continuum, naïve pluripotency, embryo transcriptome, single-cell RNA-seq

Introduction

In mammalian embryos, totipotent blastomeres become pluripotent after differentiation of the trophectoderm lineage during the morula to blastocyst transition, and form a seemingly coherent cluster of cells called the inner cell mass (ICM). After some ICM cells differentiate to the primitive endoderm (PE), pluripotency is confined to the epiblast (EPI), which will give rise to the embryo proper. Primordial germ cells (PGCs) are specified in the epiblast shortly after implantation. Ultimately, epiblast cells undergo rapid division cycles, and form an epithelialized tissue in which the posterior part gives rise to the primitive streak (PS) (Blakeley et al., 2015; Chazaud and Yamanaka, 2016; Hayashi et al., 2007; Nakamura et al., 2016; Petropoulos et al., 2016; Stirparo et al., 2018). The developmental window that extends from morula differentiation to gastrulation lasts 2–3 days in mice, compared to 7–10 days in humans and non-human primates (Nakamura et al., 2021; Shahbazi, 2020). Within that window, pluripotent cells are thought to transit through three successive pluripotency states known as the naïve, formative and primed states (Savatier et al., 2017; Smith, 2017; Takahashi et al., 2017). In mice, the ICM and epiblast cells of blastocysts, as well as the embryonic stem (ES) cell lines that are derived from them, are in the naïve state. Naïve pluripotency is associated with the expression of transcription factors *Klf2*, *Klf4*, *Gbx2*, *Tfcp2l1*, *Esrrb*, *Tbx3*, and *Sall4* (Dunn et al., 2014), low DNA methylation (Leitch et al., 2013; Leitch et al., 2016), high mitochondrial respiration (Carbognin et al., 2016; Sone et al., 2017), and enrichment of active histone modifications at promoter regions of developmental genes (Hayashi et al., 2008). Formative pluripotency characterizes the epiblast cells of peri-implantation embryos, as well as the corresponding pluripotent stem cell lines, called formative stem (FS) cells (Kinoshita et al., 2020; Smith, 2017). The formative state is associated with the expression of transcription factors *Etv5*, *Rbpj*, *Tcf3*, and *Otx2*, and intermediate DNA methylation (Kalkan et al., 2019; Kinoshita et al., 2020). Finally, the epiblast cells of early to late gastrula-stage embryos and their *in vitro* counterparts, epiblast stem cells (EpiSCs), are in the primed pluripotent state (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). The primed state is associated with expression of *Sox3* and *Oct6* transcriptional regulators (Corsinotti et al., 2017), high DNA methylation (Habibi et al., 2013; Hackett et al., 2013), low mitochondrial respiration (Zhou et al., 2012), and enrichment of repressive histone modifications at promoter regions of developmental genes (Hayashi et al., 2008; Smith, 2017). These three successive pluripotent states form the pluripotency continuum.

The characterization of the mammalian embryo transcriptome in a wide range of species is essential for unravelling the molecular mechanisms involved in pluripotency and understanding the adaptation of embryos in maintaining pluripotency across different developmental strategies. It is also important for the development of chemically-defined culture media, which can aid in the preservation and maintenance of naïve, formative, and primed pluripotency in embryo-derived stem cell lines. Single-cell transcriptomic data from preimplantation embryos is available in a large variety of species, including mice (Argelaguet et al., 2019; Mohammed et al., 2017; Tang et al., 2010), pigs (Kong et al.,

2020; Ramos-Ibeas et al., 2019), cattle (Zhao et al., 2016), marmosets (Boroviak et al., 2018), rhesus and cynomolgus macaques (Liu et al., 2018; Nakamura et al., 2016), and humans (Blakeley et al., 2015; Petropoulos et al., 2016). Transcriptome data at pre- and mid-gastrula stages is only available in mice (Peng et al., 2016; Wen et al., 2017) and cynomolgus macaques (Nakamura et al., 2016). This later-stage transcriptome data provides the first insights into spatio-temporal alterations of gene expression occurring at gastrulation in mammals. However, it is difficult to study this developmental period, as embryos have already implanted by the gastrula stage in many species.

Despite growing interest in lagomorphs for human disease and reproductive health modelling (Duranthon et al., 2012; Fischer et al., 2012) and inter-species chimera exploration (Aksoy et al., 2021), the transcriptome of the rabbit embryo is poorly documented (Leandri et al., 2009; Schmaltz-Panneau et al., 2014). In mice, pigs, cattle, humans, and non-human primates, gastrulation starts two to eight days after implantation, when embryos are already deeply buried in the uterine wall, making the formative- and primed- pluripotency states difficult to study (Nakamura et al., 2021; Shahbazi, 2020). In contrast, rabbit embryos do not implant until the end of day seven of development, after the onset of gastrulation (Fischer et al., 2012; Puschel et al., 2010). This strategy of lagomorph development allows easier access to a larger window of development compared to rodents and primates. For this reason, rabbit embryos are perfectly suited for an in-depth exploration of the transcriptomic, epigenetic, and metabolic changes taking place during the pluripotency continuum. In this study, we conducted a transcriptome analysis of rabbit pre-implantation embryos between E2.7 (morula stage) and E6.6 (early primitive streak stage) using three complementary techniques: bulk RNA-sequencing (Illumina NextSeq), single-cell RNA-seq (10X Genomics), and single-cell qPCR (Biomark) to study specific gene expression. In addition, we studied oxidative phosphorylation and glycolysis, and we analyzed active and repressive epigenetic modifications. With this unique combination of tools and cellular processes, we explored in detail the major alterations that occur in pluripotent cells along the pluripotency continuum of rabbit embryos.

Results

Rabbit preimplantation embryos show both similarities and differences with mice and macaques in lineage marker expression

To obtain a transcriptional map of the rabbit preimplantation embryo development, we first performed bulk RNA sequencing of micro-dissected embryos at: E2.7 (morula), E3.5 and E4.0 (early and mid-blastocyst, respectively: inner cell mass [ICM] and trophectoderm [TE]), E6.0 (expanded blastocyst: EPI, TE and primitive endoderm [PE]), E6.3 (expanded blastocyst: anterior EPI [EPI_ant]), and E6.6 (early primitive streak-stage: EPI_ant, and TE) (**Fig. 1A, S1A**). Thus, a total of 51 samples

Figure 1: Transcriptional map of rabbit preimplantation embryo.

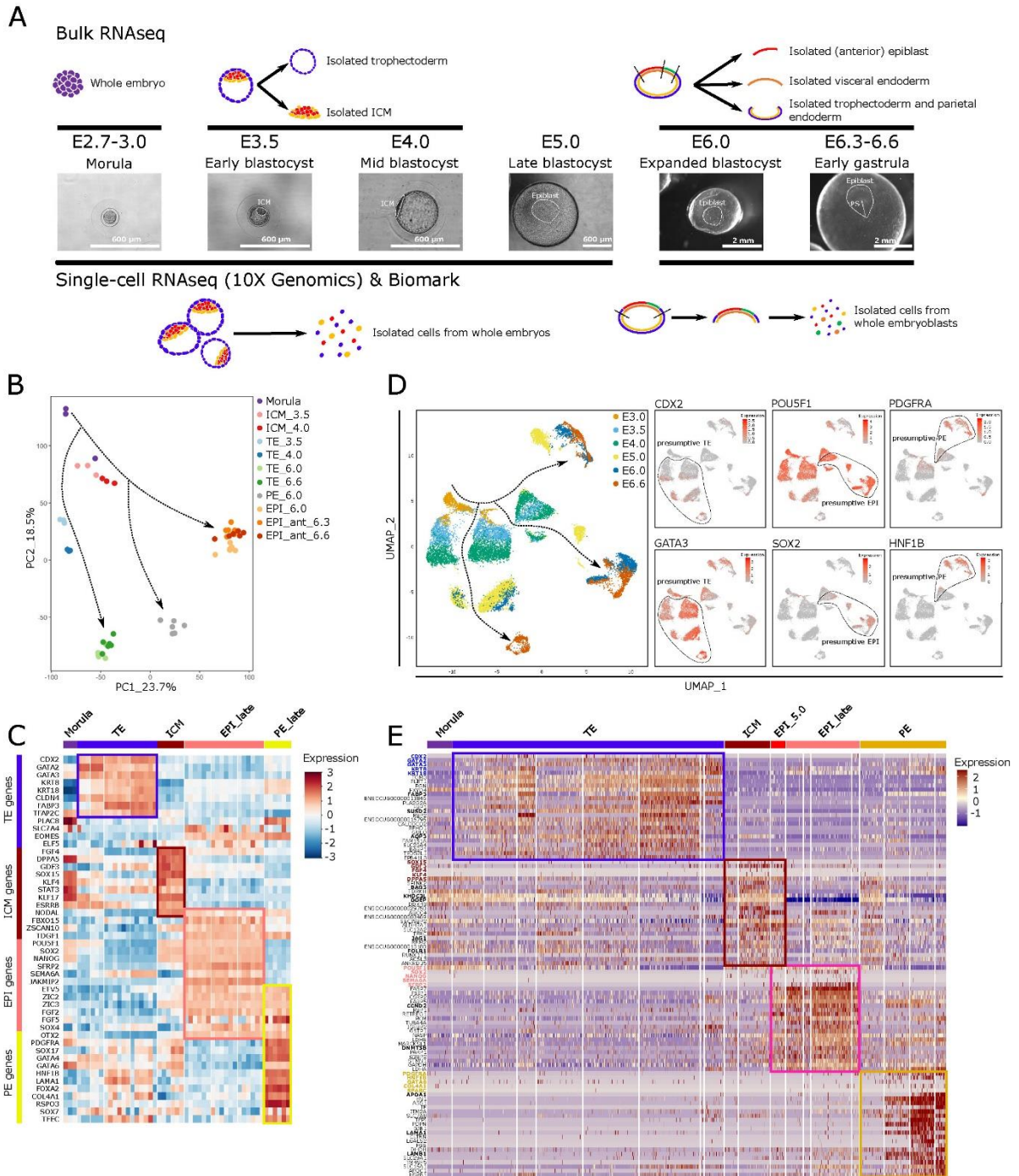


Figure 1: Transcriptional map of rabbit preimplantation embryo. (A) Experimental design with sample description. E2.7 to E6.6 indicate days of development after coïtum (or insemination); ICM: inner cell mass; PS: primitive streak. (B) Graphical representation of the two first principal components of PCA for the 51 sample transcriptomes generated with bulk RNAseq data. (C) Heatmap representation of the expression level of 48 genes selected based on their known expression in early embryonic lineages of rodents and primates (bulk RNAseq data). (D) Two-dimensional UMAP representations of 17,025 single-cell transcriptomes (left panel) and selected genes (right panels). E3.0–E6.6 indicate the embryonic day (10X Genomics data). (E) Heatmap representation grouping 20 gene markers (from B and C, highlighted in blue, maroon, pink and yellow) with the 20 most differentially expressed genes in TE vs. all the other cell types (all), ICM vs. all, EPI vs. all, and PE vs. all (from D). See also Figure S1 and Table S1.

(three or six biological replicates, each consisting of one to 20 embryos per stage) were paired-end sequenced on Illumina NextSeq500 instrument. Between 52 and 137 million reads were mapped to the rabbit genome (*Oryctolagus cuniculus* 2.0), and a mean of 56.4 to 64.7% of the pair fragments were assigned to a gene. These 51 samples separated according to developmental time and lineage when projected onto the first two components of principal component analysis (PCA) (**Fig. 1B**). We then investigated the expression of some known lineage markers of mouse, human, and cynomolgus macaque embryos, and represented the results on a heatmap (**Fig. 1C**). The TE samples (E3.5 to E6.6) were enriched in *CDX2*, *GATA2*, *GATA3*, *KRT8*, *KRT18*, *CLDN4*, *FABP3* and *TFAP2C* transcripts. The ICM samples (E3.5 and E4.0) were enriched in transcripts of pluripotency markers *FGF4*, *DPPA5*, *GDF3*, *SOX15*, *KLF4*, *STAT3*, *KLF17*, *ESRRB*, *NODAL*, *ZSCAN10*, *POU5F1 (OCT4)*, *SOX2*, *NANOG*, *ZIC2*, and *ZIC3*. The EPI samples (E6.0, E6.3, and E6.6, thereafter called EPI_late) differed from the ICM samples in that EPI samples had lower expression of pluripotency markers *FGF4*, *DPPA5*, *GDF3*, *SOX15*, *KLF4*, *STAT3*, *KLF17*, and *ESRRB*, and higher expression of pluripotency markers *SFRP2*, *SEMA6A*, *JAKMIP2*, *ETV5*, *ZIC2*, *ZIC3*, *FGF2*, *FGF5*, *OTX2*, and *SOX4*. Finally, the PE samples (E6.0, thereafter called PE_late) were enriched in *PDGFRA*, *SOX17*, *GATA4*, *GATA6*, *HNFB1B*, *LAMA1*, *FOXA2*, *COL4A1*, *RSPO3*, *SOX7*, and *TFEC* transcripts. Both TE markers (*GATA3* and *TFAP2C*) and ICM markers (*DPPA5*, *SOX15*, *KLF4*, *STAT3*, *KLF17*, *ESRRB*, *ZSCAN10*, *POU5F1*, *SOX2*, and *NANOG*) were enriched in the E2.7 morula samples, suggesting early commitment of blastomeres either to ICM or TE cells. PE markers including *PDGFRA*, *SOX17*, *GATA4*, *GATA6*, *HNFB1B*, *FOXA2*, *RSPO3*, and *SOX7* were detected in the E3.5 and E4.0 ICM samples suggesting that the PE differentiation begins as early as E3.5. Note that neither the TE markers *PLAC8* or *SLC7A4* expressed in humans (Blakeley et al., 2015) nor the TE marker *EOMES* expressed in mice (Strumpf et al., 2005) were uniquely expressed in rabbit TE. The primate-specific EPI markers *ZIC3* and *FGF2* (Nakamura et al., 2016), as well as the mouse-specific EPI markers *FGF5* and *SOX4* (Mohammed et al., 2017), were all expressed in rabbit EPI_late. Overall, these observations suggest that rabbit gene expression patterns share characteristics with both rodents and primates, though there are some notable differences.

To describe the transcriptional map of the rabbit preimplantation embryo development more precisely, we used 10X Genomics technology to sequence the transcriptome of single cells isolated from embryos ranging from morula-stage (embryonic day E3.0) up to early primitive streak-stage prior to implantation (E6.6) (**Fig. 1A**). The single-cell RNA-seq analysis included additional E5.0 embryos that were not included in the bulk RNA-seq study. After quality control, we retained 17,025 high-quality single-cell transcriptomes from 529 embryos, with an average of 979 expressed genes. A total of 28 to 166 embryos and 1,170 to 4,735 cells were analyzed per developmental stage (**Fig. S1B-D**). In order to explore the single-cell RNAseq data in an unbiased manner, we used uniform manifold approximation and projection (UMAP) dimension reduction using the 3,000 most variable genes across all cells, accounting for the mean-variance relationship present in single-cell RNA-seq gene expression data. We

found that cells separated according to developmental stage, as cells were ordered in agreement with embryonic day when projected onto the first two components (**Fig. 1D**). The six embryonic day clusters separated further into smaller clusters as follows: E3.0 cells (morula stage embryos) formed a cluster enriched in the pluripotency markers *POU5F1* and *NANOG* and in the TE markers *GATA2*, *GATA3*, and *TFAP2C* (**Figs. 1D, S1E-G**). Cells harvested from the E3.5 and E4.0 early blastocysts formed three distinct clusters. The first one was enriched in *POU5F1*, *SOX2*, *FGF4*, *GDF3*, *SOX15*, and *NANOG* transcripts (presumptive ICM cluster), while the other two clusters were enriched in *CDX2*, *GATA3*, *TFAP2C*, *KRT8*, *KRT18*, *GATA2*, and *FABP3* transcripts (presumptive TE clusters). The pluripotency-associated gene *POU5F1* and the TE-associated genes *GATA3*, *TFAP2C*, and *KRT18* were still expressed in the TE and ICM clusters, respectively, but at lower levels. This indicates that full lineage segregation is not yet complete at E4.0. At E5.0, cells separate into four clusters. The first cluster was enriched in *POU5F1*, *SOX2*, *GDF3*, *SOX15*, and *NANOG* (presumptive EPI cluster), the second one in *PDGFRA*, *HNF1B*, *LAMA1*, and *GATA6* (presumptive PE cluster), and the last two ones in *CDX2*, *GATA3*, *TFAP2C*, *KRT8*, *KRT18*, *GATA2*, and *FABP3* (presumptive TE clusters). *POU5F1* was still expressed in PE and TE, which again suggests that lineage segregation is not yet complete at E5.0. In contrast, at day 6.0, the three lineages are separated from each other, evidenced by non-overlapping expression of *POU5F1* and *SOX2* (presumptive EPI cluster), *PDGFRA* and *HNF1B* (presumptive PE cluster), and *TFAP2C* and *GATA3* (presumptive TE cluster). Based on these observations, we were able to delineate with certainty the morula, ICM, EPI, TE and PE clusters on the UMAPs.

To have a more global view of differential gene expression between the main cell clusters, a heatmap was generated using the above-mentioned markers as landmarks, with the 20 most overexpressed genes in TE vs. all, ICM vs. all, EPI vs. all, and PE vs. all (**Fig. 1E, Table S1**). Four main gene clusters were observed, characterizing rabbit TE, ICM, EPI, and PE, respectively. In addition to the landmark markers, *FABP3* and *AQP3* transcripts were enriched in TE cells, whereas *BAG3*, *KHDC3L*, *OOEP*, *JAG1* and *FOLR1* were enriched in ICM cells, *DNMT3B* was enriched in EPI cells, and *APOA1*, *LAMA1*, and *LAMB1* was enriched in PE cells. By comparison, most of the genes represented on the heatmap had similar expression profiles to those described in mouse, cynomolgus macaque, and human (Guo et al., 2010; Mohammed et al., 2017; Nakamura et al., 2016; Stirparo et al., 2018). However, two genes showed unexpected expression profile. Namely, *SUSD2*, a marker of ICM in primates (Bredenkamp et al., 2019) is highly expressed in rabbit TE, and *CCND2*, a marker of the primitive streak in mice (Wianny et al., 1998) is expressed in early and late EPI in rabbits. Taken together, these results indicate that rabbit preimplantation embryos typically express the same lineage markers as mouse and cynomolgus macaque embryos, but that there are also noticeable differences.

EPI, PE, and TE lineages are established after E5.0 in rabbit embryos

To obtain a dynamic view of lineage specification, we performed pseudo-time analyses of the single-cell RNAseq dataset based on the 1,000 most variable genes. In the first analysis, the PE cells were removed from the dataset and a pseudo-time analysis was performed with the morula, ICM and TE cells (**Fig. 2A**). The morula cells (E3.0) split into two main branches at E3.5, leading to either ICM or TE cells (**Fig. 2B,C**). At E4.0, they formed two distinct populations. A heatmap representation of the 97 most differentially expressed genes in these samples showed the following: two up-regulated genes in morula vs. ICM and TE (*FXVD4* and *S100A11*); 26 up-regulated genes in ICM vs. TE lineage including *GDF3*, *DPPA5*, and *POU5F1*; 69 up-regulated genes in TE vs. ICM lineage, including *ATP2B1*, *ANXA6*, *GATA2*, *OCLN*, *ANXA2*, *KRT8*, *KRT19*, *FABP3*, and *KRT18* (**Fig. 2D**). Immunostaining of rabbit embryos confirmed ICM/EPI-specific expression of SOX2 at E3.5 and E4.0, and TE-enriched expression of TFAP2C at E4.0 (**Fig. 2E**). Finally, the KEGG pathway analysis of the 500 top up and down regulated genes in ICM compared to TE showed enrichment of terms involved in “DNA replication,” “cell-cycle,” and “mismatch repair,” whereas terms involved in “oxydative phosphorylation” and disease mechanisms were downregulated (**Fig. 2F, Table S1**). Note that two other cell populations were observed at E3.5 and E4.0 termed “TE-like” cells (**Fig. 2A,C**). As shown on the heatmap representation of the 100 most differentially expressed genes between TE and TE-like cells, the TE-like cells showed a significant decrease in transcripts encoding ATPase and cytochrome C oxidase, suggesting reduced mitochondrial activity (**Fig. S2A, Table S1**). Expression of amino-acid transporters and aquaporin was also decreased in the TE-like cells compared to TE cells. Moreover, there was no clear link between TE vs TE-like cells and the expression of mural vs polar trophoblast markers in humans and mice (**Fig. S2B,C**). Thus, the nature of TE-like cells remains unclear, and more exploration is needed to understand these two separate populations.

In the second pseudo-time analysis, all TE cells were removed from the single-cell RNAseq dataset and analysis was performed with morula, ICM, EPI and PE cells (**Fig. 2G**). This analysis first revealed the progressive development of morula cells to ICM (E3.0 and E3.5). From E4.0 onwards, there was a split of ICM cells into two lineages, either the EPI or the PE (**Fig. 2H,I**). At E5.0, EPI and PE cells formed two distinct clusters at the tip of their respective branches. A heatmap representation of the 89 most differentially expressed genes showed the following: 10 up-regulated genes in morula vs. EPI and PE, including *GATA3*, *DPPA5*, and *POU5F1*; 35 up-regulated genes in EPI vs PE lineage, including *PRDM14*, *TCF7L1*, *GDF3*, and *RIF1*; and 44 up-regulated genes in PE vs EPI lineage, including *DKK1*, *LAMA1*, *LAMB1*, *RSPO3*, *DUSP4*, and *PDGFRA* (**Fig. 2J**). Immunostaining of rabbit embryos confirmed PE-enriched expression of GATA6 and EPI-specific expression of SOX2, OCT4 and ESSRB at E4.0 and E5.0 (**Fig. 2K, S2D**). Immunostaining also revealed expression of the pluripotency marker DPPA5 in both PE and EPI at E4.0 (**Fig. S4A**). KEGG pathway analysis of the 500 most differentially expressed genes between EPI and PE showed high enrichment in the EPI for terms associated with “cell cycle”, whereas the PE was notably enriched in terms associated with the “MAPK signaling pathway”

Figure 2: Timing of ICM/TE and EPI/PE segregation.

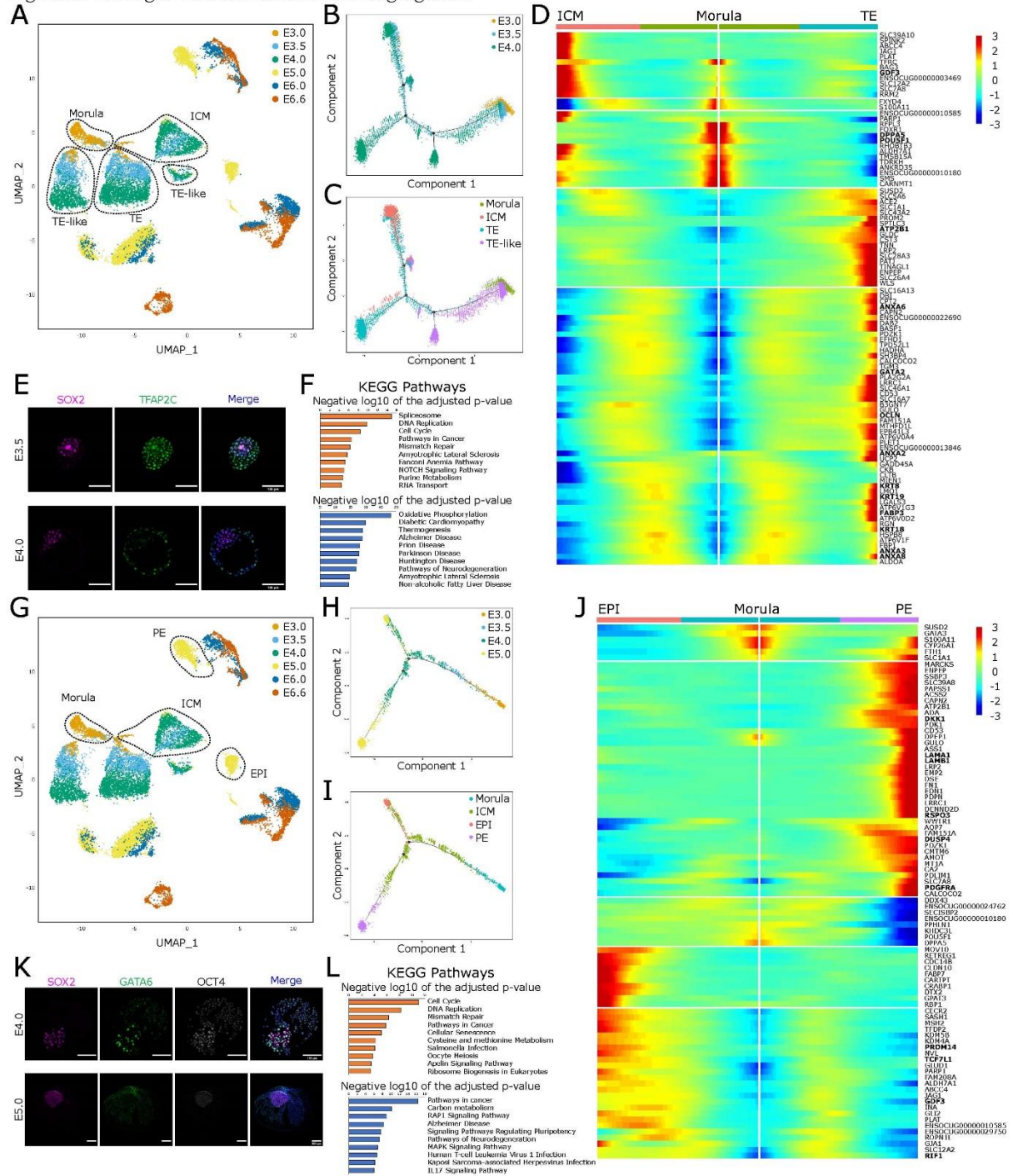


Figure 2: Timing of ICM/TE and EPI/PE segregation. (A) Two-dimensional UMAP representation of 17,025 single-cell transcriptomes showing cells selected for the pseudo-time analysis shown in B and C. (B,C) Pseudo-time analysis of selected cells (shown in A), organized by embryonic day (B) and lineage assignment (C), respectively. (D) Heatmap representation of the 97 most differentially expressed genes between morula, ICM and TE (from pseudo-time analysis). (E) Immunofluorescence analysis of SOX2 and TFAP2C expression in E3.5 (n = 7) and E4.0 (n = 4) blastocysts. Merge pictures include DAPI staining. Scale bars: 100 μm. (F) KEGG pathways enrichment analysis from the 500 most up-regulated genes in ICM vs. TE at E3.5/E4.0 (top panel) and the 500 most up-regulated genes in TE vs. ICM at E3.5/E4.0 (bottom panel). (G) Two-dimensional UMAP representation of 17,025 single-cell transcriptomes showing cells selected for pseudo-time analysis shown in H and I. (H,I) Pseudo-time representations of selected cells (shown in G), organized by embryonic day (H) and lineage assignment (I), respectively. (J) Heatmap representation of the 89 most differentially expressed genes between morula, EPI and PE (from pseudo-time analysis). (K) Immunofluorescence analysis of SOX2, OCT4, and GATA6 at E4.0 (n = 4) and E5.0 (n = 4). Merge pictures include DAPI staining. Scale bars: 100 μm at E4.0 and 200 μm

at E5.0. **(L)** KEGG pathways enrichment analysis from the 500 most up-regulated genes in EPI vs. PE at E4.0/E5.0 (top panel) and the 500 most up-regulated genes in PE vs. EPI at E4.0/E5.0 (bottom panel). See also Figure S2 and Table S1.

(Fig. 2L, Table S1). Together, these results confirm the establishment of the three main lineages, EPI, PE, and TE after E5.0 in rabbit embryos.

Specification of anterior and posterior EPI, visceral and parietal endoderm, and PGCs take place after E6.0

EPI cells from E5.0 and E6.0/E6.6 form five clusters in the UMAP, termed EPI 5.0 (from E5.0 embryos), and EPIa, EPIb, EPIc, and EPId (from E6.0/E6.6 embryos) (**Fig. 3A**). A pseudo-time analysis of the EPI cells ($n = 2878$) based on the 1000 most variably expressed genes showed a split into two branches, with some EPI E5.0 cells heading towards EPIa and EPIb, and the rest heading toward EPIc and EPId (**Fig. 3B,C**). Although their respective positions on the UMAP might suggest EPIa and EPIb are intermediate states between EPI E5.0 and EPIc and EPId, this is not likely because EPI 5.0 cells branch out to both groups separately. To clarify the identity of these five clusters, we compared the expression of the 25 most overexpressed genes in each EPI group against the other four groups (**Fig. 3D, Table S2**). EPIa, EPIb, EPIc, and EPId clusters showed a significant decrease in transcript levels of naïve pluripotency markers compared to the EPI 5.0 cluster, including *OOEP*, *DPPA5*, *KHDC3L*, and *PRDM14*. This indicates a possible transition from naïve pluripotency to primed pluripotency at E6.0 in rabbit embryos as discussed below. EPIc showed higher transcript levels for anterior epiblast markers, including *SLC7A3* and *OTX2* (Peng et al., 2016), whereas EPId showed higher transcript levels for posterior epiblast and primitive streak markers, including *MIXL1*, *EOMES*, *EVX1*, *DKK1*, *INKA1*, *FST*, *WNT5A*, *TBXT*, and *PITX2* (**Fig. S3A,B, Table S2**). This indicates that EPIc and EPId correspond to anterior EPI (EPI_ant) and posterior EPI (EPI_post), respectively. Surprisingly, all pluripotency and early lineage marker genes examined were downregulated in the EPIa and EPIb clusters compared to the other groups (**Fig. S3A**). The identity of the corresponding cells remains uncertain. Consequently, these cells were removed from all subsequent analyses.

To characterize mesodermal vs. endodermal segregation, we examined the EPI_post cells from E6.6 embryos ($n = 237$). We performed a PCA using five anterior epiblast markers (*SLC7A3*, *SLC2A1*, *ENPP2*, *ITGA6*, *NAV2*), five early endodermal markers (*CHRD*, *CER1*, *GSC*, *OTX2*, *HHEX*), and five early mesodermal markers (*TBXT*, *HAND1*, *LEF1*, *PDGFRA*, *WNT5A*). Cells formed two separate clusters in a PCA, with one cluster having higher expression of mesodermal markers, including *TBXT*, *HAND1*, *LEF1*, *PDGFRA*, and *WNT5A*, and the other cluster having higher expression of definitive endoderm markers, including *CHRD*, *CER1*, *GSC*, *OTX2*, and *HHEX* (**Fig. S3C**). *TBXT* expression was

Figure 3: Late epiblast diversification and PGC segregation.

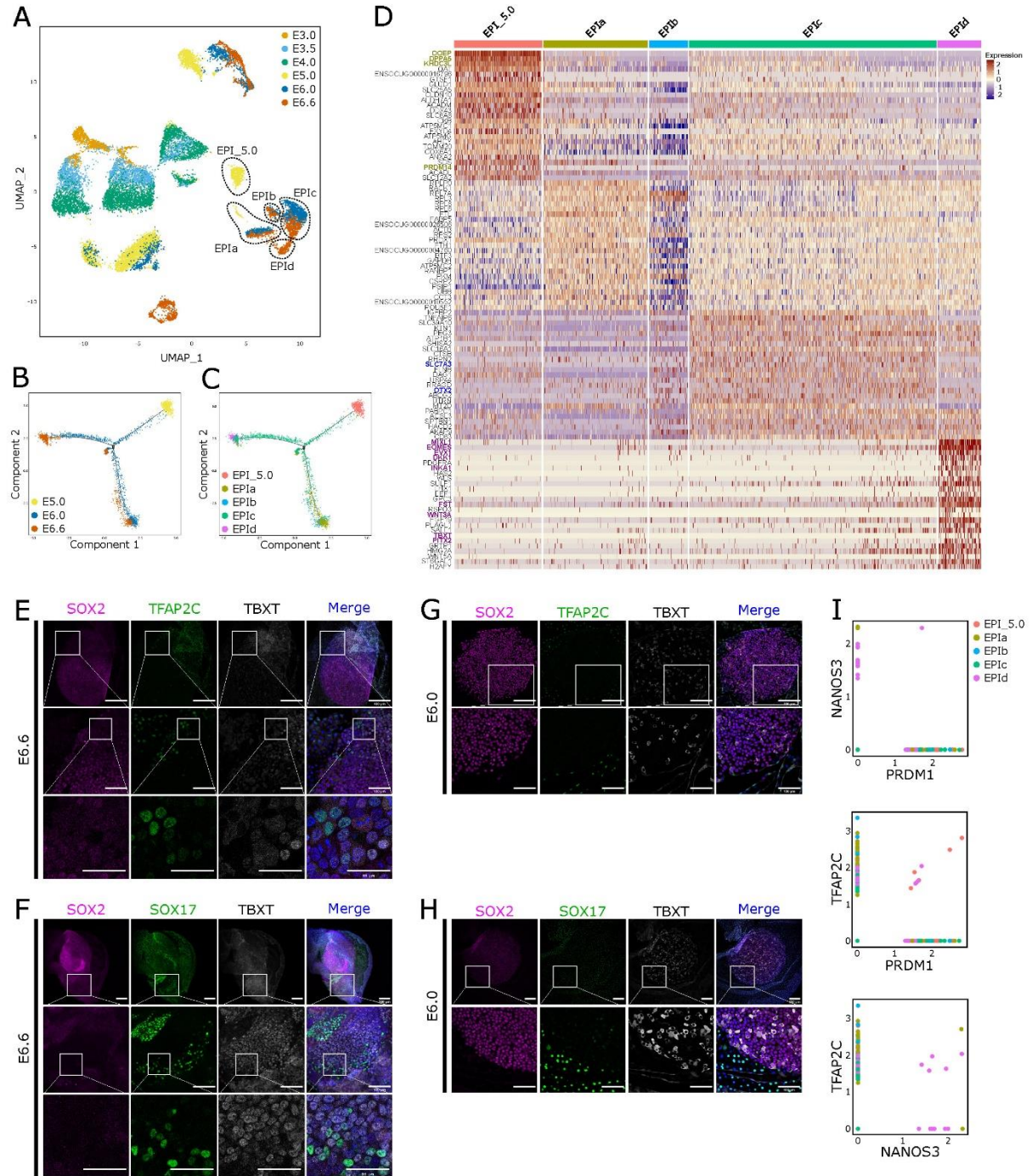


Figure 3: Late epiblast diversification and PGC segregation. (A) Two-dimensional UMAP representation of 17,025 single-cell transcriptomes showing cells selected for pseudo-time analysis shown in B-D. (B,C) Pseudo-time representation of selected cells (shown in A), showing embryonic day (B) and lineage assignment (C), respectively. (D) Heatmap representation of the 100 most differentially expressed genes between EPI at E5.0 and EPI at E6.0/E6.6 (EPIa, EPIb, EPIc, and EPId). (E-H) Immunofluorescence detection of SOX2, TFAP2C, SOX17, and TBXT in E6.6 (E,F; n = 5) (Scale bars : 400 mm, 100 mm, and 50 mm depending on enlargements) and E6.0 (G,H; n = 3) (Scale bars : 200 mm and 100 mm for enlargements) epiblasts. Merge pictures include DAPI staining. (I) Dot plot representation of single cells expressing *TFAP2C*, *PRDM1/BLIMP1*, *NANOS3* and *SOX17* in the 10X Genomics dataset. Colors indicate clusters EPI_5.0, or EPIa to EPId. See also Figure S3 and Table S2.

validated by immunostaining in E6.0 and E6.6 embryos (**Fig. 3E-H**). These results are also in line with a previous study by Viebahn and colleagues, who reported the appearance of TBXT (Brachyury)-expressing cells between E6.25 and E6.5 in the posterior epiblast of rabbit embryos (Hassoun et al., 2009a; Viebahn et al., 2002).

We sought to characterize the segregation of the primitive endoderm into the visceral and parietal endoderm. In marmosets and humans, *OTX2* is expressed in the primitive endoderm (Boroviak et al., 2018). However, in marmosets, its expression is suppressed in the parietal endoderm and is only maintained in the visceral endoderm. E4.0 and E5.0 rabbit embryos exhibited *OTX2* expression in endoderm cells (**Fig. S3D**). *OTX2* expression then became restricted to a sub-cluster of endoderm cells at E6.0 and E6.6. To characterize these *OTX2*-positive cells, we performed immunofluorescence analysis of E6.0 embryos. Strong *OTX2* expression was observed in SOX2-negative visceral endoderm cells underlying the layer of SOX2/*OTX2* double-positive EPI cells (**Fig. S3E**). These results suggest that segregation of visceral and parietal endoderm takes place at E6.0 in rabbit embryos, before embryo implantation.

Finally, we sought to identify primordial germ cells (PGCs) from those expressing *NANOS3*, *PRDM1/BLIMP1*, and *TFAP2C* in the 10X Genomics dataset of E5.0, E6.0 and E6.6 embryos. A few cells co-expressing *PRDM1/BLIMP1* and *NANOS3*, *PRDM1/BLIMP1* and *TFAP2C*, or *TFAP2C* and *NANOS3* were identified from the EPI_post (EPI_{id}) cluster (**Fig. 3I**). Immunofluorescence analysis showed cells positive for *TFAP2C* and *TBXT* (**Fig. 3E**), and *SOX17* and *TBXT* (**Fig. 3F**) in the posterior epiblast at E6.6. These double positive cells were not observed in E6.0 embryos (**Fig. 3G,H**). These results are in line with previous observations (Hassoun et al., 2009b; Hopf et al., 2011), and confirm PGCs arise between E6.0 and E6.6 in rabbit embryos.

Gradual alteration of the transcriptome in the pluripotency continuum

To characterize the transcriptomic changes taking place in the pluripotency continuum of rabbit embryos, we examined the expression of known markers of naïve, formative and primed pluripotency. First, we analyzed 30 markers in the bulk RNAseq dataset from morula (E2.7), ICM (E3.5/E4.0), and EPI_{late} (E6.0/E6.3/E6.6). A heatmap representation showed a stronger expression of naïve pluripotency genes in morula and ICM, and a stronger expression of formative and primed pluripotency genes in EPI_{late} (**Fig. 4A**). Gene ontology (GO) and KEGG pathway analysis based on the 500 most differentially expressed genes between ICM and EPI_{late} showed enrichment for “reproduction,” “embryonic organ development,” “signaling pathways regulating pluripotency,” and “positive regulation of cell differentiation” (E3.5/E4.0), compared to enrichment for “ion transmembrane transport,” “cell adhesion molecules,” and “cell-cell signaling,” in EPI_{late} cells (E6.0/E6.3/E6.6) (**Fig.**

Figure 4: Transcriptome map of the pluripotency continuum.

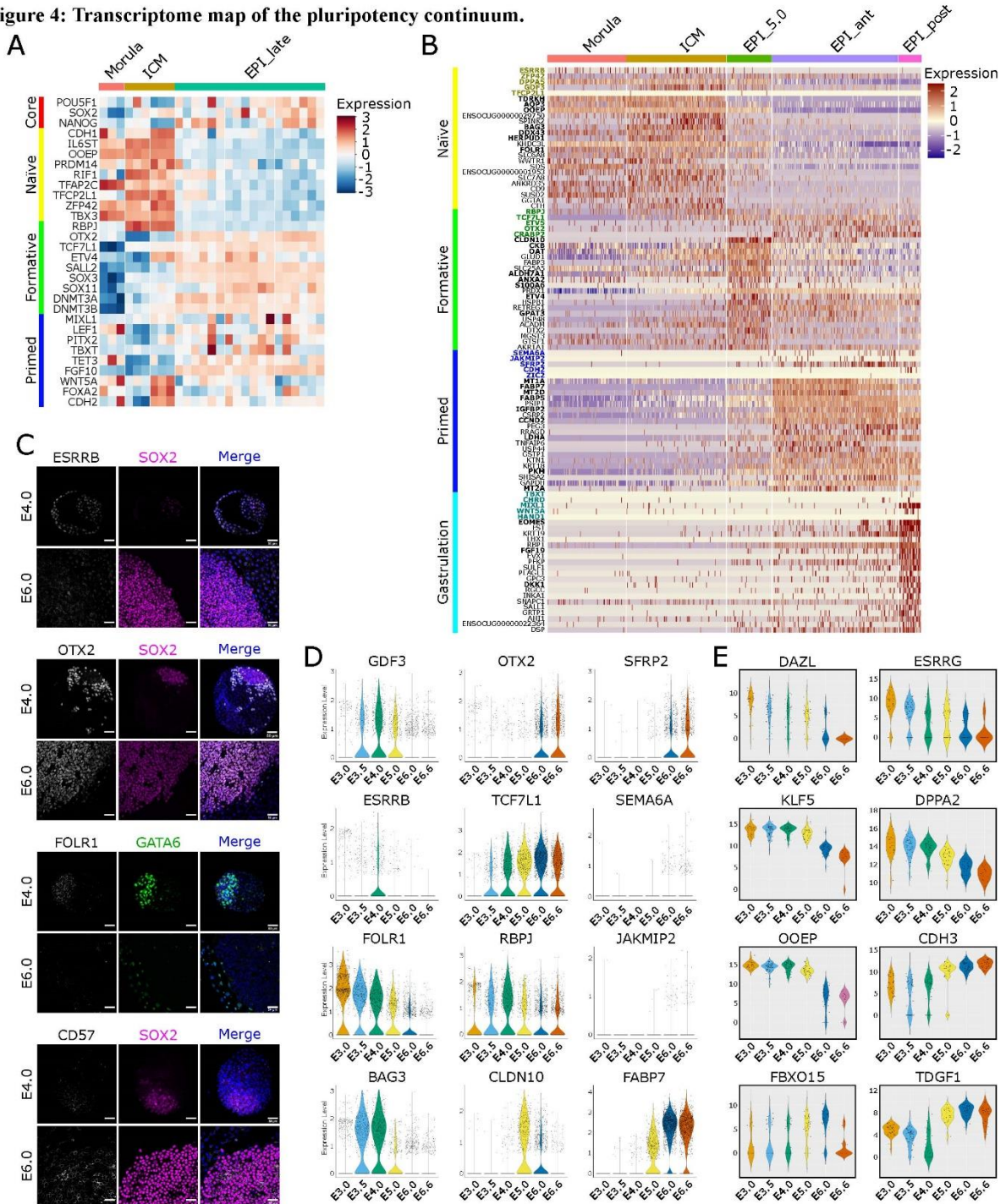


Figure 4: Transcriptome map of the pluripotency continuum. (A) Heatmap representation of the expression level of 30 genes selected on the basis of their expression in morula, ICM and EPI_ant of rodents and primates (bulk RNAseq). (B) Heatmap representation grouping 20 markers (from A) with the 20 most differentially expressed genes (10X Genomics "PLURI dataset") in ICM vs. all, EPI-mid vs. all, EPI-ant vs. all, and PS vs. all. (C) Immunofluorescence detection of ESRRB, SOX2, OTX2, FOLR1, GATA6, and CD57 in E4.0 (n = 23) and E6.6 (n = 16) embryos. Merge pictures include DAPI staining. Scale bars: 50 μm. (D) Violin plot representation of gene expression calculated from the "PLURI dataset." 1st, 2nd and 3rd rows show expression of naive, formative and primed pluripotency gene markers, respectively. (E) Violin plot representation of gene expression measured by Biomark qRT-PCR. See also Figure S4 and Table S3.

S4B,C). These results suggest that the epiblast cells of rabbit embryos between E3.5 and E6.6 encompasses the whole pluripotency continuum.

Second, we used the 10X Genomics single-cell dataset to increase the resolution of the analysis. To focus the analysis on the pluripotent cells, cells expressing TE and PE markers, and the aforementioned EPIa and EPIb clusters, were removed. The resulting “PLURI dataset” included 4018 cells from six developmental stages (E3.0, n = 875; E3.5, n = 471; E4.0, n = 580; E5.0, n = 486; E6.0, n = 937; E6.6, n = 669). A heatmap was generated grouping 20 landmark genes from the literature, with the 20 most overexpressed genes in ICM vs. all, EPI-5.0 vs. all, EPI_ant vs. all, and EPI_post vs. all (**Fig. 4B,D, Table S3**). Both morula and ICM cells (E3.5/E4.0) had a higher expression of naïve pluripotency markers *ESRRB*, *ZFP42 (REX1)*, *DPPA5*, *GDF3*, Tudor and KH domain-containing protein-encoding *TDRKH*, aquaporin-encoding *AQP3*, RNA-binding protein-encoding *OOEP*, chaperone regulator-encoding *BAG3*, ATP-dependent helicase-encoding *DDX43*, unfolded protein response-encoding *HERPUD1*, and folate receptor-encoding *FOLR1*. These markers declined in EPI 5.0, concomitantly with the upregulation of a new set of markers, including formative pluripotency markers *TCF7L1*, *ETV4*, and *ETV5*. Other markers enriched in EPI E5.0 included claudin-encoding gene *CLND10*, creatine kinase B (*CKB*), ornithine aminotransferase-encoding gene *OAT*, aldehyde dehydrogenase-encoding gene *ALDH7A1*, annexin-encoding gene *ANXA2*, calcium-binding protein-encoding gene *S100A6*, and acyltransferase-encoding gene *GPAT3*. An increase in the transcription of these genes might reflect an alteration in metabolic pathways and cell-cell interactions taking place during a change from the naïve to formative pluripotency state. Finally, in parallel with the formative/primed pluripotency markers *TCF7L1*, *ETV5*, and *OTX2*, a set of genes was upregulated in both EPI_ant and EPI_post in E6.0/E6.6 embryos. They included metallothionein-encoding genes *MT1A*, *MT2A* and *MT2D*, fatty acid-binding protein-encoding genes *FABP5* and *FABP7*, lactate dehydrogenase-encoding gene *LDHA*, and pyruvate kinase-encoding gene *PKM* (**Fig. 4B,D, Table S3**). This suggests alterations in metabolic pathways concomitantly with the transition from the formative to primed pluripotency state. Secreted frizzled-related protein-encoding gene *SFRP2*, insulin-like growth factor binding protein-encoding gene *IGFBP2*, and cell-cycle regulator *CCND2* were also up-regulated during this transition (**Fig. 4B,D, Table S3**). EPI_post cells expressed higher levels of *MIXL1*, *WNT5A*, *EOMES*, *FGF19*, and *DKK1*, indicating commitment to primitive streak and mesoderm. Differential expression of *ESRRB*, *OTX2*, *FOLR1*, and *CD57* was confirmed by immunofluorescence (**Fig. 4C**); *ESRRB* and *FOLR1* were more strongly expressed in the ICM of E4.0 embryos compared to EPI of E6.0 embryos, whereas *OTX2* and *CD57* were more strongly expressed in the EPI_late than in the ICM. GO and KEGG pathway enrichment analysis based on the 500 most differentially expressed genes between early (ICM E3.5/E4.0) and late (EPI_ant/EPI_post E6.0/E6.6) epiblast cells showed enrichment for “biosynthetic, metabolic and transport processes” in ICM/EPI cells, and enrichment for “cell death” and “Wnt signaling pathway” in EPI_ant/EPI_post cells (**Fig. S4D,E, Table S3**).

To further characterize the expression pattern of some key pluripotency genes at the single-cell level, single-cell Biomark qPCR was used to analyze morula, ICM and epiblast cells collected from E3.0, E3.5, E4.0, E5.0, E6.0 and E6.6 embryos (**Figs. 4E, S4F**). 260 cells were analyzed for each of the six developmental stages. Naïve-pluripotency markers *DAZL*, *ESRRG*, *KLF5*, *DPPA2*, *OOEP*, *FGF4*, *DPPA3*, and *ZFP42* were expressed at relatively higher levels in morula (E3.0), ICM (E3.5/E4.0) and EPI (E5.0) cells compared to cells from later embryo stages. In contrast, the primed pluripotency markers *CDH3* and *CER1* were expressed at relatively lower levels in morula (E3.0), ICM (E3.5/E4.0) and EPI (E5.0) compared to cells from E6.0 and E6.6 embryos. Interestingly, *FBXO15* and *TDGF1/CRIPTO*, markers of naïve pluripotency in mice, were upregulated in E6.0 and E6.6 EPI cells from rabbit embryos. Taken together, the results of the 10X Genomics and Biomark qPCR analyses allowed us to identify gene markers of the naïve, formative and primed pluripotency states in rabbit preimplantation embryos, including genes involved in metabolic pathways, cell-cell interactions, and signaling pathways. We also identified notable differences with mouse and cynomolgus macaque embryos.

The “PLURI dataset” was further used to investigate the expression of cell-cycle genes. The Seurat’s cell-cycle scoring and regression algorithm was used to determine the proportion of cells in each phase of the cell cycle (Scialdone et al., 2015). An overall decrease of the proportion of cells in G1 phase was observed in ICM and EPI cells during morula to blastocyst transition and blastocyst maturation (**Fig. S4G**). This decrease was associated with concomitant alterations of cell cycle regulatory gene expression including cyclin-, cyclin-dependent kinase- (CDK), and CDK inhibitor-encoding genes (bulk RNA-seq dataset; **Fig. S4H**). To identify key changes, we analyzed the “PLURI dataset” for expression of cell-cycle regulators (**Fig. S4I**). Increased expression of positive regulators of the G1/S transition including cyclin D2 (*CCND2*) and cyclin E (*CCNE1*) was observed at E5.0 and E6.0, a finding consistent with the shortening of the G1 phase in late epiblast cells (**Fig. S4G**). Increased expression of *CUL3* and *FBXW7* was also observed during the transition from early to late epiblasts. *CUL3* and *FBXW7* encode components of the E3 ubiquitin ligase complex that targets cyclin E for degradation after S-phase entry. Their upregulation might reveal the onset of oscillatory expression of cyclin E and cyclin E-CDK2 complexes in the cell cycle. Increased expression of ataxia telangiectasia mutated (*ATM*) and rad3-related (*ATR*), checkpoint kinase 2 (*CHEK2*) and *TP53* was also observed during the transition from early to late epiblasts, which might reveal the activation of ATM-ATR/CHEK/p53 pathway for DNA damage repair at E5.0/E6.0 as previously suggested (Osteil et al., 2016). Overall, these results strongly suggest that changes in cell cycle regulation take place in the pluripotency continuum of rabbit embryos.

Modification of the epigenetic landscape in the pluripotency continuum

We investigated the DNA methylation dynamics during rabbit preimplantation development using immunodetection of 5-methylcytosine (5meC) and 5-hydroxy-methylcytosine (5hmeC) in E3.0 to E6.6 embryos (**Fig. 5A**). 5meC fluorescence was low in morulae (E3.0) and early blastocysts (E3.5) compared to later stages. There was also significantly higher 5meC fluorescence in EPI cells compared to TE cells in E6.0 and E6.6 embryos. The dynamics of 5hmeC immunostaining appeared to correlate inversely with that of 5meC. Morulae (E3.0), ICM (E3.5), and TE (E3.5) all had higher levels of 5hmeC fluorescence compared to later stages embryos, indicating active demethylation at the early stages. Whereas 5hmeC signal was almost absent in all tissues at E5.0, it could again be detected at E6.0 and E6.6 in EPI cells. The 5meC and 5hmeC fluorescence patterns are consistent with the increasing expression of DNA methyltransferases (DNMTs) and the decreasing expression of ten-eleven translocation (TET) methylcytosine dioxygenases *TET1* and *TET2*, observed during the transition from ICM to EPI (**Fig. 5B,E** and **S5A**). Note, however, that *TET3* expression increased between the ICM and late EPI stages, which may explain why 5hmeC is still detected in the EPI at E6.0 and E6.6, despite the increased level of 5meC and increased expression of DNMTs (**Fig. 5A,E** and **S5A**). Thus, the rabbit embryo shows DNA methylation dynamics similar to those previously described in mice and humans (Zhang et al., 2018; Zhu et al., 2018).

Through the study of X chromosome coating by *XIST* RNA, it was shown that X inactivation begins at the morula stage in the rabbit (Okamoto et al., 2011). To describe this process in more detail across the pluripotency continuum, we analyzed H2AK119ub and H3K27me3 marks, two post-translational modifications of histones associated with X chromosome inactivation in mice (Chaumeil et al., 2011). At the morula stage, H2AK119ub immunostaining appears as small diffuse nuclear spots (E3.0) (**Fig. 5C**). From the early blastocyst stage onward, labeling begins to form foci in half of the embryos analyzed (n = 34). In those, the percentage of cells with a single nuclear focus increased from 15% (E3.5) to 100% (E5.0). Immunostaining of the repressive mark H3K27me3 revealed a similar dynamic, starting with 18% of the early blastocysts (E3.5) having a large H3K27me3 nuclear foci (n = 11, **Fig. S5B**), and plateauing at 50% of the embryos from E5.0 onward (n = 12, **Fig. 5D**). Consistent with the concomitant accumulation of both H2AK119ub and H3K27me3 marks between E3.5 and E5.0, the bulk RNAseq dataset revealed that expression of the H2AK119ub erasers, *ASXL2* and *ASXL3*, as well as expression of the H3K27me3 erasers, *KDM6A* and *KDM6B*, were downregulated during the transition from ICM to EPI_late (**Fig. 5E**).

To directly investigate the transcriptional activity of the two X chromosomes, we measured the expression of X-related genes relative to that of genes located on autosomes 2, 3, 4 and 5 in the 10X Genomics dataset. When both X chromosomes are expressed, the ratio between these two types of genes is equal to 1 (R1), as observed in half of the cells at E3.0 and E4.0 (**Fig. 5F**). When one of the X-chromosomes is transcriptionally inactive, the ratio is equal to 0.5 (R0.5). Because transcripts of the *SRY* gene (the only gene sequenced on the rabbit Y chromosome) were not detected in our dataset, we

Figure 5: Epigenetic characterization of the pluripotency continuum.

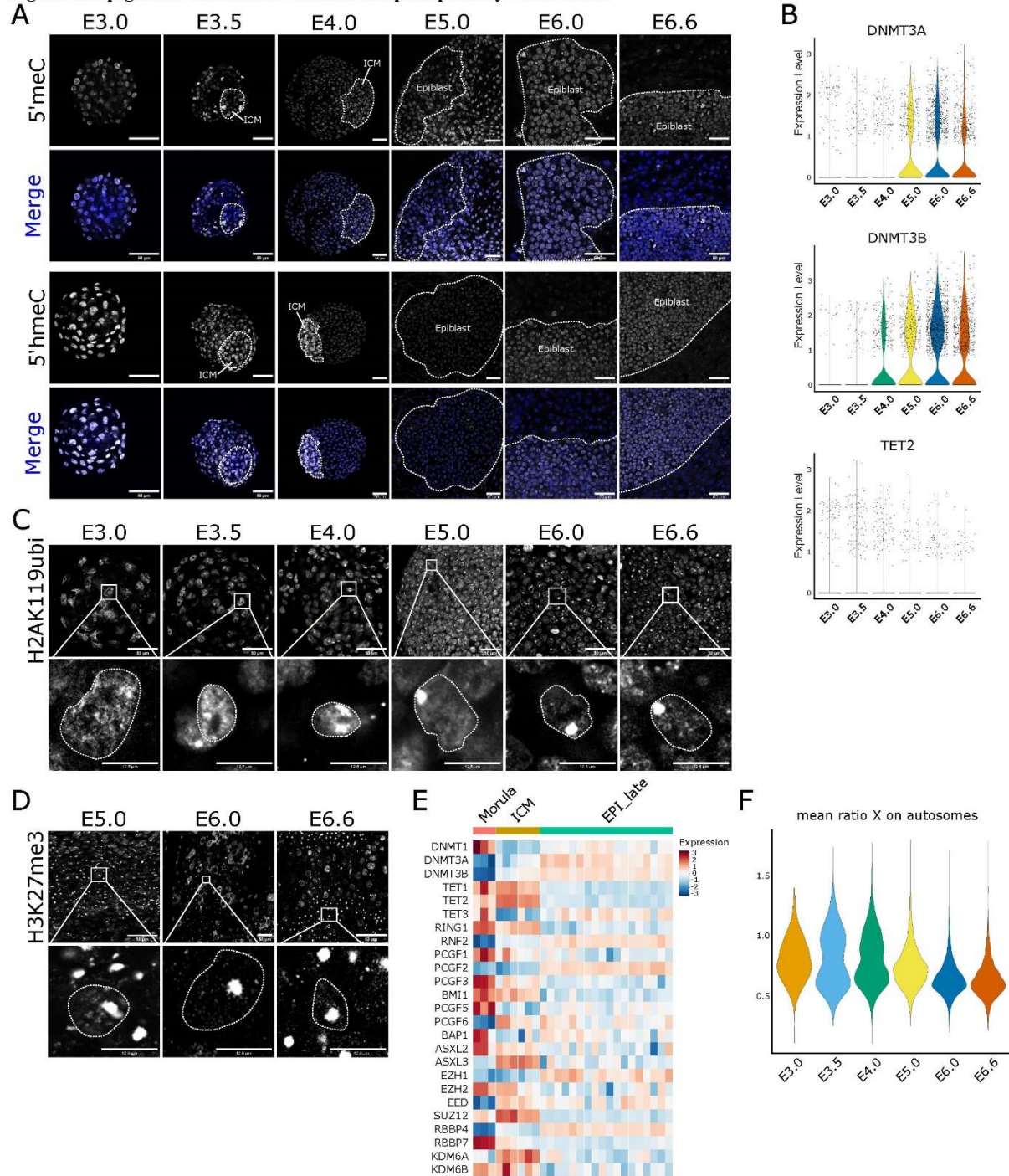


Figure 5: Epigenetic characterization of the pluripotency continuum. (A) Immunofluorescence detection of 5-methylcytosine (5meC) and 5-hydroxymethylcytosine (5hmeC) in E3.0 morula (n = 16), E3.5 (n = 18), E4.0 (n = 22) and E5.0 (n = 25) blastocysts, E6.0 (n = 6) and E6.6 (n = 5) epiblasts. ICM and epiblast are surrounded by dotted lines. Merge images include propidium iodide staining in blue. Scale bars: 50 μ m. (B) Violin plot representations of *DNMT3A*, *DNMT3B*, and *TET2* expression (“PLURI dataset”). (C) Immunolabeling of histone 2A lysine119 ubiquitinated (H2AK119ubi) marks in embryos at E3.0 to E6.6 (n = 41) (scale bar: 50 μ m). Enlargements show single nuclei (scale bar: 12.5 μ m). (D) Immunolabeling of histone 3 lysine 27 tri-methylation (H3K27me3) marks in embryos at E5.0-E6.6 (n = 12) (scale bar: 50 μ m). Enlargements show single nuclei (scale bar: 12.5 μ m). (E) Heatmap representation of bulk RNAseq dataset showing the expression of 25 genes involved in DNA methylation and polycomb repressive complexes. (F) Violin plot representation of the average expression of genes located on the X chromosome compared to those located on the autosomes 2, 3, 4 and 5, calculated from the 10X Genomics data at E3.0 to E6.6. See also Figure S5.

were unable to determine cell genders. We assumed that the R0.5 cells observed at E3.0 and E4.0 are male with a single X chromosome, while the R1 cells are female with both active X chromosomes. From E4.0 onwards, the R1 population gradually disappears in favor of the R0.5 population and it has completely disappeared at E6.0. These results corroborate the silencing of the early X-inactivated gene *HPRT1*, observed at E4.0-E5.0 in female rabbit embryos (Okamoto et al., 2011). From these results, we conclude that X chromosome inactivation by repressive marks begins as early as E3.5, followed by transcriptional inactivation, and ends at E6.0.

Gradual switch from OXPHOS to glycolysis-dependent metabolism in the pluripotency continuum

The bulk RNAseq dataset was used to investigate the expression of genes associated with oxidative phosphorylation (OXPHOS) and glycolysis. A stronger expression of both nuclear (NC)- and mitochondrial (MT)-encoded genes related to OXPHOS metabolism was observed in TE and ICM cells compared to EPI_late (**Fig. 6A**). These include genes of the *NDUF* family encoding subunits of the NADH-ubiquinone iron-sulfur oxidoreductase complex, the cytochrome c oxidase (*COX*) and ubiquinol-cytochrome c reductase (*UQCR*) encoding subunits of the electron transport chain, and genes encoding subunits of the F_0 and F_1 regions of ATPase. Analysis of *NDUFV2*, *UQCRQ*, *COX8A*, and *ATP5PD* in the single-cell “PLURI dataset” confirmed this observation, showing a gradual downregulation of gene expression between E3.0 and E6.6 (**Fig. 6B**). In contrast, lactate dehydrogenase-encoding genes, *LDHA* and *LDHB*, and pyruvate kinase-encoding gene, *PKM*, which are key genes of glycolysis, were expressed at much higher levels in EPI_late compared to ICM (**Fig. 6A**). The single-cell “PLURI dataset” confirmed this finding, showing a gradual increase in the expression of *LDHA*, *LDHB*, and *PKM* between E3.0 and E6.0 (**Fig. 6B**). These observations are consistent with a switch from OXPHOS to glycolysis for energy production between early blastocysts and pre-gastrula stage embryos in rabbits, which correlates with observations made in mice (Houghton, 2006). However, other genes involved in glucose uptake and metabolism, including the soluble carrier family-encoding genes *SLC*, hexokinase-encoding genes *HK*, and pyruvate dehydrogenase complex-encoding genes *PDH*, were already expressed at early embryo stages (ICM and E3.0 to E4.0), which suggests that the pluripotent cells of the ICM and early EPI are poised for upregulating glucose metabolism-based energy production.

To investigate mitochondrial activity during rabbit preimplantation embryo development, embryos between E3.0 and E6.6 were treated with tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE), which reveals mitochondrial membrane depolarization ($\Delta\Psi_m$). Morula and TE cells showed strong TMRE labeling, indicating high $\Delta\Psi_m$ and strong OXPHOS activity (**Fig. 6C**). TMRE labeling was much lower in the ICM and EPI cells of E3.5 to E6.0 embryos, and became undetectable by E6.6. This result was confirmed by CellROX assay, which labels the reactive oxygen species (ROS) produced by OXPHOS (**Fig. S5C**). These results are consistent with the expression pattern of *NDUF*, *COX*, *UQCR*, and *ATP5*

Figure 6: Metabolic characterization of the pluripotency continuum.

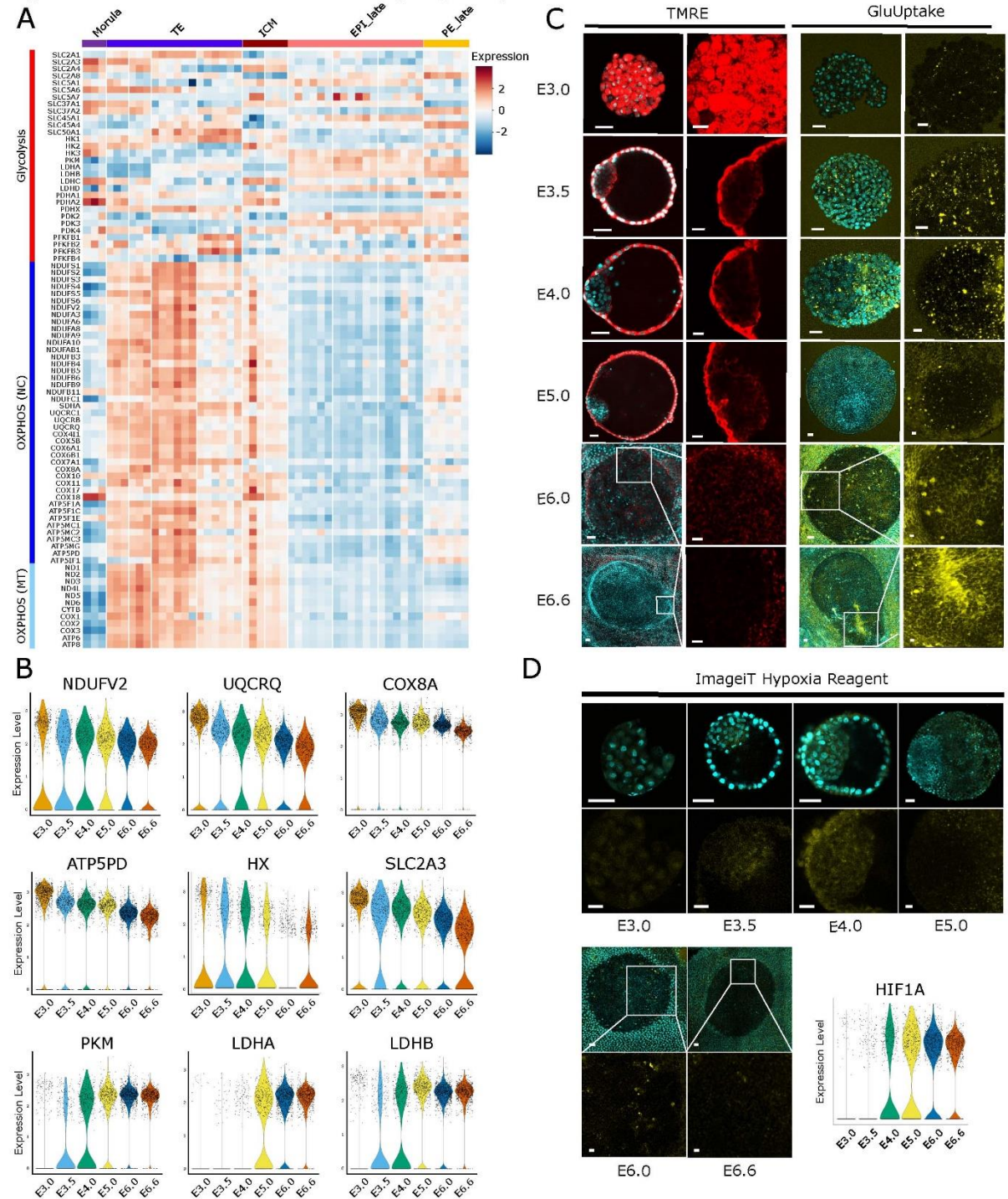


Figure 6: Metabolic characterization of the pluripotency continuum. (A) Heatmap representation of the bulk RNAseq dataset and showing the expression of genes involved in glycolysis and oxidative phosphorylation (OXPHOS). NC, nuclear genome; MT mitochondrial genome in morula (E2.7), TE (E3.5-E6.6), ICM (E3.5/E4.0), EPI_late (E6.0-E6.6) and PE_late (E6.0). (B) Violin plot representation of the expression of genes involved in OXPHOS and glycolysis at different embryonic stages in the “PLURI dataset”. (C) Metabolism analysis of live rabbit embryos between E3.0 and E6.6. The 1st vertical row show images of embryos (n = 34, 5 to 11 embryos per stage) treated with both tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE, red staining) and Hoechst (blue). The 2nd vertical row shows enlargements of ICM/epiblast cells after TMRE staining. The 3rd vertical row show images of embryos (n = 90, 5 to 19 embryos per stage) treated with GluUptake (yellow staining) and Hoechst (blue). The 4th vertical row shows enlargements of ICM/epiblast cells after GluUptake staining. Scale bars: 50 mm, and 20µm for enlargements. (D) Images of rabbit embryos (stages as indicated; n = 52, 6 to 12 embryos per stage) treated with

Image-iT Hypoxia reagent to reveal HIF-1 α activity. Images in the top row show co-staining of cytoplasm with iT Hypoxia reagent (yellow) and of nucleus with DAPI (blue); Images in the bottom row show enlargement of ICM/epiblast cells after treatment with iT Hypoxia reagent. Scale bars: 50 μ m and 20 μ m for enlargements. The violin plot represents *HIF-1 α* expression (stages as indicated; “PLURI dataset”). See also Figure S5.

families of genes, which are highly expressed in TE cells, and have low expression in EPI_late cells. Fluorometric determination of 2-deoxyglucose incorporation was performed to study glycolysis in rabbit embryos (**Fig. 6C**). Weak 2-deoxyglucose fluorescence was observed in morulae (E3.0), but gradually increased in later stages (from E3.5 onwards), first in TE cells and then in EPI cells. Strong fluorescence was observed in the primitive streak region in E6.6 embryos, correlating with the higher expression of *LDHA* and *PKM* observed in transcriptome studies (**Fig. 6B**). Activity of HIF-1 α , a master regulator of the metabolic shift from OXPHOS to glycolysis, was investigated using the Image-iT Hypoxia reagent. A peak of HIF-1 α expression and activity was observed in E3.5-E4.0 embryos (**Fig. 6D**), further suggesting a switch from OXPHOS to glycolysis-dependent metabolism during the transition from early to late EPI.

Robust markers of naive pluripotency in rabbits are common to either mice or primates and rarely to both

We sought to further characterize the naïve pluripotency state in rabbit embryos and compare to current data in mice and primates. To address this, we identified the differentially expressed genes between ICM (E3.5/E4.0) and TE (E3.5/E4.0/E6.0/E6.6), ICM (E3.5/E4.0) and PE_late (E6.0), and ICM (E3.5/E4.0) and EPI_late (E6.0/E6.3/E6.6) in the bulk RNAseq dataset, which resulted in 3,237 differentially expressed genes in ICM cells compared to the EPI, TE, and PE lineages ($p < 0.01$) (**Fig. 7A, Table S4**). This analysis revealed an upregulation of pluripotency markers *DPPA5*, *KDM4A*, *IL6R*, *SOX15* and *NODAL*, and a downregulation of early differentiation markers (*e.g.* *SEMA6A*, *CCND2*, *APOA1*, *LAMB1*, *CLDN4*, and *KRT8*) in ICM cells compared to the other lineages (**Fig. 7B, Table S4**). GO analysis highlighted the under-representation of metabolic and adhesion processes in ICM cells, including “Small molecule metabolic process”, “Organic acid metabolic process,” and “Cell-substrate adhesion” (**Fig. 7C, Table S4**). KEGG pathway analysis showed an ICM enrichment in genes related to pluripotency, including “Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells” and “Pathways in cancer” (**Fig. 7D, Table S4**).

We performed a similar differential analysis between ICM cells (E3.5/E4.0) compared to other cell types (E3.5/E4.0/E5.0/E6.0/E6.6) in the 10X-genomics dataset (average log Fold change > 0.25), and identified 140 differentially expressed genes (**Fig. 7E**). GO analysis of these 140 genes showed enrichment for biological processes related to high transcription and cell division, including “chromatin

Figure 7: Defining markers of naïve pluripotency in rabbits.

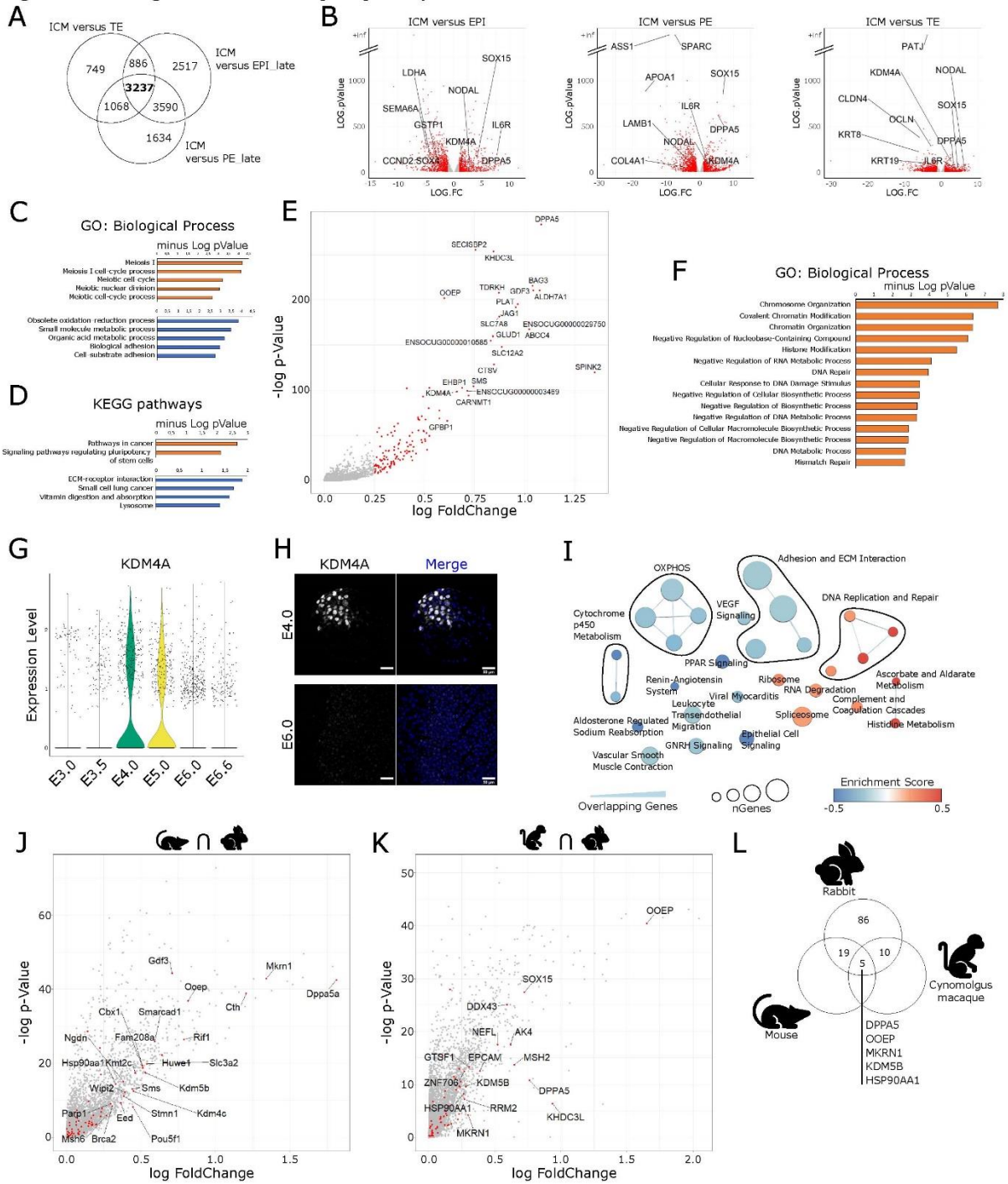


Figure 7: Defining markers of naïve pluripotency in rabbits. (A) Venn diagram representation of the total numbers of differentially expressed genes between ICM (E3.5/E4.0), TE (E3.0-E6.6), EPI_late (E6.0-E6.6), and PE_late (E6.0) in the bulk RNAseq dataset. (B) Volcano plot representations of the 3237 differentially expressed genes between ICM (E3.5/E4.0) and other samples described in A. (C) Gene Ontology biological process analysis of the significantly differentially expressed genes (log Fold Change < -0.5 and log Fold Change > 0.5) between ICM (E3.5/E4.0) and other three samples described in A, with genes up-regulated in orange and down-regulated in blue. (D) KEGG pathway analysis of the 3237 differentially expressed genes described in A, with genes up-regulated in orange and down-regulated in blue. (E) Dot plot representation (-log p-value as a function of log fold-change) of the 140 differentially expressed genes between ICM (E3.5/E4.0) and other samples in the single-cell RNAseq dataset. (F) GO biological process analysis of the 140 up-regulated genes in ICM/EPI described in E. (G) Violin plot representation of *KDM4A* expression in morula/ICM/EPI cells at E3.0 to E6.6 (“PLURI dataset”). (H) Immunofluorescence images of *KDM4A* and Merge for E4.0 and E6.0. (I) Network diagram of enriched biological processes. (J) Volcano plot of differentially expressed genes in the PLURI dataset. (K) Volcano plot of differentially expressed genes in the PLURI dataset. (L) Venn diagram of differentially expressed genes between Rabbit, Mouse, and Cynomolgus macaque.

(H) Immunofluorescence analysis of KDM4A expression in E4.0 (n = 4) and E6.0 (n = 4) rabbit embryos and counterstained with DAPI. Scale bars: 50 μ m. (I) Cytoscape representation of Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of the differentially expressed genes in ICM/EPI (E3.5/E4.0) versus other samples showing KEGG terms enriched (in red) or depleted (in blue) in ICM. (J) Dot plot representation (-log p-value as a function of log fold-change) of the positively differentially expressed genes between ICM (E3.5/E4.0) and other cell types in mice (Argelaguet et al., 2019). (K) Dot plot representation (-log p-value as a function of log fold-change) of the positively differentially expressed genes between ICM/EPI (E6.0/E9.0) and other cell types in cynomolgus monkey (Nakamura et al., 2016). (L) Venn diagram representation of the 120 up-regulated genes in rabbit ICM/EPI described in E between rabbits, mice and cynomolgus monkeys. See also Figures S6 and S7, Table S4 and S5).

organization,” “Histone modification,” “DNA repair,” and “cellular response to DNA damage stimulus” terms (**Fig. 7F, Table S5**). Among these 140 genes were pluripotency-associated genes *DPPA5*, *GDF3*, *PRDM14*, *SOX15*, chromatin regulator-encoding genes *KDM4A*, *BRDT*, *KMT2C*, *SMARCA1*, and DNA-damage associated genes *RIF1*, *MSH6*, *RRM2*, and *PARP1*. The highest expression of *KDM4A* transcripts, as well as ICM-specific expression of KDM4A protein, were observed at E4.0 (**Fig. 7G,H**). These genes might be instrumental to characterize naïve pluripotency in embryo-derived and induced pluripotent stem cell (PSC) lines. We next applied Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) to the 10X-genomics dataset, in which the aforementioned 140 genes occupied the highest ranks from all differentially-expressed genes. A Cytoscape representation revealed an enrichment in genes related to “DNA replication and repair,” and a depletion in genes related to “Oxphos,” “Adhesion and ECM interaction,” and “PPAR signaling” (**Fig. 7I, Table S5**). We then further examined the JAK-STAT, NOTCH, WNT, MAPK, and TGF-beta signaling pathways, all of which are associated with the regulation and maintenance of pluripotency in rodents and primates (Boroviak et al., 2015; Boroviak et al., 2018; Mohammed et al., 2017; Nakamura et al., 2016). Consistent with naïve pluripotency data in mice (Mohammed et al., 2017), WNT, TGF-beta and MAPK signaling pathways were all downregulated in ICM cells versus TE, PE and late EPI cells (**Fig. S6A, Table S5**). In contrast, the expression of components of the JAK-STAT signaling pathway, including *IL6R*, *IL6ST*, *ILAR*, *STAT4* and *STAT3*, were increased (**Fig. S6A,B, Table S5**). Notably, the expression of NOTCH and NOTCH target gene *HES1* were low, whereas the expression of the NOTCH ligand *JAG1* and the NOTCH inhibitor *NUMB* were high in ICM cells compared with other cells (**Fig. S6A,C, Table S5**). Low NOTCH activity in rabbit ICM is consistent with recent data indicating that treatment of human PSCs with the NOTCH pathway inhibitors, DBZ and RIN1, enhances naïve pluripotency (Bayerl et al., 2021). Overall, these results suggest that the mechanisms controlling naïve pluripotency in rabbit preimplantation embryos utilize signaling pathways that function in mice, primates, or in both.

Finally, we asked which of the aforementioned 140 genes are also specific to the ICM and early EPI cells in both mice and cynomolgus macaques, making use of the single-cell RNAseq data generated by Argelaguet and colleagues (Argelaguet et al., 2019) and Nakamura and colleagues (Nakamura et al., 2016). In these datasets, ICM and early EPI cells were identified using landmark markers of naïve

pluripotency in mice (*Fgf4*, *Esrrb* and *Klf2*) (**Fig. S7A, Table S5**) and cynomolgus macaques (*FGF4*, *KLF17*, and *SOX15*) (**Fig. S7B, Table S5**). The 50 most overexpressed genes between ICM and early EPI cells compared to all other cell types were identified and represented by heatmaps (**Fig. S7A,B, Table S5**). Genes more highly expressed in naïve cells were represented by volcano plots, highlighting 120 ortholog genes previously identified in rabbits (**Fig. 7J,K, Table S5**). Of these 120 genes, 24 were also upregulated in mice (average log fold-change > 0.25) and 15 were upregulated in cynomolgus macaques (average log fold-change > 0.25). These genes are associated with “pluripotency regulation,” “chromatin organization” and “DNA metabolism and repair” as shown in an interaction map of biological processes (**Fig. S7C, Table S5**). Remarkably, 63 (~52%) of those were also present in the list of 3,237 differentially expressed genes in ICM vs. EPI, TE, and PE lineages from the bulk RNAseq dataset.

Finally, a comparison of the most differentially expressed genes in the three species led to the identification of five common genes, *DPPA5*, *OOEP*, RING-Type E3 Ubiquitin Transferase-encoding gene *MKRNI*, Lysine demethylase-encoding gene *KDM5B*, and heat-shock protein-encoding gene *HSP90AA1* (**Fig. 7L**). Notably, these genes were also present amongst differentially expressed genes in ICM cells vs. EPI and PE cells from the bulk RNAseq (**Table S6**). In addition, *DPPA5*, *OOEP* and *MKRNI* were also present in the ICM vs. TE comparison (**Table S6**). Taken together, these results show that rabbit preimplantation embryos share some of the marker genes for naïve pluripotency with those of mice, and some with those of cynomolgus macaques.

Discussion

Our study describes the results of the first thorough investigation of the rabbit preimplantation embryos at the single-cell level. It combines bulk and single-cell RNA sequencing, protein immunolabelling, and fluorometric quantification of mitochondrial activity and glycolysis to characterize the transcriptome, epigenome and metabolome of the pluripotent cells from the morula to early gastrula stage. Four main findings emerge from this study: (1) The three early lineages, EPI, PE and TE are fully segregated between E5.0 and E6.0. (2) ICM and early EPI cells (E3.5/E4.0) and late EPI cells (E6.0/E6.6) exhibit the cardinal features associated with naïve and primed pluripotency, respectively; E5.0 is a transitional stage in that respect. (3) Novel markers of naïve pluripotency were identified, including *MKRNI* and *OOEP*; (4) Although the rabbit is evolutionarily closer to mouse than to primates, the transcriptome of rabbit pluripotent cells shares many common features with that of humans and non-human primates, including markers of naïve pluripotency.

In Eutherian mammals, TE formation is triggered by the asymmetric segregation of keratins and polarization of the outer cells of the morula at the onset of compaction (Lim et al., 2020 Nature; Gerri et al., 2021). In our study, the onset of KRT8/18 expression, and that of GATA2 and GATA3, indicates an early start of the TE program in some morula cells. On the other hand, CDX2 is only expressed late (E4.0) in the TE of the expanded blastocyst and OCT4, initially expressed in all cells of the early blastocyst, including the TE, becomes restricted to the EPI cells only at E5.0. These results point to the late differentiation of TE lineage. It is also from E4.0 onwards that the expression of SOX2 and GATA6, markers of EPI and PE, respectively, become mutually exclusive and the two cell types separate to form two distinct cell compartments at E5.0, consistent with a previous study (Piliszek et al., 2017). These results indicate that the late segregation of EPI, TE, and PE lineages is similar to what has been described in human and non-human primates (Meistermann et al., 2021; Nakamura et al., 2016; Stirparo et al., 2018).

Recent studies in mice, cynomolgus macaques, and pigs describe the evolution of the transcriptome and epigenome of pluripotent cells from the morula stage to gastrulation, highlighting the transition from the naïve to primed pluripotency states (Argelaguet et al., 2019; Mohammed et al., 2017; Nakamura et al., 2016; Ramos-Ibeas et al., 2019). In rodents and primates, this type of analysis is more challenging because the developmental stage at which this transition occurs corresponds roughly to the time when embryos implant in the uterus. This is particularly true of primates, where access to the newly implanted embryo (between E8 and E13) is virtually impossible. In contrast, rabbit embryos are well suited for investigating this transition because they have delayed embryo implantation until after the onset of gastrulation (Fischer et al., 2012; Puschel et al., 2010). We found that the epiblast of E5.0 rabbit embryos is a transition state, characterized by the downregulation of naïve pluripotency markers and the upregulation of formative and primed pluripotency markers. In addition, it is at this stage that we

observed the shift to predominantly glycolic metabolism, gene dosage compensation due to X-chromosome inactivation and genome re-methylation, all of which are considered as key events of the naïve-to-primed state transition in rodents and primates (Davidson et al., 2015; Devika et al., 2019). Despite embryo staging prior to cell preparation, some overlap between naïve, formative and primed markers can be observed, which may reflect asynchrony of gene expression dynamics. This heterogeneity emphasizes the transitional-stage notion associated with E5.0 rabbit embryos.

Our study identified new marker genes for naïve pluripotency in rabbit, a species in which it has not yet been possible to derive truly naïve pluripotent stem cell lines (Osteil et al., 2016; Taponnier et al., 2017). Five of these genes, *MKRN1*, *KDM5B*, *DPPA5*, *OOEP*, and *HSP90AA1* are also specifically expressed in the ICM and early EPI in mouse and cynomolgus macaque embryos. *MKRN1* is a target of OCT4 (Cassar et al., 2015), and encodes an E3 Ubiquitin Transferase involved in the degradation of p53 and p21 and promotes cell-cycle progression (Lee et al., 2009). *MKRN1* also induces the degradation of APC and PTEN, thus participating in the activation of the WNT and PI3K signaling pathways (Lee et al., 2018; Lee et al., 2015). It also negatively regulates glycolysis metabolism via the 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (Han et al., 2018). Thus, *MKRN1* has functional characteristics expected of a naïve pluripotency regulator. *KDM5B* encodes a H3K4 demethylase. Its depletion improves iPSC reprogramming (Dabiri et al., 2019; Kidder et al., 2013), and enhances self-renewal by preventing the deactivation of core pluripotency genes and the activation of differentiation genes (Kidder et al., 2013). *DPPA5* encodes an RNA binding protein that interacts with mRNAs encoding pluripotency and cell-cycle regulators (Tanaka et al., 2006). Moreover, *DPPA5* binds NANOG and enhances its function while also preventing its degradation (Qian et al., 2016). *OOEP* belongs to the same family as *DPPA5* (Pierre et al., 2007). Although it is known to be expressed in the ICM cells and naïve PSCs in various species, its role in the control of pluripotency remains unclear (Messmer et al., 2019; Mohammed et al., 2017; Nakamura et al., 2016; Stirparo et al., 2018). Finally, *HSP90AA1*, which encodes heat-shock protein HSP90 α may be directly involved in pluripotency regulation by potentiating the nuclear translocation of STAT3 dimers and protecting OCT4 and NANOG from proteasomal degradation (Bradley et al., 2012; Longshaw et al., 2009; Setati et al., 2010). Therefore, of the five genes identified in the inter-species comparison, four are capable of interacting directly with well-characterized pluripotency regulators.

Although many of the naïve and primed pluripotency markers identified in rabbits are common to mice and primates, our study also highlights some noticeable differences. The IL6 receptor-encoding gene *IL6R* is expressed in the ICM of rabbit and primate embryos, but is replaced by the LIF receptor-encoding gene *LIFR* in mice (Boroviak et al., 2018). *KLF17* is a naïve pluripotency marker in rabbits (this study) and primates, but not in mice (Stirparo et al., 2018; Boroviak et al., 2018). *TDGF1* is expressed in ICM and early EPI cells but downregulated in late EPI cells in mice (Boroviak et al., 2015; Mohammed et al., 2017), whereas it is only expressed in late EPI in rabbit and cynomolgus macaque

(Nakamura et al., 2016). *NODAL* is expressed in rabbit (this study), human (Blakeley et al., 2015; Stirparo et al., 2018), and cynomolgus macaque (Nakamura et al., 2016) ICM and early EPI cells, but it is only expressed in late EPI cells in mice (Blakeley et al., 2015; Boroviak et al., 2015; Mohammed et al., 2017). Thus, the last three genes exhibit an opposite expression pattern in rabbits (this study) and cynomolgus macaques *vs.* mice. Finally, some rarer genes, including *GDF3* and *DPPA5* exhibit a similar expression pattern in rabbits and mice, with strong expression in ICM and early EPI cells and low expression in late EPI cells, whereas they remain strongly expressed in the epiblast of E13-E14 cynomolgus macaque embryos (Nakamura et al., 2016). These interspecies comparisons clearly suggest a greater similarity between rabbits and primates in the expression of pluripotency regulators across the pluripotency continuum. Arguably, this makes the rabbit a suitable species for studying the embryo colonization capacity of human naïve PSCs and the generation of inter-species chimeras (Aksoy et al., 2021).

Materials and Methods

Production and dissection of rabbit embryos

All procedures in rabbits were approved by the French ethics committee CELYNE (approval number APAFIS#6438 and APAFIS #2180-2015112615371038v2), and COMETHEA n°45, registered under n°12/107 and n°15/59. Sexually mature New Zealand white rabbits were injected with follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone, followed by artificial insemination as previously described (Teixeira et al., 2018). Embryos were flushed from explanted oviducts 65–159 h after insemination.

For bulk RNAseq, morulae were collected at embryonic day 2.7 (E2.7), pooled by ten and immediately dry-frozen. Blastocysts were collected at E3.5 and E4.0. Mucin coat and zona pellucida (ZP) were removed by protease digestion (Sigma P8811-100MG). Zona-free embryos were subsequently cultured in TCM199 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma M4530) until they regain a normal morphological aspect. Inner Cell Masses (ICMs) were separated from the trophectoderm (TE) by moderate immune-surgery: briefly, blastocysts were incubated in anti-rabbit whole goat serum (Sigma R-5131) at 37°C for 90 min, washed thoroughly and then incubated with guinea pig complement serum (Sigma S-1639) for 5 min. After washing in PBS supplemented with 10% FBS, ICMs were mechanically dissociated from the TE by gentle pipetting with a glass pipette. Samples (ICM and TE) were pooled by ten and immediately dry-frozen. At E6.0, the mucoprotein layer was removed mechanically using glass microcapillaries. Zona-free embryos were opened and flattened on a

plastic dish in FHM medium to expose the embryoblast with the primitive endoderm on top. The primitive endoderm (visceral part) was first dissociated by careful scratching with a glass needle, and the epiblast was then separated from the trophoctoderm with a microscalpel. Samples were dry-frozen. At E6.3 and E6.6, embryos were processed as described for E6.0 embryos. The anterior part of the epiblast was isolated from the posterior epiblast by manual micro-dissection prior to dry-freezing. For E6.3 embryos, the procedure for isolating the anterior epiblast was validated *a posteriori* by analyzing *TBXT* expression by RT-qPCR.

For 10X single-cell RNA-seq and Biomark single-cell qPCR, embryos collected at E3.0, E3.5, E4.0 and E5.0 were treated with protease from *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich P8811) at 37°C followed by mechanical dissociation with glass microcapillaries to remove the mucin coat and ZP. For embryos collected at E6.0 and E6.6, mucoprotein layers were removed mechanically with forceps. The embryonic disks were then dissected mechanically with forceps and pooled prior to single-cell dissociation. For cell singularization, E3.0, E3.5, E4.0 and E5.0 embryos were treated with 0.05-0.1% trypsin for 5-10 min at 37°C. For E6.0 and E6.6 embryos, epiblast cells were mechanically dissociated to obtain small cell clusters (<10 cells), which were then treated with TryPLE for 5 min at 37°C, and singularized by gentle mechanical dissociation. Enzymatic activities were stopped by adding 10% fetal bovine serum (Gibco 11563397). For Biomark qPCR, single-cell were harvested using glass microcapillaries and transferred into 200 µL Eppendorf tubes containing 5mL buffer of CellsDirect™One-Step qRT-PCR kit (ThermoFisher) and immediately frozen at -80°C. For 10X single-cell RNA-seq, cell suspensions were run through a 50µm filter to remove any remaining cell clumps and were loaded on a Chromium controller.

RNA extraction and bulk RNA sequencing

Total RNA was isolated from batches of embryos, ICM or TE (n = 20) using PicoPur Arcturus (Excilone, France) with a DNase I (Qiagen, Germany) treatment as recommended by the supplier. For E6.0, E6.3, and E6.6 stages, RNAs were extracted from single embryo samples. Three nanograms of total RNA were used for amplification using the SMART-Seq V4 Ultra Low Input RNA kit (Clontech) according to the manufacturer's recommendations (10 PCR cycles were performed). cDNA quality was assessed on an Agilent Bioanalyzer 2100, using an Agilent High Sensitivity DNA Kit. Libraries were prepared from 0.15 ng cDNA using the Nextera XT Illumina library preparation kit. Libraries were pooled in equimolar proportions and sequenced (Paired-end 50–34 bp) on an Illumina NextSeq500 instrument, using a NextSeq 500 High Output 75 cycles kit. Demultiplexing was performed (bcl2fastq2V2.2.18.12) and adapters were trimmed with Cutadapt1.15, so that only reads longer than 10 bp were kept. Number of reads ranged from 52 to 137 million. Reads were mapped to the rabbit genome (*Oryctolagus cuniculus* 2.0). 81.8 to 85.7% (depending on samples) of the pair fragments could be aligned; 70.3 to 78% of these fragments passed the mapping filter; 56.4 to 64.7% of them were assigned

to a gene.

Single-cell RNA-library construction and sequencing

Cell suspensions were loaded on a Chromium controller (10x Genomics, Pleasanton, CA, USA) to generate single-cell Gel Beads-in-Emulsion (GEMs). Single-cell RNA-Seq libraries were prepared using Chromium Single cell 3'RNA Gel Bead and Library Kit (P/N 1000075, 1000153, 10x Genomics). GEM-RT was performed in a C1000 Touch Thermal cycler with 96-Deep Well Reaction Module (Bio-Rad; P/N 1851197): 53°C for 45 min, 85°C for 5 min; held at 4°C. After RT, GEMs were broken and the single-strand cDNA was cleaned up with DynaBeads MyOne Silane Beads (Thermo Fisher Scientific; P/N 37002D). cDNA was amplified using the C1000 Touch Thermal cycler with 96-DeepWell Reaction Module: 98°C for 3 min; 11 cycle of 98°C for 15 s, 63°C for 20 s, and 72°C for 1 min; 72°C for 1 min; held at 4°C. Amplified cDNA product was cleaned up with the SPRIselect beads (SPRI P/N B23318). Indexed sequencing libraries were constructed with SPRIselect following these steps: (1) Fragmentation end repair and A-tailing and size selection; (2) adapter ligation and cleanup; (3) sample index PCR and size selection. The barcode sequencing libraries were quantified by quantitative PCR (KAPA Biosystems Library Quantification Kit for Illumina platforms P/N KK4824). Sequencing libraries were loaded at 18 pM on an Illumina HiSeq2500 using the following read length: 28 bp Read1, 8 bp I7 Index, 91 bp Read2.

Biomark qPCR analysis

Reverse transcription and specific target pre-amplification were performed on single isolated cells described before, using the SuperScript III/RT Platinum Taq mix provided in the CellsDirect™One-Step qRT-PCR kit (ThermoFisher), and the targeted primer pairs. The expression of TATA-box binding protein (TBP) was controlled in the pre-amplified 500 samples for each of the six analyzed embryo stages (E3.0, E3.5, E4.0, E5.0, E6.0 and E6.6) in order to test their quality and filter them. Real-time PCR (qPCR) was performed using StepOnePlus real-time PCR system and Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). The 1560 validated samples (260 per each embryo stage) were subsequently analyzed with Universal PCR TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) and coupled with a DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm) and Evagreen (Biotium 31000) in 96.96 Dynamic Arrays on a Biomark System. Each 96.96 array allowed the study of 48 genes in 85 unique cells, using two different primer sets for each gene. Primer sequences are shown in **Table S6**.

Bioinformatics analysis

For bulk RNA-seq, reads were mapped to the rabbit genome (*Oryctolagus cuniculus* 2.0) using the splice junction mapper TopHat (version 2.0.14) associated with the short-read aligner Bowtie2 (version 2.1.0). Finally, FeatureCounts (version 1.4.5) was then used to establish a gene count table. Hierarchical clustering was computed using hclust R package with Euclidean distance metric and Ward linkage. Principal Component analysis (PCA) was made using FactoMineR (Lê et al., 2008). Data normalization and single-gene level analysis of differentially expression genes were performed using the DESeq2 (Anders and Huber, 2010). Differences were considered significant when adjusted P values (Benjamini-Hochberg) < 0.01 , and absolute fold change ≥ 2 . Log₂ transformed read counts (Rlog) (after normalization by library size) were obtained with DESeq2 package and used for heatmaps.

For single-cell RNAseq, data were analyzed using the R software (version 3.6.3) and RStudio Desktop integrated development environment (IDE) for R (version 1.4, Open Source Edition). Since the rabbit genome annotation is not complete, some genes were annotated manually using ENSG identity. The Ensembl release 104 (Howe et al., 2021), the National Center for Biotechnology Information (NCBI database) (Schoch et al., 2020), and the g:Profiler online software (Raudvere et al., 2019) were used to convert ENSG annotations into Gene symbols. The Seurat package (version 3.1.2) was used to filter, normalize and analyze the data as described (Stuart et al., 2019). Briefly, the data were filtered by eliminating all cells with mitochondrial genome expression above 0.7%, and selecting cells in which the total number of expressed genes is between 300 and 2500. Expression levels were then log-normalized and the 3000 most variable genes were identified. Principal component analysis (PCA) and uniform manifold approximation and projection (UMAP) dimension reductions were applied to the dataset to identify cell clusters. These clusters were identified using graph-based clustering algorithm on the first 20 components and annotated according to expression of lineage-specific genes and embryonic stage. Differential expression analysis was performed and genes with a log fold-change > 0.25 or < -0.25 were considered significantly differentially expressed. The same workflow was applied for published data.

Temporal trajectories were created using the following additional packages: monocle (version 2.12.0), cellranger (version 1.1.0) and viridis (version 0.4.0). Data analysis was performed as described (Trapnell et al., 2014). Briefly, differential analysis was performed on cells isolated and annotated using Seurat package, and the top 1000 most significantly differentially expressed genes were used to order the samples in pseudo-time. Stage E3.0 was set as the starting point.

Statistical enrichment analysis of Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) terms was performed using the g:Profiler online software (Raudvere et al., 2019). Gene set enrichment analysis software (GSEA) was used to identify significantly enriched KEGG terms. Cytoscape software (Shannon et al., 2003; Smoot et al., 2011) and enrichment map plug-ins were used to build and visualize networks. The node size is scaled by the number of genes contributing to each

term; edges width is proportional to the overlap between each gene set and each node is colored by their enrichment score.

For Biomark analysis, samples were analyzed using the Fluidigm^R Real-Time PCR Analysis Software (version 4.1.3) and the SingularTM Analysis Toolset R package (version 3.6.2). Pluripotent and extra-embryonic cells were distinguished by the expression of *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *SOX17* and *CDX2*, then analyzed separately.

Immunofluorescence

Embryos were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min at room temperature. After three washes in phosphate-buffered saline (PBS), embryos were permeabilized in PBS-0.5% TritonX100 for 30 min. For anti-5'-hydroxymethylcytosine and 5'-methylcytosine antibodies, embryos were permeabilized in PBS-0.5% Triton for 15 min, washed in PBS for 20 min, then incubated in 2M HCl for 30 min. Embryos were subsequently incubated in 100mM Tris-HCl pH 9 for 10 min, washed in PBS for 15 min, and incubated in blocking solution (PBS supplemented with 5% bovine serum albumin) for 1 h at room temperature. Embryos were then incubated with primary antibodies diluted in blocking solution overnight at 4°C (**Table S6**). After two washes (2 x 15 min) in PBS, embryos were incubated in secondary antibodies diluted in blocking solution at a dilution of 1:100 for 1 h at room temperature. Finally, embryos were transferred through several washes of PBS before staining DNA with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 0.5µg/mL) or propidium iodide (PI; 1µg/mL) for 10 min at room temperature. Embryos were analyzed by confocal imaging (DM 6000 CS SP5; Leica). Acquisitions were performed using an oil immersion objective (40x/1.25 0.75, PL APO HCX; Leica).

Detection of ROS, glycolysis, and mitochondrial membrane potential

After gentle removal of the mucin coat with protease from *Streptomyces griseus* (5mg/mL), embryos were incubated in pre-warmed pre-equilibrated RDH medium containing 4µM Hoechst 33342 for DNA staining and either 5µM CellROX Deep Red reagent, 5µM Image-iT Red Hypoxia reagent or 50 nM TMRE (all from ThermoFisher Scientific) for 30-45 min at 38°C. For glucose uptake assays, embryos were incubated for 30 min in the glucose uptake mix, according to the manufacturer's instructions (Abcam ab204702). Embryos were then collected and washed twice with the analysis buffer. After staining, embryos were transferred to new drops of RDH before mounting in M2 medium (Sigma) containing 20% Optiprep (Stem Cell Technologies) and ProLong Live antifade reagent for live cell imaging (1/100 dilution, ThermoFisher). Embryos were then imaged on a Leica SP5 confocal microscope with a x25 water immersion objective.

Data availability

The bulk RNA-Seq datasets generated in this study are deposited in NCBI SRA with the accession numbers: PRJNA529333 for TE_96h libraries and PRJNA743177 for whole embryo and tissue data. For the 10X single-cell RNA-seq datasets, all raw read sequence data, count matrices for each stage and count matrix of the aggregated datasets from each stage generated in this study are deposited in NCBI GEO with the accession number: GSE180048.

Supplemental information

Supplemental information includes seven supplemental figures and five tables.

Figure S1: Raw data processing and quality controls.

Figure S2: Characterization of TE and TE-like cells.

Figure S3: Characterization of late epiblast.

Figure S4: Characterization of PE/EPI segregation and analysis of genes involved in cell-cycle regulation and DNA damage response.

Figure S5: Epigenetic and metabolomic dynamics.

Figure S6: Signaling pathways enrichment in EPI cells.

Figure S7: Expression of rabbit naïve pluripotency-specific genes in mouse and monkey embryos.

Table S1: Lineage identification.

Table S2: Late epiblast identification.

Table S3: Pluripotency continuum.

Table S4: Bulk RNAseq analysis.

Table S5: Interspecies comparison.

Table S6: Primers, antibodies and genes annotation lists.

Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (contract ANR-18-CE13-023; Oryctocell), the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20170336757 to P.S.), the Infrastructure Nationale en Biologie et Santé INGESTEM (ANR-11-INBS-0009), the IHU-B CESAME (ANR-10-

IBHU-003), the LabEx REVIVE (ANR-10-LABX-73), the LabEx “DEVweCAN” (ANR-10-LABX-0061), the LabEx “CORTEX” (ANR-11-LABX-0042), and the University of Lyon within the program “Investissements d’Avenir” (ANR-11-IDEX-0007). MGX acknowledges financial support from France Génomique National infrastructure, funded as part of “Investissement d’Avenir” program managed by Agence Nationale pour la Recherche (contract ANR-10-INBS-09). W.B. is a recipient of grant from the PHASE department of INRAE. We thank Emilie Bonin, Frederic Martins and Cécile Donnadiou (Genotoul-GeT-platform, INRAE, Auzeville) for Biomark analyses. We also thank the members of UE1298 SAAJ Science de l’Animal et de l’Aliment, responsible for INRAE Jouy en Josas rabbit facility; as well as the High-throughput sequencing facility of I2BC for its sequencing and bioinformatics expertise.

Author contributions

Conceptualization, N.B, P.S., M.A., and V.D. ; Methodology, N.B., M.A., W.B., M.G., and V.D.; Validation, W.B., N.B., and V.D.; Formal Analysis, W.B., L.J., C.A.; Investigation, W.B., C.A., I.A., A.M., N.D., N.P., S.C., Y.J., M.P., and D.S.; Resources, T.J.; Data Curation, W.B. and L.J.; Writing - Original Draft, P.S. and N.B.; Writing – Review and Editing, W.B., M.A., and V.D.; Visualization, W.B. and N.B; Supervision: N.B.; Project Administration, M.A., N.B, and V.D.; Funding Acquisition, P.S. and V.D.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests

Literature cited

- Aksoy, I., Rognard, C., Moulin, A., Marcy, G., Masfaraud, E., Wianny, F., Cortay, V., Bellemin-Menard, A., Doerflinger, N., Dirheimer, M., *et al.* (2021). Apoptosis, G1 Phase Stall, and Premature Differentiation Account for Low Chimeric Competence of Human and Rhesus Monkey Naive Pluripotent Stem Cells. *Stem cell reports* *16*, 56-74.
- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* *11*, R106.
- Argelaguet, R., Clark, S.J., Mohammed, H., Stapel, L.C., Krueger, C., Kapourani, C.A., Imaz-Rosshandler, I., Lohoff, T., Xiang, Y., Hanna, C.W., *et al.* (2019). Multi-omics profiling of mouse gastrulation at single-cell resolution. *Nature* *576*, 487-491.
- Bayerl, J., Ayyash, M., Shani, T., Manor, Y.S., Gafni, O., Massarwa, R., Kalma, Y., Aguilera-Castrejon, A., Zerbib, M., Amir, H., *et al.* (2021). Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction. *Cell Stem Cell* *28*, 1–17.
- Blakeley, P., Fogarty, N.M., Del Valle, I., Wamaitha, S.E., Hu, T.X., Elder, K., Snell, P., Christie, L., Robson, P., and Niakan, K.K. (2015). Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Development* *142*, 3151-3165.
- Boroviak, T., Loos, R., Lombard, P., Okahara, J., Behr, R., Sasaki, E., Nichols, J., Smith, A., and Bertone, P. (2015). Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. *Dev Cell* *35*, 366-382.
- Boroviak, T., Stirparo, G.G., Dietmann, S., Hernando-Herraez, I., Mohammed, H., Reik, W., Smith, A., Sasaki, E., Nichols, J., and Bertone, P. (2018). Single cell transcriptome analysis of human, marmoset and mouse embryos reveals common and divergent features of preimplantation development. *Development* *145*.
- Bradley, E., Bieberich, E., Mivechi, N.F., Tangpisuthipongsa, D., and Wang, G. (2012). Regulation of embryonic stem cell pluripotency by heat shock protein 90. *Stem Cells* *30*, 1624-1633.
- Bredenkamp, N., Stirparo, G.G., Nichols, J., Smith, A., and Guo, G. (2019). The Cell-Surface Marker Sushi Containing Domain 2 Facilitates Establishment of Human Naive Pluripotent Stem Cells. *Stem cell reports* *12*, 1212-1222.
- Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., *et al.* (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* *448*, 191-195.
- Carbognin, E., Betto, R.M., Soriano, M.E., Smith, A.G., and Martello, G. (2016). Stat3 promotes mitochondrial transcription and oxidative respiration during maintenance and induction of naive pluripotency. *EMBO J* *35*, 618-634.
- Cassar, P.A., Carpenedo, R.L., Samavarchi-Tehrani, P., Olsen, J.B., Park, C.J., Chang, W.Y., Chen, Z., Choey, C., Delaney, S., Guo, H., *et al.* (2015). Integrative genomics positions MKRN1 as a novel ribonucleoprotein within the embryonic stem cell gene regulatory network. *EMBO Rep* *16*, 1334-1357.
- Chaumeil, J., Waters, P.D., Koina, E., Gilbert, C., Robinson, T.J., and Graves, J.A. (2011). Evolution from XIST-independent to XIST-controlled X-chromosome inactivation: epigenetic modifications in distantly related mammals. *PLoS ONE* *6*, e19040.

- Chazaud, C., and Yamanaka, Y. (2016). Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development* *143*, 1063-1074.
- Corsinotti, A., Wong, F.C., Tatar, T., Szczerbinska, I., Halbritter, F., Colby, D., Gogolok, S., Pantier, R., Liggat, K., Mirfazeli, E.S., *et al.* (2017). Distinct SoxB1 networks are required for naive and primed pluripotency. *eLife* *6*, e27746.
- Dabiri, Y., Gama-Brambila, R.A., Taskova, K., Herold, K., Reuter, S., Adjaye, J., Utikal, J., Mrowka, R., Wang, J., Andrade-Navarro, M.A., *et al.* (2019). Imidazopyridines as Potent KDM5 Demethylase Inhibitors Promoting Reprogramming Efficiency of Human iPSCs. *iScience* *12*, 168-181.
- Davidson, K.C., Mason, E.A., and Pera, M.F. (2015). The pluripotent state in mouse and human. *Development* *142*, 3090-3099.
- Devika, A.S., Wruck, W., Adjaye, J., and Sudheer, S. (2019). The quest for pluripotency: a comparative analysis across mammalian species. *Reproduction* *158*, R97-R111.
- Dunn, S.J., Martello, G., Yordanov, B., Emmott, S., and Smith, A.G. (2014). Defining an essential transcription factor program for naive pluripotency. *Science* *344*, 1156-1160.
- Duranthon, V., Beaujean, N., Brunner, M., Odening, K.E., Santos, A.N., Kacsokovics, I., Hiripi, L., Weinstein, E.J., and Bosze, Z. (2012). On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. *Transgenic Res* *21*, 699-713.
- Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A., and Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* *144*, 1-10.
- Guo, G., Huss, M., Tong, G.Q., Wang, C., Li Sun, L., Clarke, N.D., and Robson, P. (2010). Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev Cell* *18*, 675-685.
- Habibi, E., Brinkman, A.B., Arand, J., Kroeze, L.I., Kerstens, H.H., Matarese, F., Lepikhov, K., Gut, M., Brun-Heath, I., Hubner, N.C., *et al.* (2013). Whole-genome bisulfite sequencing of two distinct interconvertible DNA methylomes of mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* *13*, 360-369.
- Hackett, J.A., Sengupta, R., Zyllicz, J.J., Murakami, K., Lee, C., Down, T.A., and Surani, M.A. (2013). Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science* *339*, 448-452.
- Han, H., Chae, S., Hwang, D., and Song, J. (2018). Attenuating MKRN1 E3 ligase-mediated AMPKalpha suppression increases tolerance against metabolic stresses in mice. *Cell Stress* *2*, 325-328.
- Hassoun, R., Puschel, B., and Viebahn, C. (2009a). Sox17 Expression Patterns during Gastrulation and Early Neurulation in the Rabbit Suggest Two Sources of Endoderm Formation. *Cells Tissues Organs* *191*, 68-83.
- Hassoun, R., Schwartz, P., Feistel, K., Blum, M., and Viebahn, C. (2009b). Axial differentiation and early gastrulation stages of the pig embryo. *Differentiation* *78*, 301-311.
- Hayashi, K., de Sousa Lopes, S.M., and Surani, M.A. (2007). Germ cell specification in mice. *Science* *316*, 394-396.
- Hayashi, K., Lopes, S.M., Tang, F., and Surani, M.A. (2008). Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell* *3*, 391-401.

- Hopf, C., Viebahn, C., and Puschel, B. (2011). BMP signals and the transcriptional repressor BLIMP1 during germline segregation in the mammalian embryo. *Development genes and evolution* 221, 209-223.
- Houghton, F.D. (2006). Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation* 74, 11-18.
- Howe, K.L., Achuthan, P., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M.R., Armean, I.M., Azov, A.G., Bennett, R., Bhai, J., *et al.* (2021). Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res* 49, D884-D891.
- Kalkan, T., Bornelov, S., Mulas, C., Diamanti, E., Lohoff, T., Ralser, M., Middelkamp, S., Lombard, P., Nichols, J., and Smith, A. (2019). Complementary Activity of ETV5, RBPJ, and TCF3 Drives Formative Transition from Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell* 24, 785-801 e787.
- Kidder, B.L., Hu, G., Yu, Z.X., Liu, C., and Zhao, K. (2013). Extended self-renewal and accelerated reprogramming in the absence of Kdm5b. *Mol Cell Biol* 33, 4793-4810.
- Kinoshita, M., Barber, M., Mansfield, W., Cui, Y., Spindlow, D., Stirparo, G.G., Dietmann, S., Nichols, J., and Smith, A. (2020). Capture of Mouse and Human Stem Cells with Features of Formative Pluripotency. *Cell Stem Cell* 28, 453-471 e458.
- Kong, Q., Yang, X., Zhang, H., Liu, S., Zhao, J., Zhang, J., Weng, X., Jin, J., and Liu, Z. (2020). Lineage specification and pluripotency revealed by transcriptome analysis from oocyte to blastocyst in pig. *FASEB J* 34, 691-705.
- Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008). FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J Stat Softw* 25, 1-18.
- Leandri, R.D., Archilla, C., Bui, L.C., Peynot, N., Liu, Z., Cabau, C., Chastellier, A., Renard, J.P., and Duranthon, V. (2009). Revealing the dynamics of gene expression during embryonic genome activation and first differentiation in the rabbit embryo with a dedicated array screening. *Physiol Genomics* 36, 98-113.
- Lee, E.W., Lee, M.S., Camus, S., Ghim, J., Yang, M.R., Oh, W., Ha, N.C., Lane, D.P., and Song, J. (2009). Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis. *EMBO J* 28, 2100-2113.
- Lee, M.S., Han, H.J., Han, S.Y., Kim, I.Y., Chae, S., Lee, C.S., Kim, S.E., Yoon, S.G., Park, J.W., Kim, J.H., *et al.* (2018). Loss of the E3 ubiquitin ligase MKRN1 represses diet-induced metabolic syndrome through AMPK activation. *Nat Commun* 9, 3404.
- Lee, M.S., Jeong, M.H., Lee, H.W., Han, H.J., Ko, A., Hewitt, S.M., Kim, J.H., Chun, K.H., Chung, J.Y., Lee, C., *et al.* (2015). PI3K/AKT activation induces PTEN ubiquitination and destabilization accelerating tumorigenesis. *Nat Commun* 6, 7769.
- Leitch, H.G., McEwen, K.R., Turp, A., Encheva, V., Carroll, T., Grabole, N., Mansfield, W., Nashun, B., Knezovich, J.G., Smith, A., *et al.* (2013). Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nature structural & molecular biology* 20, 311-316
- Leitch, H.G., Surani, M.A., and Hajkova, P. (2016). DNA (De)Methylation: The Passive Route to Naivety? *Trends Genet* 32, 592-595.
- Liu, D., Wang, X., He, D., Sun, C., He, X., Yan, L., Li, Y., Han, J.J., and Zheng, P. (2018). Single cell RNA-sequencing reveals the existence of naive and primed pluripotency in pre-implantation rhesus monkey embryos. *Genome Res* 28, 1481-1493.

- Longshaw, V.M., Baxter, M., Prewitz, M., and Blatch, G.L. (2009). Knockdown of the co-chaperone Hop promotes extranuclear accumulation of Stat3 in mouse embryonic stem cells. *Eur J Cell Biol* 88, 153-166.
- Meistermann, D., Bruneau, A., Loubersac, S., Reignier, A., Firmin, J., Francois-Campion, V., Kilens, S., Lelievre, Y., Lammers, J., Feyeux, M., *et al.* (2021). Integrated pseudotime analysis of human pre-implantation embryo single-cell transcriptomes reveals the dynamics of lineage specification. *Cell Stem Cell* *S1934-5909(21)00185-5*.
- Messmer, T., von Meyenn, F., Savino, A., Santos, F., Mohammed, H., Lun, A.T.L., Marioni, J.C., and Reik, W. (2019). Transcriptional Heterogeneity in Naive and Primed Human Pluripotent Stem Cells at Single-Cell Resolution. *Cell reports* 26, 815-824 e814.
- Mohammed, H., Hernando-Herraez, I., Savino, A., Scialdone, A., Macaulay, I., Mulas, C., Chandra, T., Voet, T., Dean, W., Nichols, J., *et al.* (2017). Single-Cell Landscape of Transcriptional Heterogeneity and Cell Fate Decisions during Mouse Early Gastrulation. *Cell reports* 20, 1215-1228.
- Nakamura, T., Fujiwara, K., Saitou, M., and Tsukiyama, T. (2021). Non-human primates as a model for human development. *Stem cell reports* 16, 1093-1103.
- Nakamura, T., Okamoto, I., Sasaki, K., Yabuta, Y., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Seita, Y., Nakamura, S., Yamamoto, T., and Saitou, M. (2016). A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys and humans. *Nature* 537, 57-62.
- Okamoto, I., Patrat, C., Thepot, D., Peynot, N., Fauque, P., Daniel, N., Diabangouaya, P., Wolf, J.P., Renard, J.P., Duranthon, V., *et al.* (2011). Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* 472, 370-374.
- Osteil, P., Moulin, A., Santamaria, C., Joly, T., Jouneau, L., Aubry, M., Tapponnier, Y., Archilla, C., Schmaltz-Panneau, B., Lecardonnell, J., *et al.* (2016). A Panel of Embryonic Stem Cell Lines Reveals the Variety and Dynamic of Pluripotent States in Rabbits. *Stem cell reports* 7, 383-398.
- Peng, G., Suo, S., Chen, J., Chen, W., Liu, C., Yu, F., Wang, R., Chen, S., Sun, N., Cui, G., *et al.* (2016). Spatial Transcriptome for the Molecular Annotation of Lineage Fates and Cell Identity in Mid-gastrula Mouse Embryo. *Dev Cell* 36, 681-697.
- Petropoulos, S., Edsgard, D., Reinius, B., Deng, Q., Panula, S.P., Codeluppi, S., Plaza Reyes, A., Linnarsson, S., Sandberg, R., and Lanner, F. (2016). Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Cell* 165, 1012-1026.
- Pierre, A., Gautier, M., Callebaut, I., Bontoux, M., Jeanpierre, E., Pontarotti, P., and Monget, P. (2007). Atypical structure and phylogenomic evolution of the new eutherian oocyte- and embryo-expressed KHDC1/DPPA5/ECAT1/OOEP gene family. *Genomics* 90, 583-594.
- Piliszek, A., Madeja, Z.E., and Plusa, B. (2017). Suppression of ERK signalling abolishes primitive endoderm formation but does not promote pluripotency in rabbit embryo. *Development* 144, 3719-3730.
- Puschel, B., Daniel, N., Bitzer, E., Blum, M., Renard, J.P., and Viebahn, C. (2010). The rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): a model for mammalian reproduction and early embryology. *Cold Spring Harbor protocols* 2010, pdb emo139.
- Qian, X., Kim, J.K., Tong, W., Villa-Diaz, L.G., and Krebsbach, P.H. (2016). DPPA5 Supports Pluripotency and Reprogramming by Regulating NANOG Turnover. *Stem Cells* 34, 588-600.

- Ramos-Ibeas, P., Sang, F., Zhu, Q., Tang, W.W.C., Withey, S., Klisch, D., Wood, L., Loose, M., Surani, M.A., and Alberio, R. (2019). Pluripotency and X chromosome dynamics revealed in pig pre-gastrulating embryos by single cell analysis. *Nat Commun* *10*, 500.
- Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., and Vilo, J. (2019). g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res* *47*, W191-W198.
- Savatier, P., Osteil, P., and Tam, P.P. (2017). Pluripotency of embryo-derived stem cells from rodents, lagomorphs, and primates: Slippery slope, terrace and cliff. *Stem Cell Res* *19*, 104-112.
- Schmaltz-Panneau, B., Jouneau, L., Osteil, P., Taponnier, Y., Afanassieff, M., Moroldo, M., Jouneau, A., Daniel, N., Archilla, C., Savatier, P., *et al.* (2014). Contrasting transcriptome landscapes of rabbit pluripotent stem cells in vitro and in vivo. *Anim Reprod Sci* *149*, 67-79.
- Schoch, C.L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C.L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., *et al.* (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)* *2020*.
- Setati, M.M., Prinsloo, E., Longshaw, V.M., Murray, P.A., Edgar, D.H., and Blatch, G.L. (2010). Leukemia inhibitory factor promotes Hsp90 association with STAT3 in mouse embryonic stem cells. *IUBMB Life* *62*, 61-66.
- Shahbazi, M.N. (2020). Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back. *Development* *147*. [dev190629](#).
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* *13*, 2498-2504.
- Smith, A. (2017). Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. *Development* *144*, 365-373.
- Smoot, M.E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.L., and Ideker, T. (2011). Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* *27*, 431-432.
- Sone, M., Morone, N., Nakamura, T., Tanaka, A., Okita, K., Woltjen, K., Nakagawa, M., Heuser, J.E., Yamada, Y., Yamanaka, S., *et al.* (2017). Hybrid Cellular Metabolism Coordinated by Zic3 and Esrrb Synergistically Enhances Induction of Naive Pluripotency. *Cell metabolism* *25*, 1103-1117 e1106.
- Stirparo, G.G., Boroviak, T., Guo, G., Nichols, J., Smith, A., and Bertone, P. (2018). Integrated analysis of single-cell embryo data yields a unified transcriptome signature for the human preimplantation epiblast. *Development* *145*, dev158501.
- Strumpf, D., Mao, C.A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., and Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* *132*, 2093-2102.
- Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W.M., 3rd, Hao, Y., Stoeckius, M., Smibert, P., and Satija, R. (2019). Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* *177*, 1888-1902 e1821.
- Takahashi, S., Kobayashi, S., and Hiratani, I. (2017). Epigenetic differences between naive and primed pluripotent stem cells. *Cell Mol Life Sci* *75*, 1191-1203.
- Tanaka, T.S., Lopez de Silanes, I., Sharova, L.V., Akutsu, H., Yoshikawa, T., Amano, H., Yamanaka, S., Gorospe, M., and Ko, M.S. (2006). Esg1, expressed exclusively in preimplantation embryos,

- germline, and embryonic stem cells, is a putative RNA-binding protein with broad RNA targets. *Dev Growth Differ* 48, 381-390.
- Tang, F., Barbacioru, C., Bao, S., Lee, C., Nordman, E., Wang, X., Lao, K., and Surani, M.A. (2010). Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. *Cell Stem Cell* 6, 468-478.
- Tapponnier, Y., Afanassieff, M., Aksoy, I., Aubry, M., Moulin, A., Medjani, L., Bouchereau, W., Mayere, C., Osteil, P., Nurse-Francis, J., *et al.* (2017). Reprogramming of rabbit induced pluripotent stem cells toward epiblast and chimeric competency using Kruppel-like factors. *Stem Cell Res* 24, 106-117.
- Teixeira, M., Commin, L., Gavin-Plagne, L., Bruyere, P., Buff, S., and Joly, T. (2018). Rapid cooling of rabbit embryos in a synthetic medium. *Cryobiology* 85, 113-119.
- Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196-199.
- Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., Pokharel, P., Li, S., Morse, M., Lennon, N.J., Livak, K.J., Mikkelsen, T.S., and Rinn, J.L. (2014). The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat Biotechnol* 32, 381-386.
- Viebahn, C., Stortz, C., Mitchell, S.A., and Blum, M. (2002). Low proliferative and high migratory activity in the area of Brachyury expressing mesoderm progenitor cells in the gastrulating rabbit embryo. *Development* 129, 2355-2365.
- Wen, J., Zeng, Y., Fang, Z., Gu, J., Ge, L., Tang, F., Qu, Z., Hu, J., Cui, Y., Zhang, K., *et al.* (2017). Single-cell analysis reveals lineage segregation in early post-implantation mouse embryos. *J Biol Chem* 292, 9840-9854.
- Wianny, F., Real, F.X., Mummery, C.L., Van Rooijen, M., Lahti, J., Samarut, J., and Savatier, P. (1998). G1-phase regulators, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3: up-regulation at gastrulation and dynamic expression during neurulation. *Dev Dyn* 212, 49-62.
- Zhang, Y., Xiang, Y., Yin, Q., Du, Z., Peng, X., Wang, Q., Fidalgo, M., Xia, W., Li, Y., Zhao, Z.A., *et al.* (2018). Dynamic epigenomic landscapes during early lineage specification in mouse embryos. *Nat Genet* 50, 96-105.
- Zhao, X.M., Cui, L.S., Hao, H.S., Wang, H.Y., Zhao, S.J., Du, W.H., Wang, D., Liu, Y., and Zhu, H.B. (2016). Transcriptome analyses of inner cell mass and trophectoderm cells isolated by magnetic-activated cell sorting from bovine blastocysts using single cell RNA-seq. *Reprod Domest Anim* 51, 726-735.
- Zhou, W., Choi, M., Margineantu, D., Margaretha, L., Hesson, J., Cavanaugh, C., Blau, C.A., Horwitz, M.S., Hockenbery, D., Ware, C., *et al.* (2012). HIF1alpha induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. *EMBO J* 31, 2103-2116.
- Zhu, P., Guo, H., Ren, Y., Hou, Y., Dong, J., Li, R., Lian, Y., Fan, X., Hu, B., Gao, Y., *et al.* (2018). Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nat Genet* 50, 12-19.

Supplementary figures

Figure S1: Raw data processing and quality controls. (A) Sample description (bulk RNAseq) for each developmental stage (E2.7 to E6.6) with numbers of biological replicates, number of embryos per replicate, numbers of reads per library (minimal and maximal values), percentages of aligned pairs (minimal and maximal values), and percentages of reads assigned to a gene (minimal and maximal values). (B) Violin plot representation of the number of genes detected in the 10X Genomics single-cell RNAseq dataset for each developmental stage analyzed (E3.0 to E6.6); red lines indicate the thresholds used for sample filtering with retention of cells only displaying expression of more than 300 genes and less than 2500 genes. (C) Violin plot representation of the percentage of mitochondrial genes detected in the 10X Genomics single-cell RNAseq dataset for each developmental stage analyzed (E3.0 to E6.6). Red line indicates the threshold applied to samples filtering with retention of cells only displaying less than 0.7% of mitochondrial genome. (D) Sample description (10X Genomics single-cell RNAseq) for each developmental stage (E3.0 to E6.6) with numbers of dissociated embryos, analyzed cells, cells with sequenced genomes, means of reads, median of genes detected per cell and unique molecular identifier (UMI) per cell. (E-G) Two-dimensional UMAP representations of 17,025 single-cell transcriptomes generated by 10X Genomic RNAseq; the different panels show cells in function of their level of gene expression; selected genes are known to be specifically expressed in trophectoderm (E) including *TFAP2C*, *KRT8*, *KRT18*, *GATA2*, *FABP3*, and *CLDN4*, epiblast (F) including *FGF4*, *GDF3*, *SOX15*, *NANOG*, *SFRP2*, and *SEMA6A*), and primitive endoderm (G) including *LAMA1*, *COL4A1*, *GATA6*, *FOXA2*, *GATA4*, and *SOX17*.

Figure S2: Characterization of TE and TE-like cells. (A) Heatmap of the 100 most differentially expressed genes between TE and TE-like cells at E3.5/E4.0 (TE_early and TE-like_early), E5.0 (TE_mid and TE-like_mid) and E6.0/E6.6 (TE_late). (B,C) Violin plot showing expression of genes specific of the polar and mural trophectoderm cells of human (B) and mouse embryos (C). (D) Immunofluorescence detection of ESRRB and SOX2 expression in rabbit blastocysts at E4.0 (n = 5) and E5.0 (n = 2). Merge pictures include DAPI staining. Scale bars: 50 μ m.

Figure S3: Characterization of late epiblast. (A) Heatmap of early, anterior and posterior EPI, and primitive streak (PS) mouse markers in the five rabbit EPI clusters (EPI_5.0, EPIa, EPIb, EPIc and EPId). (B) Differential expression (Log Fold-change) of anterior and posterior epiblast marker genes in EPIc and EPId clusters, compared to all EPI clusters. (C) Two-dimensional UMAP of the transcriptome of the 237 PS cells showing mutually exclusive markers of definitive endoderm (DE; *CHRD*, *CER*, *GSC*, *OTX2* and *HHEX*) and mesoderm (ME; *TBXT*, *HAND1*, *LEF1*, *PDGFRA*, *WNT5A*). (D) Two-dimensional UMAP representation of the transcriptome of the 5,367 PE cells (top panel) at different embryo stages showing expression of *OTX2* (bottom panel). (E) Immunofluorescence labelling of epiblasts (E6.0; n = 7) with *OTX2* and *SOX2* antibodies. Merge pictures include DAPI staining. The white lines in the upper panels (scale bars: 50 μ m) indicate the position of the optical sections shown in the lower panels (scale bars: 25 μ m).

Figure S4: Characterization of PE/EPI segregation and analysis of genes involved in cell-cycle regulation and DNA damage response. (A) Immunofluorescence detection of DPPA5 (ICM-specific), GATA6 (PE-specific) and SOX2 (EPI-specific) in E4.0 blastocyst (n = 8). Merge image includes DAPI staining. Scale bars: 50 μ m. (B,D) GO Biological Process enrichment analysis of the 500 most up- and down-regulated genes in ICM samples compared to EPI samples [bulk RNAseq dataset in (B); single-cell RNAseq dataset in (D)]. (C,E) KEGG Pathways enrichment analysis of the 500 most up- and down-regulated genes in ICM samples compared to EPI samples [bulk RNAseq dataset in (C); single-cell RNAseq dataset in (E)]. (F) Violin plot of naïve and primed pluripotency marker gene expression in morula (E3.0), ICM (E3.5 and E4.0), and EPI cells (E5.0, E6.0 and E6.6) determined by Biomark qRT-PCR. (G) Cell-cycle distribution of morula, ICM, EPI_E5.0, EPI_ant and EPI_post cells calculated with Seurat's cell-cycle scoring and regression algorithm (single-cell RNAseq dataset). (H) Heatmap of cell-cycle gene expression in morula (E2.7), ICM (E3.5/E4.0) and EPI_late (E6.0-E6.6) determined from the bulk RNAseq dataset. (I) Violin plot of the expression of cell-cycle genes (*CCND2*, *CCNE1*, *CUL3*, *FBXW7*) and DNA-response genes (*ATM*, *ATR*, *CHEK2*, *TP53*) in morula (E3.0), ICM (E3.5 and E4.0), and EPI cells (E5.0, E6.0 and E6.6) calculated from the "PLURI" dataset.

Figure S5: Epigenetic and metabolomic dynamics. (A) Heatmap of 10X Genomics dataset, showing the expressions of 25 genes involved in DNA methylation, and polycomb repressive complexes (PRC1 and PRC2) in morula (E3.0), ICM (E3.5/E4.0), EPI_E5.0, EPI_ant (E6.0/E6.6) and EPI_post (E6.6) cells. (B) Immunofluorescence detection of the histone 3 lysine 27 tri-methylation (H3K27me3) marks associated with X chromosome inactivation, GATA6 (PE-specific) and SOX2 (EPI-specific) in E3.0 (n = 9), E3.5 (n = 11) and E4.0 (n = 5) embryos. Merge pictures include DAPI staining. Scale bars: 100 μ m. (C) Images of rabbit embryos (stages as indicated; n = 45, 5 to 10 per stage) treated with CellROX reagent to detect reactive oxygen species (ROS). Images in the top row (scale bars: 50 μ m) show co-staining of ROS with CellROX reagent (red) and of nucleus with Hoechst (blue); Images in the bottom row (scale bars: 20 μ m) show enlargement of ICM/epiblast cells after treatment with CellROX reagent only.

Figure S6: Signaling pathways enrichment in EPI cells. (A) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) plots of KEGG terms associated with JAK/STAT, NOTCH, WNT, MAPK and TGF β signaling pathways. (B,C) Schematic representation of JAK/STAT (B) and NOTCH (C) pathways highlighting differential expression (log Fold Change) of individual genes between ICM/EPI (E3.5/E4.0) and other cells (E3.5/E4.0/E5.0/E6.0/E6.6) in the 10X Genomics single-cell dataset.

Figure S7: Expression of rabbit naïve pluripotency-specific genes in mouse and monkey embryos. (A) Heatmap of the 50 most differentially expressed genes (drawn from the list of 140 described in Fig. 7E), showing their transcript levels in mouse embryos (EPI cells at E4.5, TE and EPI cells at E5.5 and E6.5, PE cells; (Argelaguet et al., 2019)). (B) Heatmap representation of the 50 most differentially expressed genes (drawn from the list of 140 described in Fig. 7E), showing their transcript levels in cynomolgus macaque embryos (EPI cells at E6.0-E9.0, TE, EPI at E13-E17, and PE cells; (Nakamura et al., 2016)). (C) STRING software network of the 34 naïve pluripotency-specific genes common to rabbit, cynomolgus macaque and mouse (described in Fig. 7L), highlighting differential expression (log Fold Change) between mouse (red) and cynomolgus macaque (green). Three main KEGG circuitries are shared by the three species analyzed.

Figure S1: Raw data processing and quality controls.

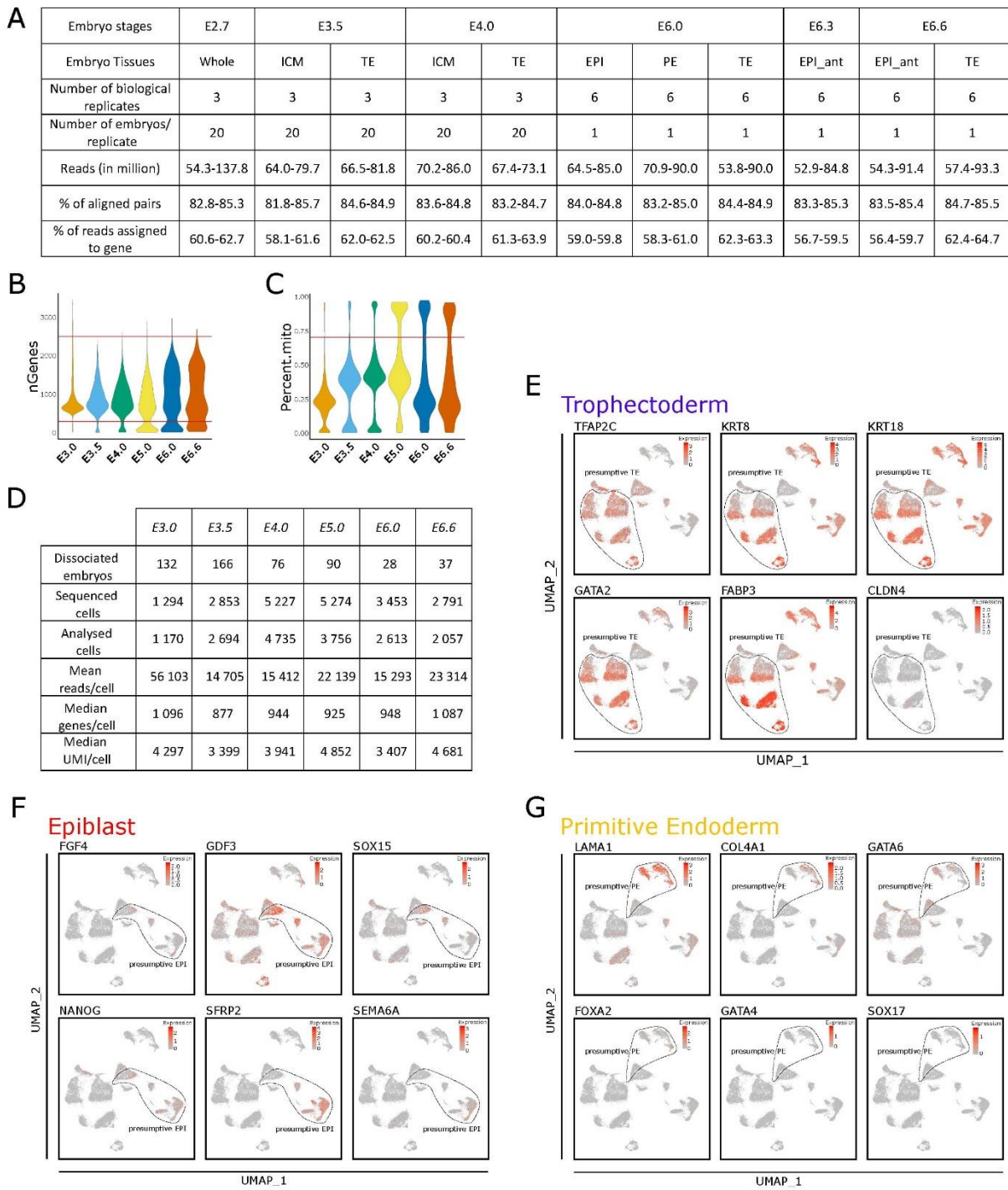


Figure S2: Characterization of TE and TE-like cells.

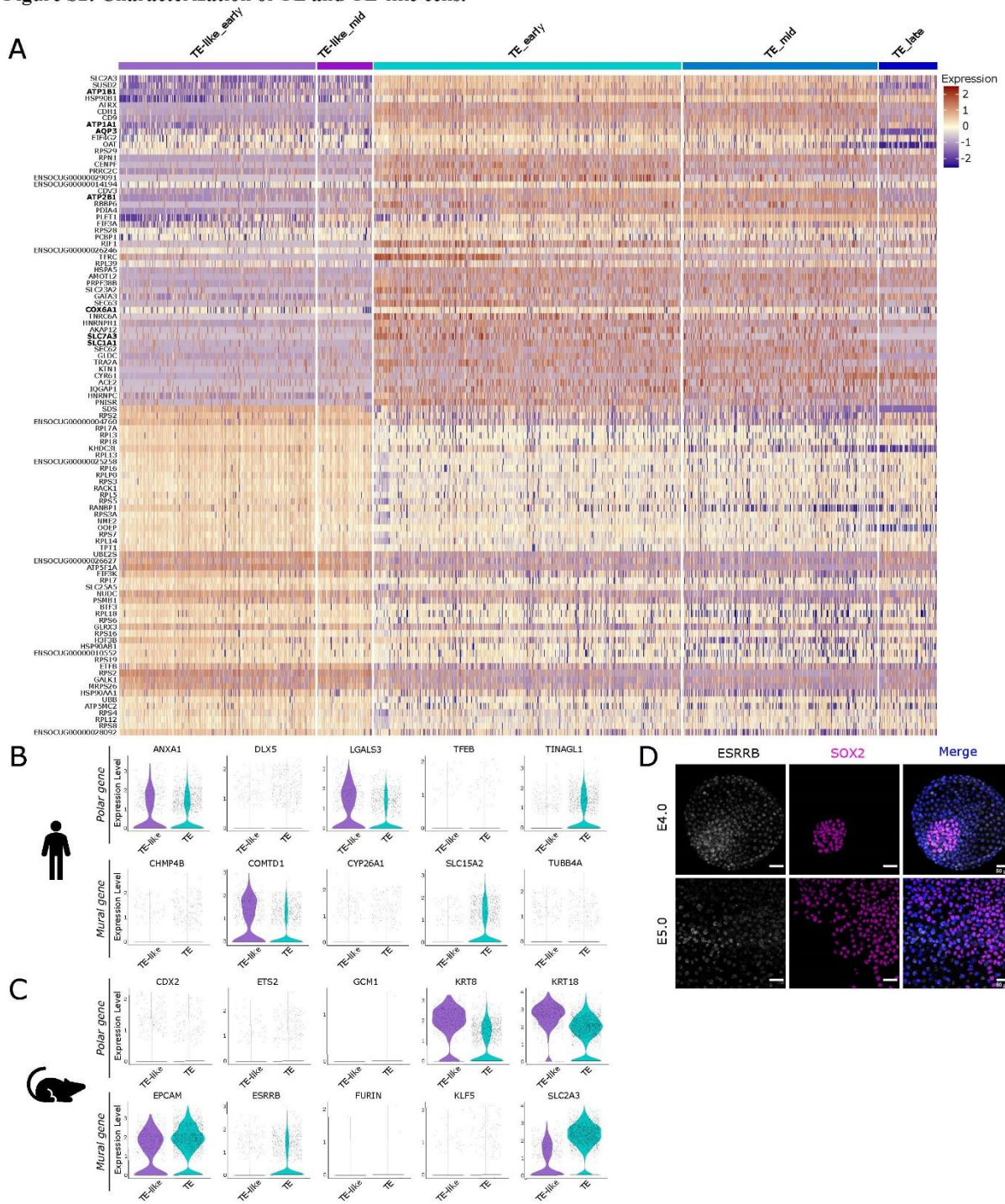


Figure S3: Characterization of late epiblast.

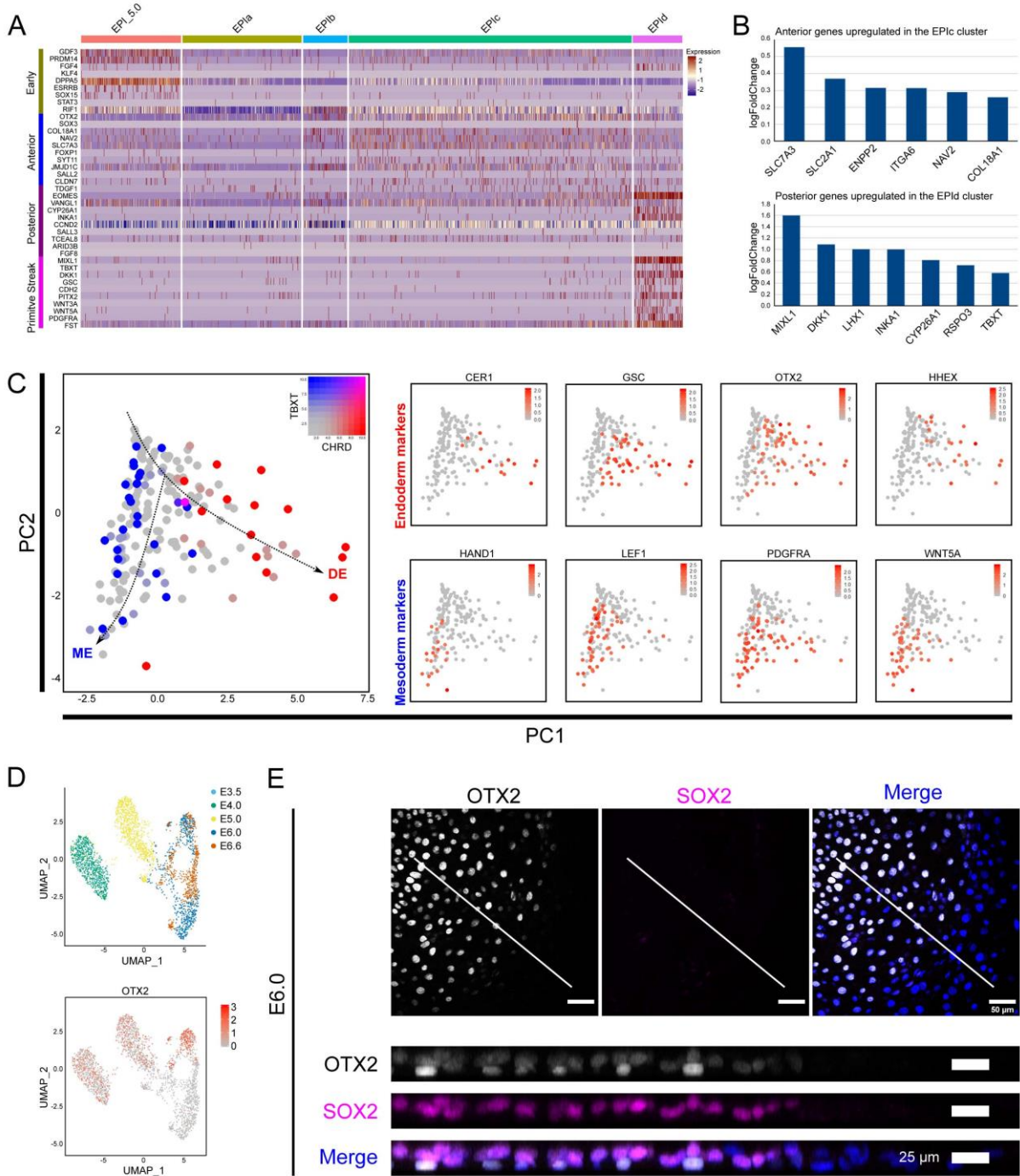


Figure S4: Characterization of PE/EPI segregation and analysis of genes involved in cell-cycle regulation and DNA damage response.

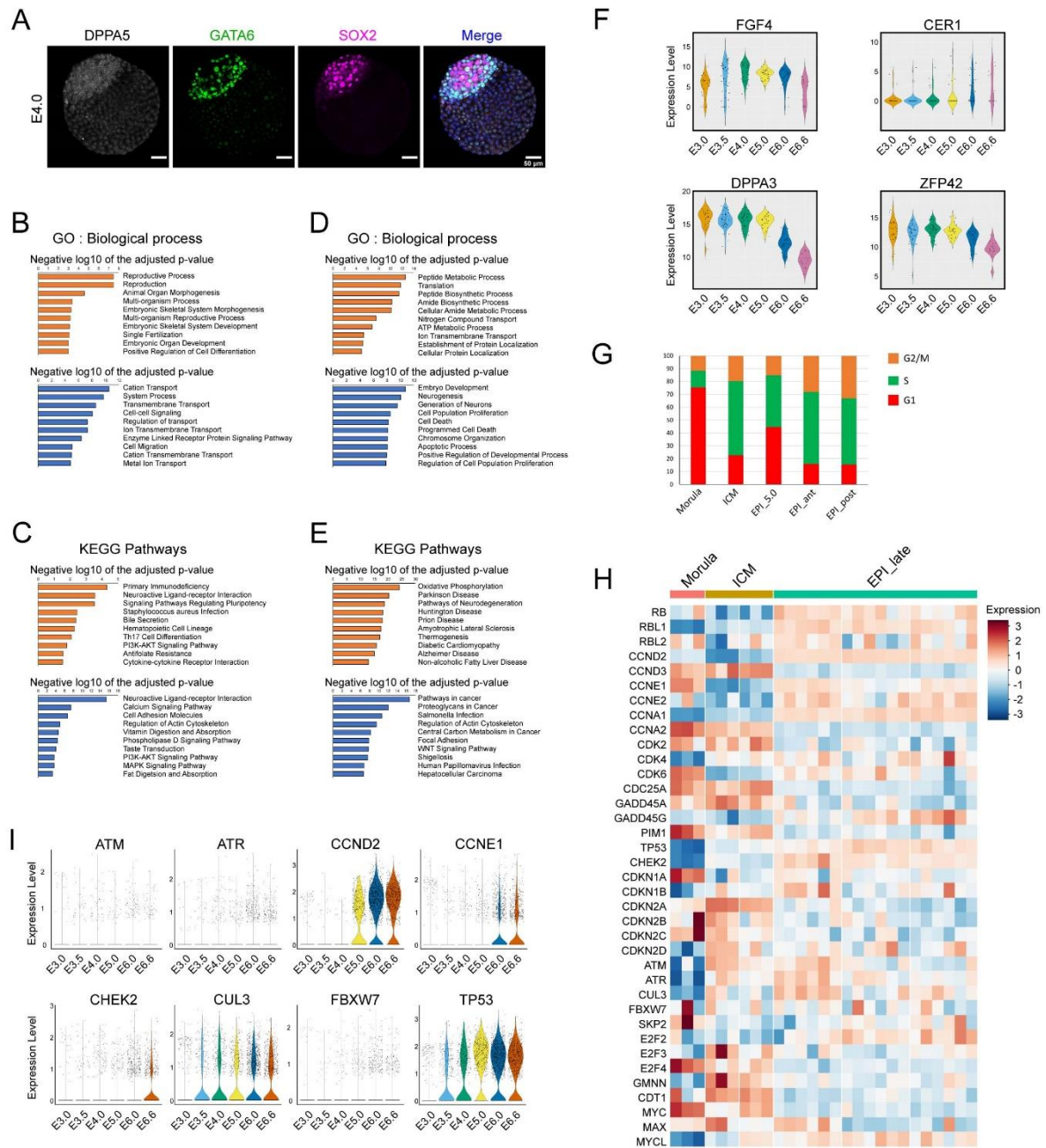


Figure S5: Epigenetic and metabolomic dynamics.

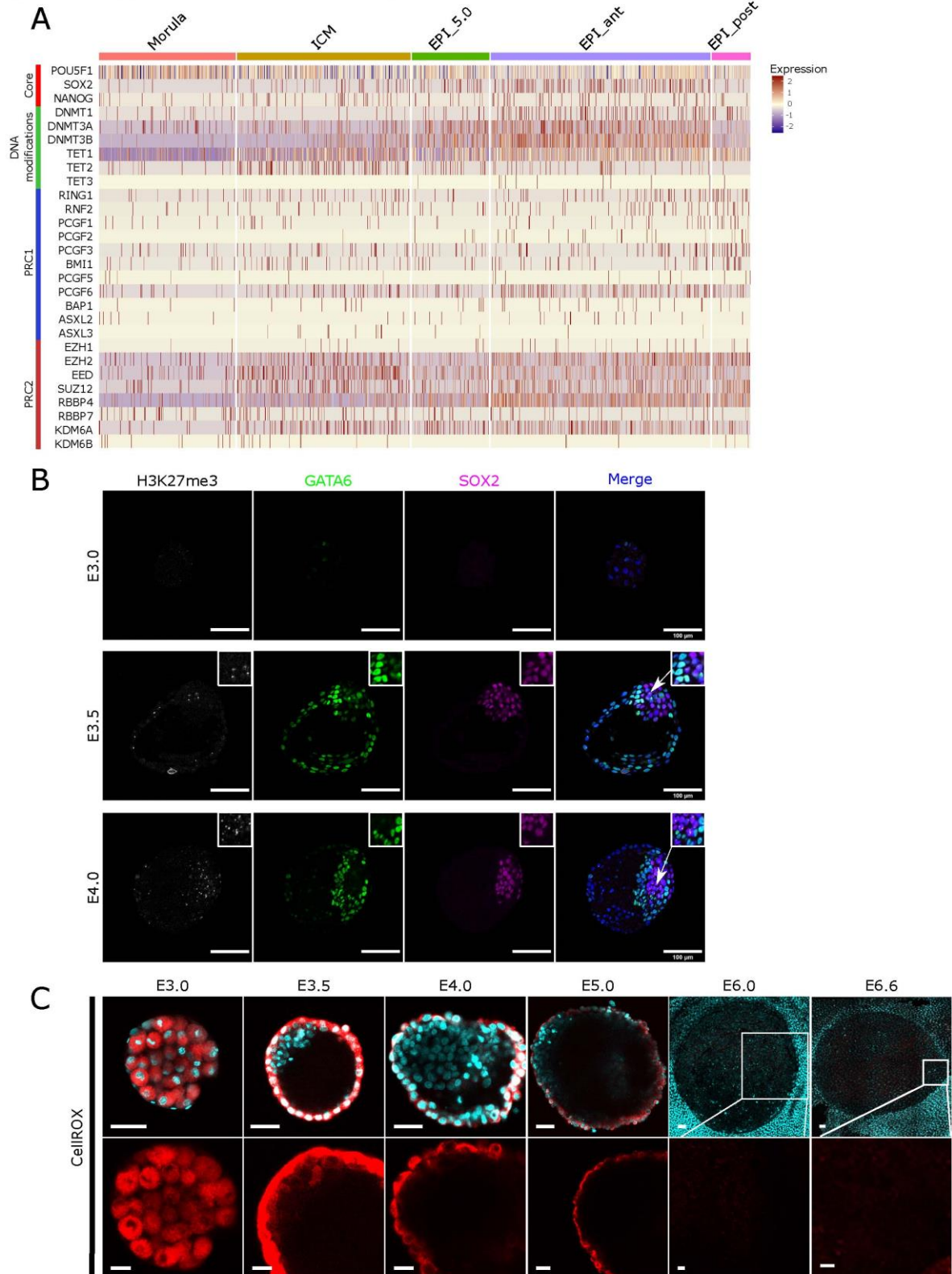


Figure S6: Signaling pathways enrichment in EPI cells

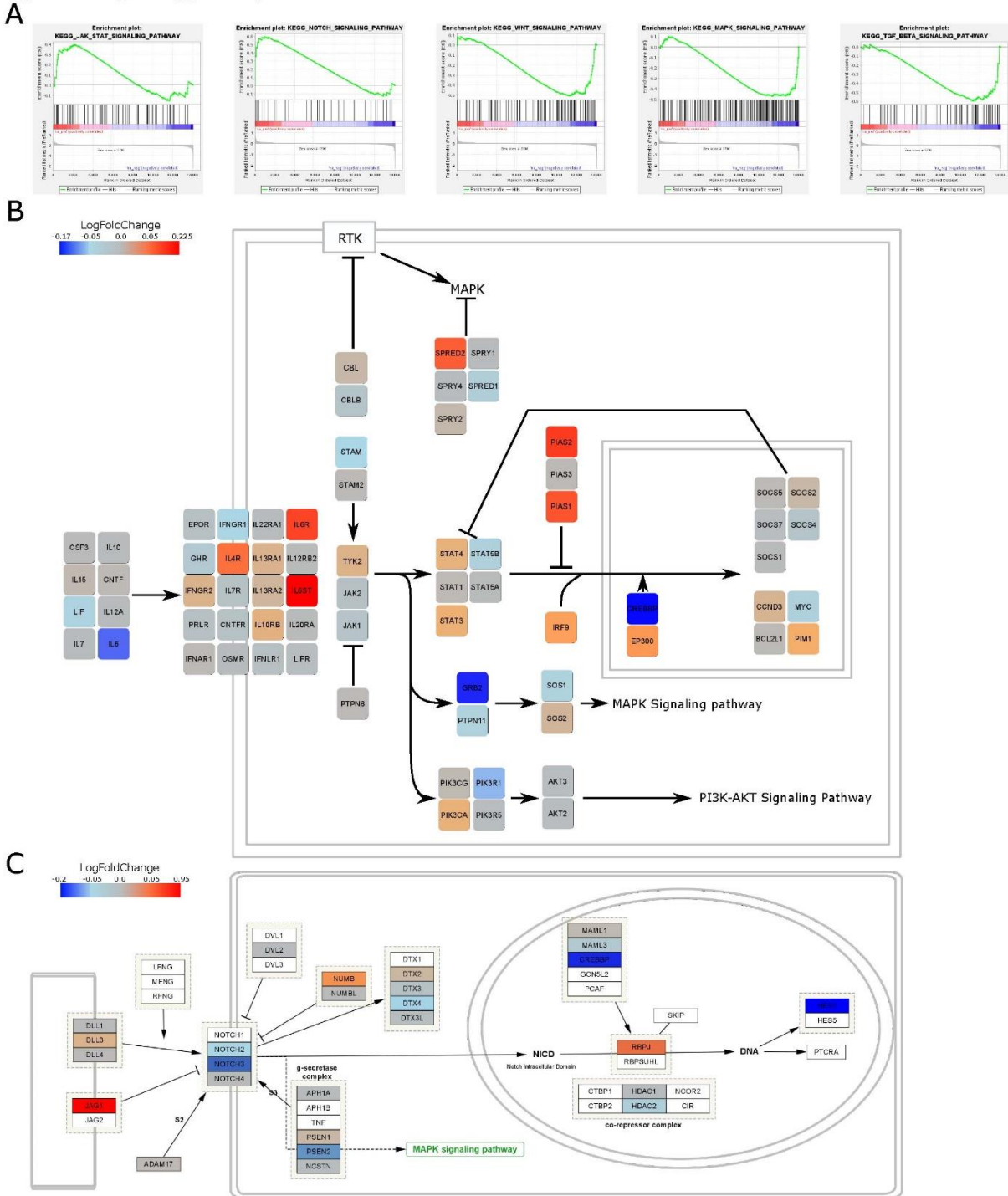
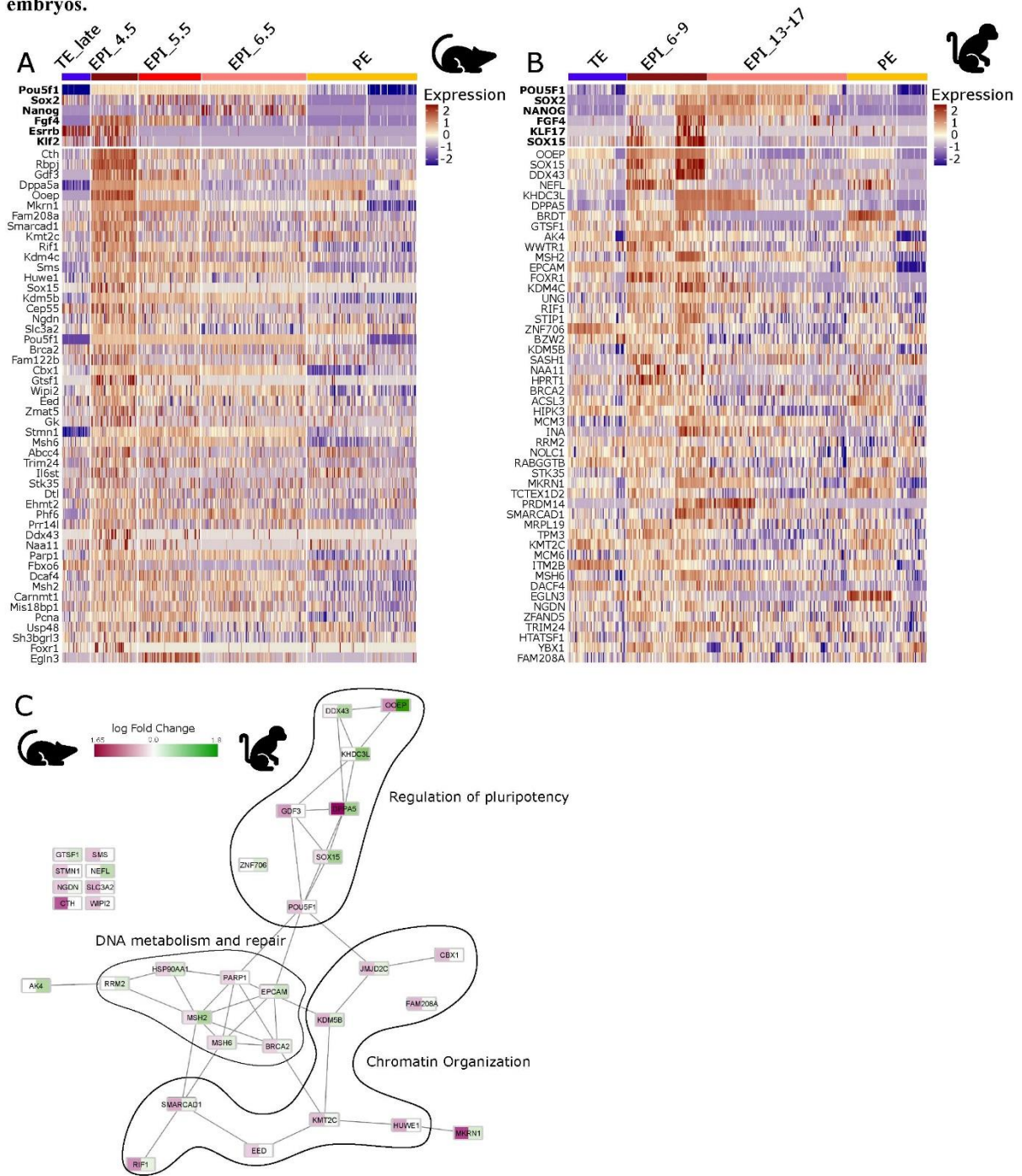


Figure S7: Expression of rabbit naïve pluripotency-specific genes in mouse and monkey embryos.



Le matériel et méthodes correspondant à la suite des résultats se trouve à la suite de la discussion.

II. Données complémentaires à l'article 1

A. L'activation de la voie HIPPO participe à la ségrégation entre les lignages embryonnaires et extra-embryonnaires

Afin de compléter les analyses présentées dans l'article 1, j'ai réalisé d'autres analyses sur les données de séquençage ARN en cellule unique 10X. Dans l'analyse de la ségrégation entre l'ICM et le TE, la voie HIPPO est étonnamment absente des termes KEGG enrichi dans le TE par rapport à l'ICM. Cependant, on peut observer que le terme KEGG « *Tight-junction* » est enrichi dans le TE. Étant donné le rôle d'épithélium entourant le blastocœle et l'ICM qu'a le TE, il n'est pas étonnant que des gènes associés à ce terme y soient surexprimés. Les jonctions serrées jouent aussi un rôle important dans la modulation de la voie HIPPO lors de la ségrégation entre le TE et l'ICM dans la morula. Elles permettent notamment l'activation de la voie HIPPO dans les cellules internes de la morula. Dans les données, on retrouve notamment les gènes *AMOT* et *AMOTL2* surexprimés dans le TE par rapport à l'ICM (Article 1, Fig 2A-F, TABLE S1). Chez la souris, la localisation de ces deux protéines détermine celle de Yap. Dans les cellules externes de la morula, leur séquestration au domaine apical permet la translocation de Yap dans le noyau, ce qui conduit à l'activation du programme transcriptomique du TE. Dans les cellules internes, ces protéines sont phosphorylées au niveau des jonction adhérente, ce qui permet la phosphorylation de Yap et sa destruction dans le cytoplasme (Hirate et al., 2013 ; Leung and Zernicka-Goetz, 2013).

La surexpression des gènes *AMOT* et *AMOTL2* dans les cellules du TE m'a donné l'idée d'aller plus loin dans l'étude de la voie HIPPO au moment de la ségrégation ICM/TE. Dans un premier temps, j'ai isolé les cellules les plus précoces de notre jeu de données, afin de capturer le moment où débute la ségrégation entre les cellules internes et externes de la morula. J'ai donc sélectionné les cellules d'embryon au jour 3.0 (n = 1249), au moment de la cavitation de la morula. J'ai ensuite réalisé une analyse différentielle entre les cellules annotées comme étant de l'ICM et celles annotées comme étant du TE (Article 1, Fig 1D, 1E). A l'aide du logiciel Cytoscape, j'ai réalisé un schéma de la voie HIPPO -YAP avec les composants actifs dans la ségrégation ICM/TE tels qu'ils sont décrits chez la souris, l'homme et le bovin (Chazaud and Yamanaka, 2016 ; Gerri et al., 2020). Chaque gène est coloré en fonction du logarithme du *fold change* calculé dans l'analyse différentielle (Fig. R1).

On peut voir que le récepteur *NOTCH2*, les composants du domaine apical *PARD3* et *PARD6B* ainsi que les composants des jonctions adhérentes cadhérine 1 (*CDH1*), caténine bêta 1 (*CTNNB1*) et neurofibromine 2 (*NF2*) sont surexprimés dans le TE (fig. R1A). A l'inverse, les ligands de la voie NOTCH *JAG1*, *DLL3* et 4 sont eux surexprimés dans l'ICM. On peut également observer que *YAP1* est surexprimé dans les cellules du TE. Les cibles de YAP dans le TE telles que *GATA2* ou *KRT18* sont également presque toutes surexprimés dans les cellules de ce dernier, à l'exception de *CDX2* et de (*CLDN4*). Néanmoins, on peut voir que le cofacteur de YAP, *WWTR1*, aussi connu sous le nom de TAZ, et la kinase inhibitrice de YAP et TAZ, *LATS1*, sont quant à eux surexprimés dans les cellules de l'ICM. C'est aussi le cas de *RBPJ*, facteur de transcription de la voie NOTCH. Il faut noter que ces facteurs de transcriptions sont quand même exprimés dans les cellules du TE au jour 3.0 (Fig. R1B). De plus, les

KEGG : *kyoto encyclopedia of genes and genomes*

JAG1 : *jagged canonical Notch ligand 1*

DLL : *delta like canonical Notch ligand*

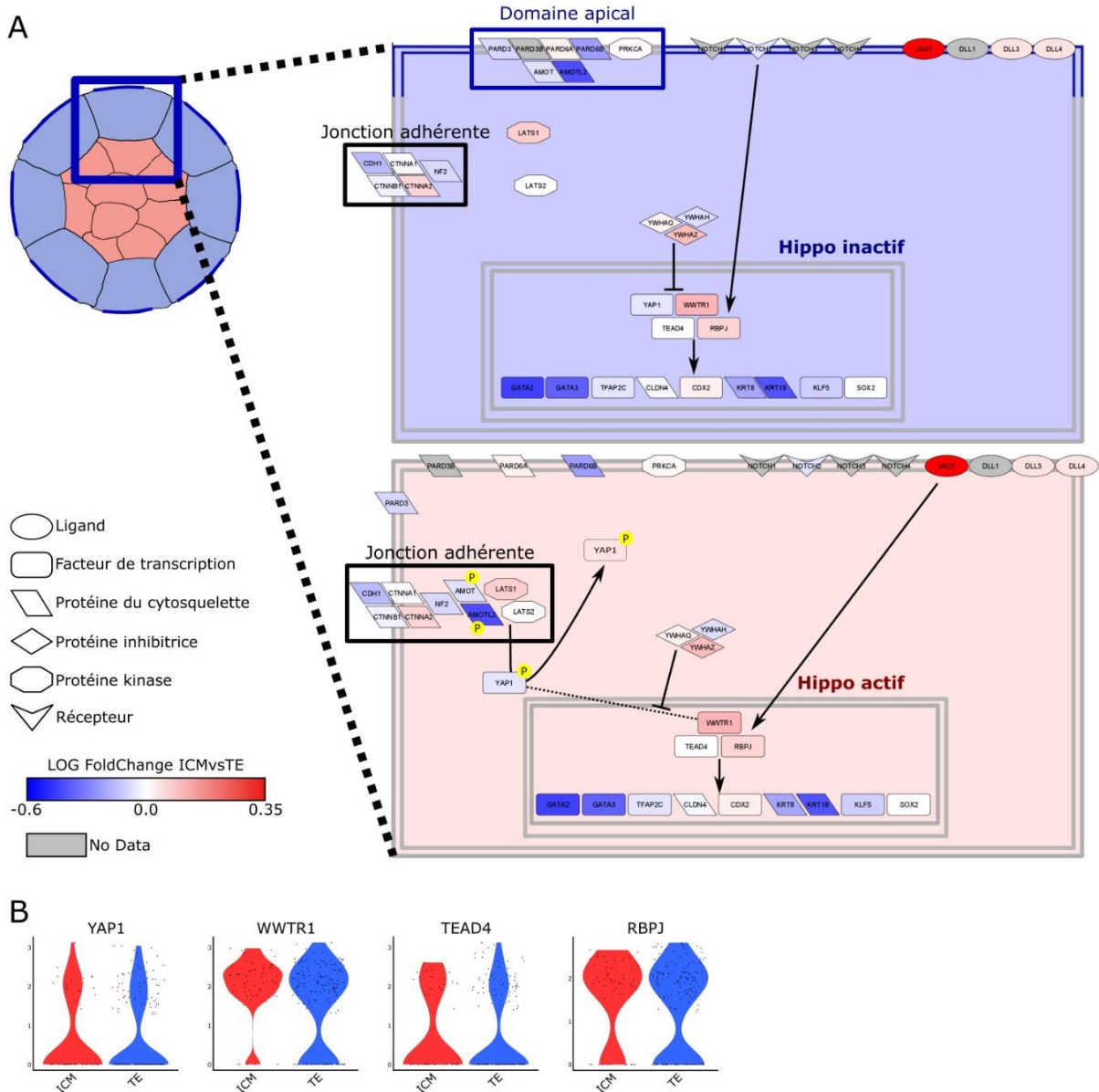


Figure R1 : Expression des composants de la voie de signalisation HIPPO-NOTCH pendant la ségrégation entre l'ICM et le TE. (A) Schéma des composants de la voie HIPPO -NOTCH impliqués dans la ségrégation entre l'ICM et le TE. Les protéines de la voie HIPPO -NOTCH sont colorées en fonction du log fold-change de l'expression des gènes correspondants issus de l'analyse différentielle entre l'ICM et le TE au jour 3.0. (B) Diagramme en violon de l'expression des facteurs de transcription de la voie HIPPO -Notch dans l'ICM et le TE dans des cellules d'embryons au jour 3.0.

gènes connus comme inhibant l'activité de *YAP1*, *YWHAQ* et *Z*, sont surexprimés dans les cellules de l'ICM. Enfin, contrairement à l'embryon de souris, *SOX2* n'est pas encore enrichi dans l'ICM au jour 3.0. Cela peut être dû à la faible profondeur des données de séquençage, seule une partie des transcrits *SOX2* étant détectée.

Ces résultats indiquent que les composants des voies HIPPO et NOTCH nécessaires à la ségrégation ICM/TE sont bien présents dès le jour 3.0 dans l'embryon de lapin. On observe dès ce stade l'activation des cibles des facteurs de transcription *YAP*, *TEAD4* et *RBPJ* dans les premières cellules du TE. Dans les

YWHAQ/Z : tyrosine 3-monooxygénase/tryptophan 5-monooxygénase activation protein theta and zeta

premières cellules de l'ICM, il semblerait qu'à l'inverse les voies NOTCH et YAP soient inhibées. Ces résultats correspondent avec ce qui est connu dans l'embryon de souris (Guo et al., 2010 ; Posfai et al., 2017). Néanmoins, il sera nécessaire de confirmer ces résultats au niveau protéique, en étudiant la localisation des effecteurs des voies HIPPO et NOTCH dans la morula du lapin, comme cela a été fait chez la souris, l'homme et le bovin (Gerri et al., 2020).

De manière surprenante, on retrouve le terme KEGG « *HIPPO signaling pathway* » enrichi à la fois dans l'épiblaste et dans le PE (Article 1, Fig. 2J, TABLE S1). Afin d'y voir plus clair dans le rôle de la voie HIPPO dans la ségrégation entre l'épiblaste et le PE, j'ai repris les résultats de l'analyse différentielle entre les cellules de l'épiblaste précoce et celle du PE précoce, aux jours 3.5 et 4.0 (Article 1, TABLE S1). Comme ci-dessus, je me suis servi du logiciel Cytoscape afin d'observer l'enrichissement des composants de la voie HIPPO dans l'épiblaste ou le PE. Comme pour la Figure 1A, on observe un enrichissement des composants du domaine apical dans le PE par rapport à l'épiblaste tels que *AMOT* et *PARD3* (Fig. R2A). On retrouve également surexprimées dans le PE des cibles de YAP et TEAD4 telles que *GATA3* et *KRT18*. On observe que cette fois-ci *YAP1* et son cofacteur *WWTR1* sont tous deux surexprimés dans le PE, tandis que *RBPJ* ainsi que les ligands de la voie NOTCH *JAG1* et *DLL3* sont surexprimés dans l'épiblaste. On peut également remarquer que la cible de YAP *TFAP2C* est aussi surexprimée dans l'épiblaste (Fig. R2A). Chez la souris, l'endoderme primitif se polarise rapidement par l'établissement d'un domaine apical autour du jour 4.0 (Saiz et al., 2013). Le gain d'un domaine apical et d'une polarité permettrait la séparation des cellules de l'épiblaste et du PE. Cela expliquerait l'inactivation de la voie HIPPO et l'activation de YAP dans le PE chez le lapin. C'est au jour 4.0 que commence la ségrégation physique entre le PE et l'épiblaste chez le lapin. Dans certains embryons, on observe en effet entre les jours 3.75 et 4.0 une séparation physique des deux lignages (Piliszek et al., 2017 ; Article 1, Fig. S4A, S5B). Il y a donc une étonnante synchronicité de la séparation de l'épiblaste et du PE entre le lapin et la souris (Saiz et al., 2016 Nature communications).

Chez la souris et l'homme, YAP se trans-localise progressivement dans le noyau des cellules de l'épiblaste (Qin et al., 2016 ; Hashimoto et al., 2019). Chez la souris, YAP conserve une localisation nucléaire dans l'épiblaste post-implantatoire (Frankenberg et al., 2013 ; Narimatsu et al., 2016). On observe chez le lapin une ambivalence entre *WWTR1*, qui est surexprimé dans les cellules de l'ICM, et *YAP1*, qui est surexprimé dans les cellules de l'épiblaste tardif (Fig. R2B ; Article 1, Fig. 4B, Table S3 et S4). Bien que la localisation de la protéine TAZ ne soit pas connue chez le lapin, chez l'homme, la souris et le bovin TAZ est présent dans les noyaux des cellules du TE et dans le cytoplasme des cellules de l'ICM de blastocystes précoces (Gerri et al., 2020). On peut supposer que la cinétique de YAP et TAZ soit similaire chez le lapin : dans un premier temps, YAP et TAZ sont séquestrés dans le cytoplasme des cellules de l'ICM ; dans un second temps, l'expression de YAP augmente, et il se translocalise dans le noyau des cellules de l'épiblaste.

Il a été montré que TAZ sous forme cytoplasmique induisait l'inhibition de la voie WNT en séquestrant la β -caténine dans le cytoplasme et en promouvant sa destruction par le complexe APC-AXIN-GSK3 (Imajo et al., 2012 ; Azzolin et al., 2014). Dans nos données, l'expression de *WWTR1* et les cibles de la voie WNT – *ESRRB* et *TCF7L1* – sont anticorrélés dans l'ICM (Fig. R2B). On peut supposer que TAZ inhibe la voie WNT dans l'ICM, puis que sa disparition permet l'activation de la voie WNT dans l'épiblaste au stade suivant (Fig. R2C).

Dans l'ICM de souris et dans les cellules humaines amorcés, YAP régule également la compétition cellulaire (Hashimoto et al., 2019 ; Price et al., 2021). La surexpression progressive de YAP dans l'épiblaste de l'embryon de lapin permettrait ainsi une augmentation de la compétition cellulaire afin de réguler la qualité des cellules qui formeront le futur embryon.

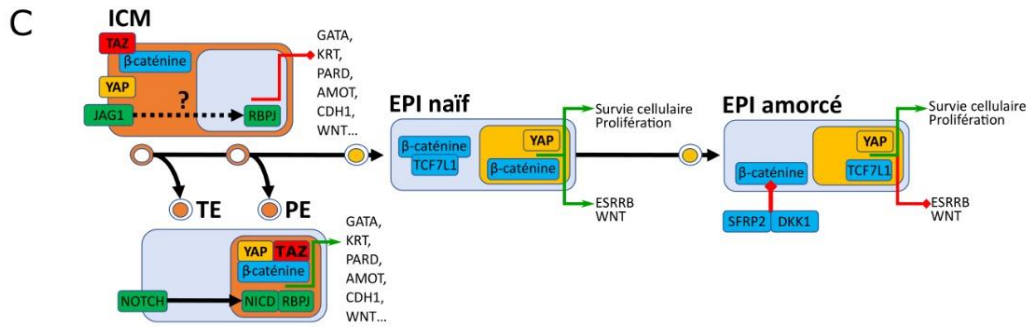
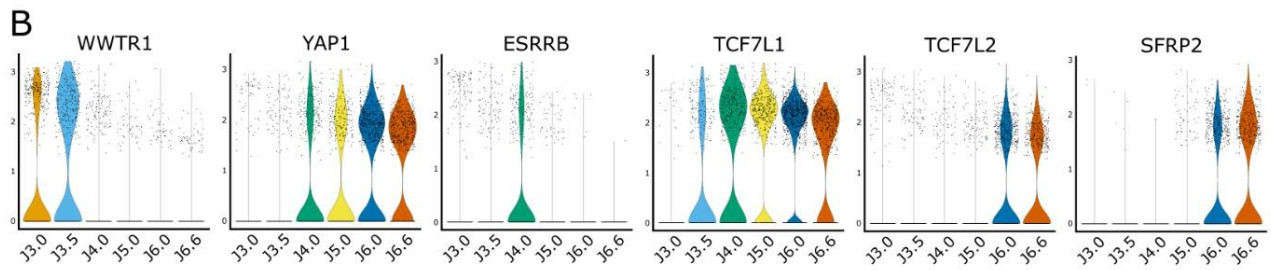
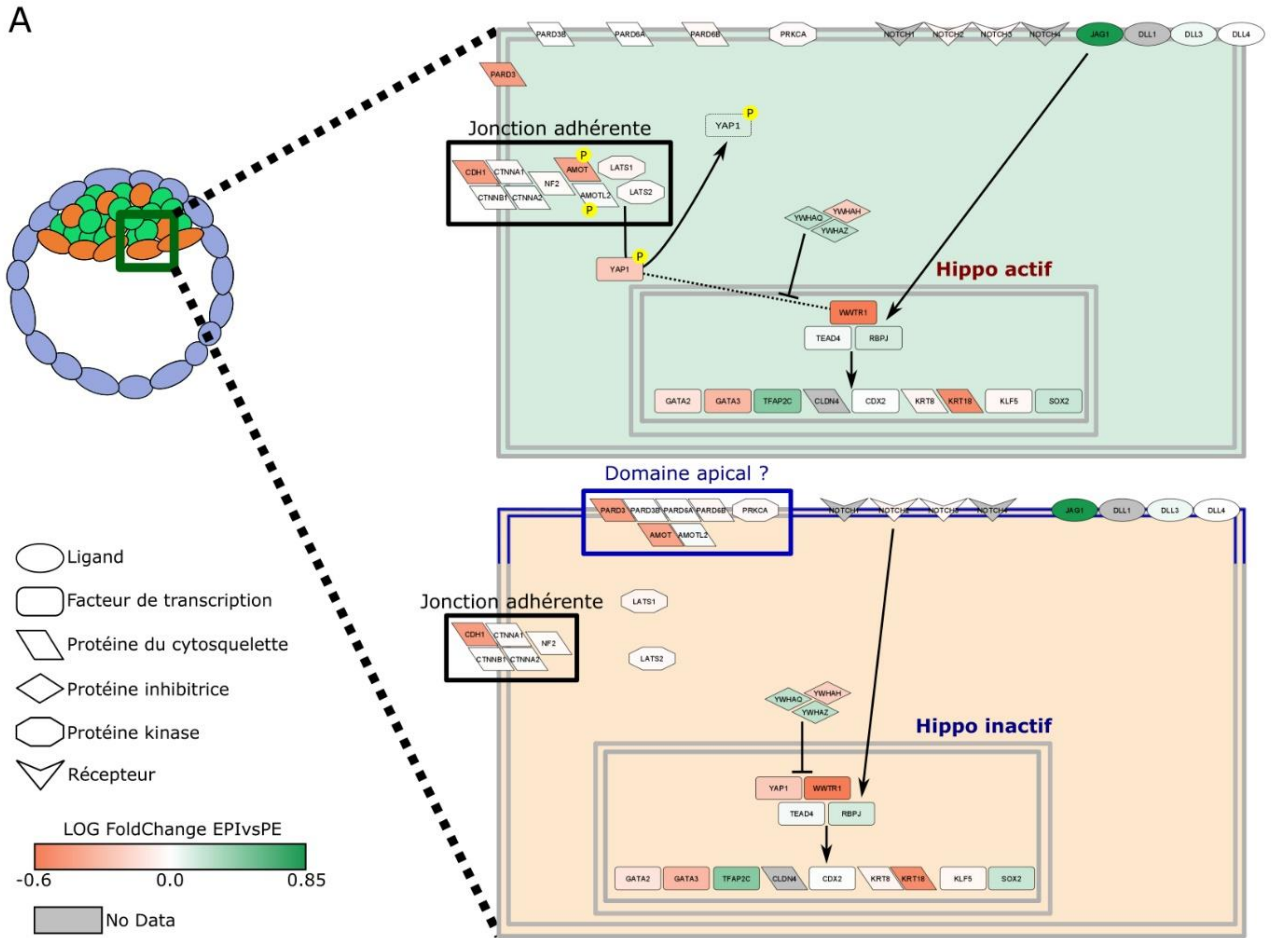


Figure R2 : Expression des composants des voies de signalisation HIPPO-NOTCH et HIPPO-WNT. (A) Schéma des composants de la voie HIPPO-NOTCH impliqués dans la ségrégation entre l'EPI et le PE. Schéma de la voie HIPPO-NOTCH, les protéines sont colorées en fonction du log fold-change de l'expression des gènes correspondants issus de l'analyse différentielle entre l'EPI et le PE d'embryons entre les jours 3.5 et 4.0. (B) Diagramme en violon de l'expression des gènes impliqués dans les voies de signalisation HIPPO et WNT dans les cellules embryonnaires pluripotentes des jours 3.0 à 6.6. (C) Schéma de l'interaction des voies HIPPO, WNT et NOTCH dans l'embryon. EPI : épiblaste.

La voie HIPPO est impliqué à de nombreux niveaux dans la régulation du développement précoce chez les mammifères. Il serait intéressant de manipuler cette voie dans des embryons de lapin pour disséquer ses fonctions dans la ségrégation entre les lignages embryonnaires et extra-embryonnaires, dans la régulation de la pluripotence et dans la compétition cellulaire dans l'épiblaste.

B. L'endoderme viscéral antérieur permet la mise en place de l'axe antéro-postérieur dès le jour 6.0

Afin de compléter nos résultats sur la ségrégation du PE, j'ai analysé la présence des protéines GATA6 (GATA6+ ou -) et SOX2 (SOX2+ ou -) dans des embryons de lapin du jour 3.0 jusqu'au jour 4.0 (Fig. R3A). A jour 3.0, on observe que les embryons les plus petits ont moins de cellules GATA6+ et aucune cellules SOX2+. Dans les embryons plus développés, la quasi-totalité des cellules sont GATA6+. On observe aussi certaines cellules SOX2+ avec une réduction du niveau d'expression de GATA6 au centre des morulas. A jour 3.5, on observe davantage de cellules SOX2+/GATA6^{faible} ou SOX2+/GATA6- dans l'ICM. De plus, on commence à observer une réduction du niveau de GATA6 dans le TE des embryons les plus grands. Enfin, dans les embryons au jour 4.0, on observe une quasi-absence de cellules à la fois SOX2 et GATA6 positives. La majorité des cellules du TE expriment alors faiblement GATA6 par rapport aux cellules du PE. Cette cinétique de l'expression de GATA6 et de sa ségrégation progressive dans l'ICM est similaire à celle décrite dans l'embryon de souris (Saiz et al., 2016 ; Kang et al., 2017 ; Posfai et al., 2017). Il faut noter qu'à la différence de la souris, l'expression de GATA6 est réprimée plus tardivement dans le TE chez le lapin (Piliszek et al., 2017) bien que l'on puisse trouver des cellules exprimant Gata6 dans le TE d'embryon de souris jusqu'au jour 4.5 (Morgani et al., 2015).

J'ai également étudié la ségrégation entre endoderme pariétal et viscéral dans l'article 1. Cependant, je ne me suis pas penché sur la question de l'apparition de l'AVE. Celui-ci est primordial dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur. J'ai donc analysé, dans le PE tardif, l'expression des gènes régulant l'apparition de l'AVE tel qu'ils sont connus chez les mammifères euthériens (Idkowiak et al., 2004a ; Yamamoto et al., 2009 ; Van Leeuwen et al., 2015 ; Yoshida et al., 2016 ; Sasaki et al., 2016 ; Molè et al., 2021). J'ai isolé les cellules du PE aux jours 6.0 et 6.6 (n = 1208), annoté comme faisant partie du ParE et du VisE (Article 1, fig. 1E, S3A, S3B). Cette nouvelle analyse montre que les gènes spécifiques de l'AVE – *OTX2*, *LEFTY2*, *HHEX*, *DKK1* et *CER1* – sont exprimés par une partie des cellules du VisE (Fig. R3B). Cependant, on ne distingue pas de sous-population au sein du VisE avec une expression plus élevée ou exclusive de ces gènes. Cela pourrait être dû à des schémas d'expression différents d'un gène à l'autre, comme cela est montré pour *DKK1* et *CER1* par RNA-FISH dans des embryons de lapins aux mêmes stades (Idkowiak et al., 2004a ; Idkowiak et al., 2004b). Il pourrait également exister une hétérogénéité d'expression pour les gènes spécifiques de l'AVE dans ces cellules. On constate cependant qu'il existe bien quelques cellules *CER1+*/*DKK1+* dans le VisE, et ce dès le jour 6.0 (Fig. R3C).

De manière intéressante, les protéines de signalisation *BMP2*, *4* et *6* sont surexprimées dans le ParE (Fig. R3D) ; observation confirmée par RNA-FISH (Hopf et al., 2011). Chez la souris, c'est l'ectoderme extra-embryonnaire qui sécrète Bmp4, ce qui restreint l'apparition de l'AVE au pôle distal de l'embryon. Sa migration subséquente détermine l'orientation de l'axe antéro-postérieur chez la souris (Soares et al., 2005 ; Yamamoto et al., 2009). Chez les primates, ce rôle pourrait être joué par l'amnios. En effet une étude sur des embryons post-implantatoires de macaque cynomolgus a montré que *BMP4* est exprimé dans l'amnios, alors que *CER1* est exprimé dans une partie du VisE (Sasaki et

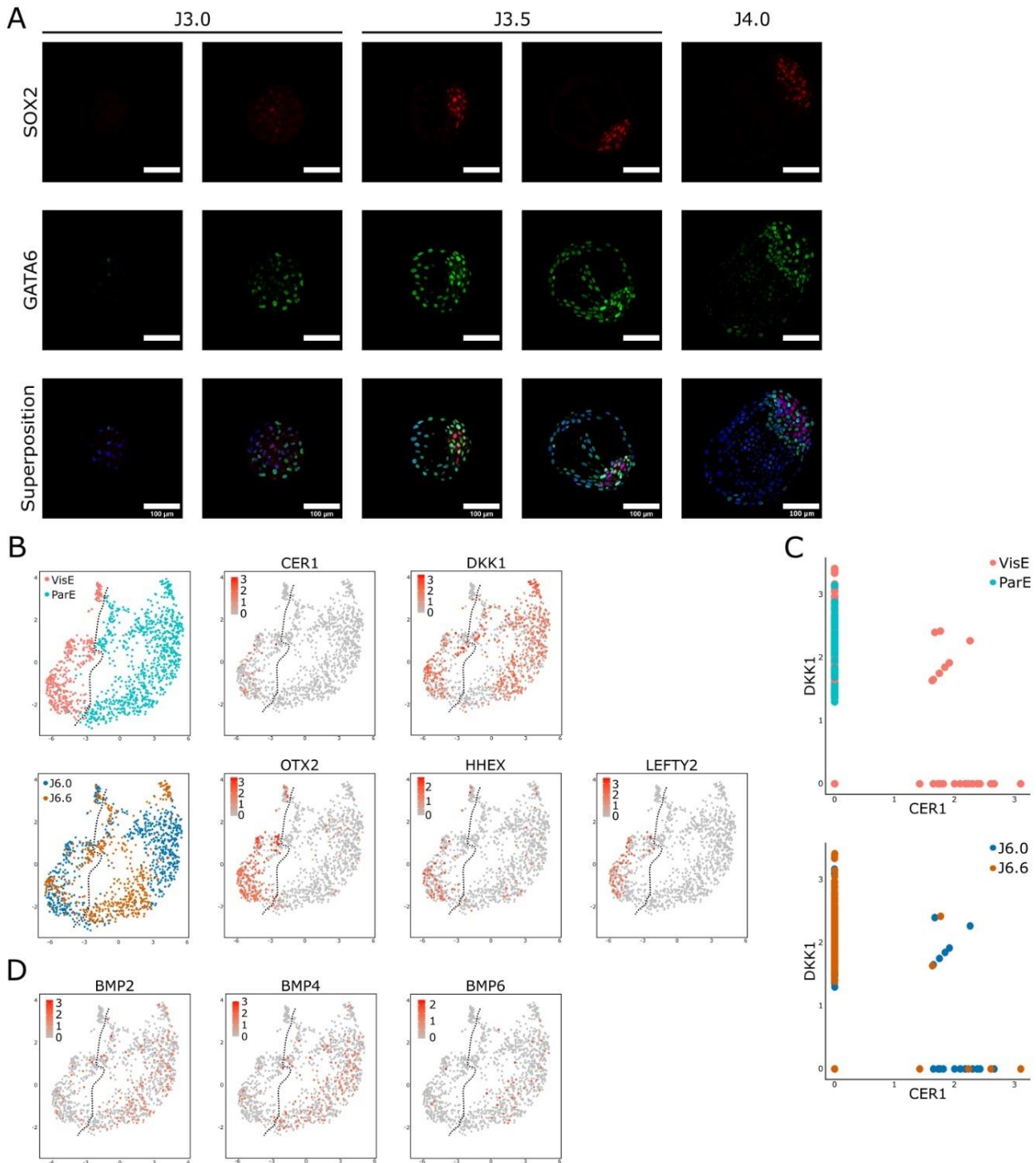


Figure R3 : Différenciation de l'endoderme primitif et apparition de l'endoderme viscéral antérieur. (A) Marquage par immunofluorescence d'embryons aux jours 3.0, 3.5 et 4.0, avec des anticorps ciblant les protéines SOX2 et GATA6. L'assemblage indique la superposition des immunomarquages avec le marquage de l'ADN au DAPI. (B) Représentation en deux dimensions UMAP des cellules de l'endoderme primitif d'embryons aux jours 6.0 et 6.6. Les échantillons sont colorés en fonction de l'annotation du tissu dans le jeu de données, du jour embryonnaire, ou de l'expression des gènes connus pour être exprimés spécifiquement dans l'endoderme viscéral et l'endoderme viscéral antérieur, incluant CER1, DKK1, OTX2, HHEX et LEFTY2. (C) Graphique de dispersion de l'expression de CER1 et DKK1 dans les cellules de l'endoderme primitif d'embryons aux jours 6.0 et 6.6. Les échantillons sont colorés en fonction de l'annotation du tissu dans le jeu de données et du jour embryonnaire. (D) Représentation en deux dimensions UMAP des cellules de l'endoderme primitif d'embryons aux jours 6.0 et 6.6. Les échantillons sont colorés en fonction de l'expression des gènes BMP2, BMP4 et BMP6. VisE: endoderme viscéral, ParE: endoderme pariétal; J6.0 : Jour 6.0, J6.6 : Jour 6.6.

al., 2016). L'expression de *CER1* au cours du développement embryonnaire tardif chez le lapin semble confirmer l'hypothèse d'une restriction de l'apparition du domaine de l'AVE par les ligands BMP exprimés dans les tissus adjacents, le ParE en l'occurrence. En effet, il a été démontré que chez le lapin *CER1* s'exprime initialement au cœur du VisE. L'expression de *CER1* se polarise ensuite dans le VisE, entraînant alors une migration cellulaire qui polarise l'embryon et restreint l'expression de *CER1* dans une partie du VisE, qui devient alors l'AVE (Idkowak et al., 2004a).

C. Conclusion et perspectives de l'article 1

Cet article a permis de décrire l'ensemble des premières ségrégations de lignages au cours du développement embryonnaire du lapin. De manière générale, celles-ci se déroulent de la même façon que chez les autres mammifères. Dans un premier temps, on observe la séparation entre le TE et l'ICM au moment de la compaction de la morula. Celle-ci est suivie de l'apparition avec un motif en « poivre-et-sel » des précurseurs de l'épiblaste et du PE. Les PGC apparaissent au moment de la formation de l'axe antéro-postérieur, à la périphérie de l'épiblaste postérieur. Ce dernier produit ensuite les précurseurs du mésoderme et du DE.

Il y a néanmoins quelques différences notables entre le lapin et les autres modèles. Dans un premier temps, l'expression de *CDX2* diffère de celle observée chez la souris et se rapproche de celle des primates, du porc et du bovin. La ségrégation entre l'épiblaste et le PE chez le lapin se rapproche également des primates plutôt que de la souris. En effet, *OTX2* est exprimé dès l'apparition de l'endoderme primitif dans l'ICM. De même, les marqueurs de lignages *OCT4* et *GATA6* ne sont restreints à l'épiblaste et au PE que tardivement. Enfin, l'inhibition de la voie ERK n'a pas un effet aussi absolu sur la séparation épiblaste/PE que chez la souris (Kuijk et al., 2012 ; Roode et al., 2012 ; Boroviak et al., 2015 ; Piliszek et al., 2017). Le lapin diffère cependant des primates lors de l'apparition des PGC. Comme chez la plupart des mammifères euthériens les PGC chez le lapin apparaissent dans l'épiblaste postérieur (revue dans Alberio et al., 2021), alors que chez le primate ces dernières proviennent de l'amnios (Sasaki et al., 2016).

Les résultats de cet article permettent de situer les différents états de pluripotence dans le développement embryonnaire du lapin. Ainsi, les cellules embryonnaires pluripotentes dans l'ICM aux jours 3.5 et 4.0 partagent de nombreuses caractéristiques de l'état naïf. Celles de l'épiblaste à 6.0 et 6.6 se rapprochent quant à elles de l'état amorcé. L'épiblaste au jour 5.0 semble lui se rapprocher de l'état formatif. Nos données montrent que la transition entre état naïf et amorcé se traduit par des changements métaboliques, épigénétiques et transcriptomiques globalement similaires à ceux qui ont été décrits chez la souris et chez les primates. Il convient de noter certaines différences cependant, comme l'absence de phase de réactivation du X comme chez la souris, ou l'expression de certains gènes qui diffère entre le lapin, le macaque cynomolgus et la souris.

Notre étude a aussi permis de mieux caractériser l'état naïf *in vivo* chez le lapin. On retrouve peu de gènes impliqués dans les voies de signalisation régulant la pluripotence surexprimés dans les cellules embryonnaires naïves : notamment certains gènes de la voie JAK-STAT, dont *IL6ST* et *IL6R*, et des répresseurs de la voie NOTCH comme *NUMB* et *JAG1*. On retrouve également surexprimés de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la chromatine et la réparation de l'ADN, dont *HSP90AA1* ou *KDM5B* qui sont communs à la souris et au macaque. Un faible degré d'hétérochromatinisation semble faire ainsi parti des caractéristiques de l'état naïf. De manière très intéressante, un des termes qui est régulièrement trouvé comme enrichi dans l'ICM par rapport aux

autres tissus embryonnaires est « *cell-cycle* ». Cela souligne l'importance de la régulation du cycle cellulaire au cours du continuum de pluripotence.

Deuxième partie – Impact de l’inhibition de l’hétérochromatine sur la pluripotence

I. Hétérochromatine et état naïf

A. La méthylation d’H3K9 est inversement corrélée à l’état naïf dans l’embryon de lapin

J’ai analysé dans l’article 1 la dynamique des modifications de l’ADN et des marques apposées par les complexes répresseurs PRC, ainsi que l’évolution de l’expression des enzymes « *writers* » et « *erasers* » associées à ces marques (Article 1, Fig. 5A-E, S5A-B). Il manque cependant à cette analyse les dynamiques des niveaux des modifications post-traductionnelles d’H3K9. En effet, la différenciation des cellules souches embryonnaires est associée à une augmentation du niveau d’hétérochromatine, notamment de la tri-méthylation d’H3K9 (Meshorer et al., 2006 ; Hawkins et al., 2010 ; Ahmed et al., 2010 ; Tosoloni et al., 2018), et à une perte de l’acétylation d’H3K9 (Krejci et al., 2009). Ces modifications d’H3K9 jouent également un rôle dans la balance entre les états naïfs et amorcés. En effet, l’utilisation d’inhibiteurs d’HDAC dans des cellules amorcées murines et humaines facilitent la reprogrammation à l’état naïf (Ware et al., 2009 ; Ware et al., 2014 ; Guo et al., 2017). Dans l’embryon de souris, la méthyltransférase d’H3K9 *Ehmt2* permet la répression de *Pou5f1* au cours du développement. A l’inverse, la déméthylation d’H3K9 par les *Kdm3* et *4* promeut l’auto-renouvellement et la survie des ESC de souris (Loh et al., 2007 ; Pedersen et al., 2016 ; Kuroki et al., 2018).

J’ai donc analysé les niveaux d’H3K9me3 et H3K9ac par immunofluorescence dans des embryons aux jours 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, et 6.6. J’ai également analysé l’expression des enzymes *writers* et *erasers* de ces deux marques au sein des cellules embryonnaires pluripotentes issues de l’article (Article 1, PLURI dataset). On observe que la modification H3K9me3 est présente dans un premier temps de manière homogène dans les cellules de la morula. On peut noter l’absence de marquage de l’hétérochromatine périnucléaire ainsi qu’intra-nucléaire dans les noyaux. Suite à la cavitation, on constate une perte de la marque dans l’ICM puis dans l’épiblaste jusqu’au jour 5.0, tandis que le TE acquiert un marquage plus intense d’H3K9me3. La marque réapparaît dans l’épiblaste au jour 6.0 et 6.6, où l’on note l’apparition d’hétérochromatine péri- et intra-nucléaire (Fig. R4A). Cette dynamique d’H3K9me3 dans l’ICM puis l’épiblaste peut être associée à l’augmentation de l’expression des méthyltransférases d’H3K9, notamment *EHMT1*, *EHMT2* ainsi que *SETDB1*. Ainsi, au cours du continuum de pluripotence, les cellules embryonnaires forment et accumulent progressivement de l’hétérochromatine.

Il y a également un pic d’expression des lysines déméthylases *KDM4A* et *C* dans l’ICM puis l’épiblaste au jour 5.0 (Fig. R4C ; Article 1, Fig. 7G-H). La modification H3K9ac quant à elle semble homogène entre les différents lignages embryonnaires (Fig. R4B). Cela peut s’expliquer par la surexpression simultanée de HAT telles que *KAT6B*, *KAT7*, *EP300* et *CREBBP*, et des HDAC *1*, *2*, *5* et *8* (Fig. R4D). On peut supposer que les cellules de l’embryon maintiennent ainsi un niveau constant d’acétylation d’H3K9 au cours du développement embryonnaire.

HSP90AA1 : *heat shock protein 90 alpha family class A member 1*

KDM5B : lysine demethylase 5B, aussi appelé *Jumonji*, *AT rich interactive domain 1B* (JARID1B)

KAT6B : *lysine acetyltransferase 6B*, aussi appelé *MOZ*, *YBF2/SAS3*, *SAS2 and TIP60 protein 4* (MYST4)

KAT7 : *lysine acetyltransferase 7*, aussi appelé *MOZ*, *YBF2/SAS3*, *SAS2 and TIP60 protein 2* (MYST2)

EP300 : *E1A binding protein P300*

CREBBP : *CREB binding protein*, aussi appelé *lysine acetyltransferase 3A* (KAT3A)

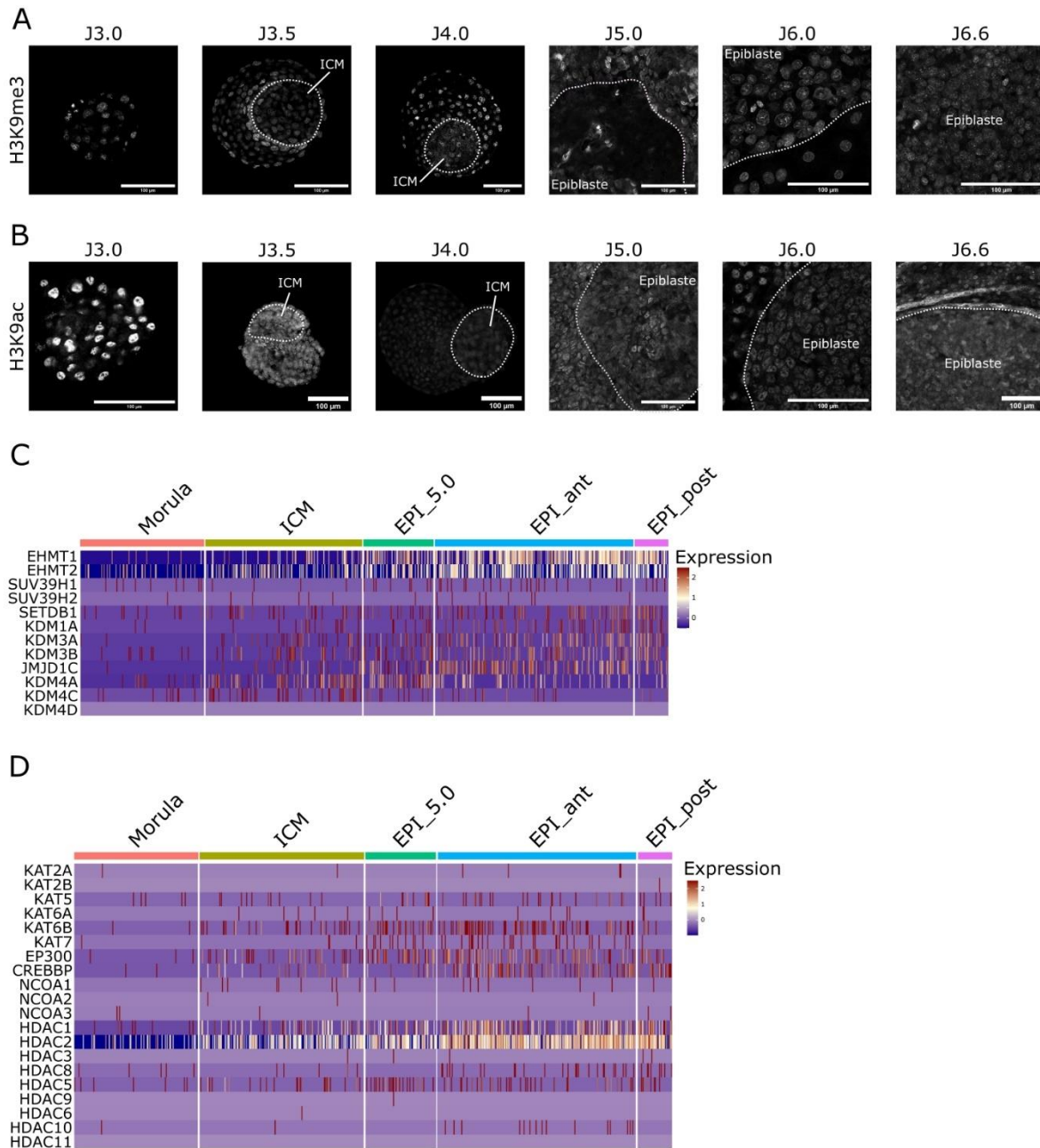


Figure R4 : Régulation de la méthylation et de l'acétylation de H3K9 dans l'embryon de lapin. (A) Immunofluorescence de l'histone 3 lysine 9 tri-méthylée (H3K9me3) dans des embryons aux jours 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0 et 6.6. (B) Immunofluorescence de l'histone 3 lysine 9 acétylée (H3K9ac) dans des embryons aux jours 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0 et 6.6. (C) Heatmap de l'expression des enzymes "writers" apposant et "erasers" éliminant la méthylation de H3K9 dans la morula (jour 3.0), l'ICM (jour 3.5-4.0), l'épiblaste (jour 5.0), les épiblastes antérieur et postérieur (jour 6.0-6.6). (D) Heatmap de l'expression des enzymes writers et erasers de l'acétylation de H3K9 dans la morula (jour 3.0), l'ICM (jour 3.5-4.0), l'épiblaste (jour 5.0), les épiblastes antérieur et postérieur (jour 6.0-6.6). EPI_5.0: épiblaste au jour 5.0; EPI_ant: épiblaste antérieur aux jours 6.0 et 6.6; EPI_post: épiblaste postérieur aux jours 6.0 et 6.6.

Au final, l'épiblaste naïf apparaît comme une « table rase » épigénétique. Cet état est maintenu à la fois passivement, par la sous-expression des enzymes apposant des marques répressives, et activement par la surexpression d'enzymes enlevant ces mêmes marques répressives.

B. L'inhibition de la formation d'hétérochromatine à un effet positif sur les cellules pluripotentes naïves dans l'embryon de lapin

De nombreux inhibiteurs ciblant les enzymes *writers* et *erasers* de la chromatine ont été développés. Certains inhibiteurs sont d'ailleurs utilisés dans les milieux de conversion à l'état naïf de PSC murines et humaines. L'inhibition d'enzymes favorisant la formation d'hétérochromatine pourrait faciliter la dérivation d'ESC de lapin à l'état naïf, en bloquant la sortie de l'état de pluripotence naïf des cellules embryonnaires. J'ai donc voulu vérifier l'effet des inhibiteurs épigénétiques sur des embryons de lapin, au moment de l'apparition des cellules embryonnaires naïves chez le lapin.

B.1. Validation des inhibiteurs sur iPSC et sur embryons de lapin

J'ai d'abord vérifié l'efficacité des inhibiteurs sur les marques d'histones ciblées, après 48h. Le premier inhibiteur choisi est l'A366. Il inhibe les enzymes EHMT1 et 2, et permet ainsi la répression de la méthylation d'H3K9. Le second inhibiteur choisi est l'UF010. Il cible et inhibe les HDAC de classe I (HDAC1, 2, 3, et 8), ce qui entraîne l'accumulation d'histones acétylées. J'ai ajouté les inhibiteurs à des concentrations croissantes sur des iPSC de lapin de la lignée B19 en milieu FGF-KOSR sur MEF (Osteil et al., 2013). Après 48h d'inhibition, j'ai fixé les cellules et réalisé des immunofluorescences sur H3K9me3 dans le cas de l'inhibition par A366, et sur H3K9ac et H3K14ac dans le cas de l'inhibition par UF010. On peut observer que l'ajout d'A366 entraîne bien une diminution significative de l'intensité du marquage d'H3K9me3 qui suit l'augmentation de la concentration d'A366 (Fig. R5A). De même, des concentrations croissantes d'UF010 sur les cellules B19 entraînent une augmentation croissante de l'intensité des marques H3K9ac et H3K14ac (Fig. R5B-C).

Je me suis ensuite penché au cours du développement embryonnaire. J'ai collecté des embryons au jour 0.5, que j'ai cultivé pendant 2 jours. Afin de permettre l'action des inhibiteurs, j'ai appliqué une courte digestion enzymatique pour perforer la zone pellucide et le manteau muqueux des embryons. 24h après cette perméabilisation, j'ai ajouté au milieu de culture les inhibiteurs A366 ou UF010 (Fig. R5D).

J'ai effectué une expérience préliminaire afin d'observer l'impact des inhibiteurs sur le développement des embryons. Au bout de 5 jours de culture, 95% des embryons contrôles se sont développés jusqu'au stade blastocyste (n = 22). Pour les embryons traités avec A366 à une concentration de 8 μ M, 90% des embryons se sont développés (n = 20). Pour les embryons traités avec UF010 à une concentration de 10 μ M, seulement 29% des embryons se sont développés. Pour ces raisons, nous avons décidé d'augmenter la concentration d'A366 à 10 μ M, afin de s'assurer une inhibition maximale, et à l'inverse nous avons baissé la concentration d'UF010 à 2 μ M, pour diminuer la toxicité de l'inhibiteur.

Après 48h d'inhibition, j'ai réalisé des immunofluorescences avec des anticorps ciblant respectivement SOX2 et H3K9me3 pour les embryons cultivés avec A366, et ciblant SOX2 et H3K9ac pour les embryons cultivés avec UF010 et leurs contrôles correspondants. De cette manière, j'ai pu vérifier l'efficacité des inhibiteurs sur les modifications d'histones régulées par les enzymes inhibées. On observe une diminution significative de l'intensité de la marque H3K9me3 dans les embryons traités 48h avec A366 à 10 μ M. Cependant, cette diminution reste faible (Fig. R5E). On peut également voir que l'inhibition par UF010 pendant 48h augmente significativement le niveau de la marque H3K9ac (Fig. R5F).

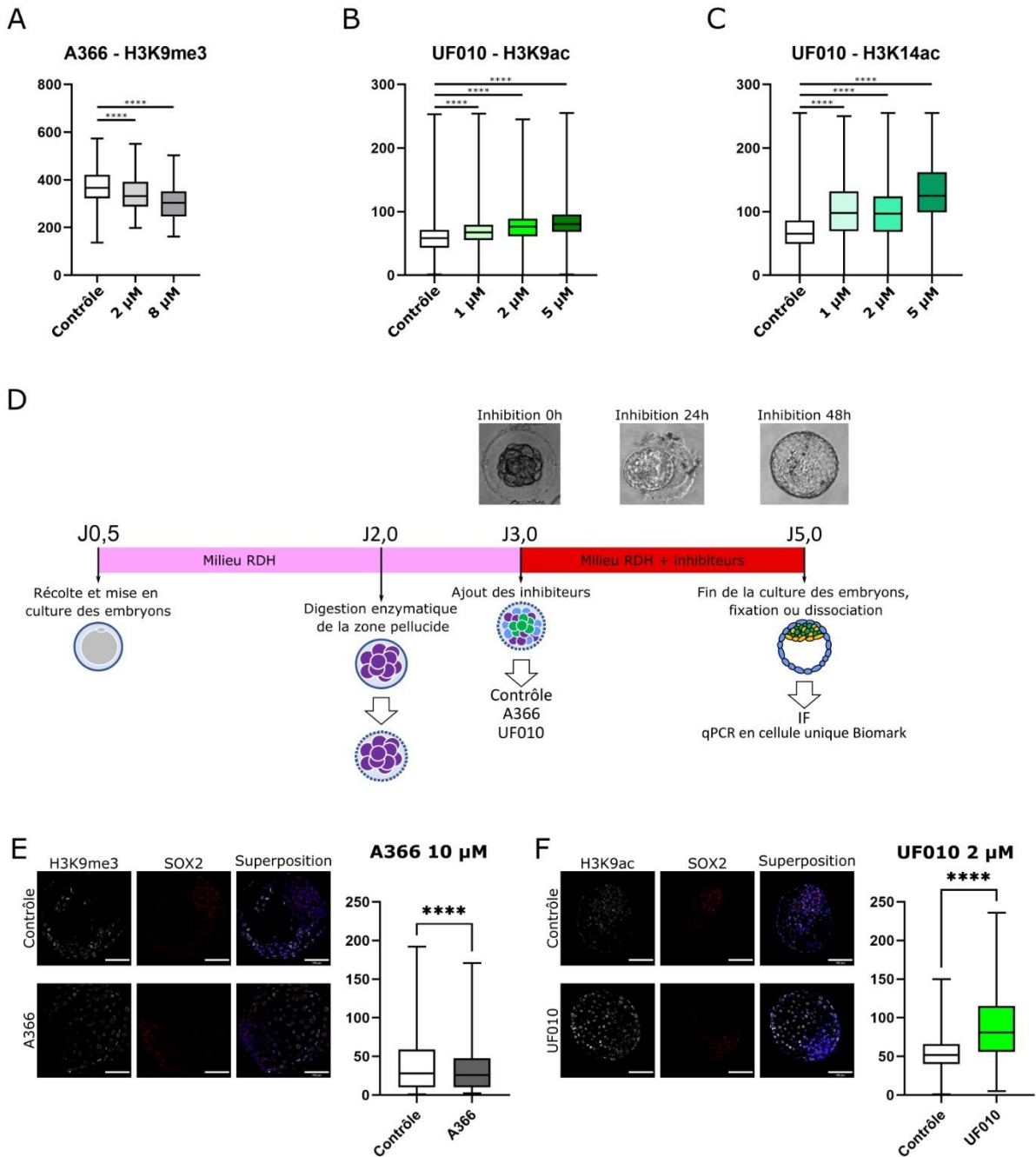


Figure R5 : Inhibition de la formation d'hétérochromatine sur des embryons de lapin mis en culture. (A-C) Intensité du marquage (unité arbitraire) de H3K9me3 (A), de H3K9ac (B) et de H3K14ac (C) sur des iPSC de lapin en milieu amorcé, après 48h de traitement par A366 (A) ou UF010 (B-C) à différentes concentrations. (D) Schéma du protocole de culture d'embryons de lapin en présence d'inhibiteurs. (E) Immuno-marquages contre la marque H3K9me3 et la protéine SOX2 sur des embryons de lapin cultivés pendant 5 jours, avec ou sans 48h d'inhibition par 10 μ M de A366. L'intensité de fluorescence du marquage de H3K9me3 a été quantifiée. (F) Immuno-marquages contre la marque H3K9ac et la protéine SOX2 sur des embryons de lapin cultivés pendant 5 jours, avec ou sans 48h d'inhibition par 2 μ M de UF010. L'intensité de fluorescence du marquage d'H3K9ac a été quantifiée. En (E) et (F), les figures incluent une superposition des marquages avec contre-coloration de l'ADN au DAPI (bleu).

B.2. L'inhibition de la méthylation de H3K9 perturbe l'apparition du PE

Ayant démontré l'efficacité des inhibiteurs sur leurs modifications d'histones ciblées, j'ai ensuite effectué des immunofluorescences sur SOX2 et SOX17 pour les embryons traités par A366, et sur SOX2 uniquement pour les embryons traités par UF010. J'ai compté le nombre de cellules total et le ratio de cellules SOX2/SOX17+ par embryon pour chaque condition. Nous pouvons observer que les embryons cultivés en présence de A366 sont plus petits en taille que les embryons contrôles. Le pourcentage de cellules SOX2+ est supérieur dans les embryons traités, tandis que le pourcentage de cellules SOX17+ est inférieur dans les embryons traités. Cependant, aucune de ces différences n'est significative (Fig. R6A). Les embryons cultivés en présence d'A366 semblent eux présenter un retard de croissance : ils sont plus petit que les contrôles, et ils ont un plus faible nombre de cellules SOX17+. De manière intéressante, les nombres de cellules SOX2+, et doubles négatives sont égaux entre les embryons contrôles et traités. La réduction de la taille des embryons est donc due à une perturbation de l'apparition du PE (Fig. R6B).

Pour aller plus loin dans l'analyse, je me suis ensuite intéressé à l'évolution du nombre de cellules SOX2+ et SOX17+ en fonction du nombre total de cellules par embryon. On peut observer que dans les embryons contrôles le nombre de cellule SOX2+ augmente légèrement avec l'augmentation du nombre total de cellules. Les premières cellules SOX17+ apparaissent dans des embryons d'environ 300 cellules. Le nombre de cellules SOX17+ croît ensuite rapidement avec l'augmentation du nombre de cellules totales des embryons.

Dans les embryons cultivés en présence d'A366, on n'observe pas de différence dans l'accroissement du nombre de cellules SOX17+. Les coefficients directeurs des courbes sont très proches (Fig. R6C). En revanche, lorsqu'on compare les courbes du nombre total de cellules en fonction du nombre de cellules SOX2+ par embryon, on constate que le coefficient de régression est négatif dans les embryons traités avec A366. Il est possible que le traitement par A366 ait un impact négatif sur les cellules de l'épiblaste. J'ai effectivement observé de la mort cellulaire dans les embryons, notamment dans l'ICM (Fig. R6D). A366 semble donc ralentir le développement des embryons en culture. Dans les embryons de souris, le KO du gène *Ehmt2* maternel conduit également à une réduction du nombre de cellules Sox17+, et à une diminution du nombre total de cellules de l'embryon (Zylicz et al., 2018). Ce ralentissement du développement embryonnaire s'explique au moins en partie par une augmentation de l'apoptose dû aux dommages à l'ADN (Zylicz et al., 2015 ; Zylicz et al., 2018). Les auteurs ont aussi observé une réduction du nombre de cellules de l'ICM à la fois par la réduction du nombre de cellules Sox17+, mais aussi par l'augmentation du nombre de cellules Sox17-/Sox2- dans l'ICM (Zylicz et al., 2018). Le KD de *Ehmt1* conduit également à un ralentissement du développement à cause de l'augmentation de l'apoptose. De plus, le KD de *Ehmt1* perturbe l'expression des gènes *Pou5f1*, *Sox2* et *Nanog*. Nos résultats sont donc cohérents avec ce qui est observé chez la souris (Huang et al., 2015). L'inhibition des enzymes EHMT1 et 2 entrainerait donc un ralentissement du développement embryonnaire par une augmentation de l'apoptose ainsi que par une perturbation de l'expression des gènes contrôlant les lignages de l'ICM.

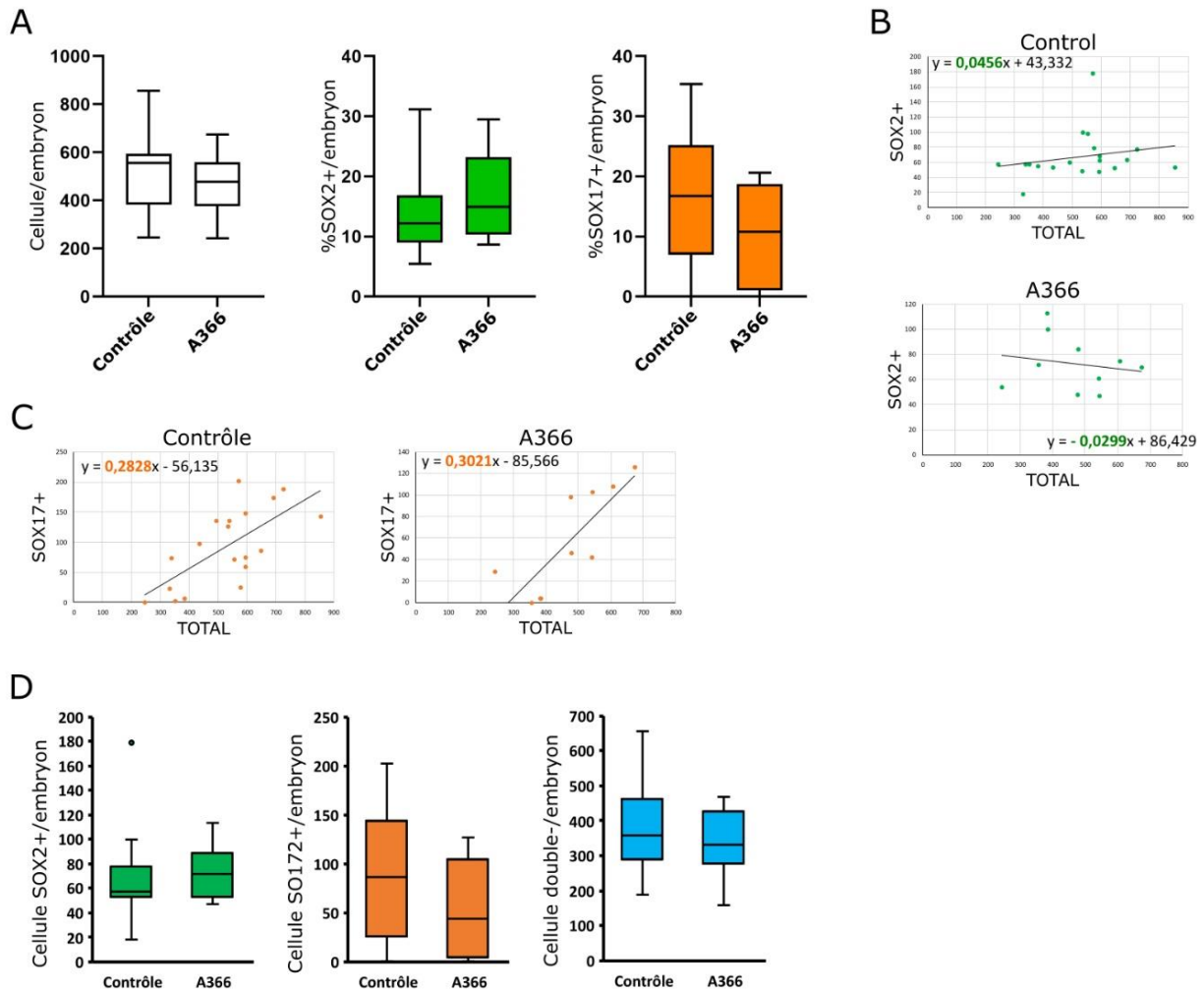


Figure R6 : Effet de l'inhibition de la méthylation de H3K9 sur la balance des lignages cellulaires d'embryons de lapin. (A) Nombre total de cellules, pourcentage de cellules SOX2 positives et pourcentage de cellules SOX17 positives, par embryon, au bout de 5 jours de culture, avec ou sans 48h de traitement par A366 à 10 μ M. (B-C) Graphique de dispersion du nombre de cellules SOX2 positives sur le nombre total de cellules (B) ou du nombre de cellules SOX17 positives (C) dans des embryons après 5 jours de culture, avec ou sans 48h de traitement par A366 à 10 μ M. Sur chaque graphique, sont indiqués l'équation de la droite de régression et le coefficient de régression (en gras). (D) Nombre de cellules SOX2 positives, SOX17 positives, et doubles négatives par embryon au bout de 5 jours de culture, avec ou sans 48h de traitement par A366 à 10 μ M.

J'ai par la suite réalisé une qPCR Biomark en cellule unique sur les embryons traités ou non avec les mêmes inhibiteurs (5 jours de culture et 48h d'inhibition). Après avoir filtré les échantillons, j'ai comparé le jeu de données contenant les échantillons contrôles (n = 89) à celui contenant les échantillons traités par A366 (n = 82). J'ai appliqué le protocole d'analyse Seurat tel qu'il est décrit dans l'article précédent (Article 1, Materials and methods). Les échantillons ont été divisés en trois groupes par *K-means graphical clustering*.

FABP3 : *fatty acid binding protein 3*

Chacun de ces groupes correspond à un des trois lignages embryonnaires, annotés grâce à leur expression de gènes marqueurs de lignages : *FGF4*, *PRDM14* et *NANOG* pour l'épiblaste, *GATA6*, *OTX2* et *PDGFRA* pour le PE, et *FABP3*, *GATA2* et *CLDN4* pour le TE (Fig. R7A). J'ai également appliqué aux cellules une réduction de dimension par UMAP. On peut observer qu'il y a peu de ségrégation entre les cellules en condition contrôle et en condition A366 (Fig. R7B). J'ai ensuite appliqué une analyse différentielle entre ces cellules. On peut voir que dans les cellules contrôle, les gènes du PRC2 *EED* et *JARID2* sont surexprimés. Dans les cellules inhibées par A366, on retrouve notamment surexprimé la méthyltransférase *SUV39H1*, ainsi que les gènes de pluripotence *DPPA3*, *POU5F1* et *ZFP36* (Fig. R7C). J'ai ensuite réalisé une analyse différentielle spécifiquement sur les cellules de chaque lignage (Fig. R7D). On remarque que seul le gène *EED* est surexprimé dans l'épiblaste contrôle ; tandis que dans l'épiblaste traité par A366 on observe un grand nombre de gènes sur-exprimés, notamment les gènes spécifiques de l'ICM *KLF17* et *GDF3*, ainsi que la méthyltransférase d'H3K9 *SUV39H1* (Fig. R7E). Dans les cellules du TE cellules traitées par A366, les gènes spécifiques au TE – *CLDN4*, *GATA3* et *FABP3* – sont surexprimés. C'est encore le cas une fois de *SUV39H1*. Dans les cellules contrôles, ce sont les gènes *JARID2*, *GATA6* et le gène marqueur de l'épiblaste *KLF17* qui sont surexprimés (Fig. R7F). Dans le PE, on retrouve ici encore les gènes du PRC2 – *EED* et *JARID2* – surexprimés dans les cellules contrôles, tandis que dans les cellules traitées ce sont les gènes de pluripotence naïve *DPPA3*, *IL6ST*, *ZFP36* et *NODAL* qui sont surexprimés, ainsi que la méthyltransférase d'H3K9 *SETDB1* et la protéine du PRC1 *BMI1* (Fig. R7G).

De manière générale, il y a peu de gènes surexprimés dans les embryons contrôles, et leur différence d'expression avec les embryons traités par A366 est faible. C'est cohérent avec une levée de la répression induite par l'inhibition de la méthylation de H3K9. Dans les embryons traités par A366, on constate une surexpression de certains gènes de pluripotence dans l'ICM, ce qui expliquerait la diminution du nombre de cellules SOX17+. L'incapacité à réprimer les gènes de pluripotence bloquerait l'apparition du PE. Chez la souris, il a été montré que la délétion du gène *Ehmt2* n'impactait pas le développement du TE, et que la réduction de la taille des embryons est essentiellement due à la réduction de l'ICM (Zylicz et al., 2018). Cela semble aussi être le cas dans cette expérience. De plus, on observe une surexpression des méthyltransférase d'H3K9me2, qui peut être un effet indirect de la dérégulation du transcriptome induit par l'inhibition de EHMT1 et 2. Cela pourrait également être dû à un effet compensatoire de l'inhibition d'EHMT1/2.

Ainsi, la dérégulation du transcriptome par l'inhibition de la méthylation d'H3K9 peut expliquer le ralentissement du développement des embryons de deux manières :

1 – La perte de la méthylation d'H3K9 entraîne l'accumulation de dommages à l'ADN dus à la dérégulation d'éléments répétés du génome, comme c'est le cas chez la souris (Zylicz et al., 2015). L'accumulation de dommages à l'ADN augmente l'apoptose, ce qui réduit la taille des embryons.

2 – La perte de la méthylation d'H3K9 entraîne des perturbations dans l'allocation des lignages cellulaires qui ne parviennent plus à se spécifier correctement dans le PE ou l'épiblaste. Il a été montré

UMAP : *uniform manifold approximation and projection*

EED : *embryonic ectoderm development*

JARID2 : *jumonji and AT-rich interaction domain containing 2*

DPPA3 : *developmental pluripotency associated 3*, aussi appelé STELLA

ZFP36 : *zinc finger protein 36*

BMI1 : *B lymphoma mo-MLV insertion region 1 homolog*

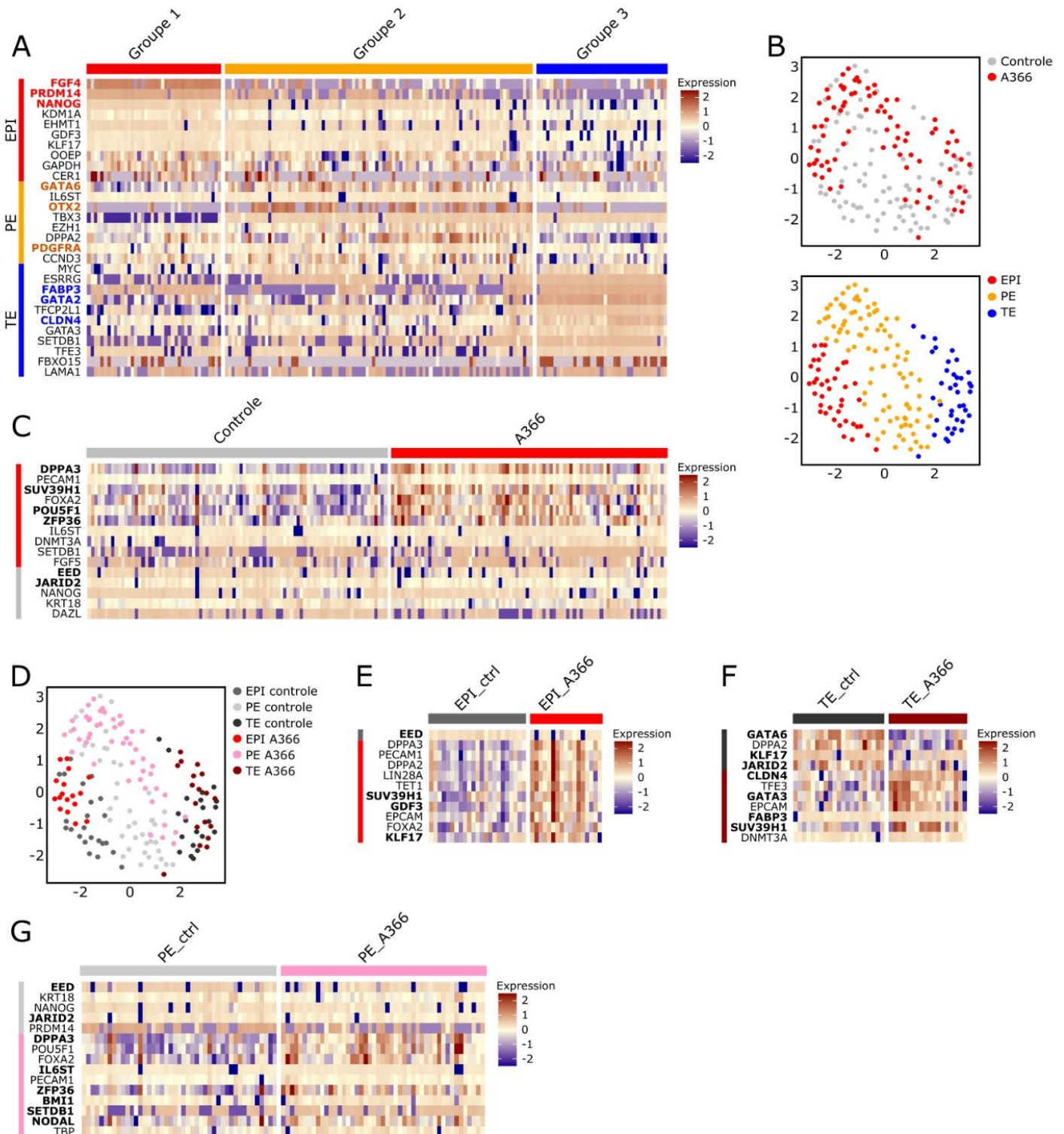


Figure R7 : Effet de l'inhibition de EHMT1 et 2 sur le transcriptome d'embryons de lapins. (A) Heatmap de l'expression des gènes différentiellement exprimés entre les groupes EPI, PE et TE. (B) Représentation en deux dimensions UMAP des échantillons, colorés en fonction de leur condition de culture ou de leur lignage embryonnaire. (C) Heatmap de l'expression des gènes différentiellement exprimés entre les échantillons contrôles et ceux avec 48h d'inhibition par 10 μ M d'A366. (D) Représentation en deux dimension UMAP des échantillons colorés à la fois en fonction de leur lignage et de leur condition de culture. (E-F) Heatmap de l'expression des gènes différentiellement exprimés entre les échantillons contrôles et ceux inhibés pendant 48h par A366 à 10 μ M, au sein du lignage EPI (E), TE (F), et PE (G). EPI : épiblaste.

que dans l'ICM d'embryon pré-implantatoire de souris, les cellules qui échouent à s'engager dans le PE ou dans l'épiblaste entre en apoptose par compétition cellulaire (Hashimoto et al., 2019). Il est possible que ce soit l'addition de ces deux mécanismes qui aboutit au phénotype observé.

B.3. L'inhibition des HDAC de classe I favorise la prolifération de l'épiblaste

Je me suis ensuite intéressé aux embryons traités avec UF010. On peut observer qu'il n'y a pas de différence significative entre les embryons traités et contrôles par rapport au nombre total de cellules, bien que ceux traités par UF010 ont en moyenne plus de cellules (en moyenne 477 cellules par embryon contrôle et 519 cellules par embryon traité). Le pourcentage de cellules SOX2+ quant à lui est significativement plus élevé dans les embryons traités avec UF010 (Fig. R8A). UF010 aurait donc un effet positif sur le nombre de cellules de l'épiblaste. Pour en savoir plus, je me suis à nouveau penché sur les courbes du nombre total de cellule en fonction du nombre de cellules SOX2+. Comme précédemment, le nombre de cellules SOX2+ augmente en fonction de l'augmentation du nombre de cellules totales par embryon. Cette-fois ci, le coefficient directeur de la courbe des embryons cultivés en présence d'UF010 est deux fois plus élevé que celui des embryons contrôles (Fig. R8B). L'inhibition des HDAC de classe I a donc bien un effet positif sur le nombre de cellules de l'épiblaste, en doublant leur vitesse de croissance. Il serait intéressant de savoir si cet accroissement se fait aux dépens des cellules du PE ou du TE, notamment par immunomarquages des protéines CDX2 et SOX17 (expérience non réalisée faute de temps).

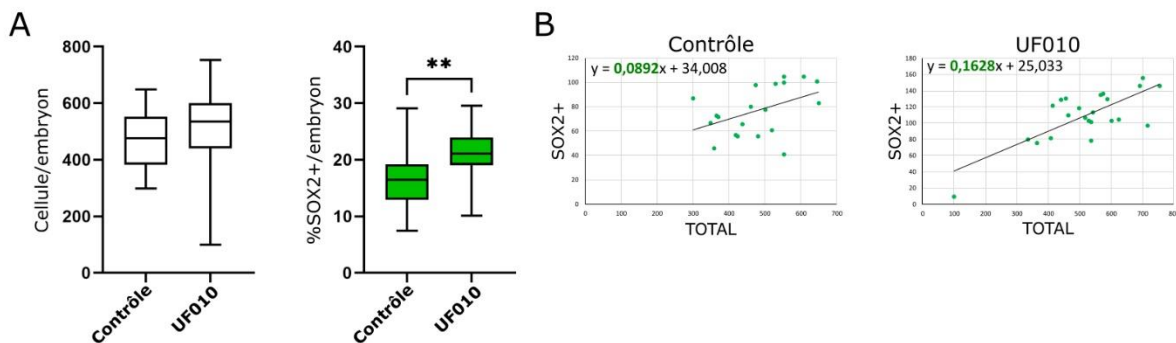


Figure R8 : Effet de l'inhibition des HDAC de classe I sur la balance des lignages d'embryons de lapin. (A) Nombre total de cellules et pourcentage de cellules SOX2 positives par embryon après 5 jours de culture, avec ou sans 48h de traitement par UF010 à 2 μ M. (B) Graphique de dispersion du nombre total de cellules sur le nombre de cellules SOX2 positives au bout de 5 jours de culture, avec ou sans 48h d'inhibition par UF010 à 2 μ M. Sur chaque graphique, sont indiqués l'équation de la droite de régression et le coefficient de régression (en vert).

L'inhibition des HDAC est très utilisée dans la reprogrammation après transfert de noyau de cellules somatiques dans un oocyte (SCNT). Le traitement d'embryons issues de SCNT améliore leur développement et la formation de blastocystes chez de nombreuses espèces, lapin inclus (Rybouchkin et al., 2006 ; J. Li et al., 2008 ; Shi et al., 2008 ; Lager et al., 2008 ; Wen et al., 2014). Cependant, l'inhibition des HDAC n'a à priori pas d'effet sur l'ICM des embryons issus de SCNT (J. Li et al., 2008 ; Cui et al., 2011 ; Chawalit et al., 2012). La répression des *Hdac1* et *2* a même des effets délétères sur le développement d'embryons murins issus de fécondation. Elle diminue la formation de blastocystes,

SCNT : somatic cell nuclear transfer

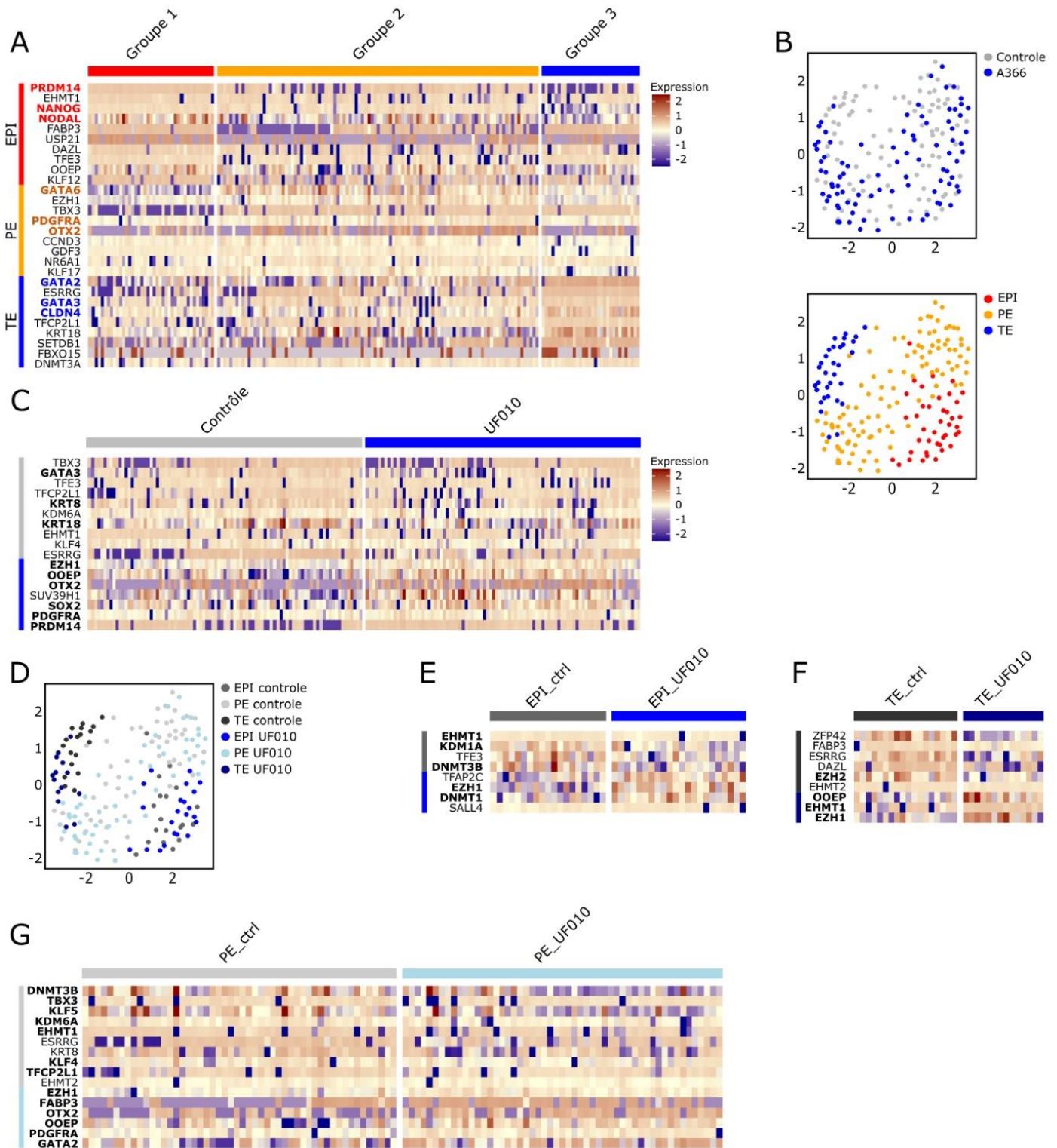


Figure R9 : Effet de l'inhibition des HDAC de classe I sur le transcriptome d'embryons de lapin. (A) Heatmap de l'expression des gènes différentiellement exprimés entre les groupes EPI, PE et TE. (B) Représentation en deux dimensions UMAP des échantillons, colorés en fonction de leur condition de culture ou de leur lignage embryonnaire. (C) Heatmap de l'expression des gènes différentiellement exprimés entre les échantillons contrôles et ceux avec 48h d'inhibition par 2 μ M d'UF010. (D) Représentation en deux dimension UMAP des échantillons colorés à la fois en fonction de leur lignage et de leur condition de culture. (E-F) Heatmap de l'expression des gènes différentiellement exprimés entre les échantillons contrôles et ceux inhibés pendant 48h par UF010 à 2 μ M, au sein du lignage EPI (E), TE (F), et PE (G). EPI : épiblaste.

notamment en augmentant l'apoptose (Ma and Schultz, 2008 ; Zhao et al., 2019). Le fait que l'on ajoute l'inhibiteur uniquement lors de la formation du blastocyste, et que UF010 inhibe spécifiquement les HDAC de classe I, peut expliquer les différences observées par rapport à ces études. En effet, dans les PSC humaines et murines, l'utilisation d'inhibiteur des HDAC facilite également la conversion à l'état naif (Ware et al., 2014 ; Guo et al., 2017). L'utilisation de l'inhibiteur des HDAC de classe I UF010 aurait donc un effet positif sur les cellules embryonnaires pluripotentes naïves.

J'ai ensuite comparé le jeu de données des embryons contrôles (n = 89) à celui des embryons inhibés par UF010 (n = 89). Comme précédemment, j'ai analysé les données à l'aide de Seurat, et identifié les trois lignages embryonnaires grâce à la surexpression de marqueurs de lignages.

On observe 3 groupes de cellules : un groupe qui surexprime notamment les gènes de pluripotence *PRDM14*, *NANOG* et *NODAL*, assigné comme étant de l'épiblaste ; un groupe qui surexprime les gènes du PE *GATA6*, *PDGFRA* et *OTX2*, annoté comme étant du PE ; et enfin un groupe de cellules exprimant les gènes du TE *GATA2*, *GATA3* et *CLDN4*, annoté comme étant du TE (Fig. R9A). J'ai appliqué aux cellules une réduction de dimension par UMAP.

On peut voir qu'il n'y a presque pas de ségrégation entre cellules traitées ou contrôles (Fig. R9B). J'ai réalisé dans un premier temps une analyse différentielle entre les cellules contrôles et inhibées par UF010. On observe que dans les embryons contrôles il y a une surexpression des gènes marqueurs du TE *GATA3*, *KRT8* et *18*. Dans les embryons soumis au traitement par UF010, les gènes de pluripotence *OOEP*, *SOX2* et *PRDM14*, ainsi que les gènes du PE *OTX2* et *PDGFRA* sont surexprimés (Fig. R9C). Dans un second temps, j'ai réalisé une analyse différentielle entre les cellules de chaque lignage contrôles et traitées par UF010 (Fig. R9D). Dans les cellules de l'épiblaste, on observe une surexpression des régulateurs de la chromatine *KDM1A*, *EHMT1* et *DNMT3B* dans les cellules contrôles. Dans les cellules traitées par UF010 se sont *enhancer of zeste 2* (*EZH1*) et *DNMT1* qui sont surexprimés (Fig. R9E). De même, on observe dans le TE que le gène *EZH2* est surexprimé dans les cellules contrôles, tandis que dans les cellules traitées ce sont les gènes *OOEP*, *EZH1* et *EHMT1* qui sont surexprimés (Fig. R9F). Dans le PE, les régulateurs de la chromatine *DNMT3B*, *EHMT1* et *KDM6A* sont surexprimés dans les cellules contrôles, ainsi que les gènes de pluripotence *TBX3*, *KLF5*, *KLF4* et *TFCP2L1*. Dans les cellules traitées par UF010, on observe une surexpression des marqueurs de lignage du TE *FABP3* et *GATA2*, ainsi que des marqueurs du PE *OTX2* et *PDGFRA*. On constate encore une fois la surexpression des gènes *EZH1* et *OOEP* (Fig. R9G).

Il est difficile de conclure sur ces résultats. La différence entre les embryons traités et non-traités sur l'expression des gènes sélectionnés est faible. Parmi les gènes différentiellement exprimés, on retrouve de nombreux régulateurs de la chromatine, signe d'un remodelage de la chromatine dans les embryons. L'accroissement du nombre de cellule SOX2+ dans les embryons traités pourrait être due à cette dérégulation de l'expression des gènes régulant l'état de la chromatine. On retrouve de manière intéressante le gène *OOEP* systématiquement surexprimé dans les cellules des embryons traités par UF010. *OOEP* est un gène de la famille du locus *KHDC1* (Pierre et al., 2007). Ces gènes sont systématiquement surexprimés à l'état naif, quel que soit le modèle considéré, *in vivo* et *in vitro* (Theunissen et al., 2014 ; Nakamura et al., 2016 ; Boroviak et al., 2018 ; Ramos-Ibeas et al., 2019 ; Molé et al., 2021 ; Article 1, Fig. 7E, 7J, 7K, S7A, S7B, S7C). Malgré cela, on ne sait pas grand-chose de leurs fonctions dans la régulation de la pluripotence, mais il est possible qu'ils participent au développement de l'épiblaste *in vivo*.

OOEP : oocyte expressed protein

Conclusion générale

Les inhibiteurs utilisés ont des effets très différents, malgré le fait qu'ils ciblent tous les deux des enzymes favorisant la formation d'hétérochromatine. L'inhibition des HDAC de classe I semble favoriser le développement des cellules de l'épiblaste, et pourrait améliorer l'efficacité de dérivation de lignée ESC de lapin. Il est connu que l'inhibition des HDAC a un effet positif sur la reprogrammation des embryons obtenus par SCNT. C'est en revanche la première fois qu'il est montré que cette inhibition a un effet positif sur les cellules pluripotentes embryonnaires *in vivo*. De plus amples analyses sont néanmoins requises afin de mieux comprendre comment l'inhibition des HDAC de classe I favorise la prolifération des cellules pluripotentes embryonnaires.

L'inhibition de EHMT1 et 2 ralentit le développement embryonnaire en perturbant la ségrégation des lignages de l'ICM, et potentiellement en induisant de l'apoptose dans celui-ci. Dans le cadre de la dérivation d'ESC, l'utilisation de l'inhibiteur A366 serait intéressante car il inhibe la formation du PE et entraîne la surexpression de gènes associés à la pluripotence naïve. Il est cependant nécessaire de trouver un moyen de diminuer son effet apoptotique, que ce soit en diminuant sa concentration ou en combinant son utilisation avec d'autres molécules, tel que l'inhibiteur UF010 par exemple.

II. Hétérochromatine, cycle cellulaire et cellules souches pluripotentes amorcées

Cibler l'hétérochromatine semble promouvoir la pluripotence naïve, et faciliterait la dérivation de lignées d'ESC s'autorenouvelant à l'état naïf. En effet, si les PSC s'autorenouvelant à l'état naïf peuvent facilement être converties à l'état amorcée en changeant leurs conditions de culture, l'inverse n'est pas vrai. Cette difficulté du passage de l'état amorcé vers l'état naïf s'expliquerait par l'existence d'une barrière épigénétique. Cette dernière empêcherait les PSC de « remonter » le continuum de pluripotence, en rendant inaccessible les *enhancers* et promoteurs des gènes du réseau étendu de la pluripotence naïve. L'utilisation de molécules ciblant les régulateurs de la chromatine a déjà permis la conversion de l'état amorcé vers l'état naïf dans d'autres espèces. L'utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHMT2 facilite ainsi la reprogrammation d'iPSC humaine (Rodriguez-Madoz et al., 2017). De plus, les cellules embryonnaires pluripotentes de l'ICM se caractérisent par la surexpression des déméthylases ciblant H3K9 (Pedersen et al., 2016 ; Kuroki et al., 2018 ; Article 1, Fig. 7B, 7E, S7A, S7B). L'utilisation d'inhibiteurs des HDAC, d'inhibiteurs des méthyltransférases d'H3K9, ou la combinaison des deux pourrait ainsi permettre et/ou faciliter la conversion de PSC de lapin à l'état naïf. Bien que l'inhibition de la méthylation d'H3K9 ait donnée des résultats mitigés sur les embryons, je me suis donc attelé à vérifier cette hypothèse.

A. Le rallongement de la phase G1 est lié à la sortie de l'état naïf de pluripotence chez le lapin

Afin d'analyser les effets des inhibiteurs sur la pluripotence, j'avais besoin que les PSC de lapin expriment une construction rapportrice fiable, pouvant m'indiquer avec précision et facilité si les PSC se rapprochent plus de l'état naïf ou amorcé. Dans les PSC murines *in vitro*, le laboratoire a montré que l'augmentation de la durée de la phase G1 est associée à un changement de l'état naïf à amorcé (Coronado et al., 2013). Nous avons donc l'idée de créer une lignée rapportrice du cycle cellulaire chez le lapin (voir le point suivant B.).

Afin de pouvoir comparer le cycle cellulaire dans cette lignée avec celui des embryons de lapin, je me suis intéressé aux données de l'Article 1. En effet, le terme KEGG « *Cell-cycle* » est enrichi dans les analyses différentiels entre l'ICM et les lignages extra-embryonnaires (Article 1, Fig. 2F, 2L). J'ai déterminé les proportions de cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire à l'aide de l'algorithme de Seurat tel que décrit précédemment (Article 1, Fig. S4G), à la fois dans le TE et le PE entre les jours 3.0 et 4.0. On constate une augmentation importante de cellules en phase G1 – par rapport à l'épiblaste précoce – dans le PE mais surtout dans le TE, où plus de 50% des cellules sont dans la phase G1. J'ai pu constater la même chose dans l'épiblaste au jour 5.0 (Fig. R10A ; Article 1, Fig. S4G). Parmi les gènes régulateurs du cycle cellulaire, un seul semble particulièrement surexprimé dans le TE et dans le PE par rapport à l'épiblaste : il s'agit de *GADD45A* (Fig. R10B-C). *Gadd45a* inhibe l'entrée en phase S, notamment en bloquant l'interaction entre *Ccnb1* et *Cdk1* dans des MEF (Jin et al., 2003). Il est également intéressant de savoir que *Gadd45a* peut inhiber la voie WNT en séquestrant la β -caténine à la membrane et facilite l'adhésion cellulaire et l'inhibition de la prolifération par contact cellulaire (Ji et al., 2007). Ces données suggèrent que les cellules de l'épiblaste, contrairement aux cellules du PE et du TE ont une phase G1 plus courte.

Pour avoir une idée précise de la vitesse de prolifération des cellules de l'épiblaste de lapin, j'ai analysé des embryons de lapins après immunomarquage de la protéine SOX2, en comptant le nombre de cellules SOX2+ par embryon aux jours 3.5 (n = 16), 4.0 (n = 21), 5.0 (n = 12), 6.0 (n = 14) et 6.6 (n = 10). Le nombre de cellules SOX2+ augmente d'un facteur ~7 entre les jours 4.0 et 5.0, alors qu'entre les jours 5.0 et 6.0 le nombre de cellules SOX2+ n'augmente que d'un facteur ~3. On peut interpréter ce

résultat comme un ralentissement du cycle-cellulaire ou une augmentation de la perte de cellules de l'épiblaste par apoptose et/ou différenciation (Fig. R10D). La ségrégation entre le PE et l'épiblaste étant à priori terminée au jour 4.0, l'hypothèse d'une perte de cellules SOX2+ par différenciation ne semble pas robuste. Le pic d'expression de *TP53* dans l'épiblaste au jour 5.0 va plutôt dans le sens soit d'un ralentissement du cycle cellulaire, soit d'une plus forte sensibilité à l'apoptose (Article 1, Fig. S4I).

Chez la souris, il a été démontré que la régulation de la taille de l'embryon ne débute qu'à la suite de l'implantation, ce qui correspond chez le lapin à l'épiblaste entre les jours 5.0 et 6.5. (Lewis and Rossant, 1982 ; Saiz et al., 2016 ; Orietti et al., 2020). Les cellules de l'épiblaste post-implantatoire sont en compétition les unes avec les autres, ce qui se traduit par une forte apoptose. Ce mécanisme permettrait à la fois de réguler finement la taille de l'embryon, de s'assurer de sa qualité et de se débarrasser des cellules s'engageant dans la différenciation trop précocement (Claveria et al., 2013 ;

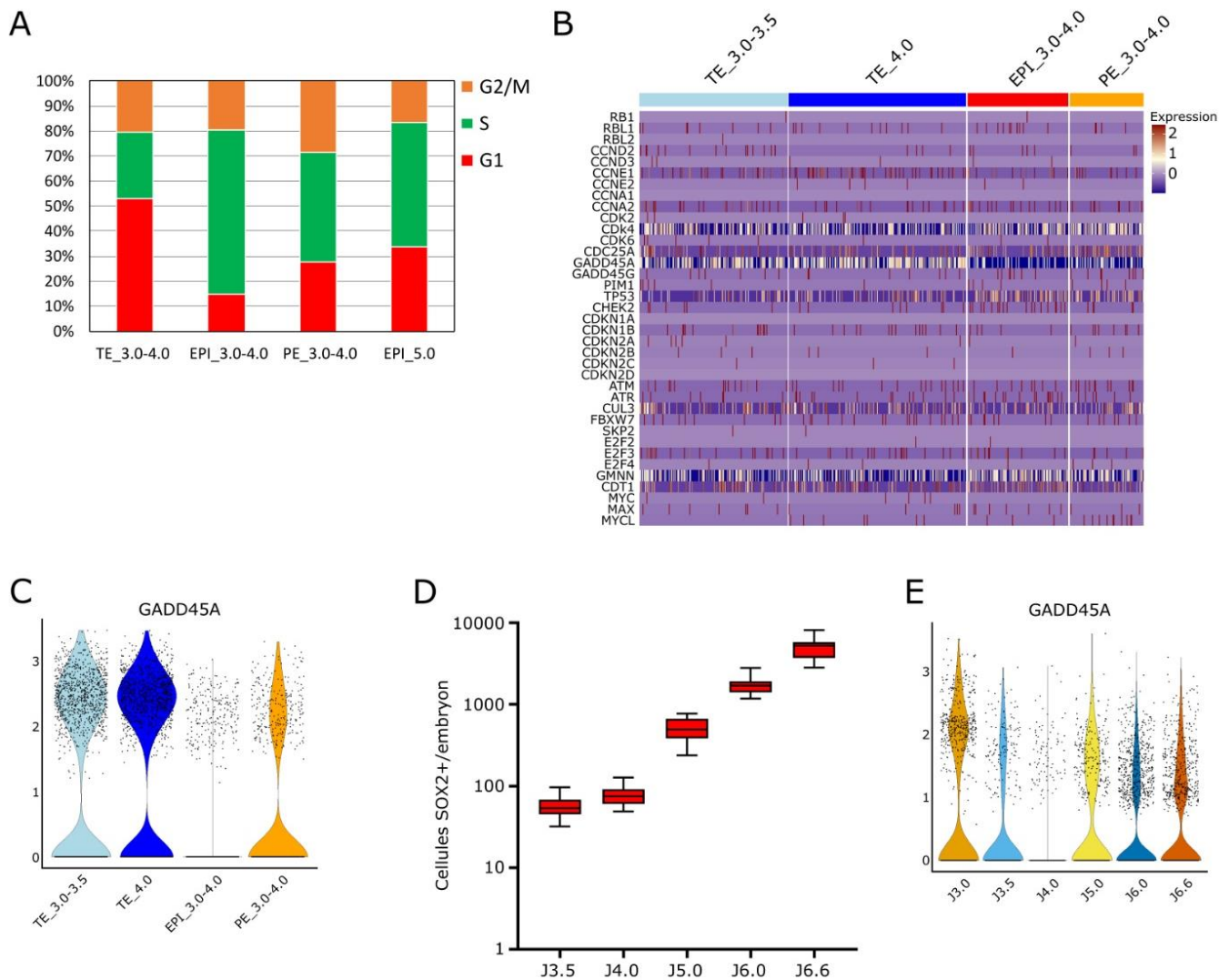


Figure R10 : Régulation du cycle-cellulaire et sortie de la pluripotence naïve. (A) Pourcentage de cellules du TE, de l'EPI et du PE entre les jours 3.0 et 4.0, ainsi que de l'EPI au jour 5.0, en phase G1, S et G2/M, calculés par l'algorithme de régression et de score du cycle cellulaire de Seurat. (B) Heatmap (carte thermique) de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire dans les cellules du TE, de l'EPI et du PE aux jours 3.0 à 4.0. (C) Diagramme en violon de l'expression du gène *GADD45A* dans les cellules du TE, de l'EPI et du PE aux jours 3.0 à 4.0. (D) Diagrammes en boîtes du nombre de cellules présentant un marquage SOX2 par embryon, en échelle logarithmique 10. (E) Diagramme en violon de l'expression du gène *GADD45A* dans les cellules embryonnaires pluripotentes aux jours 3.0 à 6.6. TE : trophoctoderme ; EPI : épiblaste ; PE : endoderme primitif.

Diaz-Diaz et al., 2017 ; Bowling et al., 2018). Par la suite entre les jours 6.0 et 6.6, il y a un accroissement du nombre de cellules SOX2+ d'un facteur 3 en 15h, ce qui veut dire que la vitesse de croissance de l'épiblaste à ce stade est redevenue équivalente à celle de l'épiblaste entre les jours 4.0 et 5.0 (Fig. R10D). Cela corrèle avec la forte baisse du pourcentage de cellule en phase G1 entre les jours 5.0 et 6.0-6.6 (Article 1, fig. S4G). C'est également cohérent avec ce qui est connu chez la souris : il a en effet été observé qu'au moment de l'implantation l'épiblaste connaît un pic de prolifération, associé à une réduction des phases G1 et G2 (Snow and Bennett, 1978 ; Solter et al., 1971 ; Guzman-Ayala et al., 2015).

Lorsqu'on s'intéresse à l'expression de *GADD45A* dans les cellules embryonnaires pluripotentes (Article 1, PLURI dataset), on observe une forte réduction du nombre de cellules exprimant *GADD45A* dans l'épiblaste au jour 4.0, suivi d'un retour dans l'épiblaste aux jours 5.0 à 6.0 à une expression presque équivalente à celle observée dans l'ICM au jour 3.5 (Fig. R10E). La sortie de la pluripotence naïve s'accompagne d'une augmentation de l'expression de *GADD45A*. Comme chez la souris et l'homme, il semblerait que le rallongement de la phase G1 soit à la fois associé à la sortie de la pluripotence par différenciation et à la progression dans le continuum de pluripotence. La longueur de la phase G1 est ainsi un excellent indicateur du niveau de pluripotence dans lequel les cellules de lapin s'autorenouvèlent.

B. L'utilisation combinée d'inhibiteurs épigénétiques permet un raccourcissement de la phase G1 et du cycle-cellulaire total dans des cellules souches pluripotentes induites de lapin

L'ouverture de la chromatine par des inhibiteurs semble être corrélée à la pluripotence naïve *in vivo*. L'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes favorisant la formation d'hétérochromatine devrait donc rapprocher les PSC de l'état naïf. Afin de tester cette hypothèse, j'ai sélectionné plusieurs inhibiteurs des méthyltransférases d'H3K9 EHMT1/2, A366 et UNC0642. J'ai également choisi l'inhibiteur des HDAC de classe I UF010, ainsi qu'un inhibiteur des HDAC classe II BRD4354. Dans un premier temps, j'ai testé l'efficacité de ces inhibiteurs sur la lignée B19 d'iPSC de lapin en condition de culture amorcée pendant 96h et 192h. Les inhibiteurs ont été utilisés aux concentrations suivantes, choisies en fonction de l'IC50 de l'inhibiteur d'après les informations du fournisseur : 2 µM pour A366, UNC0642 et UF010, et 5 µM pour BRD4354. Les modifications d'histones H3K9ac et H3K9me3 ont été analysées par immunofluorescence. On peut observer qu'après 96h de traitement par BRD4354 ou UF010, il y a une augmentation significative de l'intensité de la modification H3K9ac (Fig. R11A). De même, il y a une augmentation significative de l'intensité de la modification H3K9ac après 192h d'inhibition (Fig. R11B). Pour les inhibiteurs A366 et UNC0642, on observe une diminution significative de l'intensité de la modification H3K9me3, aussi bien après 96h qu'après 192h de traitement. Cependant, l'effet d'UNC0643 semble moindre que celui d'A366 sur la diminution d'H3K9me3, nous ne l'avons donc pas utilisé dans les expériences suivantes (Fig. R11C-D).

GADD45A : growth arrest and DNA damage inducible alpha

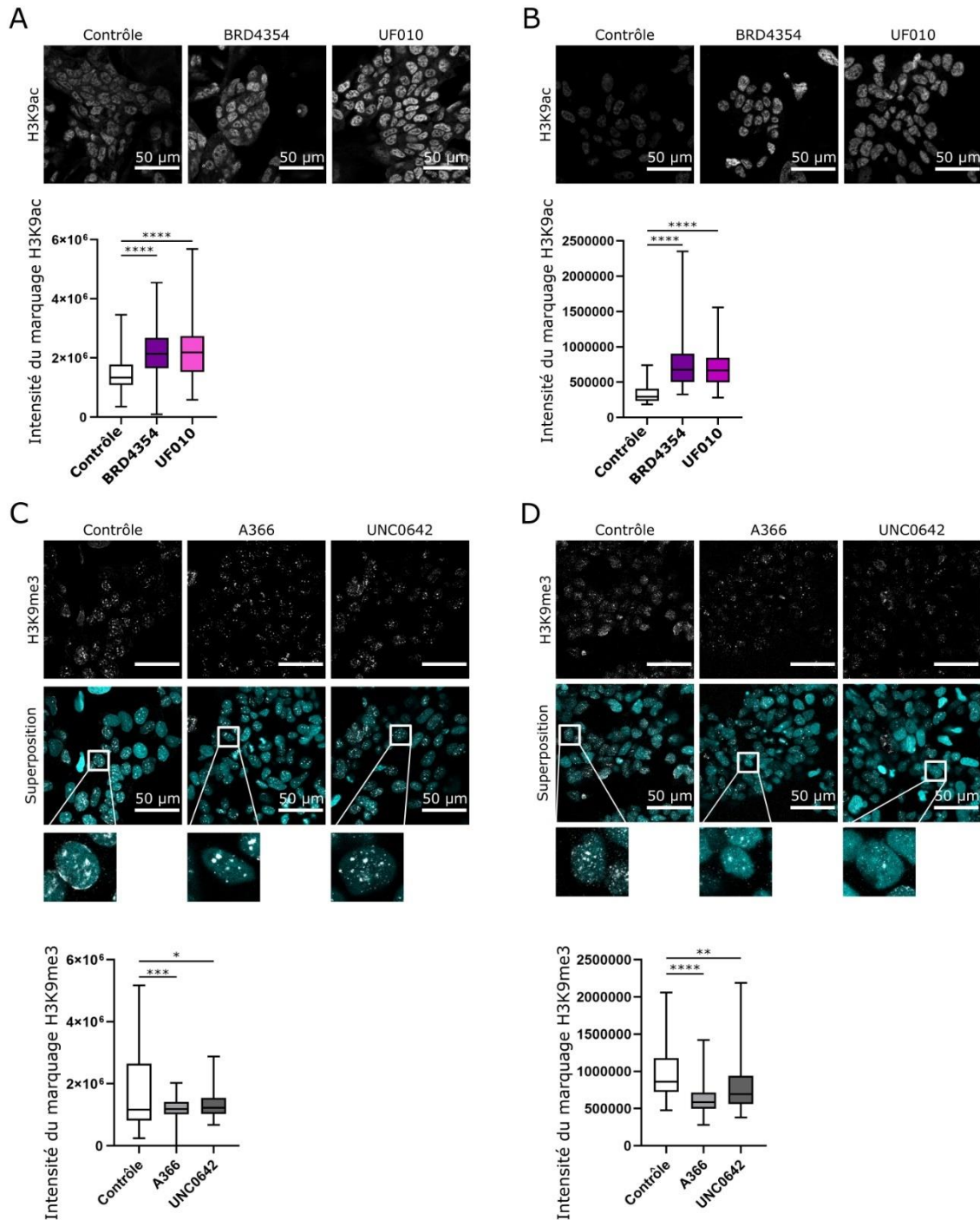


Figure R11 : Inhibition de formation d'hétérochromatine sur des iPSC de lapin. (A-B) Intensité du marquage de H3K9ac dans des iPSC de lapin en milieu amorcé après traitement avec 5 μ M de BRD4354 et 2 μ M d'UF010 pendant 96h (A) et pendant 192h (B). (C-D) Intensité du marquage de H3K9me3 dans des iPSC de lapin en milieu amorcé après traitement avec 2 μ M d'A366 et 2 μ M d'UNC0642 pendant 96h (C) et pendant 192h (D). Les figures (C) et (D) incluent une superposition des immunomarquages avec la contre-coloration de l'ADN au DAPI (bleu).

Sachant que la durée de la phase G1 dans les PSC murines *in vitro* est associée à la pluripotence (Coronado et al., 2012) et que la vitesse de prolifération ainsi que le nombre de cellules dans la phase G1 varient dans l'épiblaste de lapin à la sortie de l'état naif, j'ai voulu évaluer l'effet des inhibiteurs sur le cycle cellulaire des iPSC de lapin. J'ai fait l'hypothèse que si les inhibiteurs permettent de faire

remonter le continuum de pluripotente aux cellules amorcées, on devrait observer une réduction de la durée de la phase G1. A l'inverse, un effet adverse des inhibiteurs se traduirait en une augmentation de la durée de la G1. Pour tester cette hypothèse, j'ai créé une lignée rapportrice du cycle-cellulaire à l'aide du système FUCCI (Sakaue-Sawano et al., 2017). Cette lignée exprime la protéine de fusion hCDT1-mCherry, qui est synthétisée au début de la phase G2, et dont la dégradation abrupte marque la fin de la phase G1. Elle exprime aussi la protéine de fusion hGMNN-mVenus, qui est synthétisée au début de la phase S, et qui est abruptement dégradée lors de la mitose. La synthèse et la dégradation successive de ces protéines couplées à des fluorophores permettent ainsi le suivi des différentes phases du cycle-cellulaire dans chaque cellule (Sakaue-Sawano et al., 2017). Enfin, j'ai rajouté la protéine de fusion histone 2A-mTurquoise dans cette lignée, afin de suivre les noyaux des cellules (Fig. R12A).

J'ai cultivé les iPSC de lapin en présence des inhibiteurs pendant 144 heures, soit 6 jours. Au bout de ces 6 jours, j'ai passé les cellules sous un microscope à fluorescence, qui permet de suivre l'évolution de la fluorescence des cellules au cours du temps (time-lapse). Les cellules sont restées sous le microscope time-lapse 24 heures de plus, toujours en milieu amorcé et en présence des inhibiteurs (Fig. R12B). Lorsque j'ai traité les cellules pendant 168h avec A366, BRD4354 et UF010, aucun n'a significativement réduit la durée totale du cycle-cellulaire. Il en est de même pour la durée de la G1. On note même un allongement de la durée de la phase G1 dans les cellules traitées par A366, ainsi qu'un allongement de la durée du cycle-cellulaire. Cela peut s'expliquer par le fait que l'inhibition de EHMT1/2 entraîne des perturbations de la mitose et de la progression du cycle-cellulaire (McManus et al., 2006 ; Mathison et al., 2017 ; Urrutia et al., 2020). Il est important de noter que les iPSC de lapin en condition de culture amorcé ont déjà un cycle-cellulaire d'en moyenne 10,7h et une G1 d'une durée moyenne de 2,1h (Fig. R12C). C'est très proche des ESC de souris cultivées en condition naïve 2i-LIF, qui ont un cycle-cellulaire de 10h en moyenne. Cependant, dans ces ESC murines, la phase G1 est encore plus courte, d'une durée moyenne d'une heure (Sakaue-Sawano et al., 2017). Cela signifie qu'il est possible de réduire davantage la durée de la phase G1 en théorie. Nous avons décidé d'aller plus loin et d'utiliser en combinaison l'inhibiteur A366 avec soit UF010 ou BRD4354 sur nos cellules pendant 168h. On observe alors que la condition A366 + BRD4354 n'a pas d'effet significatif sur la durée de la phase G1 ni sur la longueur du cycle-cellulaire totale, bien que la durée de la phase G1 soit plus courte dans l'absolu (1,94h au lieu de 2,11h). En revanche la combinaison A366 + UF010 réduit significativement la durée de la phase G1 et la longueur totale du cycle-cellulaire (Fig. R12D). Cet effet d'UF010 peut-être attribué au fait que ce sont les HDAC de classe I qui sont le plus exprimées dans l'épiblaste tardif chez le lapin, notamment HDAC1 et 2 (Fig. R4D).

En conclusion, les inhibiteurs utilisés seuls ne raccourcissent pas la longueur de la phase G1, bien qu'ils puissent avoir potentiellement d'autres effets bénéfiques sur l'autorenouvellement des iPSC de lapin. En revanche, leur combinaison, notamment celle d'A366 et UF010, permet un raccourcissement significatif du cycle-cellulaire et de la phase G1. J'ai montré précédemment qu'UF010 favorise la prolifération des cellules de l'épiblaste de l'embryon de lapin, tandis qu'A366 promeut l'expression de gènes associés à la pluripotente naïve. Il est intéressant que seule leur utilisation combinée a un effet sur le cycle cellulaire. Cependant, je n'ai pas pu observer de changement morphologique notable des colonies. Bien que je n'ai pas réalisé d'analyse moléculaire plus poussée, il est très probable que les cellules s'autorenouvèlent toujours à l'état amorcé. Il serait

FUCCI : *fluorescent, ubiquitination-based cell cycle indicator*

hCDT1 : *human chromatin licensing and DNA replication factor 1*

hGMNN : *human geminin DNA replication inhibitor*

intéressant de combiner l'utilisation d'A366 et UF010 avec différents milieux de conversion à l'état naif, tel qu'ils sont décrits dans l'article 3 (Afanassieff et al., 2020 *Experimental cell research* – Article 3).

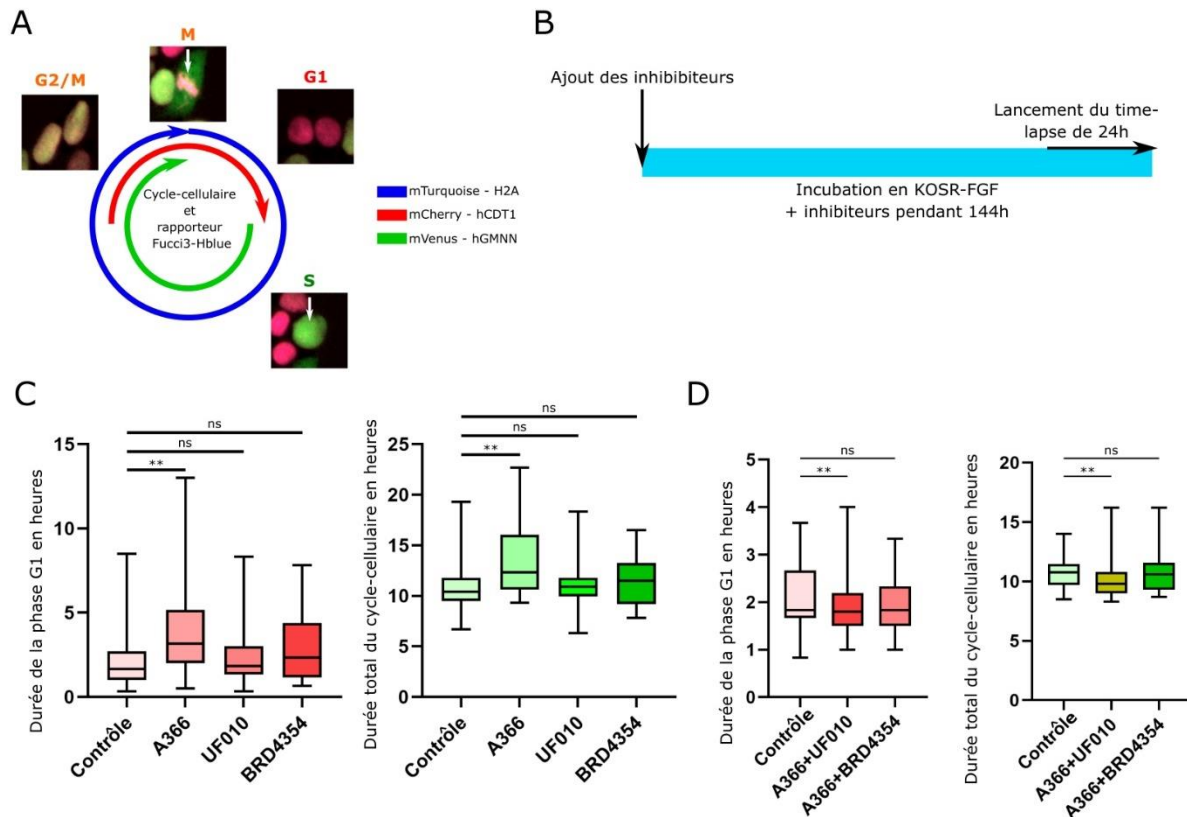


Figure R12 : Inhibition de formation d'hétérochromatine sur une lignée d'iPSC de lapin rapportrice du cycle cellulaire. (A) Schéma représentant la présence des trois fluorophores pendant les différentes phases du cycle cellulaire, accompagné d'exemples pour la lignée de iPSC de lapin exprimant les transgènes Fucci3 et H2A-blue, appelée F3Hblue. (B) Schéma résumant le protocole de mesure du cycle cellulaire des iPSC de lapin en présence d'inhibiteurs. (C-D) Durée de la phase G1 et durée totale du cycle cellulaire dans des cellules F3Hblue mises sous microscope à fluorescence time-lapse pendant 24h en condition amorcée et traitées pendant 144h avec 2 μ M d'A366, 2 μ M d'UF010 ou 5 μ M de BRD4354 (C) ; ou avec un traitement combiné de 2 μ M d'A366 et de 2 μ M d'UF010 ou 5 μ M de BRD4354 (D).

Bien que ces milieux aient jusqu'ici échoué à convertir les PSC de lapin vers l'état naif, l'ouverture de la chromatine permettrait probablement de rendre accessible les cibles des voies de signalisation activée dans ces milieux, et ainsi de réactiver le réseau étendu de la pluripotence naïve.

Discussion

Partie 1 – Vers la capture de l'état naïf chez le lapin : perspectives à court et moyen termes

L'étude du continuum de pluripotence chez le lapin révèle de nouveaux gènes d'intérêts. Certains de ces gènes, comme *MKRN1*, *HSP90AA1*, *KDM5B* et les gènes du locus *KHDC1* sont des marqueurs de l'état naïf chez la souris et le macaque. Il serait intéressant de voir si leur surexpression faciliterait la conversion de PSC de lapin de l'état amorcé à l'état naïf. Il serait également intéressant de voir si ces gènes sont surexprimés dans les cellules embryonnaires naïves d'autres mammifères. Une étude de scRNA-seq sur des embryons d'opossums a été récemment publiée (Mahadevaiah et al., 2020). D'après cette étude le gène *HSP90B1*, paralogue de *HSP90AA1*, est surexprimé dans l'épiblaste précoce de l'embryon d'opossum. Ce résultat confirme l'importance de la protéine HSP90 dans la régulation de l'état naïf chez les mammifères.

En ce qui concerne les gènes du locus *KHDC1*, leur fonction reste encore mystérieuse, notamment dans leur régulation de la pluripotence : la délétion de *OOEP* ou *DPPA5* n'empêche pas l'autorenouveau des ESC de souris, mais perturbe leur dérivation (Amano et al., 2006 ; Zhao et al., 2013). Il est possible que ces protéines soient redondantes entre-elles. Une étude approfondie du rôle de ces protéines dans le contrôle de la pluripotence sera donc nécessaire.

Notre étude révèle aussi que, malgré une relativement faible proximité transcriptomique, le continuum de pluripotence chez le lapin partage de nombreuses caractéristiques avec les autres espèces : le changement d'un métabolisme majoritairement OXPHOS à un métabolisme dépendant de la glycolyse ; le remodelage de la régulation du cycle cellulaire et le rallongement de la phase G1 ; l'inactivation progressive d'un des deux chromosomes X chez les individus femelles ; l'augmentation de la méthylation de l'ADN ; et enfin, de manière générale, la propagation de l'hétérochromatine. Il est intéressant d'observer que parmi les gènes surexprimés dans les cellules embryonnaires naïves, de nombreux gènes codent pour des protéines régulant l'organisation de la chromatine. Beaucoup de ces gènes sont d'ailleurs aussi surexprimés à l'état naïf chez le macaque et/ou la souris (Article 1, Fig., 7F, 7J, 7K, S7A-C).

D'ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes favorisant la formation d'hétérochromatine a permis d'augmenter l'expression de gènes de pluripotence dans l'embryon de lapin, d'inhiber la formation du PE et de favoriser la prolifération des cellules de l'épiblaste. En théorie, ces caractéristiques devraient faciliter la capture des ESC de lapin à l'état naïf. Il serait donc intéressant de voir l'effet combiné des inhibiteurs, et si cet effet permettrait d'empêcher la progression des ESC de lapin vers l'état amorcé.

J'ai également pu montrer l'importance du cycle cellulaire et de sa régulation dans la pluripotence chez le lapin. La sortie de l'état naïf des cellules embryonnaires s'accompagne en effet d'un rallongement du cycle cellulaire et d'une augmentation du nombre de cellules en phase G1. Ainsi, la longueur de la phase G1 semble être un bon indicateur de la position des PSC le long du continuum de pluripotence. Dans mes expériences sur le cycle cellulaire des PSC de lapin à l'état amorcé, j'ai observé que la combinaison de l'inhibition des HDAC de classe I et des méthyltransférases d'H3K9 permettait le raccourcissement du cycle cellulaire, et notamment de la phase G1. Ce résultat est prometteur et il sera intéressant d'étudier la synergie entre les inhibiteurs des enzymes favorisant la formation d'hétérochromatine et différents milieux de capture de l'état naïf.

La manipulation de l'hétérochromatine apparaît comme un outil puissant pour contrôler la pluripotence et sa régulation est à priori conservée entre les différentes espèces modèles. De même, il semble que le rallongement progressif de la phase G1 le long du continuum de pluripotence soit conservé. Mon travail sur les mécanismes de la pluripotence chez le lapin pourrait donc servir, à plus

long terme, de base pour l'étude de ces mêmes mécanismes chez d'autres espèces où les cellules pluripotentes *in vivo* sont plus inaccessibles.

Partie 2 – Comparaison des continuums de pluripotence chez les mammifères euthériens

I. L'unicité des mécanismes du développement embryonnaire

Le développement embryonnaire péri-implantatoire chez le lapin est relativement similaire à celui des autres mammifères euthériens modèles (Fig. D1A-E). Je voudrai souligner 5 étapes remarquablement conservées de ce développement embryonnaire :

1. La polarisation des blastomères et l'héritage asymétrique d'éléments du cytosquelette permettent la ségrégation entre les cellules externes et internes de la morula. Dans les premières, la polarisation des cellules entraîne l'inactivation de la voie HIPPO, et la nucléarisation de YAP et TAZ. YAP, en coopération avec d'autres facteurs de transcription, comme TEAD4 et RBPJ, active alors le programme transcriptionnel du TE. Dans les cellules internes de la morula, l'absence de YAP nucléaire conduit à l'expression de SOX2 et des gènes de pluripotence (Fig. D1A).

2. Dans l'ICM, les cellules coexpriment dans un premier temps, plus ou moins fortement, GATA6 et NANOG. L'expression de l'un prend ensuite le dessus sur l'autre et, peu à peu, les cellules n'expriment plus qu'un seul des deux facteurs. Les cellules exprimant fortement GATA6 deviennent les précurseurs du PE tandis que celles exprimant fortement NANOG deviennent les précurseurs de l'épiblaste. Les précurseurs de l'épiblaste expriment FGF4, qui va activer la voie FGF-ERK dans les précurseurs du PE et enclencher le programme transcriptionnel endodermique (Fig. D1B).

3. A la suite de la ségrégation du PE et de l'épiblaste, ce dernier va sortir graduellement de l'état naïf de pluripotence. Cette sortie s'accompagne d'un remodelage de la chromatine et d'un changement du réseau étendu de pluripotence. Les différentes voies de signalisation irriguant le réseau de pluripotence changent de cibles du fait des réarrangements épigénétiques dans les *enhancers* et les promoteurs. En parallèle, les cellules de l'épiblaste accumulent de l'hétérochromatine, et passent d'un métabolisme majoritairement dépendant de l'OXPPOS à un métabolisme exclusivement dépendant de la glycolyse. Enfin, la sortie de l'état naïf de pluripotence entraîne un rallongement de la phase G1 (Fig. D1C).

4. La sécrétion de protéines BMP par les tissus adjacents au VisE entraîne la restriction de l'expression des molécules inhibitrices DKK1, LEFTY et CER1 au centre de celui-ci. Des mouvements cellulaires provoquent la polarisation du VisE et la formation de l'AVE. Ce dernier restreint la zone d'apparition de l'épiblaste postérieur par la sécrétion d'inhibiteurs des voies WNT, NODAL et BMP. Cette polarisation de l'épiblaste entraîne la création d'une niche environnementale où il y a une forte concentration de ligands BMP, NODAL et WNT à la bordure entre l'épiblaste postérieur et les tissus extra-embryonnaires. Dans cette niche, les précurseurs des PGC apparaissent de manière dispersée, en « poivre-et-sel » (Fig. D1D).

5. L'extension progressive de l'épiblaste conduit à la séparation des zones d'activités des voies BMP/WNT d'un côté et de NODAL de l'autre. Cette séparation marque la fin de la compétence de l'épiblaste à former des PGC. Les cellules de la partie la plus postérieure de l'épiblaste entrent en EMT et s'engagent dans le lignage mésodermique sous l'action des voies BMP et WNT. Dans la partie

antérieure de l'épiblaste postérieur, l'activité de NODAL permet la formation des précurseurs du DE (Fig. D1E).

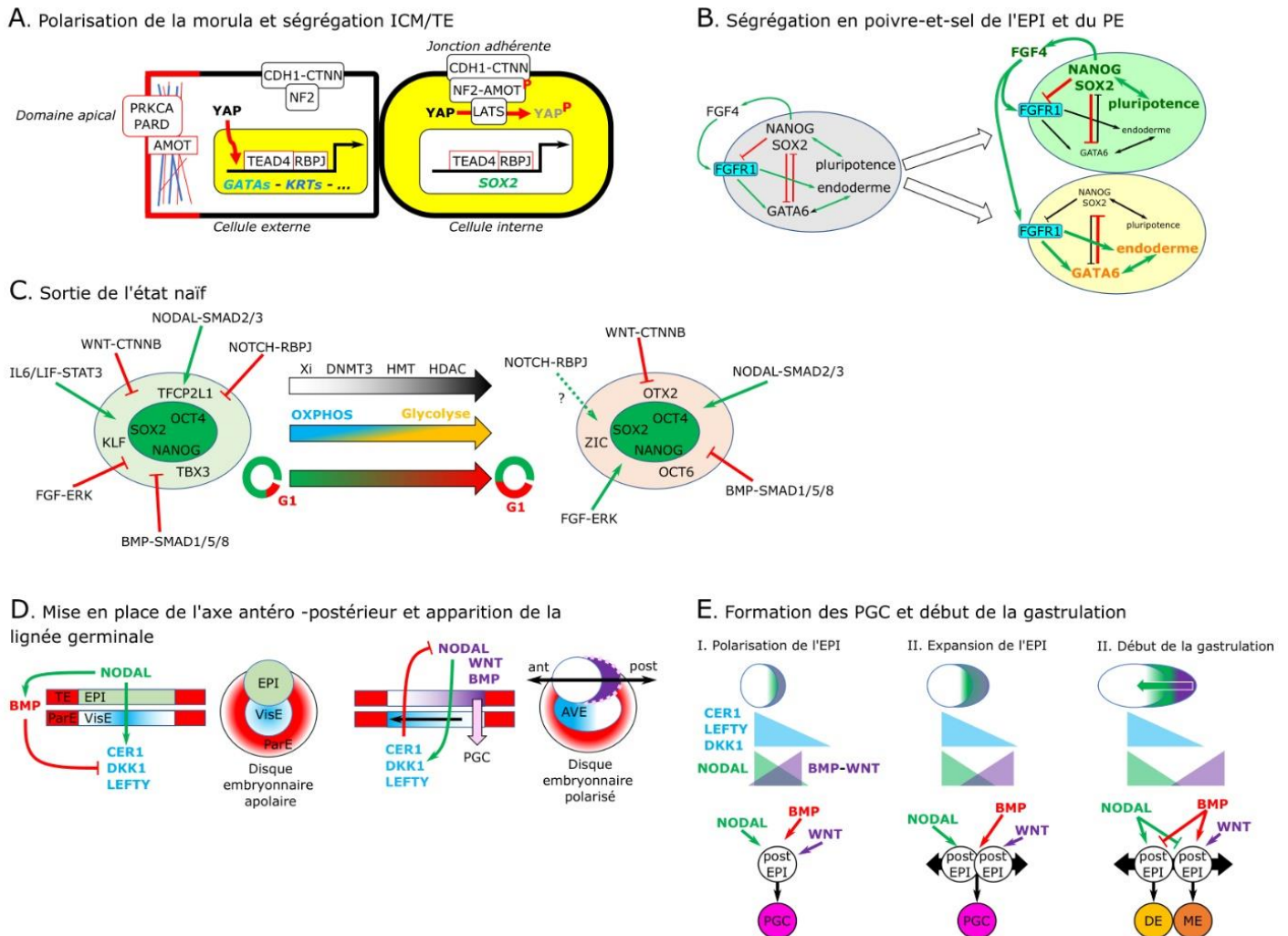


Figure D1 : Schémas récapitulant les principales étapes du développement embryonnaire péri-implantatoire. (A) Schéma représentant l'activité de la voie HIPPO dans les cellules internes et externes de la morula au moment de la ségrégation ICM/TE. (B) Schéma représentant la balance entre l'engagement vers l'EPI ou le PE dans l'ICM. (C) Schéma représentant les changements multiples entourant la sortie de l'état naïf de l'épiblaste. (D) Schéma représentant le contrôle de la polarisation de l'épiblaste et l'apparition de la lignée germinale par les voies NODAL, WNT et BMP. (E) Schéma représentant le passage progressif d'un épiblaste postérieur capable de générer des PGC à un épiblaste postérieur régionalisé selon l'axe antéro-postérieur et s'engageant soit vers le DE soit vers le mésoderme. EPI : épiblaste.

Bien que l'enchaînement des différentes étapes du développement embryonnaire péri-implantatoire soit conservé entre les mammifères euthériens, lorsque l'on se focalise sur chaque étape une à une, des divergences notables apparaissent d'une espèce à l'autre.

II. Divergence dans la mise en route du génome embryonnaire et destin cellulaire

L'EGA débute de manière variable chez les mammifères, cependant la majorité des espèces ont leur EGA entre les stades 4- et 8-cellules. Chez les rongeurs, en revanche, elle a lieu remarquablement tôt, dès le stade 2-cellules. Ce décalage de l'EGA chez la souris permettrait une ségrégation des lignages et une restriction de leur potentiel plus rapides.

En effet, lors de la ségrégation entre le TE et l'ICM, *Cdx2* s'exprime dans certains blastomères dès le stade 4-cellules chez la souris. Chez le lapin, les primates, le bovin et le porc, *CDX2* n'est exprimé que tardivement dans le TE. De même, la présence de *OCT4* n'est restreinte à l'épiblaste que tardivement chez les espèces non-murines, contrairement à la souris où *Oct4* n'est exprimé que dans l'ICM dès la cavitation de l'embryon.

Chez les mammifères non-murins, il y a donc une corrélation entre la restriction tardive de l'expression de *OCT4* et de *CDX2* à leur lignage respectif, et le potentiel des cellules de l'ICM à se différencier en TE. Ainsi, l'incapacité des PSC à l'état naïf à se différencier en TE semble être spécifique au modèle souris. Il est donc probable que les PSC de lapins à l'état naïf soient également capables de contribuer au TE. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse en suivant en temps réel les cellules de l'épiblaste dans l'embryon de lapin pour voir si elles contribuent au TE jusqu'aux jours 4.0 et 5.0 de développement. Cependant, cette étude nécessiterait de développer au préalable une nouvelle technique de culture d'embryons de lapin. En effet, au bout de 5 jours de culture, les embryons de lapin s'arrêtent de croître et restent bloqués à un stade équivalent au jour 4.0 post-coïtum dans l'utérus (Fabreges et al., 2018 ; données personnelles non-publiées).

III. Divergence des voies permettant l'autorenouveaulement à l'état basal de pluripotence chez la souris

L'action des différentes voies de signalisation au cours du développement embryonnaire précoce est semblable d'une espèce à l'autre. Cependant, la réponse à l'inhibition ou l'activation de ces voies peut varier fortement. Ainsi, c'est le ligand *Lif* et son récepteur *Lifr* qui active la voie *Jak-Stat3* permettant la survie de l'ICM chez la souris. Chez les autres espèces, dont le lapin, le ligand *IL6* et le récepteur *IL6R* les remplacent. L'addition et la délétion de *LIF* ou d'*IL6* ne semblent néanmoins n'avoir aucun effet sur le développement de l'ICM chez la souris, le porc et le bovin. En revanche, l'inhibition des protéines *JAK* ou la délétion de *STAT3* conduit à la disparition de l'ICM chez ces trois espèces. Cette discordance est encore aujourd'hui inexplicée. Une hypothèse serait que la voie *IL6R/LIFR-IL6ST-JAK-STAT3* peut être activée par d'autres cytokines présentes dans l'embryon. De plus, chez la souris la présence de *LIF* devient nécessaire à l'autorenouveaulement de l'épiblaste lors de la diapause. Cette particularité du développement de la souris expliquerait le succès de la dérivation de cellules à l'état naïf, alors que les cellules de l'ICM des autres mammifères ne répondent pas ou peu à la stimulation par le *LIF* ou l'*IL6*.

Dans l'embryon de marmouset, l'inhibition de la voie *WNT* favorise le développement de l'épiblaste aux dépens du PE. *In vitro*, l'inhibition de la voie *WNT* dans les PSC humaines promeut l'autorenouveaulement à l'état naïf, à l'inverse de ce qui est observé chez la souris. En effet, chez la souris l'inhibition de la voie *Wnt* entraîne la progression des cellules dans le continuum de pluripotence, sans quitter cependant l'état naïf tant que la voie *Erk* est inhibée. L'inhibition de la voie *WNT* permet également la stabilisation des PSC à l'état amorcé chez la souris, l'Homme et le bovin. L'inhibition de

la voie WNT serait donc une caractéristique universelle de la pluripotence, même dans les PSC de souris à l'état naïf (Fig. D1C). Il ne faut pas oublier que l'existence de la diapause pré-implantatoire chez la souris fausse la donne. Ainsi, l'activation de la voie WNT dans les PSC de souris permettrait le maintien de l'autorenouveauement comme lors de la diapause. Chez le lapin, les cibles de la voie WNT, *ESRRB* et *TCF7L1*, sont exprimées dans l'épiblaste naïf. A l'opposé, les gènes associés à la voie WNT sont sous-enrichis dans l'épiblaste naïf par rapport à l'épiblaste tardif. Des études complémentaires sur l'effet de l'activation ou l'inhibition de la voie WNT dans l'embryon de lapin sont donc nécessaires pour mieux connaître le rôle de la voie WNT dans le développement de l'ICM de lapin.

Enfin, l'inhibition de la voie ERK n'entraîne pas une disparition complète des cellules du PE chez les mammifères non-murins. Chez l'Homme et le lapin, elle n'a d'ailleurs aucun effet sur la répartition des cellules exprimant GATA6. Chez le marmouset, le bovin et le porc, on observe une réduction du nombre de cellules exprimant GATA6. Chez le bovin, le porc et le lapin, l'inhibition de ERK entraîne la disparition de l'expression de *SOX17*. Selon les espèces, il semble donc exister une sensibilité variable à la voie FGF-ERK, qui est nécessaire à la propagation du PE chez la souris. Chez les autres espèces, les précurseurs du PE sont moins dépendants de son activation pour apparaître. Ils nécessitent cependant son activation pour évoluer et notamment exprimer *SOX17*. En fait, la plus grande sensibilité des cellules pluripotentes murines à l'activation de la voie Fgf-Erk faciliterait la capture de l'état naïf en bloquant à la fois la différenciation en PE et la progression du continuum de pluripotence. Même chez le rat, pourtant très proche phylogénétiquement de la souris, la capture de l'état naïf nécessite ainsi l'ajout d'un inhibiteur des récepteurs Fgf en plus de l'inhibition de Erk.

La divergence dans la régulation des voies LIF/IL6, WNT et ERK, entre la souris et les autres mammifères, expliquerait la difficulté de capturer l'état naïf *in vitro* chez les espèces non-murines. Il est donc nécessaire chez les autres mammifères, dont le lapin, d'utiliser d'autres voies de signalisation régulant la pluripotence afin de capturer des PSC à l'état naïf.

IV. Les autres voies de signalisation soutenant la pluripotence naïve chez les espèces non-murines

Les voies de signalisation de la famille TGF β sont régulées différemment entre la souris et les autres espèces. Chez les primates, le porc et le lapin, *NODAL* est surexprimé dans l'ICM, alors que chez la souris c'est *Bmp4* qui est exprimé dans ce lignage. L'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs de NODAL conduit chez l'Homme et le porc à la disparition de l'ICM, alors qu'aux mêmes concentrations ils n'ont aucun effet sur les embryons de souris. On peut émettre l'hypothèse que chez le lapin, comme chez ces dernières espèces, l'activation de la voie NODAL est nécessaire à l'autorenouveauement de l'ICM et pourrait soutenir l'autorenouveauement à l'état naïf.

La voie NOTCH est, elle, relativement peu étudiée dans le cadre de la pluripotence. Dans une publication de 2016, les auteurs montrent une augmentation de l'expression des récepteurs *NOTCH2* et *3* dans l'épiblaste post-implantatoire de macaque cynomolgus et de souris (Nakamura et al., 2016). Le facteur de transcription RBPJ, activé par la voie NOTCH, est quant à lui présent aussi bien dans l'épiblaste pré-implantatoire que post-implantatoire. Chez le lapin, j'ai également observé la surexpression des récepteurs *NOTCH* dans l'épiblaste tardif, mais aussi dans une moindre mesure dans le TE et le PE précoces. *RBPJ* chez le lapin est également exprimé dans toutes les cellules embryonnaires pluripotentes. Comme chez la souris, *RBPJ* est cependant davantage exprimé dans l'épiblaste précoce que tardif. L'activation de la voie NOTCH est ainsi associée à l'état amorcé chez ces trois espèces.

Dans les PSC murines, il a été montré que Rbpj permet la sortie de l'état naïf (Kalkan et al., 2019). Dans la même veine, une étude récente sur la conversion de PSC humaine à l'état naïf montre que l'inhibition de la voie NOTCH permet de remplacer l'inhibition de ERK afin de soutenir l'autorenouveau des PSC reprogrammées (Bayerl et al., 2021). L'expression de RBPJ à l'état naïf en l'absence d'activité de la voie NOTCH pourrait s'expliquer par le fonctionnement de celle-ci. En effet, l'activation des récepteurs NOTCH conduit au changement de liaison de RBPJ d'un complexe répresseur à un complexe activateur de la transcription. RBPJ aurait donc un double-rôle au cours du continuum de pluripotence : à l'état naïf, il soutiendrait l'autorenouveau en réprimant les gènes induisant la sortie de l'état naïf ; à l'inverse, à l'état amorcé l'activation des récepteurs NOTCH conduirait à l'activation de gènes favorisant la sortie de l'état naïf de pluripotence (Fig. D1C).

V. Implantation et apparition de la lignée germinale : un exemple de robustesse et de diversité de régulation

Les mammifères euthériens diffèrent également par leur stratégie d'implantation. Dans beaucoup d'espèces de mammifère euthérien, le TE polaire se désagrège avant l'implantation. En revanche, chez certaines espèces, comme les primates et les rongeurs, le TE polaire ne disparaît pas et participe à l'implantation, tandis que l'épiblaste s'invagine pour former la cavité pré-amniotique. Malgré ces changements, l'enchaînement des étapes suivantes du développement embryonnaire reste relativement inchangé d'une espèce à l'autre. Cette diversité de stratégie d'implantation est reflétée par les tissus producteurs des ligands BMP permettant la formation de l'AVE. Lors de l'apparition de la polarité antéro-postérieure chez la souris, c'est l'ExE qui est la source des ligands BMP permettant la restriction de la zone d'apparition de l'AVE. Chez le lapin et le bovin, c'est le ParE qui en est la source, ainsi que la périphérie de l'épiblaste chez le lapin, tandis que chez les primates, c'est l'amnios qui sécrète les ligands BMP.

Tout comme la polarisation de l'épiblaste, l'émergence des PGC est dictée par l'activité des mêmes voies de signalisation peu importe l'espèce. Cependant, la niche où les PGC apparaissent varie en fonction de la physiologie de l'embryon. Chez les primates, l'apparition précoce de l'amnios entraîne l'apparition de la lignée germinale dans ce dernier plutôt que dans l'épiblaste postérieur, comme c'est le cas chez le lapin, le porc et la souris. Il n'est cependant pas exclu que l'épiblaste postérieur puisse aussi contribuer à la lignée germinale. Une autre différence notable est le remplacement de *SOX17* dans le réseau de gènes permettant l'émergence des PGC par *SOX2* chez la souris.

La fonction des voies WNT, BMP et NODAL dans la polarisation de l'épiblaste et l'émergence de la lignée germinale est conservée d'une espèce à l'autre, malgré les divergences dans l'organisation des tissus embryonnaires.

VI. Comparaison des continuums de pluripotence : bilan

Les mécanismes contrôlant les différentes étapes de progression du développement embryonnaire sont conservés de manière très robuste chez les mammifères. Cette robustesse est notamment illustrée par la production des ligands BMP permettant le contrôle de l'apparition de l'AVE et des PGC. Dans chaque espèce, ils sont sécrétés par les tissus adjacents à l'épiblaste : ExE chez la souris ; ParE et périphérie de l'épiblaste chez le lapin ; et amnios chez les primates. Dans un second temps, malgré ces similitudes, on observe une grande variabilité dans le transcriptome ainsi que dans

la réponse aux différentes voies de signalisation d'une espèce à l'autre. On peut émettre deux hypothèses pour expliquer cela :

1 – La divergence dans les cinétiques du développement péri-implantatoire entraîne l'apparition de nouvelles contraintes physiologiques au cours du développement embryonnaire. Ces divergences nécessitent une adaptation qui passe par un remaniement des réseaux de signalisation et de facteurs de transcriptions. Chez les rongeurs par exemple, l'implantation a lieu seulement 5 jours après la fécondation. On peut émettre l'hypothèse que le début de l'EGA dès le stade 2-cellules permet l'engagement rapide des cellules dans les lignages embryonnaires et extra-embryonnaires, afin qu'ils

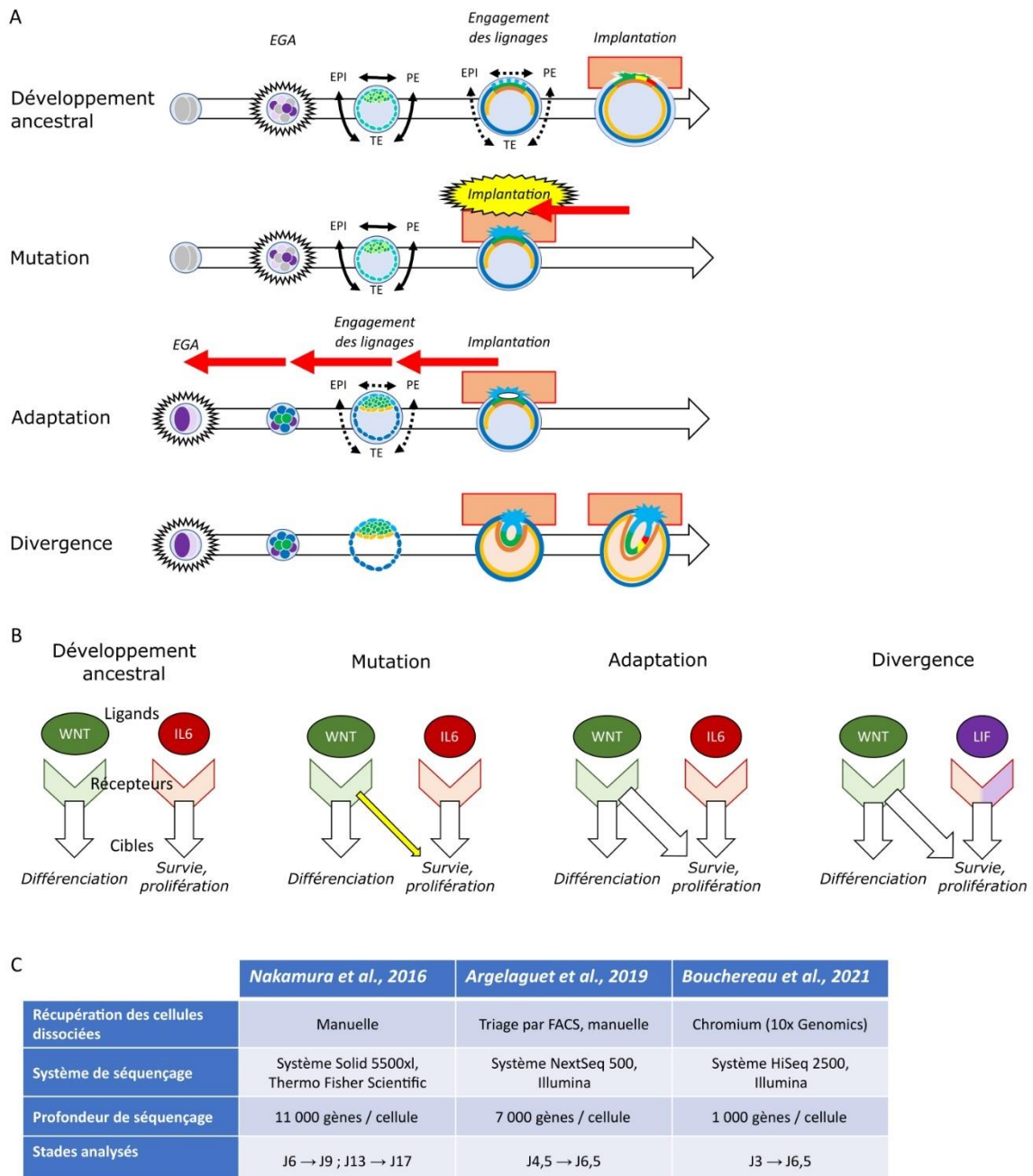


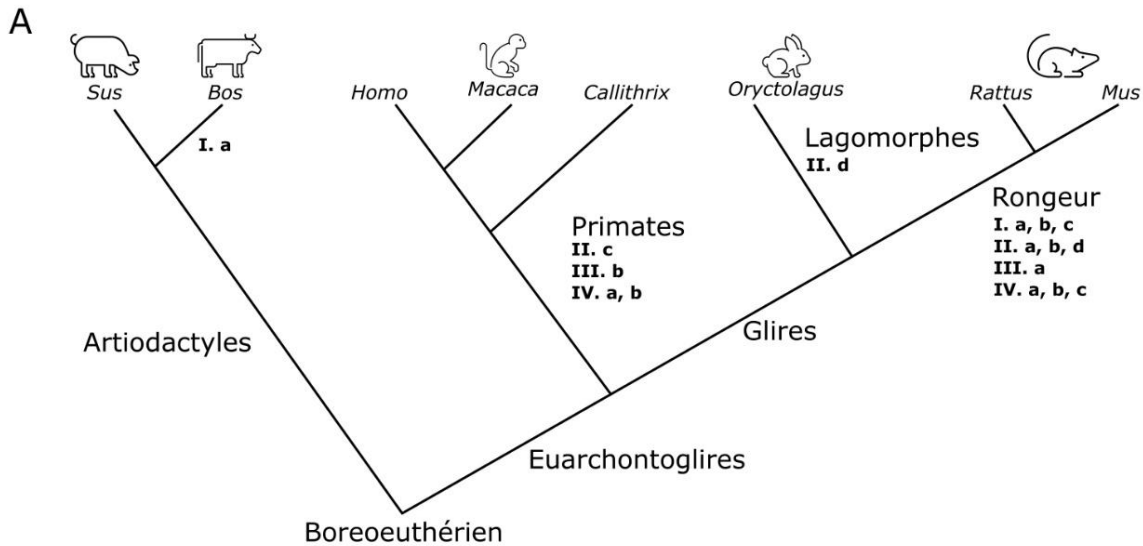
Figure D2 : Hypothèses expliquant la variabilité des transcriptomes embryonnaires étudiés. (A) Schéma illustrant l'acquisition d'une nouvelle cinétique de développement. (B) Schéma représentant la divergence entre les voies de signalisation (C) Tableau comparant les trois analyses de scRNA-seq sur embryons de macaque cynomolgus, de souris et de lapin tel qu'ils sont décrits dans l'article 1.

soient déjà matures au moment de l'implantation. Cela expliquerait la restriction très précoce des facteurs de transcription de lignage, comme *Cdx2* ou *Oct4*. Ainsi, l'engagement dans chaque lignage peut se faire plus précocement chez la souris, alors que chez les autres espèces, l'EGA est plus tardive et l'expression des gènes de lignage est décalée (Fig. D2A).

2 – La dérive génétique entre les différentes espèces conduit à la modification des interactions ligand-récepteur, ainsi que des interactions entre les facteurs de transcriptions et l'ADN. Cela conduit à des variations dans la sensibilité des différentes voies de signalisation. La grande efficacité des voies *Lif-Stat3* et *Wnt-β-caténine* à soutenir l'autorenouveau et la survie des PSC à l'état naïf chez la souris permet ainsi la survie de l'épiblaste pendant la diapause embryonnaire (Fig. D2B). Un autre aspect de la dérive génétique est le décalage dans les dynamiques d'expression des gènes. Par exemple, le gène *EGLN3* est spécifiquement exprimé dans l'épiblaste précoce chez le lapin. Chez la souris, *Egln3* est exprimé plus tardivement que chez le lapin, dans l'épiblaste péri-implantatoire au jour 5.5. Chez le macaque, il n'est pas non plus un bon marqueur naïf car il est également surexprimé dans le PE précoce (Article 1, Fig., S7A-B).

3 – Enfin, d'un point de vue expérimental, il est possible que la diversité des protocoles d'analyse du transcriptome embryonnaire diminue l'efficacité des comparaisons inter-espèces. En effet, je n'ai trouvé que peu de gènes exprimés communément à l'état naïf chez le lapin, la souris et le macaque cynomolgus (Article 3, Fig. 7 et S7). Dans les données de séquençage ARN sur cellules uniques isolées d'embryons de souris péri-implantatoires de la publication d'Argelaguet et al., le gène *Prdm14* n'est pratiquement pas détecté (Argelaguet et al., 2019), alors que ce dernier est connu chez la souris comme étant exprimé dans l'ICM et l'épiblaste (Yamaji et al., 2008) (Fig. D2C). Les variations techniques ne peuvent être ignorées dans ces comparaisons, c'est pourquoi il serait idéal de réaliser une analyse en parallèle sur les différents modèles à comparer, en utilisant les mêmes techniques de récupération des échantillons, de séquençage et d'analyse des données pour avoir une comparaison plus solide.

Lorsqu'on fait le bilan des divergences et des similitudes du développement embryonnaire précoce chez les mammifères euthériens, on constate que celui de la souris a accumulé un grand nombre de caractères modifiés par rapport aux autres espèces. A l'inverse, le développement embryonnaire du lapin a relativement peu divergé de celui des autres espèces (Fig. D3). Le modèle lapin est donc un bon modèle alternatif à la souris dans l'étude du développement embryonnaire précoce et la régulation du continuum de pluripotence. Chez les primates, les embryons sont en effet peu accessibles pour des raisons éthiques évidentes, tandis que chez les autres mammifères, comme le porc ou le bovin, la taille des animaux réduit également la facilité d'obtention d'embryons. La manipulation d'embryons de lapin pourrait ainsi éclaircir les points de divergences entre la souris et les autres mammifères et contribuer à une meilleure compréhension de la pluripotence en général.



B

	Souris	Lapin	Primate	Porc	Bovin	
I Sortie de la totipotence						
a	EGA	2C	4-8C	8C	4C	8-16C
b	Expression de CDX2	Précoce	Tardive	Tardive	Tardive	Tardive
c	Restriction de OCT4 à l'épiblaste	Précoce	Tardive	Tardive	Tardive	Tardive
II Régulation de l'ICM						
a	Couple ligand-récepteur activant STAT3	LIF-LIFR	IL6-IL6R	IL6-IL6R	IL6-IL6R	?
b	Diapause dépendante de LIF et WNT	Oui	Non	Non	Non	Non
c	Expression de ESRRB et TCF7L1 dans l'ICM	Oui	Oui	Non	Oui	?
d	Effet de l'inhibition de ERK	Absence de PE	PE, absence de SOX17	Réduction du PE	Réduction du PE	Réduction du PE
III Autres voies de signalisation						
a	Ligand de la famille TGFβ exprimé dans l'ICM	BMP4	NODAL	NODAL	NODAL	?
b	Expression de RBPJ dans le continuum de pluripotence	Plus forte à l'état naïf	Plus forte à l'état naïf	Plus forte à l'état amorcé	?	?
IV Développement tardif						
a	Stratégie d'implantation	Par le TE polaire	Disparition du TE polaire	Par le TE polaire	Disparition du TE polaire	Disparition du TE polaire
b	Source de ligand BMP4 pendant la polarisation	ExE, VisE	ParE	Amnios	ParE	ParE
c	Facteur SOX exprimé dans les PGC	SOX2	SOX17	SOX17	SOX17	?

Figure D3 : Phylogénie et développement embryonnaire péri-implantatoire. (A) Arbre phylogénétique des animaux modèles comparés dans ce manuscrit. A chaque branche est indiquée la présence de caractères dérivés par rapport aux autres espèces, selon le tableau (B). (B) Tableau de la variabilité des différentes caractéristiques du développement embryonnaire péri-implantatoire chez la souris, le lapin, les primates, le porc et le bovin. Les caractères dérivés par rapport aux autres espèces sont colorés en jaune.

Conclusion générale

L'étude du développement embryonnaire du lapin nous a fourni de nombreuses informations sur la régulation de la pluripotence chez le lapin. En la comparant à celles des autres espèces de mammifère chez qui la pluripotence est étudiée, on note une remarquable conservation dans la régulation des différentes étapes du continuum de pluripotence, malgré une variabilité dans les cinétiques des événements, dans la réponse aux différentes voies de signalisation contrôlant le développement embryonnaire et dans la dynamique du transcriptome. De plus, bien que le lapin se distingue sur de nombreux aspects du modèle murin, il présente la même surexpression de *RBPJ* et de *ESRRB* dans l'épiblaste naïf.

Ces informations sur le continuum de pluripotence dans l'embryon de lapin permettront de situer de manière précise les PSC de lapin dans le continuum de pluripotence, grâce à leur épigénome, leur métabolome, leur transcriptome et leur cycle cellulaire. Grâce à ces données, nous pourrions explorer de nouvelles pistes dans la quête de la capture de l'état naïf de pluripotence chez le lapin, que ce soit par la conversion de cellules amorcées vers l'état naïf ou par la dérivation de ESC directement dans l'état naïf. La manipulation de la chromatine a déjà donné des résultats prometteurs, mais il sera nécessaire de combiner cette reprogrammation épigénétique avec un milieu de culture capable de maintenir l'état naïf propre au lapin. En plus des voies déjà utilisées dans la capture de l'état naïf chez les autres mammifères, la voie NOTCH apparaît comme une nouvelle cible intéressante dont l'inhibition favoriserait l'émergence de PSC naïve.

En conclusion, la description du continuum de pluripotence embryonnaire chez le lapin a mis en lumière la conservation des mécanismes régulant la pluripotence d'une espèce à l'autre, tout en soulignant les spécificités propres à chaque modèle. Le continuum de pluripotence de la souris semble ainsi avoir beaucoup divergé de l'ancêtre commun aux mammifères euthériens. La caractérisation de la pluripotence *in vivo* a fourni de nouveaux outils pour capturer l'état naïf *in vitro* chez le lapin. Parmi ceux-ci, le raccourcissement du cycle cellulaire, l'inhibition de la formation d'hétérochromatine par les HDAC de classe I et par les méthyltransférases d'H3K9, ainsi que la répression de la voie NOTCH semblent prometteurs. Cependant, des études mécanistiques sur la régulation de la pluripotence chez le lapin restent nécessaires afin de tester nos hypothèses et de valider les données obtenues, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

Matériels et méthodes

Récolte et culture des embryons de lapin :

Les embryons de lapin aux jours 0.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0 et 6.6 post-fécondation ont été récupérés, leurs manteaux muqueux et leurs zones pellucides ont été enlevés selon la méthode décrite dans l'article 1. Rapidement, les embryons ont été isolés des cornes utérines par refoulement à l'aide de milieu FLUSH, composé de DPBS (*dulbecco's phosphate buffered saline*, Gibco, 14190-094), 10% de FBS (*fetal bovine serum*, Corning, 35-079-) et 1% de Pénicilline Streptomycine Glutamine (PSG, Gibco, 10378-016). Les embryons sont ensuite transférés dans du milieu RDH, composé de 1/3 de milieu DMEM-glutamax (Gibco, 31966-021), 1/3 de milieu RPMI-glutamax (Gibco, 61870-010), 1/3 de milieu F10-glutamax (Gibco, 41550-021), 4% de *bovine serum albumine* (BSA, Sigma A3311-10G) et 0.8% de taurine (Sigma T8691). Le manteau muqueux et la zone pellucide sont digérés en incubant les embryons dans 0.5% de protéase de *Streptomyces griseus* (Sigma P8811-100MG) entre 1 et 10 minutes à 37°C, puis remis dans du milieu RDH pour la suite des expériences.

Les embryons en culture sont conservés dans du milieu RDH dans un incubateur à 38°C et à 5% d'O₂. Les inhibiteurs A366 (MedChem Express, HY-12583), UNCO642 (MedChem Express, HY-13980) et UF010 (Tocris, 5588) ont été re-suspendus en DMSO et l'inhibiteur BRD4354 (Tocris, 6010) a été re-suspendu dans de l'éthanol, pour être stockés à -20°C. Ils sont dilués aux concentrations appropriées dans du PBS, avant d'être ajoutés au milieu de culture. Avant le début des inhibitions, les embryons sont transférés dans du milieu RDH frais avant que les inhibiteurs soient ajoutés ou non aux concentrations appropriées. Après 24 heures d'inhibition, les embryons sont à nouveau transférés dans du milieu RDH frais avec ou sans inhibiteurs. Après 48 heures, les embryons sont fixés en paraformaldéhyde selon la méthode décrite dans l'article 1.

Immunomarquages et analyse d'image :

Les immunomarquages sont réalisés en suivant le protocole décrit dans l'article 1. Le tableau ci-dessous énumère les différents anticorps utilisés.

Anticorps primaire	Anticorps secondaire
Anti-GATA6 (chèvre): R&D systems, AF1700	Anti-chèvre Green (488nm): Fisher Scientific, A21467
Anti-SOX17 (chèvre): Bio-Techne, AF1924	
Anti-SOX2 (souris): Ozyme, L1D6A2	Anti-souris FarRed (647nm): Invitogen, A32728
Anti-H3K9me3 (Souris): Abcam, ab8898	
Anti-H3K9ac (Lapin): Active Motif, 39917	Anti-lapin Red (555nm): Fisher Scientific, 10749004
Anti-H3K14ac (Lapin): Abcam, ab52946	

Les lames sont observées à l'aide d'un microscope confocal SP5 (Leica SP5) et du logiciel associé LAS AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence, version 2.7.3.9723). Les lasers utilisés sont : la diode 405 nm pour la fluorescence bleue des noyaux et le laser Helium-Neon 633 pour observer les immunomarquages.

Les images obtenues sont ensuite analysées avec le logiciel image J (version 2.1.0). Les différences de numération de cellules pour chaque embryon ont été testées par un test de Student non-pairé. L'intensité de fluorescence a également été évaluée en utilisant le logiciel image J et les différences d'intensité ont été testées par un test de Student non-pairé. Une étoile : $p\text{-value} < 0.05\%$; deux étoiles : $p\text{-value} < 0.01\%$; trois étoiles : $p\text{-value} < 0.001\%$; quatre étoiles : $p\text{-value} < 0.0001\%$.

Analyse de qPCR Biomark en cellules uniques :

Après les 48 heures d'inhibition, les embryons ont été disséqués, dissociés et les cellules singularisées récupérées suivant le protocole décrit dans l'article 1. Les échantillons ont ensuite été pré-amplifiés en utilisant un mélange des amorces listées dans l'annexe 1. Le contrôle qualité des échantillons pré-amplifiés, la qPCR Biomark et l'analyse bioinformatique des données ont été réalisés en suivant le protocole décrit dans l'article 1. Le package umap (version 0.2.7.0) a été utilisé en plus pour réaliser les UMAP décrites dans les résultats.

Analyse bioinformatique :

Le jeu de données produit dans l'article 1 a été ré-analysé pour les figures R1 à 4, en suivant les méthodes décrites dans l'article 1.

Culture cellulaire :

La lignée de iPSC de lapin B19 provient de fibroblastes d'oreille de lapin de souche New-Zealand White reprogrammés (Osteil et al., 2013). Ces cellules ont par la suite subi une transfection en utilisant le kit de transfection FuGENE (Promega, E2311) afin d'intégrer le système rapporteur du cycle cellulaire FUCCI 3 (Sakaue-Sawano et al., 2017), puis une deuxième transfection d'un rapporteur codant pour une protéine de fusion H2A-mTurquoise sous contrôle d'un promoteur CAG afin d'identifier les noyaux des cellules.

Les MEF sont préparés à partir d'embryons de souris au jour 12.5 issus de la lignée de souris OF1 (Charles River). Les iPSC de lapin sont cultivées dans un incubateur à 38°C en condition 5% O₂ et 5% CO₂. Elles sont cultivées sur MEF, dont la croissance est interrompue par un traitement à la mitomycine C (Sigma, M4287-2MG), dans du milieu appelé KF. Le milieu KF est composé de DMEM/F-12 1X (Dulbecco's Modified Eagle Medium (1X), F-12 Nutrient Mixture (Gibco, 1331-020)) auquel sont ajoutés 20% de *knock out serum replacement* (KOSR, Gibco, 10828-028), 1% de Pénicilline Streptomycine Glutamine 100X (PSG, Gibco, 10378-016), 1% de *non-essentials amino-acids 100X* (NEAA, Gibco, 11140-035), 1% de sodium pyruvate 100mM (Gibco, 11360-070) et 0,2% de 2-Mercaptoethanol 50 mM (Gibco, 31350-010). Extemporément, le facteur de croissance FGF2 bovin (Gibco, PHG0263) est ajouté au milieu à une concentration de 10ng/mL. Enfin de la puromycin dihydrochloride de Streptomyces (Sigma, P8833-10MG) est introduite à raison de 1ng/mL pour permettre de sélectionner les cellules possédant les gènes rapporteurs. Le milieu de culture est changé tous les jours et les cellules sont dissociées tous les deux-trois jours par traitement à la trypsine-EDTA 0.05% (Gibco, 15400054).

Analyse time-lapse :

Après avoir été cultivées en présence des inhibiteurs pendant le temps indiqué dans la partie « résultats », les cellules ont été placées sous un microscope épifluorescent (Nikon Eclipse Ti) équipé d'une lampe UV, d'une chambre chauffante à 38°C et d'une alimentation en gaz (5% de CO₂ et 5% O₂) permettant une observation des cellules vivantes. Les colonies sélectionnées ont alors été photographiées avec un filtre CFT (cyan, Ex438/24 – Em 483/32), mVenus (Ex490/20 - Em525/20) et mCherry (Ex562/40 – Em641/75) toutes les 10 minutes pendant 24h (« Time-lapse ») avec un objectif de grossissement 20X.

Le film obtenu a été analysé grâce au logiciel AIVIA (version 8.5.0), capable de traquer les noyaux des cellules. Pour chaque noyau, le logiciel mesure et représente sous forme graphique l'intensité des différentes fluorescences au cours du temps. Grâce au système FUCCI3/H2A-mTurquoise que possèdent les cellules, il est possible de déterminer la durée du cycle cellulaire et de la phase G1. Cette dernière est délimitée par la dégradation de la protéine hGMNN-mVenus à la fin de la mitose et par la dégradation de la protéine hCDT1-mCherry à la fin de la phase G1. Les baisses brutales d'intensité de fluorescence observées sur le logiciel permettent ainsi de déterminer la durée de la phase G1. La durée totale du cycle cellulaire est délimitée soit par chaque dégradation de hGMNN-mVenus, soit en observant la séparation des chromosomes marqués par la protéine H2A-mTurquoise. Les comparaisons des différentes durées ont été réalisées avec le test de Student non-pairés. Une étoile : *p-value* < 0.05% ; deux étoiles : *p-value* < 0.01% ; trois étoiles : *p-value* < 0.001% ; quatre étoiles : *p-value* < 0.0001%.

Bibliographie

- Acampora, Dario, Luca G. Di Giovannantonio, et Antonio Simeone. « Otx2 Is an Intrinsic Determinant of the Embryonic Stem Cell State and Is Required for Transition to a Stable Epiblast Stem Cell Condition ». *Development (Cambridge, England)* 140, n° 1 (1 janvier 2013): 43-55. <https://doi.org/10.1242/dev.085290>.
- Acampora, Dario, Daniela Omodei, Giuseppe Petrosino, Arcomaria Garofalo, Marco Savarese, Vincenzo Nigro, Luca Giovanni Di Giovannantonio, Vincenzo Mercadante, et Antonio Simeone. « Loss of the Otx2-Binding Site in the Nanog Promoter Affects the Integrity of Embryonic Stem Cell Subtypes and Specification of Inner Cell Mass-Derived Epiblast ». *Cell Reports* 15, n° 12 (21 juin 2016): 2651-64. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.041>.
- Adamo, Antonio, Borja Sesé, Stephanie Boue, Julio Castaño, Ida Paramonov, Maria J. Barrero, et Juan Carlos Izpisua Belmonte. « LSD1 Regulates the Balance between Self-Renewal and Differentiation in Human Embryonic Stem Cells ». *Nature Cell Biology* 13, n° 6 (juin 2011): 652-59. <https://doi.org/10.1038/ncb2246>.
- Afanassieff, Marielle, Florence Perold, Wilhelm Bouchereau, Antoine Cadiou, et Nathalie Beaujean. « Embryo-Derived and Induced Pluripotent Stem Cells: Towards Naive Pluripotency and Chimeric Competency in Rabbits ». *Experimental Cell Research* 389, n° 2 (15 avril 2020): 111908. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111908>.
- Ahmed, Kashif, Hesam Dehghani, Peter Rugg-Gunn, Eden Fussner, Janet Rossant, et David P. Bazett-Jones. « Global Chromatin Architecture Reflects Pluripotency and Lineage Commitment in the Early Mouse Embryo ». *PloS One* 5, n° 5 (7 mai 2010): e10531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010531>.
- Ahn, Ji-Hye, Youn Seok Choi, et Jung-Hye Choi. « Leptin Promotes Human Endometrial Cell Migration and Invasion by Up-Regulating MMP-2 through the JAK2/STAT3 Signaling Pathway ». *Molecular Human Reproduction* 21, n° 10 (octobre 2015): 792-802. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav039>.
- Aksoy, Irene, Ralf Jauch, Jiaxuan Chen, Mateusz Dyla, Ushashree Divakar, Gireesh K. Bogu, Roy Teo, et al. « Oct4 Switches Partnering from Sox2 to Sox17 to Reinterpret the Enhancer Code and Specify Endoderm ». *The EMBO Journal* 32, n° 7 (3 avril 2013): 938-53. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.31>.
- Aksoy, Irène, Cloé Rognard, Anaïs Moulin, Guillaume Marcy, Etienne Masfaraud, Florence Wianny, Véronique Cortay, et al. « Apoptosis, G1 Phase Stall, and Premature Differentiation Account for Low Chimeric Competence of Human and Rhesus Monkey Naive Pluripotent Stem Cells ». *Stem Cell Reports* 16, n° 1 (12 janvier 2021): 56-74. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.12.004>.
- Alberio, Ramiro, Nicola Croxall, et Cinzia Allegrucci. « Pig Epiblast Stem Cells Depend on Activin/Nodal Signaling for Pluripotency and Self-Renewal ». *Stem Cells and Development* 19, n° 10 (octobre 2010): 1627-36. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0012>.
- Alberio, Ramiro, Toshihiro Kobayashi, et M. Azim Surani. « Conserved Features of Non-Primate Bilaminar Disc Embryos and the Germline ». *Stem Cell Reports* 16, n° 5 (11 mai 2021): 1078-92. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.03.011>.
- Amano, Hisayuki, Ken Itakura, Masayoshi Maruyama, Tomoko Ichisaka, Masato Nakagawa, et Shinya Yamanaka. « Identification and Targeted Disruption of the Mouse Gene Encoding ESG1 (PH34/ECAT2/DPPA5) ». *BMC Developmental Biology* 6 (28 février 2006): 11. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-11>.
- Aoki, F., D. M. Worrall, et R. M. Schultz. « Regulation of Transcriptional Activity during the First and Second Cell Cycles in the Preimplantation Mouse Embryo ». *Developmental Biology* 181, n° 2 (15 janvier 1997): 296-307. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.8466>.
- Argelaguet, Ricard, Stephen J. Clark, Hisham Mohammed, L. Carine Stapel, Christel Krueger, Chantierint-Andreas Kapourani, Ivan Imaz-Rosshandler, et al. « Multi-Omics Profiling of

- Mouse Gastrulation at Single-Cell Resolution ». *Nature* 576, n° 7787 (décembre 2019): 487-91. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1825-8>.
- Artus, Jérôme, Minjung Kang, Michel Cohen-Tannoudji, et Anna-Katerina Hadjantonakis. « PDGF Signaling Is Required for Primitive Endoderm Cell Survival in the Inner Cell Mass of the Mouse Blastocyst ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 31, n° 9 (septembre 2013): 1932-41. <https://doi.org/10.1002/stem.1442>.
- Auclair, Ghislain, Sylvain Guibert, Ambre Bender, et Michael Weber. « Ontogeny of CpG Island Methylation and Specificity of DNMT3 Methyltransferases during Embryonic Development in the Mouse ». *Genome Biology* 15, n° 12 (2014): 545. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0545-5>.
- Avilion, Ariel A., Silvia K. Nicolis, Larysa H. Pevny, Lidia Perez, Nigel Vivian, et Robin Lovell-Badge. « Multipotent Cell Lineages in Early Mouse Development Depend on SOX2 Function ». *Genes & Development* 17, n° 1 (1 janvier 2003): 126-40. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>.
- Azzolin, Luca, Tito Panciera, Sandra Soligo, Elena Enzo, Silvio Bicciato, Sirio Dupont, Silvia Bresolin, et al. « YAP/TAZ Incorporation in the β -Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response ». *Cell* 158, n° 1 (3 juillet 2014): 157-70. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.013>.
- Azzolin, Luca, Francesca Zanconato, Silvia Bresolin, Mattia Forcato, Giuseppe Basso, Silvio Bicciato, Michelangelo Cordenonsi, et Stefano Piccolo. « Role of TAZ as Mediator of Wnt Signaling ». *Cell* 151, n° 7 (21 décembre 2012): 1443-56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.027>.
- Babaie, Yasmin, Ralf Herwig, Boris Greber, Thore C. Brink, Wasco Wruck, Detlef Groth, Hans Lehrach, Tom Burdon, et James Adjaye. « Analysis of Oct4-Dependent Transcriptional Networks Regulating Self-Renewal and Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25, n° 2 (février 2007): 500-510. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0426>.
- Bao, Siqin, Fuchou Tang, Xihe Li, Katsuhiko Hayashi, Astrid Gillich, Kaiqin Lao, et M. Azim Surani. « Epigenetic Reversion of Post-Implantation Epiblast to Pluripotent Embryonic Stem Cells ». *Nature* 461, n° 7268 (29 octobre 2009): 1292-95. <https://doi.org/10.1038/nature08534>.
- Bayerl, Jonathan, Muneef Ayyash, Tom Shani, Yair Shlomo Manor, Ohad Gafni, Rada Massarwa, Yael Kalma, et al. « Principles of Signaling Pathway Modulation for Enhancing Human Naive Pluripotency Induction ». *Cell Stem Cell* 28, n° 9 (2 septembre 2021): 1549-1565.e12. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.04.001>.
- Bazer, Fuller W., Thomas E. Spencer, Greg A. Johnson, Robert C. Burghardt, et Guoyao Wu. « Comparative Aspects of Implantation ». *Reproduction (Cambridge, England)* 138, n° 2 (août 2009): 195-209. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0158>.
- Beaujean, Nathalie, Jane Taylor, John Gardner, Ian Wilmut, Richard Meehan, et Lorraine Young. « Effect of Limited DNA Methylation Reprogramming in the Normal Sheep Embryo on Somatic Cell Nuclear Transfer ». *Biology of Reproduction* 71, n° 1 (juillet 2004): 185-93. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.026559>.
- Becker, Klaus A., Prachi N. Ghule, Jaclyn A. Therrien, Jane B. Lian, Janet L. Stein, Andre J. van Wijnen, et Gary S. Stein. « Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells Is Supported by a Shortened G1 Cell Cycle Phase ». *Journal of Cellular Physiology* 209, n° 3 (décembre 2006): 883-93. <https://doi.org/10.1002/jcp.20776>.
- Bedzhov, Ivan, et Magdalena Zernicka-Goetz. « Self-Organizing Properties of Mouse Pluripotent Cells Initiate Morphogenesis upon Implantation ». *Cell* 156, n° 5 (27 février 2014): 1032-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.023>.
- Bendall, Sean C., Morag H. Stewart, Pablo Menendez, Dustin George, Kausalia Vijayaragavan, Tamra Werbowetski-Ogilvie, Veronica Ramos-Mejia, et al. « IGF and FGF Cooperatively

- Establish the Regulatory Stem Cell Niche of Pluripotent Human Cells in Vitro ». *Nature* 448, n° 7157 (30 août 2007): 1015-21. <https://doi.org/10.1038/nature06027>.
- Ben-Haim, Nadav, Cindy Lu, Marcela Guzman-Ayala, Luca Pescatore, Daniel Mesnard, Mirko Bischofberger, Felix Naef, Elizabeth J. Robertson, et Daniel B. Constam. « The Nodal Precursor Acting via Activin Receptors Induces Mesoderm by Maintaining a Source of Its Convertases and BMP4 ». *Developmental Cell* 11, n° 3 (septembre 2006): 313-23. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.07.005>.
- Berg, Debbie L. C. van den, Tim Snoek, Nick P. Mullin, Adam Yates, Karel Bezstarosti, Jeroen Demmers, Ian Chambers, et Raymond A. Poot. « An Oct4-Centered Protein Interaction Network in Embryonic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 6, n° 4 (2 avril 2010): 369-81. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.014>.
- Berg, Debra K., Craig S. Smith, David J. Pearton, David N. Wells, Ric Broadhurst, Martyn Donnison, et Peter L. Pfeffer. « Trophectoderm Lineage Determination in Cattle ». *Developmental Cell* 20, n° 2 (15 février 2011): 244-55. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.003>.
- Berge, Derk ten, Dorota Kurek, Tim Blauwkamp, Wouter Koole, Alex Maas, Elif Eroglu, Ronald K. Siu, et Roel Nusse. « Embryonic Stem Cells Require Wnt Proteins to Prevent Differentiation to Epiblast Stem Cells ». *Nature Cell Biology* 13, n° 9 (14 août 2011): 1070-75. <https://doi.org/10.1038/ncb2314>.
- Bernstein, Bradley E., Tarjei S. Mikkelsen, Xiaohui Xie, Michael Kamal, Dana J. Huebert, James Cuff, Ben Fry, et al. « A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells ». *Cell* 125, n° 2 (21 avril 2006): 315-26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>.
- Bilodeau, Steve, Michael H. Kagey, Garrett M. Frampton, Peter B. Rahl, et Richard A. Young. « SetDB1 Contributes to Repression of Genes Encoding Developmental Regulators and Maintenance of ES Cell State ». *Genes & Development* 23, n° 21 (1 novembre 2009): 2484-89. <https://doi.org/10.1101/gad.1837309>.
- Blakeley, Paul, Norah M. E. Fogarty, Ignacio del Valle, Sissy E. Wamaitha, Tim Xiaoming Hu, Kay Elder, Philip Snell, Leila Christie, Paul Robson, et Kathy K. Niakan. « Defining the Three Cell Lineages of the Human Blastocyst by Single-Cell RNA-Seq ». *Development (Cambridge, England)* 142, n° 18 (15 septembre 2015): 3151-65. <https://doi.org/10.1242/dev.123547>.
- Boer, Brian, Janel Kopp, Sunil Mallanna, Michelle Desler, Harini Chakravarthy, Phillip J. Wilder, Cory Bernadt, et Angie Rizzino. « 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, n° 6 (2007): 1773-86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm059>.
- Bogliotti, Yanina Soledad, Jun Wu, Marcela Vilarino, Daiji Okamura, Delia Alba Soto, Cuiqing Zhong, Masahiro Sakurai, et al. « Efficient Derivation of Stable Primed Pluripotent Embryonic Stem Cells from Bovine Blastocysts ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, n° 9 (27 février 2018): 2090-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716161115>.
- Borgel, Julie, Sylvain Guibert, Yufeng Li, Hatsune Chiba, Dirk Schübeler, Hiroyuki Sasaki, Thierry Forné, et Michael Weber. « Targets and Dynamics of Promoter DNA Methylation during Early Mouse Development ». *Nature Genetics* 42, n° 12 (décembre 2010): 1093-1100. <https://doi.org/10.1038/ng.708>.
- Boroviak, Thorsten, Remco Loos, Patrick Lombard, Junko Okahara, Rüdiger Behr, Erika Sasaki, Jennifer Nichols, Austin Smith, et Paul Bertone. « Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis ». *Developmental Cell* 35, n° 3 (9 novembre 2015): 366-82. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.10.011>.

- Boroviak, Thorsten, Giuliano G. Stirparo, Sabine Dietmann, Irene Hernando-Herraez, Hisham Mohammed, Wolf Reik, Austin Smith, Erika Sasaki, Jennifer Nichols, et Paul Bertone. « Single Cell Transcriptome Analysis of Human, Marmoset and Mouse Embryos Reveals Common and Divergent Features of Preimplantation Development ». *Development (Cambridge, England)* 145, n° 21 (9 novembre 2018): dev167833. <https://doi.org/10.1242/dev.167833>.
- Bou, Gerelchimeg, Shichao Liu, Jia Guo, Yueming Zhao, Mingju Sun, Binghua Xue, Jiaqiang Wang, Yanchang Wei, Qingran Kong, et Zhonghua Liu. « Cdx2 Represses Oct4 Function via Inducing Its Proteasome-Dependent Degradation in Early Porcine Embryos ». *Developmental Biology* 410, n° 1 (1 février 2016): 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.12.014>.
- Bourillot, Pierre-Yves, Irène Aksoy, Valerie Schreiber, Florence Wianny, Herbert Schulz, Oliver Hummel, Norbert Hubner, et Pierre Savatier. « Novel STAT3 Target Genes Exert Distinct Roles in the Inhibition of Mesoderm and Endoderm Differentiation in Cooperation with Nanog ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27, n° 8 (août 2009): 1760-71. <https://doi.org/10.1002/stem.110>.
- Bourillot, Pierre-Yves, Claire Santamaria, Laurent David, et Pierre Savatier. « GP130 Signaling and the Control of Naïve Pluripotency in Humans, Monkeys, and Pigs ». *Experimental Cell Research* 386, n° 1 (1 janvier 2020): 111712. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111712>.
- Bowling, Sarah, Aida Di Gregorio, Margarida Sancho, Sara Pozzi, Marieke Aarts, Massimo Signore, Michael D Schneider, Juan Pedro Martinez-Barbera, Jesús Gil, et Tristan A. Rodríguez. « P53 and MTOR Signalling Determine Fitness Selection through Cell Competition during Early Mouse Embryonic Development ». *Nature Communications* 9, n° 1 (2 mai 2018): 1763. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04167-y>.
- Boyer, Laurie A., Tong Ihn Lee, Megan F. Cole, Sarah E. Johnstone, Stuart S. Levine, Jacob P. Zucker, Matthew G. Guenther, et al. « Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells ». *Cell* 122, n° 6 (23 septembre 2005): 947-56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>.
- Brennan, J., C. C. Lu, D. P. Norris, T. A. Rodriguez, R. S. Beddington, et E. J. Robertson. « Nodal Signalling in the Epiblast Patterns the Early Mouse Embryo ». *Nature* 411, n° 6840 (21 juin 2001): 965-69. <https://doi.org/10.1038/35082103>.
- Brons, I. Gabrielle M., Lucy E. Smithers, Matthew W. B. Trotter, Peter Rugg-Gunn, Bowen Sun, Susana M. Chuva de Sousa Lopes, Sarah K. Howlett, et al. « Derivation of Pluripotent Epiblast Stem Cells from Mammalian Embryos ». *Nature* 448, n° 7150 (12 juillet 2007): 191-95. <https://doi.org/10.1038/nature05950>.
- Brown, J. J., et D. G. Whittingham. « The Roles of Pyruvate, Lactate and Glucose during Preimplantation Development of Embryos from F1 Hybrid Mice in Vitro ». *Development (Cambridge, England)* 112, n° 1 (mai 1991): 99-105.
- Brown, Stephanie, Adrian Teo, Siim Pauklin, Nicholas Hannan, Candy H.-H. Cho, Bing Lim, Leah Vardy, et al. « Activin/Nodal Signaling Controls Divergent Transcriptional Networks in Human Embryonic Stem Cells and in Endoderm Progenitors ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 29, n° 8 (août 2011): 1176-85. <https://doi.org/10.1002/stem.666>.
- Buecker, Christa, Rajini Srinivasan, Zhixiang Wu, Eliezer Calo, Dario Acampora, Tiago Faial, Antonio Simeone, Minjia Tan, Tomasz Swigut, et Joanna Wysocka. « Reorganization of Enhancer Patterns in Transition from Naive to Primed Pluripotency ». *Cell Stem Cell* 14, n° 6 (5 juin 2014): 838-53. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.04.003>.
- Buehr, Mia, Stephen Meek, Kate Blair, Jian Yang, Janice Ure, Jose Silva, Renee McLay, John Hall, Qi-Long Ying, et Austin Smith. « Capture of Authentic Embryonic Stem Cells from Rat Blastocysts ». *Cell* 135, n° 7 (26 décembre 2008): 1287-98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.007>.
- Bulut-Karslioglu, Aydan, Steffen Biechele, Hu Jin, Trisha A. Macrae, Miroslav Hejna, Marina Gertsenstein, Jun S. Song, et Miguel Ramalho-Santos. « Inhibition of MTOR Induces a Paused

- Pluripotent State ». *Nature* 540, n° 7631 (1 décembre 2016): 119-23. <https://doi.org/10.1038/nature20578>.
- Campolo, Federica, Manuele Gori, Rebecca Favaro, Silvia Nicolis, Manuela Pellegrini, Flavia Botti, Pellegrino Rossi, Emmanuele A. Jannini, et Susanna Dolci. « Essential Role of Sox2 for the Establishment and Maintenance of the Germ Cell Line ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 31, n° 7 (juillet 2013): 1408-21. <https://doi.org/10.1002/stem.1392>.
- Camus, Anne, Aitana Perea-Gomez, Anne Moreau, et Jérôme Collignon. « Absence of Nodal Signaling Promotes Precocious Neural Differentiation in the Mouse Embryo ». *Developmental Biology* 295, n° 2 (15 juillet 2006): 743-55. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.047>.
- Canizo, Jessica R., Amada E. Ynsaurralde Rivolta, Camila Vazquez Echegaray, Mariana Suvá, Virgilia Alberio, Juan F. Aller, Alejandra S. Guberman, Daniel F. Salamone, Ricardo H. Alberio, et Ramiro Alberio. « A Dose-Dependent Response to MEK Inhibition Determines Hypoblast Fate in Bovine Embryos ». *BMC Developmental Biology* 19, n° 1 (4 juillet 2019): 13. <https://doi.org/10.1186/s12861-019-0193-9>.
- Carbognin, Elena, Riccardo M. Betto, Maria E. Soriano, Austin G. Smith, et Graziano Martello. « Stat3 Promotes Mitochondrial Transcription and Oxidative Respiration during Maintenance and Induction of Naive Pluripotency ». *The EMBO Journal* 35, n° 6 (15 mars 2016): 618-34. <https://doi.org/10.15252/embj.201592629>.
- Carey, Bryce W., Lydia W. S. Finley, Justin R. Cross, C. David Allis, et Craig B. Thompson. « Intracellular α -Ketoglutarate Maintains the Pluripotency of Embryonic Stem Cells ». *Nature* 518, n° 7539 (19 février 2015): 413-16. <https://doi.org/10.1038/nature13981>.
- Castaño, Julio, Cristina Morera, Borja Sesé, Stephanie Boue, Carles Bonet-Costa, Merce Martí, Alicia Roque, Albert Jordan, et Maria J. Barrero. « SETD7 Regulates the Differentiation of Human Embryonic Stem Cells ». *PloS One* 11, n° 2 (2016): e0149502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149502>.
- Chamberlain, Stormy J., Della Yee, et Terry Magnuson. « Polycomb Repressive Complex 2 Is Dispensable for Maintenance of Embryonic Stem Cell Pluripotency ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26, n° 6 (juin 2008): 1496-1505. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0102>.
- Chambers, Ian, Douglas Colby, Morag Robertson, Jennifer Nichols, Sonia Lee, Susan Tweedie, et Austin Smith. « Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells ». *Cell* 113, n° 5 (30 mai 2003): 643-55. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00392-1).
- Chambers, Ian, Jose Silva, Douglas Colby, Jennifer Nichols, Bianca Nijmeijer, Morag Robertson, Jan Vrana, Ken Jones, Lars Grotewold, et Austin Smith. « Nanog Safeguards Pluripotency and Mediates Germline Development ». *Nature* 450, n° 7173 (20 décembre 2007): 1230-34. <https://doi.org/10.1038/nature06403>.
- Chan, Yun-Shen, Jonathan Göke, Jia-Hui Ng, Xinyi Lu, Kevin Andrew Uy Gonzales, Cheng-Peow Tan, Wei-Quan Tng, Zhong-Zhi Hong, Yee-Siang Lim, et Huck-Hui Ng. « Induction of a Human Pluripotent State with Distinct Regulatory Circuitry That Resembles Preimplantation Epiblast ». *Cell Stem Cell* 13, n° 6 (5 décembre 2013): 663-75. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.015>.
- Chavez, Shawn L., Sohyun L. McElroy, Nancy L. Bossert, Christopher J. De Jonge, Maria Vera Rodriguez, Denise E. Leong, Barry Behr, Lynn M. Westphal, et Renee A. Reijo Pera. « Comparison of Epigenetic Mediator Expression and Function in Mouse and Human Embryonic Blastomeres ». *Human Molecular Genetics* 23, n° 18 (15 septembre 2014): 4970-84. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu212>.
- Chawalit, Siriboon, Ngoc Tan Nguyen, Jung-Kai Tseng, Neng-Wen Lo, Ching-Fu Tu, et Jyh-Cherng Ju. « Trichostatin A and Ascorbic Acid Assist in the Development of Porcine Handmade Cloned Embryos via Different Physiologic Pathways ». *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 19, n° 9 (septembre 2012): 976-86. <https://doi.org/10.1177/1933719112440049>.

- Chazaud, Claire, et Yojiro Yamanaka. « Lineage Specification in the Mouse Preimplantation Embryo ». *Development (Cambridge, England)* 143, n° 7 (1 avril 2016): 1063-74. <https://doi.org/10.1242/dev.128314>.
- Chazaud, Claire, Yojiro Yamanaka, Tony Pawson, et Janet Rossant. « Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway ». *Developmental Cell* 10, n° 5 (mai 2006): 615-24. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.02.020>.
- Chen, Canhe, Stephanie M. Ware, Akira Sato, Dianne E. Houston-Hawkins, Raymond Habas, Martin M. Matzuk, Michael M. Shen, et Chester W. Brown. « The Vg1-Related Protein Gdf3 Acts in a Nodal Signaling Pathway in the Pre-Gastrulation Mouse Embryo ». *Development (Cambridge, England)* 133, n° 2 (janvier 2006): 319-29. <https://doi.org/10.1242/dev.02210>.
- Chen, Chien-Hong, Wei-Fang Chang, Chia-Chia Liu, Hwa-Yun Su, Song-Kun Shyue, Winston T. K. Cheng, Y. Eugene Chen, et al. « Spatial and Temporal Distribution of Oct-4 and Acetylated H4K5 in Rabbit Embryos ». *Reproductive Biomedicine Online* 24, n° 4 (avril 2012): 433-42. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.01.001>.
- Chen, Hongwei, Irène Aksoy, Fabrice Gonnot, Pierre Osteil, Maxime Aubry, Claire Hamela, Cloé Rognard, et al. « Reinforcement of STAT3 Activity Reprogrammes Human Embryonic Stem Cells to Naive-like Pluripotency ». *Nature Communications* 6 (13 mai 2015): 7095. <https://doi.org/10.1038/ncomms8095>.
- Cheng, En-Hui, Jer-Yuh Liu, Tsung-Hsein Lee, Chun-Chia Huang, Chung-I. Chen, Lii-Sheng Huang, et Maw-Sheng Lee. « Requirement of Leukemia Inhibitory Factor or Epidermal Growth Factor for Pre-Implantation Embryogenesis via JAK/STAT3 Signaling Pathways ». *PLoS One* 11, n° 4 (2016): e0153086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153086>.
- Chern, C. J., et E. Beutler. « Biochemical and Electrophoretic Studies of Erythrocyte Pyridoxine Kinase in White and Black Americans ». *American Journal of Human Genetics* 28, n° 1 (janvier 1976): 9-17.
- Chew, Joon-Lin, Yuin-Han Loh, Wensheng Zhang, Xi Chen, Wai-Leong Tam, Leng-Siew Yeap, Pin Li, et al. « Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells ». *Molecular and Cellular Biology* 25, n° 14 (juillet 2005): 6031-46. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.6031-6046.2005>.
- Chhabra, Sapna, Lizhong Liu, Ryan Goh, Xiangyu Kong, et Aryeh Warmflash. « Dissecting the Dynamics of Signaling Events in the BMP, WNT, and NODAL Cascade during Self-Organized Fate Patterning in Human Gastruloids ». *PLoS Biology* 17, n° 10 (octobre 2019): e3000498. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000498>.
- Choy, Mun-Kit, Mehregan Movassagh, Hock-Guan Goh, Martin R. Bennett, Thomas A. Down, et Roger S. Y. Foo. « Genome-Wide Conserved Consensus Transcription Factor Binding Motifs Are Hyper-Methylated ». *BMC Genomics* 11 (27 septembre 2010): 519. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-519>.
- Christians, E., V. H. Rao, et J. P. Renard. « Sequential Acquisition of Transcriptional Control during Early Embryonic Development in the Rabbit ». *Developmental Biology* 164, n° 1 (juillet 1994): 160-72. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1188>.
- Cidral, Ana Luíza, Joana C. Moreira de Mello, Joost Gribnau, et Lygia V. Pereira. « Concurrent X Chromosome Inactivation and Upregulation during Non-Human Primate Preimplantation Development Revealed by Single-Cell RNA-Sequencing ». *Scientific Reports* 11, n° 1 (5 mai 2021): 9624. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89175-7>.
- Ciemerych, Maria A., Anna M. Kenney, Ewa Sicinska, Ilona Kalaszczynska, Roderick T. Bronson, David H. Rowitch, Humphrey Gardner, et Piotr Sicinski. « Development of Mice Expressing a Single D-Type Cyclin ». *Genes & Development* 16, n° 24 (15 décembre 2002): 3277-89. <https://doi.org/10.1101/gad.1023602>.

- Clavería, Cristina, Giovanna Giovinazzo, Rocío Sierra, et Miguel Torres. « Myc-Driven Endogenous Cell Competition in the Early Mammalian Embryo ». *Nature* 500, n° 7460 (1 août 2013): 39-44. <https://doi.org/10.1038/nature12389>.
- Collinson, Adam, Amanda J. Collier, Natasha P. Morgan, Arnold R. Sienerth, Tamir Chandra, Simon Andrews, et Peter J. Rugg-Gunn. « Deletion of the Polycomb-Group Protein EZH2 Leads to Compromised Self-Renewal and Differentiation Defects in Human Embryonic Stem Cells ». *Cell Reports* 17, n° 10 (6 décembre 2016): 2700-2714. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.032>.
- Conlon, F. L., K. M. Lyons, N. Takaesu, K. S. Barth, A. Kispert, B. Herrmann, et E. J. Robertson. « A Primary Requirement for Nodal in the Formation and Maintenance of the Primitive Streak in the Mouse ». *Development (Cambridge, England)* 120, n° 7 (juillet 1994): 1919-28.
- Coronado, Diana, Murielle Godet, Pierre-Yves Bourillot, Yann Taponnier, Agnieszka Bernat, Maxime Petit, Marielle Afanassieff, et al. « A Short G1 Phase Is an Intrinsic Determinant of Naïve Embryonic Stem Cell Pluripotency ». *Stem Cell Research* 10, n° 1 (janvier 2013): 118-31. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.10.004>.
- Cui, Xiang-Shun, Yong-Nan Xu, Xing-Hui Shen, Li-Qun Zhang, Jia-Bao Zhang, et Nam-Hyung Kim. « Trichostatin A Modulates Apoptotic-Related Gene Expression and Improves Embryo Viability in Cloned Bovine Embryos ». *Cellular Reprogramming* 13, n° 2 (avril 2011): 179-89. <https://doi.org/10.1089/cell.2010.0060>.
- Czechanski, Anne, Candice Byers, Ian Greenstein, Nadine Schrode, Leah Rae Donahue, Anna-Katerina Hadjantonakis, et Laura G. Reinholdt. « Derivation and Characterization of Mouse Embryonic Stem Cells from Permissive and Nonpermissive Strains ». *Nature Protocols* 9, n° 3 (mars 2014): 559-74. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.030>.
- Dahéron, Laurence, Sarah L. Opitz, Holm Zaehres, M. William Lensch, William M. Lensch, Peter W. Andrews, Joseph Itskovitz-Eldor, et George Q. Daley. « LIF/STAT3 Signaling Fails to Maintain Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 22, n° 5 (2004): 770-78. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-770>.
- Dailey, Lisa, Davide Ambrosetti, Alka Mansukhani, et Claudio Basilico. « Mechanisms Underlying Differential Responses to FGF Signaling ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16, n° 2 (avril 2005): 233-47. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.007>.
- Dawlaty, Meelad M., Achim Breiling, Thuc Le, Günter Raddatz, M. Inmaculada Barrasa, Albert W. Cheng, Qing Gao, et al. « Combined Deficiency of Tet1 and Tet2 Causes Epigenetic Abnormalities but Is Compatible with Postnatal Development ». *Developmental Cell* 24, n° 3 (11 février 2013): 310-23. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.12.015>.
- De Jaime-Soguero, Anchel, Francesco Aulicino, Gokhan Ertaylan, Anna Griego, Aniello Cerrato, Aravind Tallam, Antonio Del Sol, Maria Pia Cosma, et Frederic Lluís. « Wnt/Tcf1 Pathway Restricts Embryonic Stem Cell Cycle through Activation of the Ink4/Arf Locus ». *PLoS Genetics* 13, n° 3 (mars 2017): e1006682. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006682>.
- De Paepe, Caroline, Greet Cauffman, An Verloes, Johan Sterckx, Paul Devroey, Herman Tournaye, Inge Liebaers, et Hilde Van de Velde. « Human Trophoblast Cells Are Not yet Committed ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 28, n° 3 (mars 2013): 740-49. <https://doi.org/10.1093/humrep/des432>.
- De Vries, Wilhelmine N., Alexei V. Evsikov, Bryce E. Haac, Karen S. Fancher, Andrea E. Holbrook, Rolf Kemler, Davor Solter, et Barbara B. Knowles. « Maternal Beta-Catenin and E-Cadherin in Mouse Development ». *Development (Cambridge, England)* 131, n° 18 (septembre 2004): 4435-45. <https://doi.org/10.1242/dev.01316>.
- Dean, W., F. Santos, M. Stojkovic, V. Zakhartchenko, J. Walter, E. Wolf, et W. Reik. « Conservation of Methylation Reprogramming in Mammalian Development: Aberrant Reprogramming in Cloned Embryos ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, n° 24 (20 novembre 2001): 13734-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.241522698>.

- Deng, C. X., A. Wynshaw-Boris, M. M. Shen, C. Daugherty, D. M. Ornitz, et P. Leder. « Murine FGFR-1 Is Required for Early Postimplantation Growth and Axial Organization ». *Genes & Development* 8, n° 24 (15 décembre 1994): 3045-57. <https://doi.org/10.1101/gad.8.24.3045>.
- Denicol, Anna C., Jeremy Block, Dale E. Kelley, Ky G. Pohler, Kyle B. Dobbs, Christopher J. Mortensen, M. Sofia Ortega, et Peter J. Hansen. « The WNT Signaling Antagonist Dickkopf-1 Directs Lineage Commitment and Promotes Survival of the Preimplantation Embryo ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28, n° 9 (septembre 2014): 3975-86. <https://doi.org/10.1096/fj.14-253112>.
- Denicol, Anna C., Kyle B. Dobbs, Kanyon M. McLean, Silvia F. Carambula, Barbara Loureiro, et Peter J. Hansen. « Canonical WNT Signaling Regulates Development of Bovine Embryos to the Blastocyst Stage ». *Scientific Reports* 3 (2013): 1266. <https://doi.org/10.1038/srep01266>.
- Díaz-Díaz, Covadonga, Laura Fernandez de Manuel, Daniel Jimenez-Carretero, María Concepción Montoya, Cristina Clavería, et Miguel Torres. « Pluripotency Surveillance by Myc-Driven Competitive Elimination of Differentiating Cells ». *Developmental Cell* 42, n° 6 (25 septembre 2017): 585-599.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.08.011>.
- Ding, Vanessa M. Y., Ling Ling, Subaashini Natarajan, Miranda G. S. Yap, Simon M. Cool, et Andre B. H. Choo. « FGF-2 Modulates Wnt Signaling in Undifferentiated HESC and IPS Cells through Activated PI3-K/GSK3beta Signaling ». *Journal of Cellular Physiology* 225, n° 2 (novembre 2010): 417-28. <https://doi.org/10.1002/jcp.22214>.
- Diril, M. Kasim, Chandrahas Koumar Ratnacaram, V. C. Padmakumar, Tiehua Du, Martin Wasser, Vincenzo Coppola, Lino Tessarollo, et Philipp Kaldis. « Cyclin-Dependent Kinase 1 (Cdk1) Is Essential for Cell Division and Suppression of DNA Re-Replication but Not for Liver Regeneration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, n° 10 (6 mars 2012): 3826-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115201109>.
- Do, Dang Vinh, Jun Ueda, Daniel M. Messerschmidt, Chanchao Lorthongpanich, Yi Zhou, Bo Feng, Guoji Guo, et al. « A Genetic and Developmental Pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG Circuit Is Essential for Maintenance of ICM Lineages in Vivo ». *Genes & Development* 27, n° 12 (15 juin 2013): 1378-90. <https://doi.org/10.1101/gad.221176.113>.
- Doble, Bradley W., Satish Patel, Geoffrey A. Wood, Lisa K. Kockeritz, et James R. Woodgett. « Functional Redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/Beta-Catenin Signaling Shown by Using an Allelic Series of Embryonic Stem Cell Lines ». *Developmental Cell* 12, n° 6 (juin 2007): 957-71. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.04.001>.
- Dodge, Jonathan E., Yong-Kook Kang, Hideyuki Beppu, Hong Lei, et En Li. « Histone H3-K9 Methyltransferase ESET Is Essential for Early Development ». *Molecular and Cellular Biology* 24, n° 6 (mars 2004): 2478-86. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.6.2478-2486.2004>.
- Donohoe, Mary E., Susana S. Silva, Stefan F. Pinter, Na Xu, et Jeannie T. Lee. « The Pluripotency Factor Oct4 Interacts with Ctf and Also Controls X-Chromosome Pairing and Counting ». *Nature* 460, n° 7251 (2 juillet 2009): 128-32. <https://doi.org/10.1038/nature08098>.
- Dovey, Oliver M., Charles T. Foster, et Shaun M. Cowley. « Histone Deacetylase 1 (HDAC1), but Not HDAC2, Controls Embryonic Stem Cell Differentiation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, n° 18 (4 mai 2010): 8242-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000478107>.
- Downs, Karen M. « Systematic Localization of Oct-3/4 to the Gastrulating Mouse Conceptus Suggests Manifold Roles in Mammalian Development ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 237, n° 2 (février 2008): 464-75. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21438>.
- Dunlison, G. F., D. H. Barlow, et I. L. Sargent. « Leukaemia Inhibitory Factor Significantly Enhances the Blastocyst Formation Rates of Human Embryos Cultured in Serum-Free Medium ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 11, n° 1 (janvier 1996): 191-96. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019016>.

- Edwards, D. L., C. P. Arora, D. T. Bui, et L. C. Castro. « Long-Term Nitric Oxide Blockade in the Pregnant Rat: Effects on Blood Pressure and Plasma Levels of Endothelin-1 ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 175, n° 2 (août 1996): 484-88. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(96\)70166-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(96)70166-7).
- Evans, M. J., et M. H. Kaufman. « Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos ». *Nature* 292, n° 5819 (9 juillet 1981): 154-56. <https://doi.org/10.1038/292154a0>.
- Fabrèges, Dimitri, Nathalie Daniel, Véronique Duranthon, et Nadine Peyriéras. « Control of the Proportion of Inner Cells by Asymmetric Divisions and the Ensuing Resilience of Cloned Rabbit Embryos ». *Development (Cambridge, England)* 145, n° 8 (18 avril 2018): dev152041. <https://doi.org/10.1242/dev.152041>.
- Fan, Rui, Yung Su Kim, Jie Wu, Rui Chen, Dagmar Zeuschner, Karina Mildner, Kenjiro Adachi, et al. « Wnt/Beta-Catenin/Esrrb Signalling Controls the Tissue-Scale Reorganization and Maintenance of the Pluripotent Lineage during Murine Embryonic Diapause ». *Nature Communications* 11, n° 1 (30 octobre 2020): 5499. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19353-0>.
- Fang, Lan, Jun Zhang, Hui Zhang, Xiaoqin Yang, Xueling Jin, Ling Zhang, David G. Skalnik, et al. « H3K4 Methyltransferase Set1a Is A Key Oct4 Coactivator Essential for Generation of Oct4 Positive Inner Cell Mass ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 34, n° 3 (mars 2016): 565-80. <https://doi.org/10.1002/stem.2250>.
- Fang, Riguo, Kang Liu, Yang Zhao, Haibo Li, Dicong Zhu, Yuanyuan Du, Chengang Xiang, et al. « Generation of Naive Induced Pluripotent Stem Cells from Rhesus Monkey Fibroblasts ». *Cell Stem Cell* 15, n° 4 (2 octobre 2014): 488-97. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.004>.
- Faust, C., K. A. Lawson, N. J. Schork, B. Thiel, et T. Magnuson. « The Polycomb-Group Gene Eed Is Required for Normal Morphogenetic Movements during Gastrulation in the Mouse Embryo ». *Development (Cambridge, England)* 125, n° 22 (novembre 1998): 4495-4506.
- Feldman, Nirit, Ariela Gerson, Jia Fang, En Li, Yi Zhang, Yoichi Shinkai, Howard Cedar, et Yehudit Bergman. « G9a-Mediated Irreversible Epigenetic Inactivation of Oct-3/4 during Early Embryogenesis ». *Nature Cell Biology* 8, n° 2 (février 2006): 188-94. <https://doi.org/10.1038/ncb1353>.
- Filipczyk, Adam A., Andrew L. Laslett, Christine Mummery, et Martin F. Pera. « Differentiation Is Coupled to Changes in the Cell Cycle Regulatory Apparatus of Human Embryonic Stem Cells ». *Stem Cell Research* 1, n° 1 (octobre 2007): 45-60. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2007.09.002>.
- Fiorenzano, Alessandro, Emilia Pascale, Cristina D'Aniello, Dario Acampora, Cecilia Bassalart, Francesco Russo, Gennaro Andolfi, et al. « Cripto Is Essential to Capture Mouse Epiblast Stem Cell and Human Embryonic Stem Cell Pluripotency ». *Nature Communications* 7 (2 septembre 2016): 12589. <https://doi.org/10.1038/ncomms12589>.
- Fluckiger, Anne-Catherine, Guillaume Marcy, Mélanie Marchand, Didier Nègre, François-Loïc Cosset, Shoukhrat Mitalipov, Don Wolf, Pierre Savatier, et Colette Dehay. « Cell Cycle Features of Primate Embryonic Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24, n° 3 (mars 2006): 547-56. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0194>.
- Frankenberg, Stephen, François Gerbe, Sylvain Bessonard, Corinne Belville, Pierre Pouchin, Olivier Bardot, et Claire Chazaud. « Primitive Endoderm Differentiates via a Three-Step Mechanism Involving Nanog and RTK Signaling ». *Developmental Cell* 21, n° 6 (13 décembre 2011): 1005-13. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.019>.
- Frankenberg, Stephen, Geoff Shaw, Claudia Freyer, Andrew J. Pask, et Marilyn B. Renfree. « Early Cell Lineage Specification in a Marsupial: A Case for Diverse Mechanisms among Mammals ». *Development (Cambridge, England)* 140, n° 5 (mars 2013): 965-75. <https://doi.org/10.1242/dev.091629>.

- Frum, Tristan, Michael A. Halbisen, Chaoyang Wang, Hossein Amiri, Paul Robson, et Amy Ralston. « Oct4 Cell-Autonomously Promotes Primitive Endoderm Development in the Mouse Blastocyst ». *Developmental Cell* 25, n° 6 (24 juin 2013): 610-22. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.05.004>.
- Gafni, Ohad, Leehee Weinberger, Abed AlFatah Mansour, Yair S. Manor, Elad Chomsky, Dalit Ben-Yosef, Yael Kalma, et al. « Derivation of Novel Human Ground State Naive Pluripotent Stem Cells ». *Nature* 504, n° 7479 (12 décembre 2013): 282-86. <https://doi.org/10.1038/nature12745>.
- Gao, Zhiguang, Jesse L. Cox, Joshua M. Gilmore, Briana D. Ormsbee, Sunil K. Mallanna, Michael P. Washburn, et Angie Rizzino. « Determination of Protein Interactome of Transcription Factor Sox2 in Embryonic Stem Cells Engineered for Inducible Expression of Four Reprogramming Factors ». *The Journal of Biological Chemistry* 287, n° 14 (30 mars 2012): 11384-97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.320143>.
- Gardner, R. L., et F. A. Brook. « Reflections on the Biology of Embryonic Stem (ES) Cells ». *The International Journal of Developmental Biology* 41, n° 2 (avril 1997): 235-43.
- Gearing, D. P., C. J. Thut, T. VandeBos, S. D. Gimpel, P. B. Delaney, J. King, V. Price, D. Cosman, et M. P. Beckmann. « Leukemia Inhibitory Factor Receptor Is Structurally Related to the IL-6 Signal Transducer, Gp130 ». *The EMBO Journal* 10, n° 10 (octobre 1991): 2839-48.
- Geng, Yan, Qunyan Yu, Ewa Sicinska, Manjusri Das, Jürgen E. Schneider, Shoumo Bhattacharya, William M. Rideout, Roderick T. Bronson, Humphrey Gardner, et Piotr Sicinski. « Cyclin E Ablation in the Mouse ». *Cell* 114, n° 4 (22 août 2003): 431-43. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00645-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00645-7).
- Gerri, Claudia, Afshan McCarthy, Gregorio Alanis-Lobato, Andrej Demtschenko, Alexandre Bruneau, Sophie Loubersac, Norah M. E. Fogarty, et al. « Initiation of a Conserved Trophectoderm Program in Human, Cow and Mouse Embryos ». *Nature* 587, n° 7834 (novembre 2020): 443-47. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2759-x>.
- Gonnot, Fabrice, Diana Langer, Pierre-Yves Bourillot, Nathalie Doerflinger, et Pierre Savatier. « Regulation of Cyclin E by Transcription Factors of the Naïve Pluripotency Network in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 18, n° 20 (octobre 2019): 2697-2712. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1656475>.
- Gonzales, Kevin Andrew Uy, Hongqing Liang, Yee-Siang Lim, Yun-Shen Chan, Jia-Chi Yeo, Cheng-Peow Tan, Bin Gao, et al. « Deterministic Restriction on Pluripotent State Dissolution by Cell-Cycle Pathways ». *Cell* 162, n° 3 (30 juillet 2015): 564-79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.001>.
- Gopichandran, N., et H. J. Leese. « Metabolic Characterization of the Bovine Blastocyst, Inner Cell Mass, Trophectoderm and Blastocoel Fluid ». *Reproduction (Cambridge, England)* 126, n° 3 (septembre 2003): 299-308. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260299>.
- Goszczynski, Daniel E., Hao Cheng, Sebastian Demyda-Peyrás, Juan F. Medrano, Jun Wu, et Pablo J. Ross. « In Vitro Breeding: Application of Embryonic Stem Cells to Animal Production† ». *Biology of Reproduction* 100, n° 4 (1 avril 2019): 885-95. <https://doi.org/10.1093/biolre/iy0256>.
- Grabarek, Joanna B., Krystyna Zyzyńska, Néstor Saiz, Anna Piliszek, Stephen Frankenberg, Jennifer Nichols, Anna-Katerina Hadjantonakis, et Berenika Plusa. « Differential Plasticity of Epiblast and Primitive Endoderm Precursors within the ICM of the Early Mouse Embryo ». *Development (Cambridge, England)* 139, n° 1 (janvier 2012): 129-39. <https://doi.org/10.1242/dev.067702>.
- Grabole, Nils, Julia Tischler, Jamie A. Hackett, Shinseog Kim, Fuchou Tang, Harry G. Leitch, Erna Magnúsdóttir, et M. Azim Surani. « Prdm14 Promotes Germline Fate and Naive Pluripotency by Repressing FGF Signalling and DNA Methylation ». *EMBO Reports* 14, n° 7 (juillet 2013): 629-37. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.67>.

- Graham, Sarah J. L., Krzysztof B. Wicher, Agnieszka Jedrusik, Guoji Guo, Wishva Herath, Paul Robson, et Magdalena Zernicka-Goetz. « BMP Signalling Regulates the Pre-Implantation Development of Extra-Embryonic Cell Lineages in the Mouse Embryo ». *Nature Communications* 5 (16 décembre 2014): 5667. <https://doi.org/10.1038/ncomms6667>.
- Greber, Boris, Hans Lehrach, et James Adjaye. « Fibroblast Growth Factor 2 Modulates Transforming Growth Factor Beta Signaling in Mouse Embryonic Fibroblasts and Human ESCs (HESCs) to Support HESC Self-Renewal ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25, n° 2 (février 2007): 455-64. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0476>.
- Greber, Boris, Guangming Wu, Christof Bernemann, Jin Young Joo, Dong Wook Han, Kinarm Ko, Natalia Tapia, et al. « Conserved and Divergent Roles of FGF Signaling in Mouse Epiblast Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 6, n° 3 (5 mars 2010): 215-26. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.01.003>.
- Guibert, Sylvain, et Michael Weber. « Functions of DNA Methylation and Hydroxymethylation in Mammalian Development ». *Current Topics in Developmental Biology* 104 (2013): 47-83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416027-9.00002-4>.
- Guo, Ge, Ferdinand von Meyenn, Maria Rostovskaya, James Clarke, Sabine Dietmann, Duncan Baker, Anna Sahakyan, et al. « Epigenetic Resetting of Human Pluripotency ». *Development (Cambridge, England)* 144, n° 15 (1 août 2017): 2748-63. <https://doi.org/10.1242/dev.146811>.
- Guo, Ge, Giuliano Giuseppe Stirparo, Stanley E. Strawbridge, Daniel Spindlow, Jian Yang, James Clarke, Anish Dattani, et al. « Human Naive Epiblast Cells Possess Unrestricted Lineage Potential ». *Cell Stem Cell* 28, n° 6 (3 juin 2021): 1040-1056.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.025>.
- Guo, Guoji, Mikael Huss, Guo Qing Tong, Chaoyang Wang, Li Li Sun, Neil D. Clarke, et Paul Robson. « Resolution of Cell Fate Decisions Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst ». *Developmental Cell* 18, n° 4 (20 avril 2010): 675-85. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.012>.
- Guo, Hongshan, Ping Zhu, Liying Yan, Rong Li, Boqiang Hu, Ying Lian, Jie Yan, et al. « The DNA Methylation Landscape of Human Early Embryos ». *Nature* 511, n° 7511 (31 juillet 2014): 606-10. <https://doi.org/10.1038/nature13544>.
- Guzman-Ayala, Marcela, Michael Sachs, Fong Ming Koh, Courtney Onodera, Aydan Bulut-Karslioglu, Chih-Jen Lin, Priscilla Wong, Rachel Nitta, Jun S. Song, et Miguel Ramalho-Santos. « Chd1 Is Essential for the High Transcriptional Output and Rapid Growth of the Mouse Epiblast ». *Development (Cambridge, England)* 142, n° 1 (1 janvier 2015): 118-27. <https://doi.org/10.1242/dev.114843>.
- Habibi, Ehsan, Arie B. Brinkman, Julia Arand, Leonie I. Kroeze, Hindrik H. D. Kerstens, Filomena Matarese, Konstantin Lepikhov, et al. « Whole-Genome Bisulfite Sequencing of Two Distinct Interconvertible DNA Methylomes of Mouse Embryonic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 13, n° 3 (5 septembre 2013): 360-69. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.06.002>.
- Hackett, Jamie A., Sabine Dietmann, Kazuhiro Murakami, Thomas A. Down, Harry G. Leitch, et M. Azim Surani. « Synergistic Mechanisms of DNA Demethylation during Transition to Ground-State Pluripotency ». *Stem Cell Reports* 1, n° 6 (2013): 518-31. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.010>.
- Hall, John, Ge Guo, Jason Wray, Isobel Eyres, Jennifer Nichols, Lars Grotewold, Sofia Morfopoulou, et al. « Oct4 and LIF/Stat3 Additively Induce Krüppel Factors to Sustain Embryonic Stem Cell Self-Renewal ». *Cell Stem Cell* 5, n° 6 (4 décembre 2009): 597-609. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.003>.
- Hanna, Jacob, Albert W. Cheng, Krishanu Saha, Jongpil Kim, Christopher J. Lengner, Frank Soldner, John P. Cassady, Julien Muffat, Bryce W. Carey, et Rudolf Jaenisch. « Human Embryonic Stem Cells with Biological and Epigenetic Characteristics Similar to Those of

- Mouse ESCs ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, n° 20 (18 mai 2010): 9222-27. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004584107>.
- Hao, Jing, Teng-Guo Li, Xiaoxia Qi, Dong-Feng Zhao, et Guang-Quan Zhao. « WNT/Beta-Catenin Pathway up-Regulates Stat3 and Converges on LIF to Prevent Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells ». *Developmental Biology* 290, n° 1 (1 février 2006): 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.11.011>.
- Hashimoto, Masakazu, et Hiroshi Sasaki. « Epiblast Formation by TEAD-YAP-Dependent Expression of Pluripotency Factors and Competitive Elimination of Unspecified Cells ». *Developmental Cell* 50, n° 2 (22 juillet 2019): 139-154.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.024>.
- Hassoun, Romia, Bernd Püschel, et Christoph Viebahn. « Sox17 Expression Patterns during Gastrulation and Early Neurulation in the Rabbit Suggest Two Sources of Endoderm Formation ». *Cells, Tissues, Organs* 191, n° 2 (2010): 68-83. <https://doi.org/10.1159/000236044>.
- Hassoun, Romia, Peter Schwartz, Kerstin Feistel, Martin Blum, et Christoph Viebahn. « Axial Differentiation and Early Gastrulation Stages of the Pig Embryo ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 78, n° 5 (décembre 2009): 301-11. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2009.07.006>.
- Hawkins, R. David, Gary C. Hon, Leonard K. Lee, Queminh Ngo, Ryan Lister, Mattia Pelizzola, Lee E. Edsall, et al. « Distinct Epigenomic Landscapes of Pluripotent and Lineage-Committed Human Cells ». *Cell Stem Cell* 6, n° 5 (7 mai 2010): 479-91. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.018>.
- Hayashi, Katsuhiko, Hiroshi Ohta, Kazuki Kurimoto, Shinya Aramaki, et Mitunori Saitou. « Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells ». *Cell* 146, n° 4 (19 août 2011): 519-32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.052>.
- Hayashi, Katsuhiko, Susana M. Chuva de Sousa Lopes, Fuchou Tang, Kaiqin Lao, et M. Azim Surani. « Dynamic Equilibrium and Heterogeneity of Mouse Pluripotent Stem Cells with Distinct Functional and Epigenetic States ». *Cell Stem Cell* 3, n° 4 (9 octobre 2008): 391-401. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.027>.
- Hayes, Kevin, Yun-Kyo Kim, et Martin F. Pera. « A Case for Revisiting Nodal Signaling in Human Pluripotent Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 39, n° 9 (septembre 2021): 1137-44. <https://doi.org/10.1002/stem.3383>.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Müller-Newen, F. Schaper, et L. Graeve. « Interleukin-6-Type Cytokine Signalling through the Gp130/Jak/STAT Pathway ». *The Biochemical Journal* 334 (Pt 2) (1 septembre 1998): 297-314. <https://doi.org/10.1042/bj3340297>.
- Hirate, Yoshikazu, Shino Hirahara, Ken-Ichi Inoue, Atsushi Suzuki, Vernadeth B. Alarcon, Kazunori Akimoto, Takaaki Hirai, et al. « Polarity-Dependent Distribution of Angiomotin Localizes Hippo Signaling in Preimplantation Embryos ». *Current Biology: CB* 23, n° 13 (8 juillet 2013): 1181-94. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.014>.
- Honda, Arata, Michiko Hirose, Kimiko Inoue, Narumi Ogonuki, Hiromi Miki, Nobuhiro Shimozawa, Masanori Hatori, et al. « Stable Embryonic Stem Cell Lines in Rabbits: Potential Small Animal Models for Human Research ». *Reproductive Biomedicine Online* 17, n° 5 (novembre 2008): 706-15. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60320-3](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60320-3).
- Honda, Arata, Michiko Hirose, et Atsuo Ogura. « Basic FGF and Activin/Nodal but Not LIF Signaling Sustain Undifferentiated Status of Rabbit Embryonic Stem Cells ». *Experimental Cell Research* 315, n° 12 (15 juillet 2009): 2033-42. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.01.024>.
- Hopf, Clas, Christoph Viebahn, et Bernd Püschel. « BMP Signals and the Transcriptional Repressor BLIMP1 during Germline Segregation in the Mammalian Embryo ». *Development Genes and Evolution* 221, n° 4 (octobre 2011): 209-23. <https://doi.org/10.1007/s00427-011-0373-5>.

- Houghton, F. D., J. G. Thompson, C. J. Kennedy, et H. J. Leese. « Oxygen Consumption and Energy Metabolism of the Early Mouse Embryo ». *Molecular Reproduction and Development* 44, n° 4 (août 1996): 476-85. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199608\)44:4<476::AID-MRD7>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199608)44:4<476::AID-MRD7>3.0.CO;2-I).
- Houghton, Francesca D. « Energy Metabolism of the Inner Cell Mass and Trophectoderm of the Mouse Blastocyst ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 74, n° 1 (février 2006): 11-18. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00052.x>.
- Huang, Xian-Ju, Xueshan Ma, Xuguang Wang, Xiaolong Zhou, Juan Li, Shao-Chen Sun, et Honglin Liu. « Involvement of G9A-like Protein (GLP) in the Development of Mouse Preimplantation Embryos in Vitro ». *Reproduction, Fertility, and Development*, 18 mai 2015. <https://doi.org/10.1071/RD14341>.
- Huang, Yali, Rodrigo Osorno, Anestis Tsakiridis, et Valerie Wilson. « In Vivo Differentiation Potential of Epiblast Stem Cells Revealed by Chimeric Embryo Formation ». *Cell Reports* 2, n° 6 (27 décembre 2012): 1571-78. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.022>.
- Huelsken, J., R. Vogel, V. Brinkmann, B. Erdmann, C. Birchmeier, et W. Birchmeier. « Requirement for Beta-Catenin in Anterior-Posterior Axis Formation in Mice ». *The Journal of Cell Biology* 148, n° 3 (7 février 2000): 567-78. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.3.567>.
- Hwang, In-Young, Sojung Kwak, Sangho Lee, Hyunsoo Kim, Sang Eun Lee, Jae-Hwan Kim, Young Ah Kim, et al. « Psat1-Dependent Fluctuations in α -Ketoglutarate Affect the Timing of ESC Differentiation ». *Cell Metabolism* 24, n° 3 (13 septembre 2016): 494-501. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.014>.
- Iager, Amy E., Neli P. Ragina, Pablo J. Ross, Zeki Beyhan, Kerriane Cunniff, Ramon M. Rodriguez, et Jose B. Cibelli. « Trichostatin A Improves Histone Acetylation in Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Early Embryos ». *Cloning and Stem Cells* 10, n° 3 (septembre 2008): 371-79. <https://doi.org/10.1089/clo.2007.0002>.
- Idkowiak, Jan, Gunnar Weisheit, Juliane Plitzner, et Christoph Viebahn. « Hypoblast Controls Mesoderm Generation and Axial Patterning in the Gastrulating Rabbit Embryo ». *Development Genes and Evolution* 214, n° 12 (décembre 2004): 591-605. <https://doi.org/10.1007/s00427-004-0436-y>.
- Idkowiak, Jan, Gunnar Weisheit, et Christoph Viebahn. « Polarity in the Rabbit Embryo ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15, n° 5 (octobre 2004): 607-17. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2004.04.007>.
- Illmensee, K., et B. Mintz. « Totipotency and Normal Differentiation of Single Teratocarcinoma Cells Cloned by Injection into Blastocysts ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, n° 2 (février 1976): 549-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.2.549>.
- Imajo, Masamichi, Koichi Miyatake, Akira Imura, Atsumu Miyamoto, et Eisuke Nishida. « A Molecular Mechanism That Links Hippo Signalling to the Inhibition of Wnt/ β -Catenin Signalling ». *The EMBO Journal* 31, n° 5 (7 mars 2012): 1109-22. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.487>.
- Irie, Naoko, Leehee Weinberger, Walfred W. C. Tang, Toshihiro Kobayashi, Sergey Viukov, Yair S. Manor, Sabine Dietmann, Jacob H. Hanna, et M. Azim Surani. « SOX17 Is a Critical Specifier of Human Primordial Germ Cell Fate ». *Cell* 160, n° 1-2 (15 janvier 2015): 253-68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.013>.
- Ito, Shinsuke, Ana C. D'Alessio, Olena V. Taranova, Kwonho Hong, Lawrence C. Sowers, et Yi Zhang. « Role of Tet Proteins in 5mC to 5hmC Conversion, ES-Cell Self-Renewal and Inner Cell Mass Specification ». *Nature* 466, n° 7310 (26 août 2010): 1129-33. <https://doi.org/10.1038/nature09303>.
- Ivanova, Natalia, Radu Dobrin, Rong Lu, Iulia Kotenko, John Levarse, Christina DeCoste, Xenia Schafer, Yi Lun, et Ihor R. Lemischka. « Dissecting Self-Renewal in Stem Cells with RNA

- Interference ». *Nature* 442, n° 7102 (3 août 2006): 533-38. <https://doi.org/10.1038/nature04915>.
- Iwafuchi-Doi, Makiko, Kazunari Matsuda, Kazuhiro Murakami, Hitoshi Niwa, Paul J. Tesar, Jun Aruga, Isao Matsuo, et Hisato Kondoh. « Transcriptional Regulatory Networks in Epiblast Cells and during Anterior Neural Plate Development as Modeled in Epiblast Stem Cells ». *Development (Cambridge, England)* 139, n° 21 (novembre 2012): 3926-37. <https://doi.org/10.1242/dev.085936>.
- Jamaladdin, Shereen, Richard D. W. Kelly, Laura O'Regan, Oliver M. Dovey, Grace E. Hodson, Christopher J. Millard, Nicola Portolano, Andrew M. Fry, John W. R. Schwabe, et Shaun M. Cowley. « Histone Deacetylase (HDAC) 1 and 2 Are Essential for Accurate Cell Division and the Pluripotency of Embryonic Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, n° 27 (8 juillet 2014): 9840-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321330111>.
- Jedrusik, Agnieszka, David-Emlyn Parfitt, Guoji Guo, Maria Skamagki, Joanna B. Grabarek, Martin H. Johnson, Paul Robson, et Magdalena Zernicka-Goetz. « Role of Cdx2 and Cell Polarity in Cell Allocation and Specification of Trophectoderm and Inner Cell Mass in the Mouse Embryo ». *Genes & Development* 22, n° 19 (1 octobre 2008): 2692-2706. <https://doi.org/10.1101/gad.486108>.
- Ji, J., R. Liu, T. Tong, Y. Song, S. Jin, M. Wu, et Q. Zhan. « Gadd45a Regulates Beta-Catenin Distribution and Maintains Cell-Cell Adhesion/Contact ». *Oncogene* 26, n° 44 (27 septembre 2007): 6396-6405. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210469>.
- Jiang, Jianming, Yun-Shen Chan, Yuin-Han Loh, Jun Cai, Guo-Qing Tong, Ching-Aeng Lim, Paul Robson, Sheng Zhong, et Huck-Hui Ng. « A Core Klf Circuitry Regulates Self-Renewal of Embryonic Stem Cells ». *Nature Cell Biology* 10, n° 3 (mars 2008): 353-60. <https://doi.org/10.1038/ncb1698>.
- Jiang, Yonghua, Zhaohui Kou, Tong Wu, Weidong An, Ran Zhou, Hong Wang, Yawei Gao, et Shaorong Gao. « Xist Deficiency and Disorders of X-Inactivation in Rabbit Embryonic Stem Cells Can Be Rescued by Transcription-Factor-Mediated Conversion ». *Stem Cells and Development* 23, n° 19 (1 octobre 2014): 2283-96. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0011>.
- Jin, Jiali, Jian Liu, Cong Chen, Zhenping Liu, Cong Jiang, Hongshang Chu, Weijuan Pan, et al. « The Deubiquitinase USP21 Maintains the Stemness of Mouse Embryonic Stem Cells via Stabilization of Nanog ». *Nature Communications* 7 (25 novembre 2016): 13594. <https://doi.org/10.1038/ncomms13594>.
- Jin, Shunqian, Lucia Mazzacurati, Xiaocheng Zhu, Tong Tong, Yongmei Song, Shao Shujuan, Kimberly L. Petrik, Baskaran Rajasekaran, Min Wu, et Qimin Zhan. « Gadd45a Contributes to P53 Stabilization in Response to DNA Damage ». *Oncogene* 22, n° 52 (20 novembre 2003): 8536-40. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206907>.
- Johnson, W. H., N. M. Loskutoff, Y. Plante, et K. J. Betteridge. « Production of Four Identical Calves by the Separation of Blastomeres from an in Vitro Derived Four-Cell Embryo ». *The Veterinary Record* 137, n° 1 (1 juillet 1995): 15-16. <https://doi.org/10.1136/vr.137.1.15>.
- Kalkan, Tüzer, Susanne Bornelöv, Carla Mulas, Evangelia Diamanti, Tim Lohoff, Meryem Ralsler, Sjors Middelkamp, Patrick Lombard, Jennifer Nichols, et Austin Smith. « Complementary Activity of ETV5, RBPJ, and TCF3 Drives Formative Transition from Naive Pluripotency ». *Cell Stem Cell* 24, n° 5 (2 mai 2019): 785-801.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.017>.
- Kalkan, Tüzer, Nelly Olova, Mila Roode, Carla Mulas, Heather J. Lee, Isabelle Nett, Hendrik Marks, et al. « Tracking the Embryonic Stem Cell Transition from Ground State Pluripotency ». *Development (Cambridge, England)* 144, n° 7 (1 avril 2017): 1221-34. <https://doi.org/10.1242/dev.142711>.
- Kang, Minjung, Vidur Garg, et Anna-Katerina Hadjantonakis. « Lineage Establishment and Progression within the Inner Cell Mass of the Mouse Blastocyst Requires FGFR1 and FGFR2 ».

- Developmental Cell* 41, n° 5 (5 juin 2017): 496-510.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.05.003>.
- Kang, Minjung, Anna Piliszek, Jérôme Artus, et Anna-Katerina Hadjantonakis. « FGF4 Is Required for Lineage Restriction and Salt-and-Pepper Distribution of Primitive Endoderm Factors but Not Their Initial Expression in the Mouse ». *Development (Cambridge, England)* 140, n° 2 (15 janvier 2013): 267-79. <https://doi.org/10.1242/dev.084996>.
- Karwacki-Neisius, Violetta, Jonathan Göke, Rodrigo Osorno, Florian Halbritter, Jia Hui Ng, Andrea Y. Weiße, Frederick C. K. Wong, et al. « Reduced Oct4 Expression Directs a Robust Pluripotent State with Distinct Signaling Activity and Increased Enhancer Occupancy by Oct4 and Nanog ». *Cell Stem Cell* 12, n° 5 (2 mai 2013): 531-45. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.023>.
- Kelly, Kevin F., Deborah Y. Ng, Gowtham Jayakumaran, Geoffrey A. Wood, Hiroshi Koide, et Bradley W. Doble. « β -Catenin Enhances Oct-4 Activity and Reinforces Pluripotency through a TCF-Independent Mechanism ». *Cell Stem Cell* 8, n° 2 (4 février 2011): 214-27. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.010>.
- Kemler, Rolf, Andreas Hierholzer, Benoît Kanzler, Stefan Kuppig, Kati Hansen, Makoto M. Taketo, Wilhelmine N. de Vries, Barbara B. Knowles, et Davor Solter. « Stabilization of Beta-Catenin in the Mouse Zygote Leads to Premature Epithelial-Mesenchymal Transition in the Epiblast ». *Development (Cambridge, England)* 131, n° 23 (décembre 2004): 5817-24. <https://doi.org/10.1242/dev.01458>.
- Kidder, Benjamin L., et Stephen Palmer. « HDAC1 Regulates Pluripotency and Lineage Specific Transcriptional Networks in Embryonic and Trophoblast Stem Cells ». *Nucleic Acids Research* 40, n° 7 (avril 2012): 2925-39. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1151>.
- Kim, Hoon, Jun Wu, Shoudong Ye, Chih-I. Tai, Xingliang Zhou, Hexin Yan, Ping Li, Martin Pera, et Qi-Long Ying. « Modulation of β -Catenin Function Maintains Mouse Epiblast Stem Cell and Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal ». *Nature Communications* 4 (2013): 2403. <https://doi.org/10.1038/ncomms3403>.
- King, Hamish W., et Robert J. Klose. « The Pioneer Factor OCT4 Requires the Chromatin Remodeller BRG1 to Support Gene Regulatory Element Function in Mouse Embryonic Stem Cells ». *ELife* 6 (13 mars 2017): e22631. <https://doi.org/10.7554/eLife.22631>.
- Kinoshita, Masaki, Michael Barber, William Mansfield, Yingzhi Cui, Daniel Spindlow, Giuliano Giuseppe Stirparo, Sabine Dietmann, Jennifer Nichols, et Austin Smith. « Capture of Mouse and Human Stem Cells with Features of Formative Pluripotency ». *Cell Stem Cell* 28, n° 3 (4 mars 2021): 453-471.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.005>.
- Kleinsmith, L. J., et G. B. Pierce. « MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS ». *Cancer Research* 24 (octobre 1964): 1544-51.
- Kohri, Nanami, Hiroki Akizawa, Sakie Iisaka, Hanako Bai, Yojiro Yanagawa, Masashi Takahashi, Masaya Komatsu, Masahito Kawai, Masashi Nagano, et Manabu Kawahara. « Trophectoderm Regeneration to Support Full-Term Development in the Inner Cell Mass Isolated from Bovine Blastocyst ». *The Journal of Biological Chemistry* 294, n° 50 (13 décembre 2019): 19209-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010746>.
- Koledova, Zuzana, Leona Raskova Kafkova, Lenka Calabkova, Vladimir Krystof, Petr Dolezel, et Vladimir Divoky. « Cdk2 Inhibition Prolongs G1 Phase Progression in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Stem Cells and Development* 19, n° 2 (février 2010): 181-94. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0065>.
- Kopp, Janel L., Briana D. Ormsbee, Michelle Desler, et Angie Rizzino. « Small Increases in the Level of Sox2 Trigger the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26, n° 4 (avril 2008): 903-11. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0951>.
- Korotkevich, Ekaterina, Ritsuya Niwayama, Aurélien Courtois, Stefanie Friese, Nicolas Berger, Frank Buchholz, et Takashi Hiragi. « The Apical Domain Is Required and Sufficient for the

- First Lineage Segregation in the Mouse Embryo ». *Developmental Cell* 40, n° 3 (6 février 2017): 235-247.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.01.006>.
- Koyama, H., H. Suzuki, X. Yang, S. Jiang, et R. H. Foote. « Analysis of Polarity of Bovine and Rabbit Embryos by Scanning Electron Microscopy ». *Biology of Reproduction* 50, n° 1 (janvier 1994): 163-70. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.1.163>.
- Kozar, Katarzyna, Maria A. Ciemerych, Vivienne I. Rebel, Hirokazu Shigematsu, Agnieszka Zagodzón, Ewa Sicinska, Yan Geng, et al. « Mouse Development and Cell Proliferation in the Absence of D-Cyclins ». *Cell* 118, n° 4 (20 août 2004): 477-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.025>.
- Krejčí, Jana, Radka Uhlířová, Gabriela Galiová, Stanislav Kozubek, Jana Smigová, et Eva Bárťová. « Genome-Wide Reduction in H3K9 Acetylation during Human Embryonic Stem Cell Differentiation ». *Journal of Cellular Physiology* 219, n° 3 (juin 2009): 677-87. <https://doi.org/10.1002/jcp.21714>.
- Krivega, M., W. Essahib, et H. Van de Velde. « WNT3 and Membrane-Associated β -Catenin Regulate Trophectoderm Lineage Differentiation in Human Blastocysts ». *Molecular Human Reproduction* 21, n° 9 (septembre 2015): 711-22. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav036>.
- Kuijk, Ewart W., Leonie Du Puy, Helena T. A. Van Tol, Christine H. Y. Oei, Henk P. Haagsman, Ben Colenbrander, et Bernard A. J. Roelen. « Differences in Early Lineage Segregation between Mammals ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 237, n° 4 (avril 2008): 918-27. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21480>.
- Kuijk, Ewart W., Leni T. A. van Tol, Hilde Van de Velde, Richard Wubbolts, Maaïke Welling, Niels Geijsen, et Bernard A. J. Roelen. « The Roles of FGF and MAP Kinase Signaling in the Segregation of the Epiblast and Hypoblast Cell Lineages in Bovine and Human Embryos ». *Development (Cambridge, England)* 139, n° 5 (mars 2012): 871-82. <https://doi.org/10.1242/dev.071688>.
- Kunath, Tilo, Marc K. Saba-El-Leil, Marwa Almousaillekh, Jason Wray, Sylvain Meloche, et Austin Smith. « FGF Stimulation of the Erk1/2 Signalling Cascade Triggers Transition of Pluripotent Embryonic Stem Cells from Self-Renewal to Lineage Commitment ». *Development (Cambridge, England)* 134, n° 16 (août 2007): 2895-2902. <https://doi.org/10.1242/dev.02880>.
- Kurek, Dorota, Alex Neagu, Melodi Tastemel, Nesrin Tüysüz, Johannes Lehmann, Harmen J. G. van de Werken, Sjaak Philipsen, et al. « Endogenous WNT Signals Mediate BMP-Induced and Spontaneous Differentiation of Epiblast Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells ». *Stem Cell Reports* 4, n° 1 (13 janvier 2015): 114-28. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.11.007>.
- Kurimoto, Kazuki, Yukihiko Yabuta, Yasuhide Ohinata, Mayo Shigeta, Kaori Yamanaka, et Mitinori Saitou. « Complex Genome-Wide Transcription Dynamics Orchestrated by Blimp1 for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice ». *Genes & Development* 22, n° 12 (15 juin 2008): 1617-35. <https://doi.org/10.1101/gad.1649908>.
- Kuroki, Shunsuke, Yuji Nakai, Ryo Maeda, Naoki Okashita, Mika Akiyoshi, Yutaro Yamaguchi, Satsuki Kitano, et al. « Combined Loss of JMJD1A and JMJD1B Reveals Critical Roles for H3K9 Demethylation in the Maintenance of Embryonic Stem Cells and Early Embryogenesis ». *Stem Cell Reports* 10, n° 4 (10 avril 2018): 1340-54. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.02.002>.
- Lanner, Fredrik, Kian Leong Lee, Marcus Sohl, Katarina Holmborn, Henry Yang, Johannes Wilbertz, Lorenz Poellinger, Janet Rossant, et Filip Farnebo. « Heparan Sulfation-Dependent Fibroblast Growth Factor Signaling Maintains Embryonic Stem Cells Primed for Differentiation in a Heterogeneous State ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28, n° 2 (février 2010): 191-200. <https://doi.org/10.1002/stem.265>.
- Le Bin, Gloryn Chia, Silvia Muñoz-Descalzo, Agata Kurowski, Harry Leitch, Xinghua Lou, William Mansfield, Charles Etienne-Dumeau, et al. « Oct4 Is Required for Lineage Priming in the

- Developing Inner Cell Mass of the Mouse Blastocyst ». *Development (Cambridge, England)* 141, n° 5 (mars 2014): 1001-10. <https://doi.org/10.1242/dev.096875>.
- Lee, Kyoung-Hwa, Mangmang Li, Aleksandra M. Michalowski, Xinyue Zhang, Hongling Liao, Lingyi Chen, Yang Xu, Xiaolin Wu, et Jing Huang. « A Genomewide Study Identifies the Wnt Signaling Pathway as a Major Target of P53 in Murine Embryonic Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, n° 1 (5 janvier 2010): 69-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909734107>.
- Leeb, Martin, Diego Pasini, Maria Novatchkova, Markus Jaritz, Kristian Helin, et Anton Wutz. « Polycomb Complexes Act Redundantly to Repress Genomic Repeats and Genes ». *Genes & Development* 24, n° 3 (1 février 2010): 265-76. <https://doi.org/10.1101/gad.544410>.
- Leeuwen, Jessica van, Debra K. Berg, et Peter L. Pfeffer. « Morphological and Gene Expression Changes in Cattle Embryos from Hatched Blastocyst to Early Gastrulation Stages after Transfer of In Vitro Produced Embryos ». *PLoS One* 10, n° 6 (2015): e0129787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129787>.
- Leeuwen, Jessica van, Pisana Rawson, Debra K. Berg, David N. Wells, et Peter L. Pfeffer. « On the Enigmatic Disappearance of Rauber's Layer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117, n° 28 (14 juillet 2020): 16409-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002008117>.
- Leung, Chuen Yan, et Magdalena Zernicka-Goetz. « Angiotensin Prevents Pluripotent Lineage Differentiation in Mouse Embryos via Hippo Pathway-Dependent and -Independent Mechanisms ». *Nature Communications* 4 (2013): 2251. <https://doi.org/10.1038/ncomms3251>.
- Levine, Ariel J., et Ali H. Brivanlou. « GDF3, a BMP Inhibitor, Regulates Cell Fate in Stem Cells and Early Embryos ». *Development (Cambridge, England)* 133, n° 2 (janvier 2006): 209-16. <https://doi.org/10.1242/dev.02192>.
- Lewis, N. E., et J. Rossant. « Mechanism of Size Regulation in Mouse Embryo Aggregates ». *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 72 (décembre 1982): 169-81.
- Li, Han, Manuel Collado, Aranzazu Villasante, Ander Matheu, Cian J. Lynch, Marta Cañamero, Karine Rizzoti, et al. « P27(Kip1) Directly Represses Sox2 during Embryonic Stem Cell Differentiation ». *Cell Stem Cell* 11, n° 6 (7 décembre 2012): 845-52. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.014>.
- Li, J., O. Svarcova, K. Villemoes, P. M. Kragh, M. Schmidt, I. B. Bøgh, Y. Zhang, et al. « High in Vitro Development after Somatic Cell Nuclear Transfer and Trichostatin A Treatment of Reconstructed Porcine Embryos ». *Theriogenology* 70, n° 5 (15 septembre 2008): 800-808. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.046>.
- Li, Jian, Guangwen Wang, Chengyan Wang, Yang Zhao, Hong Zhang, Zhijia Tan, Zhihua Song, Mingxiao Ding, et Hongkui Deng. « MEK/ERK Signaling Contributes to the Maintenance of Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 75, n° 4 (avril 2007): 299-307. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00143.x>.
- Li, Jing-Yu, Min-Tie Pu, Ryutaro Hirasawa, Bin-Zhong Li, Yan-Nv Huang, Rong Zeng, Nai-He Jing, et al. « Synergistic Function of DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the Methylation of Oct4 and Nanog ». *Molecular and Cellular Biology* 27, n° 24 (décembre 2007): 8748-59. <https://doi.org/10.1128/MCB.01380-07>.
- Li, Lei, Juanjuan Wang, Jie Hou, Zhaojia Wu, Yuan Zhuang, Mengxue Lu, Yiran Zhang, et al. « Cdk1 Interplays with Oct4 to Repress Differentiation of Embryonic Stem Cells into Trophectoderm ». *FEBS Letters* 586, n° 23 (30 novembre 2012): 4100-4107. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.10.030>.
- Li, Ping, Chang Tong, Ruty Mehriani-Shai, Li Jia, Nancy Wu, Youzhen Yan, Robert E. Maxson, et al. « Germline Competent Embryonic Stem Cells Derived from Rat Blastocysts ». *Cell* 135, n° 7 (26 décembre 2008): 1299-1310. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.006>.

- Lim, Hui Yi Grace, Yanina D. Alvarez, Maxime Gasnier, Yiming Wang, Piotr Tetlak, Stephanie Bissiere, Hongmei Wang, Maté Biro, et Nicolas Plachta. « Keratins Are Asymmetrically Inherited Fate Determinants in the Mammalian Embryo ». *Nature* 585, n° 7825 (septembre 2020): 404-9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2647-4>.
- Lim, Linda Shushan, Yuin-Han Loh, Weiwei Zhang, Yixun Li, Xi Chen, Yinan Wang, Manjiri Bakre, Huck-Hui Ng, et Lawrence W. Stanton. « Zic3 Is Required for Maintenance of Pluripotency in Embryonic Stem Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 18, n° 4 (avril 2007): 1348-58. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-07-0624>.
- Liu, Jiao, Xiumei Zhu, Jinshan Li, Zhihui Liu, Yanhong Liu, Fei Xue, Lan Yang, et al. « Deriving Rabbit Embryonic Stem Cells by Small Molecule Inhibitors ». *American Journal of Translational Research* 11, n° 8 (2019): 5122-33.
- Liu, Lijun, Wojciech Michowski, Hiroyuki Inuzuka, Kouhei Shimizu, Naoe Taira Nihira, Joel M. Chick, Na Li, et al. « G1 Cyclins Link Proliferation, Pluripotency and Differentiation of Embryonic Stem Cells ». *Nature Cell Biology* 19, n° 3 (mars 2017): 177-88. <https://doi.org/10.1038/ncb3474>.
- Liu, S., J. Wang, H.-M. Qin, X.-M. Yan, X.-S. Yang, C. Liu, et Q. Yan. « LIF Upregulates PoFUT1 Expression and Promotes Trophoblast Cell Migration and Invasion at the Fetal-Maternal Interface ». *Cell Death & Disease* 5 (28 août 2014): e1396. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.335>.
- Liu, Shichao, Gerelchimeg Bou, Jianchao Zhao, Shimeng Guo, Jia Guo, Xiaogang Weng, Zhi Yin, et Zhonghua Liu. « Asynchronous CDX2 Expression and Polarization of Porcine Trophoblast Cells Reflects a Species-Specific Trophoderm Lineage Determination Progress Model ». *Molecular Reproduction and Development* 85, n° 7 (juillet 2018): 590-98. <https://doi.org/10.1002/mrd.22994>.
- Liu, Xiaosong, Jinyan Huang, Taotao Chen, Ying Wang, Shunmei Xin, Jian Li, Gang Pei, et Jiuhong Kang. « Yamanaka Factors Critically Regulate the Developmental Signaling Network in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Cell Research* 18, n° 12 (décembre 2008): 1177-89. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.309>.
- Loh, Yuin-Han, Qiang Wu, Joon-Lin Chew, Vinsensius B. Vega, Weiwei Zhang, Xi Chen, Guillaume Bourque, et al. « The Oct4 and Nanog Transcription Network Regulates Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Nature Genetics* 38, n° 4 (avril 2006): 431-40. <https://doi.org/10.1038/ng1760>.
- Loh, Yuin-Han, Weiwei Zhang, Xi Chen, Joshy George, et Huck-Hui Ng. « Jmjd1a and Jmjd2c Histone H3 Lys 9 Demethylases Regulate Self-Renewal in Embryonic Stem Cells ». *Genes & Development* 21, n° 20 (15 octobre 2007): 2545-57. <https://doi.org/10.1101/gad.1588207>.
- Lu, Cindy C., et Elizabeth J. Robertson. « Multiple Roles for Nodal in the Epiblast of the Mouse Embryo in the Establishment of Anterior-Posterior Patterning ». *Developmental Biology* 273, n° 1 (1 septembre 2004): 149-59. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.06.004>.
- Lynch, Cian J., Raquel Bernad, Ana Martínez-Val, Marta N. Shahbazi, Sandrina Nóbrega-Pereira, Isabel Calvo, Carmen Blanco-Aparicio, et al. « Global Hyperactivation of Enhancers Stabilizes Human and Mouse Naive Pluripotency through Inhibition of CDK8/19 Mediator Kinases ». *Nature Cell Biology* 22, n° 10 (octobre 2020): 1223-38. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0573-1>.
- Lyon, M. F. « Gene Action in the X-Chromosome of the Mouse (*Mus Musculus* L.) ». *Nature* 190 (22 avril 1961): 372-73. <https://doi.org/10.1038/190372a0>.
- Ma, Huaixiao, Jinglei Zhai, Haifeng Wan, Xiangxiang Jiang, Xiaoxiao Wang, Lin Wang, Yunlong Xiang, et al. « In Vitro Culture of Cynomolgus Monkey Embryos beyond Early Gastrulation ». *Science (New York, N.Y.)* 366, n° 6467 (15 novembre 2019): eaax7890. <https://doi.org/10.1126/science.aax7890>.

- Ma, Pengpeng, et Richard M. Schultz. « Histone Deacetylase 1 (HDAC1) Regulates Histone Acetylation, Development, and Gene Expression in Preimplantation Mouse Embryos ». *Developmental Biology* 319, n° 1 (1 juillet 2008): 110-20. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.011>.
- Mac Auley, A., Z. Werb, et P. E. Mirkes. « Characterization of the Unusually Rapid Cell Cycles during Rat Gastrulation ». *Development (Cambridge, England)* 117, n° 3 (mars 1993): 873-83.
- Maddox-Hyttel, P., A. Dinnyés, J. Laurincik, D. Rath, H. Niemann, C. Rosenkranz, et I. Wilmut. « Gene Expression during Pre- and Peri-Implantation Embryonic Development in Pigs ». *Reproduction (Cambridge, England) Supplement* 58 (2001): 175-89.
- Madeja, Zofia E., Piotr Pawlak, et Anna Piliszek. « Beyond the Mouse: Non-Rodent Animal Models for Study of Early Mammalian Development and Biomedical Research ». *The International Journal of Developmental Biology* 63, n° 3-4-5 (2019): 187-201. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180414ap>.
- Mahadevaiah, Shantha K., Mahesh N. Sangrithi, Takayuki Hirota, et James M. A. Turner. « A Single-Cell Transcriptome Atlas of Marsupial Embryogenesis and X Inactivation ». *Nature* 586, n° 7830 (octobre 2020): 612-17. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2629-6>.
- Mantalenakis, S. J., et M. M. Ketchel. « Frequency and Extent of Delayed Implantation in Lactating Rats and Mice ». *Journal of Reproduction and Fertility* 12, n° 2 (octobre 1966): 391-94. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0120391>.
- Marks, Hendrik, Tüzer Kalkan, Roberta Menafra, Sergey Denissov, Kenneth Jones, Helmut Hofemeister, Jennifer Nichols, et al. « The Transcriptional and Epigenomic Foundations of Ground State Pluripotency ». *Cell* 149, n° 3 (27 avril 2012): 590-604. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.026>.
- Marqués-Torrejón, M. Ángeles, Eva Porlan, Ana Banito, Esther Gómez-Ibarlucea, Andrés J. Lopez-Contreras, Oscar Fernández-Capetillo, Anxo Vidal, Jesús Gil, Josema Torres, et Isabel Fariñas. « Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P21 Controls Adult Neural Stem Cell Expansion by Regulating Sox2 Gene Expression ». *Cell Stem Cell* 12, n° 1 (3 janvier 2013): 88-100. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.001>.
- Martello, Graziano, Paul Bertone, et Austin Smith. « Identification of the Missing Pluripotency Mediator Downstream of Leukaemia Inhibitory Factor ». *The EMBO Journal* 32, n° 19 (2 octobre 2013): 2561-74. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.177>.
- Martello, Graziano, Toshimi Sugimoto, Evangelia Diamanti, Anagha Joshi, Rebecca Hannah, Satoshi Ohtsuka, Berthold Göttgens, Hitoshi Niwa, et Austin Smith. « Esrrb Is a Pivotal Target of the Gsk3/Tcf3 Axis Regulating Embryonic Stem Cell Self-Renewal ». *Cell Stem Cell* 11, n° 4 (5 octobre 2012): 491-504. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.06.008>.
- Martin, G. R. « 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 of the United States of America* 78, n° 12 (décembre 1981): 7634-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>.
- . « Teratocarcinomas as a Model System for the Study of Embryogenesis and Neoplasia ». *Cell* 5, n° 3 (juillet 1975): 229-43. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90098-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90098-7).
- Martinez-Pastor, Barbara, Claudia Cosentino, et Raul Mostoslavsky. « A Tale of Metabolites: The Cross-Talk between Chromatin and Energy Metabolism ». *Cancer Discovery* 3, n° 5 (mai 2013): 497-501. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0059>.
- Martyn, Iain, Ali H. Brivanlou, et Eric D. Siggia. « A Wave of WNT Signaling Balanced by Secreted Inhibitors Controls Primitive Streak Formation in Micropattern Colonies of Human Embryonic Stem Cells ». *Development (Cambridge, England)* 146, n° 6 (25 mars 2019): dev172791. <https://doi.org/10.1242/dev.172791>.
- Masui, Shinji, Yuhki Nakatake, Yayoi Toyooka, Daisuke Shimosato, Rika Yagi, Kazue Takahashi, Hitoshi Okochi, et al. « Pluripotency Governed by Sox2 via Regulation of Oct3/4 Expression

- in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Nature Cell Biology* 9, n° 6 (juin 2007): 625-35. <https://doi.org/10.1038/ncb1589>.
- Mathison, Angela, Ann Salmonson, Mckenna Missfeldt, Jennifer Bintz, Monique Williams, Sarah Kossak, Asha Nair, et al. « Combined AURKA and H3K9 Methyltransferase Targeting Inhibits Cell Growth By Inducing Mitotic Catastrophe ». *Molecular Cancer Research: MCR* 15, n° 8 (août 2017): 984-97. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0063>.
- Matsuda, T., T. Nakamura, K. Nakao, T. Arai, M. Katsuki, T. Heike, et T. Yokota. « STAT3 Activation Is Sufficient to Maintain an Undifferentiated State of Mouse Embryonic Stem Cells ». *The EMBO Journal* 18, n° 15 (2 août 1999): 4261-69. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.15.4261>.
- Matsumoto, K., M. Miyake, K. Utsumi, et A. Iritani. « Production of Identical Twins by Separating Two-Cell Rat Embryos ». *Gamete Research* 22, n° 3 (mars 1989): 257-63. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120220303>.
- Mayer, Daniela, Michael B. Stadler, Melanie Rittirsch, Daniel Hess, Ilya Lukonin, Maria Winzi, Austin Smith, Frank Buchholz, et Joerg Betschinger. « Zfp281 Orchestrates Interconversion of Pluripotent States by Engaging Ehmt1 and Zic2 ». *The EMBO Journal* 39, n° 2 (15 janvier 2020): e102591. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102591>.
- McLean, Zachariah, Fanli Meng, Harold Henderson, Pavla Turner, et Björn Oback. « Increased MAP Kinase Inhibition Enhances Epiblast-Specific Gene Expression in Bovine Blastocysts ». *Biology of Reproduction* 91, n° 2 (août 2014): 49. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.120832>.
- McManus, Kirk J., Vincent L. Biron, Ryan Heit, D. Alan Underhill, et Michael J. Hendzel. « Dynamic Changes in Histone H3 Lysine 9 Methylations: Identification of a Mitosis-Specific Function for Dynamic Methylation in Chromosome Congression and Segregation ». *The Journal of Biological Chemistry* 281, n° 13 (31 mars 2006): 8888-97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505323200>.
- Meilhac, Sigolène M., Richard J. Adams, Samantha A. Morris, Anne Danckaert, Jean-François Le Garrec, et Magdalena Zernicka-Goetz. « Active Cell Movements Coupled to Positional Induction Are Involved in Lineage Segregation in the Mouse Blastocyst ». *Developmental Biology* 331, n° 2 (15 juillet 2009): 210-21. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.036>.
- Meirelles, F. V., A. R. Caetano, Y. F. Watanabe, P. Ripamonte, S. F. Carambula, G. K. Merighe, et S. M. Garcia. « Genome Activation and Developmental Block in Bovine Embryos ». *Animal Reproduction Science* 82-83 (juillet 2004): 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.012>.
- Mekhoubad, Shila, Christoph Bock, A. Sophie de Boer, Evangelos Kiskinis, Alexander Meissner, et Kevin Eggan. « Erosion of Dosage Compensation Impacts Human iPSC Disease Modeling ». *Cell Stem Cell* 10, n° 5 (4 mai 2012): 595-609. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.014>.
- Meshorer, Eran, Dhananjay Yellajoshula, Eric George, Peter J. Scambler, David T. Brown, et Tom Misteli. « Hyperdynamic Plasticity of Chromatin Proteins in Pluripotent Embryonic Stem Cells ». *Developmental Cell* 10, n° 1 (janvier 2006): 105-16. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.10.017>.
- Mesnard, Daniel, Marcela Guzman-Ayala, et Daniel B. Constam. « Nodal Specifies Embryonic Visceral Endoderm and Sustains Pluripotent Cells in the Epiblast before Overt Axial Patterning ». *Development (Cambridge, England)* 133, n° 13 (juillet 2006): 2497-2505. <https://doi.org/10.1242/dev.02413>.
- Meyenn, Ferdinand von, Mario Iurlaro, Ehsan Habibi, Ning Qing Liu, Ali Salehzadeh-Yazdi, Fátima Santos, Edoardo Petrini, et al. « Impairment of DNA Methylation Maintenance Is the Main Cause of Global Demethylation in Naive Embryonic Stem Cells ». *Molecular Cell* 62, n° 6 (16 juin 2016): 983. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.005>.

- Mitalipov, Shoukhrat, Hung-Chih Kuo, James Byrne, Lisa Clepper, Lorraine Meisner, Julie Johnson, Renee Zeier, et Don Wolf. « Isolation and Characterization of Novel Rhesus Monkey Embryonic Stem Cell Lines ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24, n° 10 (octobre 2006): 2177-86. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0125>.
- Mitalipov, Shoukhrat M., Richard R. Yeoman, Hung-Chih Kuo, et Don P. Wolf. « Monozygotic Twinning in Rhesus Monkeys by Manipulation of in Vitro-Derived Embryos ». *Biology of Reproduction* 66, n° 5 (mai 2002): 1449-55. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.5.1449>.
- Mitsui, Kaoru, Yoshimi Tokuzawa, Hiroaki Itoh, Kohichi Segawa, Mirei Murakami, Kazutoshi Takahashi, Masayoshi Maruyama, Mitsuyo Maeda, et Shinya Yamanaka. « The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells ». *Cell* 113, n° 5 (30 mai 2003): 631-42. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00393-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00393-3).
- Mohammed, Hisham, Irene Hernando-Herraez, Aurora Savino, Antonio Scialdone, Iain Macaulay, Carla Mulas, Tamir Chandra, et al. « Single-Cell Landscape of Transcriptional Heterogeneity and Cell Fate Decisions during Mouse Early Gastrulation ». *Cell Reports* 20, n° 5 (1 août 2017): 1215-28. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.009>.
- Molè, Matteo A., Tim H. H. Coorens, Marta N. Shahbazi, Antonia Weberling, Bailey A. T. Weatherbee, Carlos W. Gantner, Carmen Sancho-Serra, et al. « A Single Cell Characterisation of Human Embryogenesis Identifies Pluripotency Transitions and Putative Anterior Hypoblast Centre ». *Nature Communications* 12, n° 1 (17 juin 2021): 3679. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23758-w>.
- Molls, M., N. Zamboglou, et C. Streffer. « A Comparison of the Cell Kinetics of Pre-Implantation Mouse Embryos from Two Different Mouse Strains ». *Cell and Tissue Kinetics* 16, n° 3 (mai 1983): 277-83.
- Molotkov, Andrei, Pierre Mazot, J. Richard Brewer, Ryan M. Cinalli, et Philippe Soriano. « Distinct Requirements for FGFR1 and FGFR2 in Primitive Endoderm Development and Exit from Pluripotency ». *Developmental Cell* 41, n° 5 (5 juin 2017): 511-526.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.05.004>.
- Molotkov, Andrei, et Philippe Soriano. « Distinct Mechanisms for PDGF and FGF Signaling in Primitive Endoderm Development ». *Developmental Biology* 442, n° 1 (1 octobre 2018): 155-61. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.07.010>.
- Moore, N. W., C. E. Adams, et L. E. Rowson. « Developmental Potential of Single Blastomeres of the Rabbit Egg ». *Journal of Reproduction and Fertility* 17, n° 3 (décembre 1968): 527-31. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0170527>.
- Moreira de Mello, Joana C., Gustavo R. Fernandes, Maria D. Vbranovski, et Lygia V. Pereira. « Early X Chromosome Inactivation during Human Preimplantation Development Revealed by Single-Cell RNA-Sequencing ». *Scientific Reports* 7, n° 1 (7 septembre 2017): 10794. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11044-z>.
- Morgani, Sophie M., et Joshua M. Brickman. « LIF Supports Primitive Endoderm Expansion during Pre-Implantation Development ». *Development (Cambridge, England)* 142, n° 20 (15 octobre 2015): 3488-99. <https://doi.org/10.1242/dev.125021>.
- Morgani, Sophie M., et Anna-Katerina Hadjantonakis. « Signaling Regulation during Gastrulation: Insights from Mouse Embryos and in Vitro Systems ». *Current Topics in Developmental Biology* 137 (2020): 391-431. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.11.011>.
- Morgani, Sophie M., Jakob J. Metzger, Jennifer Nichols, Eric D. Siggia, et Anna-Katerina Hadjantonakis. « Micropattern Differentiation of Mouse Pluripotent Stem Cells Recapitulates Embryo Regionalized Cell Fate Patterning ». *ELife* 7 (7 février 2018): e32839. <https://doi.org/10.7554/eLife.32839>.
- Morris, Samantha A., Seema Grewal, Florencia Barrios, Sameer N. Patankar, Bernhard Strauss, Lee Buttery, Morgan Alexander, Kevin M. Shakesheff, et Magdalena Zernicka-Goetz. « Dynamics

- of Anterior-Posterior Axis Formation in the Developing Mouse Embryo ». *Nature Communications* 3 (14 février 2012): 673. <https://doi.org/10.1038/ncomms1671>.
- Moussaieff, Arieh, Matthieu Rouleau, Daniel Kitsberg, Merav Cohen, Gahl Levy, Dinorah Barasch, Alina Nemirovski, et al. « Glycolysis-Mediated Changes in Acetyl-CoA and Histone Acetylation Control the Early Differentiation of Embryonic Stem Cells ». *Cell Metabolism* 21, n° 3 (3 mars 2015): 392-402. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.02.002>.
- Mulas, Carla, Tüzer Kalkan, et Austin Smith. « NODAL Secures Pluripotency upon Embryonic Stem Cell Progression from the Ground State ». *Stem Cell Reports* 9, n° 1 (11 juillet 2017): 77-91. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.033>.
- Murphy, M., M. G. Stinnakre, C. Senamaud-Beaufort, N. J. Winston, C. Sweeney, M. Kubelka, M. Carrington, C. Bréchet, et J. Sobczak-Thépot. « Delayed Early Embryonic Lethality Following Disruption of the Murine Cyclin A2 Gene ». *Nature Genetics* 15, n° 1 (janvier 1997): 83-86. <https://doi.org/10.1038/ng0197-83>.
- Na, Jie, Miho K. Furue, et Peter W. Andrews. « Inhibition of ERK1/2 Prevents Neural and Mesendodermal Differentiation and Promotes Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal ». *Stem Cell Research* 5, n° 2 (septembre 2010): 157-69. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2010.06.002>.
- Na, Jie, Karin Lykke-Andersen, Maria Elena Torres Padilla, et Magdalena Zernicka-Goetz. « Dishevelled Proteins Regulate Cell Adhesion in Mouse Blastocyst and Serve to Monitor Changes in Wnt Signaling ». *Developmental Biology* 302, n° 1 (1 février 2007): 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.036>.
- Nakamura, Tomonori, Ikuhiro Okamoto, Kotaro Sasaki, Yukihiro Yabuta, Chizuru Iwatani, Hideaki Tsuchiya, Yasunari Seita, Shinichiro Nakamura, Takuya Yamamoto, et Mitunori Saitou. « A Developmental Coordinate of Pluripotency among Mice, Monkeys and Humans ». *Nature* 537, n° 7618 (1 septembre 2016): 57-62. <https://doi.org/10.1038/nature19096>.
- Narimatsu, Masahiro, Batool Labibi, Jeffrey L. Wrana, et Liliana Attisano. « Analysis of Hippo and TGF β Signaling in Polarizing Epithelial Cells and Mouse Embryos ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 91, n° 4-5 (juin 2016): 109-18. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.01.003>.
- Navarro, Pablo, Andrew Oldfield, Julie Legoupi, Nicola Festuccia, Agnès Dubois, Mikael Attia, Jon Schoorlemmer, Claire Rougeulle, Ian Chambers, et Philip Avner. « Molecular Coupling of Tsix Regulation and Pluripotency ». *Nature* 468, n° 7322 (18 novembre 2010): 457-60. <https://doi.org/10.1038/nature09496>.
- Neagu, Alex, Emiel van Genderen, Irene Escudero, Lucas Verwegen, Dorota Kurek, Johannes Lehmann, Jente Stel, et al. « In Vitro Capture and Characterization of Embryonic Rosette-Stage Pluripotency between Naive and Primed States ». *Nature Cell Biology* 22, n° 5 (mai 2020): 534-45. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0508-x>.
- Neganova, I., X. Zhang, S. Atkinson, et M. Lako. « Expression and Functional Analysis of G1 to S Regulatory Components Reveals an Important Role for CDK2 in Cell Cycle Regulation in Human Embryonic Stem Cells ». *Oncogene* 28, n° 1 (8 janvier 2009): 20-30. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.358>.
- Niakan, Kathy K., Emily C. Davis, Robert C. Clipsham, Meisheng Jiang, Deborah B. Dehart, Kathleen K. Sulik, et Edward R. B. McCabe. « Novel Role for the Orphan Nuclear Receptor Dax1 in Embryogenesis, Different from Steroidogenesis ». *Molecular Genetics and Metabolism* 88, n° 3 (juillet 2006): 261-71. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.12.010>.
- Niakan, Kathy K., et Kevin Eggan. « Analysis of Human Embryos from Zygote to Blastocyst Reveals Distinct Gene Expression Patterns Relative to the Mouse ». *Developmental Biology* 375, n° 1 (1 mars 2013): 54-64. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.008>.

- Nichols, J., I. Chambers, T. Taga, et A. Smith. « Physiological Rationale for Responsiveness of Mouse Embryonic Stem Cells to Gp130 Cytokines ». *Development (Cambridge, England)* 128, n° 12 (juin 2001): 2333-39.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler, et A. Smith. « Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4 ». *Cell* 95, n° 3 (30 octobre 1998): 379-91. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81769-9).
- Nichols, Jennifer, Kenneth Jones, Jenny M. Phillips, Stephen A. Newland, Mila Roode, William Mansfield, Austin Smith, et Anne Cooke. « Validated Germline-Competent Embryonic Stem Cell Lines from Nonobese Diabetic Mice ». *Nature Medicine* 15, n° 7 (juillet 2009): 814-18. <https://doi.org/10.1038/nm.1996>.
- Nichols, Jennifer, Jose Silva, Mila Roode, et Austin Smith. « Suppression of Erk Signalling Promotes Ground State Pluripotency in the Mouse Embryo ». *Development (Cambridge, England)* 136, n° 19 (octobre 2009): 3215-22. <https://doi.org/10.1242/dev.038893>.
- Nichols, Jennifer, et Austin Smith. « Naive and Primed Pluripotent States ». *Cell Stem Cell* 4, n° 6 (5 juin 2009): 487-92. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.015>.
- Nishioka, Noriyuki, Ken-ichi Inoue, Kenjiro Adachi, Hiroshi Kiyonari, Mitsunori Ota, Amy Ralston, Norikazu Yabuta, et al. « The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass ». *Developmental Cell* 16, n° 3 (mars 2009): 398-410. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.02.003>.
- Niu, Yuyu, Nianqin Sun, Chang Li, Ying Lei, Zhihao Huang, Jun Wu, Chenyang Si, et al. « Dissecting Primate Early Post-Implantation Development Using Long-Term in Vitro Embryo Culture ». *Science (New York, N.Y.)* 366, n° 6467 (15 novembre 2019): eaaw5754. <https://doi.org/10.1126/science.aaw5754>.
- Niwa, H., T. Burdon, I. Chambers, et A. Smith. « Self-Renewal of Pluripotent Embryonic Stem Cells Is Mediated via Activation of STAT3 ». *Genes & Development* 12, n° 13 (1 juillet 1998): 2048-60. <https://doi.org/10.1101/gad.12.13.2048>.
- Niwa, H., J. Miyazaki, et A. G. Smith. « Quantitative Expression of Oct-3/4 Defines Differentiation, Dedifferentiation or Self-Renewal of ES Cells ». *Nature Genetics* 24, n° 4 (avril 2000): 372-76. <https://doi.org/10.1038/74199>.
- Niwa, Hitoshi, Kazuya Ogawa, Daisuke Shimosato, et Kenjiro Adachi. « A Parallel Circuit of LIF Signalling Pathways Maintains Pluripotency of Mouse ES Cells ». *Nature* 460, n° 7251 (2 juillet 2009): 118-22. <https://doi.org/10.1038/nature08113>.
- Niwa, Hitoshi, Yayoi Toyooka, Daisuke Shimosato, Dan Strumpf, Kadue Takahashi, Rika Yagi, et Janet Rossant. « Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophectoderm Differentiation ». *Cell* 123, n° 5 (2 décembre 2005): 917-29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.040>.
- Norwitz, E. R., D. J. Schust, et S. J. Fisher. « Implantation and the Survival of Early Pregnancy ». *The New England Journal of Medicine* 345, n° 19 (8 novembre 2001): 1400-1408. <https://doi.org/10.1056/NEJMra000763>.
- O'Carroll, D., S. Erhardt, M. Pagan, S. C. Barton, M. A. Surani, et T. Jenuwein. « The Polycomb-Group Gene Ezh2 Is Required for Early Mouse Development ». *Molecular and Cellular Biology* 21, n° 13 (juillet 2001): 4330-36. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.13.4330-4336.2001>.
- Oda, Masaaki, David Oxley, Wendy Dean, et Wolf Reik. « Regulation of Lineage Specific DNA Hypomethylation in Mouse Trophectoderm ». *PloS One* 8, n° 6 (2013): e68846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068846>.
- Ohinata, Yasuhide, Hiroshi Ohta, Mayo Shigeta, Kaori Yamanaka, Teruhiko Wakayama, et Mitinori Saitou. « A Signaling Principle for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice ». *Cell* 137, n° 3 (1 mai 2009): 571-84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.014>.

- Ohinata, Yasuhide, Bernhard Payer, Dónal O'Carroll, Katia Ancelin, Yukiko Ono, Mitsue Sano, Sheila C. Barton, et al. « Blimp1 Is a Critical Determinant of the Germ Cell Lineage in Mice ». *Nature* 436, n° 7048 (14 juillet 2005): 207-13. <https://doi.org/10.1038/nature03813>.
- Ohinata, Yasuhide, et Tomoyuki Tsukiyama. « Establishment of Trophoblast Stem Cells under Defined Culture Conditions in Mice ». *PloS One* 9, n° 9 (2014): e107308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107308>.
- Ohsugi, M., S. Y. Hwang, S. Butz, B. B. Knowles, D. Solter, et R. Kemler. « Expression and Cell Membrane Localization of Catenins during Mouse Preimplantation Development ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 206, n° 4 (août 1996): 391-402. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199608\)206:4<391::AID-AJA5>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199608)206:4<391::AID-AJA5>3.0.CO;2-D).
- Okamoto, Ikuhiro, Arie P. Otte, C. David Allis, Danny Reinberg, et Edith Heard. « Epigenetic Dynamics of Imprinted X Inactivation during Early Mouse Development ». *Science (New York, N.Y.)* 303, n° 5658 (30 janvier 2004): 644-49. <https://doi.org/10.1126/science.1092727>.
- Okamoto, Ikuhiro, Catherine Patrat, Dominique Thépot, Nathalie Peynot, Patricia Fauque, Nathalie Daniel, Patricia Diabangouaya, et al. « Eutherian Mammals Use Diverse Strategies to Initiate X-Chromosome Inactivation during Development ». *Nature* 472, n° 7343 (21 avril 2011): 370-74. <https://doi.org/10.1038/nature09872>.
- Okamoto, Yoshinori, Naoko Yoshida, Toru Suzuki, Nobuhiro Shimosawa, Maki Asami, Tomonari Matsuda, Nakao Kojima, Anthony C. F. Perry, et Tatsuyuki Takada. « DNA Methylation Dynamics in Mouse Preimplantation Embryos Revealed by Mass Spectrometry ». *Scientific Reports* 6 (11 janvier 2016): 19134. <https://doi.org/10.1038/srep19134>.
- Okashita, Naoki, Yoshiaki Suwa, Osamu Nishimura, Nao Sakashita, Mitsutaka Kadota, Go Nagamatsu, Masanori Kawaguchi, et al. « PRDM14 Drives OCT3/4 Recruitment via Active Demethylation in the Transition from Primed to Naïve Pluripotency ». *Stem Cell Reports* 7, n° 6 (13 décembre 2016): 1072-86. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.10.007>.
- Oosten, Anouk L. van, Yael Costa, Austin Smith, et José C. R. Silva. « JAK/STAT3 Signalling Is Sufficient and Dominant over Antagonistic Cues for the Establishment of Naïve Pluripotency ». *Nature Communications* 3 (8 mai 2012): 817. <https://doi.org/10.1038/ncomms1822>.
- Orietti, Lorenzo C., Viviane Souza Rosa, Francesco Antonica, Christos Kyprianou, William Mansfield, Henrique Marques-Souza, Marta N. Shahbazi, et Magdalena Zernicka-Goetz. « Embryo Size Regulates the Timing and Mechanism of Pluripotent Tissue Morphogenesis ». *Stem Cell Reports* 16, n° 5 (11 mai 2021): 1182-96. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.09.004>.
- Ornitz, David M., et Nobuyuki Itoh. « The Fibroblast Growth Factor Signaling Pathway ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology* 4, n° 3 (juin 2015): 215-66. <https://doi.org/10.1002/wdev.176>.
- Osnato, Anna, Stephanie Brown, Christel Krueger, Simon Andrews, Amanda J. Collier, Shota Nakanoh, Mariana Quiroga Londoño, et al. « TGFβ Signalling Is Required to Maintain Pluripotency of Human Naïve Pluripotent Stem Cells ». *ELife* 10 (31 août 2021): e67259. <https://doi.org/10.7554/eLife.67259>.
- Osteil, Pierre, Anaïs Moulin, Claire Santamaria, Thierry Joly, Luc Jouneau, Maxime Aubry, Yann Tapponnier, et al. « A Panel of Embryonic Stem Cell Lines Reveals the Variety and Dynamic of Pluripotent States in Rabbits ». *Stem Cell Reports* 7, n° 3 (13 septembre 2016): 383-98. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.07.022>.
- Osteil, Pierre, Yann Tapponnier, Suzy Markossian, Murielle Godet, Barbara Schmaltz-Panneau, Luc Jouneau, Cédric Cabau, et al. « Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Rabbits Exhibit Some Characteristics of Naïve Pluripotency ». *Biology Open* 2, n° 6 (15 juin 2013): 613-28. <https://doi.org/10.1242/bio.20134242>.

- Padgett, Joe, et Silvia D. M. Santos. « From Clocks to Dominoes: Lessons on Cell Cycle Remodelling from Embryonic Stem Cells ». *FEBS Letters*, 14 juin 2020. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13862>.
- Paling, Nicholas R. D., Helen Wheadon, Heather K. Bone, et Melanie J. Welham. « Regulation of Embryonic Stem Cell Self-Renewal by Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 279, n° 46 (12 novembre 2004): 48063-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406467200>.
- Pan, Guangjin, Shulan Tian, Jeff Nie, Chuhu Yang, Victor Ruotti, Hairong Wei, Gudrun A. Jonsdottir, Ron Stewart, et James A. Thomson. « Whole-Genome Analysis of Histone H3 Lysine 4 and Lysine 27 Methylation in Human Embryonic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 1, n° 3 (13 septembre 2007): 299-312. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.003>.
- Panova, Alexandra V., Alexandra N. Bogomazova, Maria A. Lagarkova, et Sergey L. Kiselev. « Epigenetic Reprogramming by Naïve Conditions Establishes an Irreversible State of Partial X Chromosome Reactivation in Female Stem Cells ». *Oncotarget* 9, n° 38 (18 mai 2018): 25136-47. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25353>.
- Pardo, Mercedes, Benjamin Lang, Lu Yu, Haydn Prosser, Allan Bradley, M. Madan Babu, et Jyoti Choudhary. « An Expanded Oct4 Interaction Network: Implications for Stem Cell Biology, Development, and Disease ». *Cell Stem Cell* 6, n° 4 (2 avril 2010): 382-95. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.004>.
- Parisi, Tiziana, Andreas R. Beck, Nathalie Rougier, Tom McNeil, Linda Lucian, Zena Werb, et Bruno Amati. « Cyclins E1 and E2 Are Required for Endoreplication in Placental Trophoblast Giant Cells ». *The EMBO Journal* 22, n° 18 (15 septembre 2003): 4794-4803. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg482>.
- Pasini, Diego, Adrian P. Bracken, Jacob B. Hansen, Manuela Capillo, et Kristian Helin. « The Polycomb Group Protein Suz12 Is Required for Embryonic Stem Cell Differentiation ». *Molecular and Cellular Biology* 27, n° 10 (mai 2007): 3769-79. <https://doi.org/10.1128/MCB.01432-06>.
- Pasini, Diego, Adrian P. Bracken, Michael R. Jensen, Eros Lazzerini Denchi, et Kristian Helin. « Suz12 Is Essential for Mouse Development and for EZH2 Histone Methyltransferase Activity ». *The EMBO Journal* 23, n° 20 (13 octobre 2004): 4061-71. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600402>.
- Pastor, William A., Di Chen, Wanlu Liu, Rachel Kim, Anna Sahakyan, Anastasia Lukianchikov, Kathrin Plath, Steven E. Jacobsen, et Amander T. Clark. « Naive Human Pluripotent Cells Feature a Methylation Landscape Devoid of Blastocyst or Germline Memory ». *Cell Stem Cell* 18, n° 3 (3 mars 2016): 323-29. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.019>.
- Pastor, William A., Wanlu Liu, Di Chen, Jamie Ho, Rachel Kim, Timothy J. Hunt, Anastasia Lukianchikov, et al. « TFAP2C Regulates Transcription in Human Naive Pluripotency by Opening Enhancers ». *Nature Cell Biology* 20, n° 5 (mai 2018): 553-64. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0089-0>.
- Pauklin, Siim, Pedro Madrigal, Alessandro Bertero, et Ludovic Vallier. « Initiation of Stem Cell Differentiation Involves Cell Cycle-Dependent Regulation of Developmental Genes by Cyclin D ». *Genes & Development* 30, n° 4 (15 février 2016): 421-33. <https://doi.org/10.1101/gad.271452.115>.
- Pauklin, Siim, et Ludovic Vallier. « The Cell-Cycle State of Stem Cells Determines Cell Fate Propensity ». *Cell* 155, n° 1 (26 septembre 2013): 135-47. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.031>.
- Pedersen, Marianne Terndrup, Susanne Marije Kooistra, Aliaksandra Radzisheskaya, Anne Laugesen, Jens Vilstrup Johansen, Daniel Geoffrey Hayward, Jakob Nilsson, Karl Agger, et Kristian Helin. « Continual Removal of H3K9 Promoter Methylation by Jmjd2 Demethylases

- Is Vital for ESC Self-Renewal and Early Development ». *The EMBO Journal* 35, n° 14 (15 juillet 2016): 1550-64. <https://doi.org/10.15252/embj.201593317>.
- Pereira, Paulo N. G., Mariya P. Dobрева, Elke Maas, Frederique M. Cornelis, Iván M. Moya, Lieve Umans, Catherine M. Verfaillie, et al. « Antagonism of Nodal Signaling by BMP/Smad5 Prevents Ectopic Primitive Streak Formation in the Mouse Amnion ». *Development (Cambridge, England)* 139, n° 18 (septembre 2012): 3343-54. <https://doi.org/10.1242/dev.075465>.
- Peters, A. H., D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schöfer, K. Weipoltshammer, et al. « Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability ». *Cell* 107, n° 3 (2 novembre 2001): 323-37. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00542-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00542-6).
- Pierre, Alice, Mathieu Gautier, Isabelle Callebaut, Martine Bontoux, Eric Jeanpierre, Pierre Pontarotti, et Philippe Monget. « Atypical Structure and Phylogenomic Evolution of the New Eutherian Oocyte- and Embryo-Expressed KHDC1/DPPA5/ECAT1/OOEP Gene Family ». *Genomics* 90, n° 5 (novembre 2007): 583-94. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.06.003>.
- Pijuan-Sala, Blanca, Jonathan A. Griffiths, Carolina Guibentif, Tom W. Hiscock, Wajid Jawaid, Fernando J. Calero-Nieto, Carla Mulas, et al. « A Single-Cell Molecular Map of Mouse Gastrulation and Early Organogenesis ». *Nature* 566, n° 7745 (février 2019): 490-95. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0933-9>.
- Piliszek, Anna, Zofia E. Madeja, et Berenika Plusa. « Suppression of ERK Signalling Abolishes Primitive Endoderm Formation but Does Not Promote Pluripotency in Rabbit Embryo ». *Development (Cambridge, England)* 144, n° 20 (15 octobre 2017): 3719-30. <https://doi.org/10.1242/dev.156406>.
- Plöger, Ruben, et Christoph Viebahn. « Pitx2 and Nodal as Conserved Early Markers of the Anterior-Posterior Axis in the Rabbit Embryo ». *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft* 218 (juillet 2018): 256-64. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.02.016>.
- Plusa, Berenika, Stephen Frankenberg, Andrew Chalmers, Anna-Katerina Hadjantonakis, Catherine A. Moore, Nancy Papalopulu, Virginia E. Papaioannou, David M. Glover, et Magdalena Zernicka-Goetz. « Downregulation of Par3 and APKC Function Directs Cells towards the ICM in the Preimplantation Mouse Embryo ». *Journal of Cell Science* 118, n° Pt 3 (1 février 2005): 505-15. <https://doi.org/10.1242/jcs.01666>.
- Plusa, Berenika, Anna Piliszek, Stephen Frankenberg, Jérôme Artus, et Anna-Katerina Hadjantonakis. « Distinct Sequential Cell Behaviours Direct Primitive Endoderm Formation in the Mouse Blastocyst ». *Development (Cambridge, England)* 135, n° 18 (septembre 2008): 3081-91. <https://doi.org/10.1242/dev.021519>.
- Poole-Wilson, P. A., et G. A. Langer. « Effect of PH on Ionic Exchange and Function in Rat and Rabbit Myocardium ». *The American Journal of Physiology* 229, n° 3 (septembre 1975): 570-81. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1975.229.3.570>.
- Posfai, Eszter, Sophie Petropoulos, Flavia Regina Oliveira de Barros, John Paul Schell, Igor Jurisica, Rickard Sandberg, Fredrik Lanner, et Janet Rossant. « Position- and Hippo Signaling-Dependent Plasticity during Lineage Segregation in the Early Mouse Embryo ». *ELife* 6 (22 février 2017): e22906. <https://doi.org/10.7554/eLife.22906>.
- Price, Christopher J., Dylan Stavish, Paul J. Gokhale, Ben A. Stevenson, Samantha Sargeant, Joanne Lacey, Tristan A. Rodriguez, et Ivana Barbaric. « Genetically Variant Human Pluripotent Stem Cells Selectively Eliminate Wild-Type Counterparts through YAP-Mediated Cell Competition ». *Developmental Cell* 56, n° 17 (13 septembre 2021): 2455-2470.e10. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.07.019>.

- Qin, Han, Miroslav Hejna, Yanxia Liu, Michelle Percharde, Mark Wossidlo, Laure Blouin, Jens Durruthy-Durruthy, et al. « YAP Induces Human Naive Pluripotency ». *Cell Reports* 14, n° 10 (15 mars 2016): 2301-12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.036>.
- Qiu, Dongbo, Shoudong Ye, Bryan Ruiz, Xingliang Zhou, Dahai Liu, Qi Zhang, et Qi-Long Ying. « Klf2 and Tfcp2l1, Two Wnt/ β -Catenin Targets, Act Synergistically to Induce and Maintain Naive Pluripotency ». *Stem Cell Reports* 5, n° 3 (8 septembre 2015): 314-22. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.07.014>.
- Ramos-Ibeas, Priscila, Fei Sang, Qifan Zhu, Walfred W. C. Tang, Sarah Withey, Doris Klisch, Liam Wood, Matt Loose, M. Azim Surani, et Ramiro Alberio. « Pluripotency and X Chromosome Dynamics Revealed in Pig Pre-Gastrulating Embryos by Single Cell Analysis ». *Nature Communications* 10, n° 1 (30 janvier 2019): 500. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08387-8>.
- Rayon, Teresa, Sergio Menchero, Andres Nieto, Panagiotis Xenopoulos, Miguel Crespo, Katie Cockburn, Susana Cañon, et al. « Notch and Hippo Converge on Cdx2 to Specify the Trophectoderm Lineage in the Mouse Blastocyst ». *Developmental Cell* 30, n° 4 (25 août 2014): 410-22. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.019>.
- Reeve, W. J., et C. A. Ziomek. « Distribution of Microvilli on Dissociated Blastomeres from Mouse Embryos: Evidence for Surface Polarization at Compaction ». *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 62 (avril 1981): 339-50.
- Reima, I., E. Lehtonen, I. Virtanen, et J. E. Fléchon. « The Cytoskeleton and Associated Proteins during Cleavage, Compaction and Blastocyst Differentiation in the Pig ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 54, n° 1 (août 1993): 35-45. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1993.tb00657.x>.
- Reis e Silva, Adriana R., Céline Bruno, Renaud Fleurot, Nathalie Daniel, Catherine Archilla, Nathalie Peynot, Carolina M. Lucci, Nathalie Beaujean, et Veronique Duranthon. « Alteration of DNA Demethylation Dynamics by in Vitro Culture Conditions in Rabbit Pre-Implantation Embryos ». *Epigenetics* 7, n° 5 (mai 2012): 440-46. <https://doi.org/10.4161/epi.19563>.
- Renfree, Marilyn B., et Jane C. Fenelon. « The Enigma of Embryonic Diapause ». *Development (Cambridge, England)* 144, n° 18 (15 septembre 2017): 3199-3210. <https://doi.org/10.1242/dev.148213>.
- Rivera-Pérez, Jaime A., et Terry Magnuson. « Primitive Streak Formation in Mice Is Preceded by Localized Activation of Brachyury and Wnt3 ». *Developmental Biology* 288, n° 2 (15 décembre 2005): 363-71. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.09.012>.
- Rodríguez, Aida, Cinzia Allegrucci, et Ramiro Alberio. « Modulation of Pluripotency in the Porcine Embryo and IPS Cells ». *PloS One* 7, n° 11 (2012): e49079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049079>.
- Rodriguez, Tristan A., Shankar Srinivas, Melanie P. Clements, James C. Smith, et Rosa S. P. Beddington. « Induction and Migration of the Anterior Visceral Endoderm Is Regulated by the Extra-Embryonic Ectoderm ». *Development (Cambridge, England)* 132, n° 11 (juin 2005): 2513-20. <https://doi.org/10.1242/dev.01847>.
- Rodriguez-Madoz, Juan Roberto, Edurne San Jose-Eneriz, Obdulia Rabal, Natalia Zapata-Linares, Estibaliz Miranda, Saray Rodriguez, Angelo Porciuncula, et al. « Reversible Dual Inhibitor against G9a and DNMT1 Improves Human iPSC Derivation Enhancing MET and Facilitating Transcription Factor Engagement to the Genome ». *PloS One* 12, n° 12 (2017): e0190275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190275>.
- Roode, Mila, Kathryn Blair, Philip Snell, Kay Elder, Sally Marchant, Austin Smith, et Jennifer Nichols. « Human Hypoblast Formation Is Not Dependent on FGF Signalling ». *Developmental Biology* 361, n° 2 (15 janvier 2012): 358-63. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.10.030>.
- Rostovskaya, Maria, Giuliano G. Stirparo, et Austin Smith. « Capacitation of Human Naive Pluripotent Stem Cells for Multi-Lineage Differentiation ». *Development (Cambridge, England)* 146, n° 7 (3 avril 2019): dev172916. <https://doi.org/10.1242/dev.172916>.

- Rugg-Gunn, Peter J., Brian J. Cox, Amy Ralston, et Janet Rossant. « Distinct Histone Modifications in Stem Cell Lines and Tissue Lineages from the Early Mouse Embryo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, n° 24 (15 juin 2010): 10783-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914507107>.
- Rybouchkin, Andrei, Yoko Kato, et Yukio Tsunoda. « Role of Histone Acetylation in Reprogramming of Somatic Nuclei Following Nuclear Transfer ». *Biology of Reproduction* 74, n° 6 (juin 2006): 1083-89. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.047456>.
- Sahakyan, Anna, Rachel Kim, Constantinos Chronis, Shan Sabri, Giancarlo Bonora, Thorold W. Theunissen, Edward Kuoy, et al. « Human Naive Pluripotent Stem Cells Model X Chromosome Dampening and X Inactivation ». *Cell Stem Cell* 20, n° 1 (5 janvier 2017): 87-101. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.10.006>.
- Saiz, Néstor, Joanna B. Grabarek, Nitin Sabherwal, Nancy Papalopulu, et Berenika Plusa. « Atypical Protein Kinase C Couples Cell Sorting with Primitive Endoderm Maturation in the Mouse Blastocyst ». *Development (Cambridge, England)* 140, n° 21 (novembre 2013): 4311-22. <https://doi.org/10.1242/dev.093922>.
- Saiz, Néstor, Kiah M. Williams, Venkatraman E. Seshan, et Anna-Katerina Hadjantonakis. « Asynchronous Fate Decisions by Single Cells Collectively Ensure Consistent Lineage Composition in the Mouse Blastocyst ». *Nature Communications* 7 (18 novembre 2016): 13463. <https://doi.org/10.1038/ncomms13463>.
- Sakaue, Morito, Hiroshi Ohta, Yuichi Kumaki, Masaaki Oda, Yuko Sakaide, Chisa Matsuoka, Akiko Yamagiwa, Hitoshi Niwa, Teruhiko Wakayama, et Masaki Okano. « DNA Methylation Is Dispensable for the Growth and Survival of the Extraembryonic Lineages ». *Current Biology: CB* 20, n° 16 (24 août 2010): 1452-57. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.050>.
- Sakaue-Sawano, Asako, Masahiro Yo, Naoki Komatsu, Toru Hiratsuka, Takako Kogure, Tetsushi Hoshida, Naoki Goshima, Michiyuki Matsuda, Hiroyuki Miyoshi, et Atsushi Miyawaki. « Genetically Encoded Tools for Optical Dissection of the Mammalian Cell Cycle ». *Molecular Cell* 68, n° 3 (2 novembre 2017): 626-640.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.001>.
- Salvaing, J., N. Peynot, M. N. Bedhane, S. Veniel, E. Pellier, C. Boulesteix, N. Beaujean, N. Daniel, et V. Duranthon. « Assessment of “one-Step” versus “Sequential” Embryo Culture Conditions through Embryonic Genome Methylation and Hydroxymethylation Changes ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 31, n° 11 (novembre 2016): 2471-83. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew214>.
- Santamaría, David, Cédric Barrière, Antonio Cerqueira, Sarah Hunt, Claudine Tardy, Kathryn Newton, Javier F. Cáceres, Pierre Dubus, Marcos Malumbres, et Mariano Barbacid. « Cdk1 Is Sufficient to Drive the Mammalian Cell Cycle ». *Nature* 448, n° 7155 (16 août 2007): 811-15. <https://doi.org/10.1038/nature06046>.
- Santos, Fátima, Brian Hendrich, Wolf Reik, et Wendy Dean. « Dynamic Reprogramming of DNA Methylation in the Early Mouse Embryo ». *Developmental Biology* 241, n° 1 (1 janvier 2002): 172-82. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0501>.
- Sasaki, Kotaro, Tomonori Nakamura, Ikuhiro Okamoto, Yukihiro Yabuta, Chizuru Iwatani, Hideaki Tsuchiya, Yasunari Seita, et al. « The Germ Cell Fate of Cynomolgus Monkeys Is Specified in the Nascent Amnion ». *Developmental Cell* 39, n° 2 (24 octobre 2016): 169-85. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.007>.
- Savatier, P., S. Huang, L. Szekely, K. G. Wiman, et J. Samarut. « Contrasting Patterns of Retinoblastoma Protein Expression in Mouse Embryonic Stem Cells and Embryonic Fibroblasts ». *Oncogene* 9, n° 3 (mars 1994): 809-18.
- Schmaltz-Panneau, Barbara, Luc Jouneau, Pierre Osteil, Yann Tapponnier, Marielle Afanassieff, Marco Moroldo, Alice Jouneau, et al. « Contrasting Transcriptome Landscapes of Rabbit Pluripotent Stem Cells in Vitro and in Vivo ». *Animal Reproduction Science* 149, n° 1-2 (septembre 2014): 67-79. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.05.014>.

- Schrode, Nadine, Néstor Saiz, Stefano Di Talia, et Anna-Katerina Hadjantonakis. « GATA6 Levels Modulate Primitive Endoderm Cell Fate Choice and Timing in the Mouse Blastocyst ». *Developmental Cell* 29, n° 4 (27 mai 2014): 454-67. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.011>.
- Seki, Yoshiyuki, Masashi Yamaji, Yukihiro Yabuta, Mitsue Sano, Mayo Shigeta, Yasuhisa Matsui, Yumiko Saga, Makoto Tachibana, Yoichi Shinkai, et Mitinori Saitou. « Cellular Dynamics Associated with the Genome-Wide Epigenetic Reprogramming in Migrating Primordial Germ Cells in Mice ». *Development (Cambridge, England)* 134, n° 14 (juillet 2007): 2627-38. <https://doi.org/10.1242/dev.005611>.
- Sela, Yogev, Natali Molotski, Saar Golan, Joseph Itskovitz-Eldor, et Yoav Soen. « Human Embryonic Stem Cells Exhibit Increased Propensity to Differentiate during the G1 Phase Prior to Phosphorylation of Retinoblastoma Protein ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 30, n° 6 (juin 2012): 1097-1108. <https://doi.org/10.1002/stem.1078>.
- Senft, Anna D., Ita Costello, Hamish W. King, Arne W. Mould, Elizabeth K. Bikoff, et Elizabeth J. Robertson. « Combinatorial Smad2/3 Activities Downstream of Nodal Signaling Maintain Embryonic/Extra-Embryonic Cell Identities during Lineage Priming ». *Cell Reports* 24, n° 8 (21 août 2018): 1977-1985.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.077>.
- Seshagiri, P. B., D. I. McKenzie, B. D. Bavister, J. L. Williamson, et J. M. Aiken. « Golden Hamster Embryonic Genome Activation Occurs at the Two-Cell Stage: Correlation with Major Developmental Changes ». *Molecular Reproduction and Development* 32, n° 3 (juillet 1992): 229-35. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080320307>.
- Shahbazi, Marta N., Antonio Scialdone, Natalia Skorupska, Antonia Weberling, Gaëlle Recher, Meng Zhu, Agnieszka Jedrusik, et al. « Pluripotent State Transitions Coordinate Morphogenesis in Mouse and Human Embryos ». *Nature* 552, n° 7684 (14 décembre 2017): 239-43. <https://doi.org/10.1038/nature24675>.
- Shan, Yongli, Zechuan Liang, Qi Xing, Tian Zhang, Bo Wang, Shulan Tian, Wenhao Huang, et al. « PRC2 Specifies Ectoderm Lineages and Maintains Pluripotency in Primed but Not Naïve ESCs ». *Nature Communications* 8, n° 1 (22 septembre 2017): 672. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00668-4>.
- Sharov, Alexei A., Shinji Masui, Lioudmila V. Sharova, Yulan Piao, Kazuhiro Aiba, Ryo Matoba, Li Xin, Hitoshi Niwa, et Minoru S. H. Ko. « Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog Downstream Target Genes with Statistical Confidence by Applying a Novel Algorithm to Time Course Microarray and Genome-Wide Chromatin Immunoprecipitation Data ». *BMC Genomics* 9 (3 juin 2008): 269. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-269>.
- Shen, Xiaohua, Yingchun Liu, Yu-Jung Hsu, Yuko Fujiwara, Jonghwan Kim, Xiaohong Mao, Guo-Cheng Yuan, et Stuart H. Orkin. « EZH1 Mediates Methylation on Histone H3 Lysine 27 and Complements EZH2 in Maintaining Stem Cell Identity and Executing Pluripotency ». *Molecular Cell* 32, n° 4 (21 novembre 2008): 491-502. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.016>.
- Shi, Li-Hong, Yi-Liang Miao, Ying-Chun Ouyang, Jun-Cheng Huang, Zi-Li Lei, Ji-Wen Yang, Zhi-Ming Han, Xiang-Fen Song, Qing-Yuan Sun, et Da-Yuan Chen. « Trichostatin A (TSA) Improves the Development of Rabbit-Rabbit Intraspecies Cloned Embryos, but Not Rabbit-Human Interspecies Cloned Embryos ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 237, n° 3 (mars 2008): 640-48. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21450>.
- Silva, Jose, Jennifer Nichols, Thorold W. Theunissen, Ge Guo, Anouk L. van Oosten, Ornella Barrandon, Jason Wray, Shinya Yamanaka, Ian Chambers, et Austin Smith. « Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State ». *Cell* 138, n° 4 (21 août 2009): 722-37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.039>.

- Simerly, Calvin R., Christopher S. Navara, Carlos A. Castro, Janet C. Turpin, Carrie J. Redinger, Jocelyn D. Mich-Basso, Ethan S. Jacoby, et al. « Establishment and Characterization of Baboon Embryonic Stem Cell Lines: An Old World Primate Model for Regeneration and Transplantation Research ». *Stem Cell Research* 2, n° 3 (mai 2009): 178-87. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.02.004>.
- Simmet, Kilian, Valeri Zakhartchenko, Julia Philippou-Massier, Helmut Blum, Nikolai Klymiuk, et Eckhard Wolf. « OCT4/POU5F1 Is Required for NANOG Expression in Bovine Blastocysts ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, n° 11 (13 mars 2018): 2770-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718833115>.
- Singh, Amar M., Takashi Hamazaki, Katherine E. Hankowski, et Naohiro Terada. « A Heterogeneous Expression Pattern for Nanog in Embryonic Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25, n° 10 (octobre 2007): 2534-42. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0126>.
- Singh, Amar M., David Reynolds, Timothy Cliff, Satoshi Ohtsuka, Alexa L. Mattheyses, Yuhua Sun, Laura Menendez, Michael Kulik, et Stephen Dalton. « Signaling Network Crosstalk in Human Pluripotent Cells: A Smad2/3-Regulated Switch That Controls the Balance between Self-Renewal and Differentiation ». *Cell Stem Cell* 10, n° 3 (2 mars 2012): 312-26. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.014>.
- Smith, A. G., J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, et D. Rogers. « Inhibition of Pluripotential Embryonic Stem Cell Differentiation by Purified Polypeptides ». *Nature* 336, n° 6200 (15 décembre 1988): 688-90. <https://doi.org/10.1038/336688a0>.
- Smith, Austin. « Formative Pluripotency: The Executive Phase in a Developmental Continuum ». *Development (Cambridge, England)* 144, n° 3 (1 février 2017): 365-73. <https://doi.org/10.1242/dev.142679>.
- Smith, Joseph R., Ludovic Vallier, Giuseppe Lupo, Morgan Alexander, William A. Harris, et Roger A. Pedersen. « Inhibition of Activin/Nodal Signaling Promotes Specification of Human Embryonic Stem Cells into Neuroectoderm ». *Developmental Biology* 313, n° 1 (1 janvier 2008): 107-17. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.003>.
- Smith, Zachary D., Michelle M. Chan, Kathryn C. Humm, Rahul Karnik, Shila Mekhoubad, Aviv Regev, Kevin Eggan, et Alexander Meissner. « DNA Methylation Dynamics of the Human Preimplantation Embryo ». *Nature* 511, n° 7511 (31 juillet 2014): 611-15. <https://doi.org/10.1038/nature13581>.
- Snow, M. H., et D. Bennett. « Gastrulation in the Mouse: Assessment of Cell Populations in the Epiblast of Tw18/Tw18 Embryos ». *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 47 (octobre 1978): 39-52.
- Soares, Miguel L., Seiki Haraguchi, Maria-Elena Torres-Padilla, Tibor Kalmar, Lee Carpenter, Graham Bell, Alastair Morrison, et al. « Functional Studies of Signaling Pathways in Peri-Implantation Development of the Mouse Embryo by RNAi ». *BMC Developmental Biology* 5 (28 décembre 2005): 28. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-5-28>.
- Solter, D., N. Skreb, et I. Damjanov. « Cell Cycle Analysis in the Mouse EGG-Cylinder ». *Experimental Cell Research* 64, n° 2 (février 1971): 331-34. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(71\)90084-x](https://doi.org/10.1016/0014-4827(71)90084-x).
- Sone, Masamitsu, Nobuhiro Morone, Tomonori Nakamura, Akito Tanaka, Keisuke Okita, Knut Woltjen, Masato Nakagawa, et al. « Hybrid Cellular Metabolism Coordinated by Zic3 and Esrrb Synergistically Enhances Induction of Naive Pluripotency ». *Cell Metabolism* 25, n° 5 (2 mai 2017): 1103-1117.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.017>.
- Sousa, Elsa J., Hannah T. Stuart, Lawrence E. Bates, Mohammadmehdi Ghorbani, Jennifer Nichols, Sabine Dietmann, et José C. R. Silva. « Exit from Naive Pluripotency Induces a Transient X Chromosome Inactivation-like State in Males ». *Cell Stem Cell* 22, n° 6 (1 juin 2018): 919-928.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.001>.

- Spindle, A., H. Nagano, et R. A. Pedersen. « Inhibition of DNA Replication in Preimplantation Mouse Embryos by Aphidicolin ». *The Journal of Experimental Zoology* 235, n° 2 (août 1985): 289-95. <https://doi.org/10.1002/jez.1402350216>.
- Stavridis, Marios P., Barry J. Collins, et Kate G. Storey. « Retinoic Acid Orchestrates Fibroblast Growth Factor Signalling to Drive Embryonic Stem Cell Differentiation ». *Development (Cambridge, England)* 137, n° 6 (mars 2010): 881-90. <https://doi.org/10.1242/dev.043117>.
- Stead, Elaine, Josephine White, Renate Faast, Simon Conn, Sherilyn Goldstone, Joy Rathjen, Urvashi Dhingra, Peter Rathjen, Duncan Walker, et Stephen Dalton. « Pluripotent Cell Division Cycles Are Driven by Ectopic Cdk2, Cyclin A/E and E2F Activities ». *Oncogene* 21, n° 54 (28 novembre 2002): 8320-33. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206015>.
- Stephenson, Robert Odell, Yojiro Yamanaka, et Janet Rossant. « Disorganized Epithelial Polarity and Excess Trophectoderm Cell Fate in Preimplantation Embryos Lacking E-Cadherin ». *Development (Cambridge, England)* 137, n° 20 (octobre 2010): 3383-91. <https://doi.org/10.1242/dev.050195>.
- Steptoe, P. C., R. G. Edwards, et J. M. Purdy. « Human Blastocysts Grown in Culture ». *Nature* 229, n° 5280 (8 janvier 1971): 132-33. <https://doi.org/10.1038/229132a0>.
- Stevens, L. C. « The Biology of Teratomas ». *Advances in Morphogenesis* 6 (1967): 1-31. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4831-9953-5.50005-6>.
- . « The Development of Transplantable Teratocarcinomas from Intratesticular Grafts of Pre- and Postimplantation Mouse Embryos ». *Developmental Biology* 21, n° 3 (mars 1970): 364-82. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(70\)90130-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(70)90130-2).
- Strauss, Bernhard, Andrew Harrison, Paula Almeida Coelho, Keiko Yata, Magdalena Zernicka-Goetz, et Jonathon Pines. « Cyclin B1 Is Essential for Mitosis in Mouse Embryos, and Its Nuclear Export Sets the Time for Mitosis ». *The Journal of Cell Biology* 217, n° 1 (2 janvier 2018): 179-93. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612147>.
- Streffler, C., D. van Beuningen, M. Molls, N. Zamboglou, et S. Schulz. « Kinetics of Cell Proliferation in the Pre-Implanted Mouse Embryo in Vivo and in Vitro ». *Cell and Tissue Kinetics* 13, n° 2 (mars 1980): 135-43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1980.tb00456.x>.
- Strumpf, Dan, Chai-An Mao, Yojiro Yamanaka, Amy Ralston, Kallayanee Chawengsaksophak, Felix Beck, et Janet Rossant. « Cdx2 Is Required for Correct Cell Fate Specification and Differentiation of Trophectoderm in the Mouse Blastocyst ». *Development (Cambridge, England)* 132, n° 9 (mai 2005): 2093-2102. <https://doi.org/10.1242/dev.01801>.
- Suemori, H., T. Tada, R. Torii, Y. Hosoi, K. Kobayashi, H. Imahie, Y. Kondo, A. Iritani, et N. Nakatsuji. « Establishment of Embryonic Stem Cell Lines from Cynomolgus Monkey Blastocysts Produced by IVF or ICSI ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 222, n° 2 (octobre 2001): 273-79. <https://doi.org/10.1002/dvdy.1191>.
- Sumi, Tomoyuki, Yasuko Fujimoto, Norio Nakatsuji, et Hirofumi Suemori. « STAT3 Is Dispensable for Maintenance of Self-Renewal in Nonhuman Primate Embryonic Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 22, n° 5 (2004): 861-72. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-861>.
- Suwińska, Aneta, Renata Czołowska, Waclaw Ozdzeński, et Andrzej K. Tarkowski. « Blastomeres of the Mouse Embryo Lose Totipotency after the Fifth Cleavage Division: Expression of Cdx2 and Oct4 and Developmental Potential of Inner and Outer Blastomeres of 16- and 32-Cell Embryos ». *Developmental Biology* 322, n° 1 (1 octobre 2008): 133-44. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.07.019>.
- Tachibana, Makoto, Kenji Sugimoto, Masami Nozaki, Jun Ueda, Tsutomu Ohta, Misao Ohki, Mikiko Fukuda, et al. « G9a Histone Methyltransferase Plays a Dominant Role in Euchromatic Histone H3 Lysine 9 Methylation and Is Essential for Early Embryogenesis ». *Genes & Development* 16, n° 14 (15 juillet 2002): 1779-91. <https://doi.org/10.1101/gad.989402>.

- Tachibana, Masahito, Michelle Sparman, Cathy Ramsey, Hong Ma, Hyo-Sang Lee, Maria Cecilia T. Penedo, et Shoukhrat Mitalipov. « Generation of Chimeric Rhesus Monkeys ». *Cell* 148, n° 1-2 (20 janvier 2012): 285-95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.007>.
- Tai, Chih-I., et Qi-Long Ying. « Gbx2, a LIF/Stat3 Target, Promotes Reprogramming to and Retention of the Pluripotent Ground State ». *Journal of Cell Science* 126, n° Pt 5 (1 mars 2013): 1093-98. <https://doi.org/10.1242/jcs.118273>.
- Takahashi, Kazutoshi, Kaoru Mitsui, et Shinya Yamanaka. « Role of ERas in Promoting Tumour-like Properties in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Nature* 423, n° 6939 (29 mai 2003): 541-45. <https://doi.org/10.1038/nature01646>.
- Takahashi, Yutaka, Nick Carpino, James C. Cross, Miguel Torres, Evan Parganas, et James N. Ihle. « SOCS3: An Essential Regulator of LIF Receptor Signaling in Trophoblast Giant Cell Differentiation ». *The EMBO Journal* 22, n° 3 (3 février 2003): 372-84. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg057>.
- Takashima, Yasuhiro, Ge Guo, Remco Loos, Jennifer Nichols, Gabriella Ficz, Felix Krueger, David Oxley, et al. « Resetting Transcription Factor Control Circuitry toward Ground-State Pluripotency in Human ». *Cell* 158, n° 6 (11 septembre 2014): 1254-69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.029>.
- Tam, Patrick P. L., et David A. F. Loebel. « Gene Function in Mouse Embryogenesis: Get Set for Gastrulation ». *Nature Reviews. Genetics* 8, n° 5 (mai 2007): 368-81. <https://doi.org/10.1038/nrg2084>.
- Taponnier, Yann, Marielle Afanassieff, Irène Aksoy, Maxime Aubry, Anaïs Moulin, Lucas Medjani, Wilhelm Bouchereau, et al. « Reprogramming of Rabbit Induced Pluripotent Stem Cells toward Epiblast and Chimeric Competency Using Krüppel-like Factors ». *Stem Cell Research* 24 (octobre 2017): 106-17. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.09.001>.
- Tarkowski, A. K. « Experiments on the Development of Isolated Blastomers of Mouse Eggs ». *Nature* 184 (24 octobre 1959): 1286-87. <https://doi.org/10.1038/1841286a0>.
- Ter Huurne, Menno, James Chappell, Stephen Dalton, et Hendrik G. Stunnenberg. « Distinct Cell-Cycle Control in Two Different States of Mouse Pluripotency ». *Cell Stem Cell* 21, n° 4 (5 octobre 2017): 449-455.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.09.004>.
- Tesar, Paul J., Josh G. Chenoweth, Frances A. Brook, Timothy J. Davies, Edward P. Evans, David L. Mack, Richard L. Gardner, et Ronald D. G. McKay. « New Cell Lines from Mouse Epiblast Share Defining Features with Human Embryonic Stem Cells ». *Nature* 448, n° 7150 (12 juillet 2007): 196-99. <https://doi.org/10.1038/nature05972>.
- Tesarík, J., V. Kopečný, M. Plachot, et J. Mandelbaum. « High-Resolution Autoradiographic Localization of DNA-Containing Sites and RNA Synthesis in Developing Nucleoli of Human Preimplantation Embryos: A New Concept of Embryonic Nucleologenesis ». *Development (Cambridge, England)* 101, n° 4 (décembre 1987): 777-91.
- TeSlaa, Tara, Andrea C. Chaikovsky, Inna Lipchina, Sandra L. Escobar, Konrad Hochedlinger, Jing Huang, Thomas G. Graeber, Daniel Braas, et Michael A. Teitell. « α -Ketoglutarate Accelerates the Initial Differentiation of Primed Human Pluripotent Stem Cells ». *Cell Metabolism* 24, n° 3 (13 septembre 2016): 485-93. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.002>.
- Theunissen, Thorold W., Marc Friedli, Yupeng He, Evarist Planet, Ryan C. O'Neil, Styliani Markoulaki, Julien Pontis, et al. « Molecular Criteria for Defining the Naive Human Pluripotent State ». *Cell Stem Cell* 19, n° 4 (6 octobre 2016): 502-15. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.011>.
- Theunissen, Thorold W., Benjamin E. Powell, Haoyi Wang, Maya Mitalipova, Dina A. Faddah, Jessica Reddy, Zi Peng Fan, et al. « Systematic Identification of Culture Conditions for Induction and Maintenance of Naive Human Pluripotency ». *Cell Stem Cell* 15, n° 4 (2 octobre 2014): 471-87. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.07.002>.

- Thomas, P. Q., A. Brown, et R. S. Beddington. « Hex: A Homeobox Gene Revealing Peri-Implantation Asymmetry in the Mouse Embryo and an Early Transient Marker of Endothelial Cell Precursors ». *Development (Cambridge, England)* 125, n° 1 (janvier 1998): 85-94.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, et J. M. Jones. « Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts ». *Science (New York, N.Y.)* 282, n° 5391 (6 novembre 1998): 1145-47. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>.
- Thomson, J. A., J. Kalishman, T. G. Golos, M. Durning, C. P. Harris, et J. P. Hearn. « Pluripotent Cell Lines Derived from Common Marmoset (*Callithrix Jacchus*) Blastocysts ». *Biology of Reproduction* 55, n° 2 (août 1996): 254-59. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.2.254>.
- Thomson, Matt, Siyuan John Liu, Ling-Nan Zou, Zack Smith, Alexander Meissner, et Sharad Ramanathan. « Pluripotency Factors in Embryonic Stem Cells Regulate Differentiation into Germ Layers ». *Cell* 145, n° 6 (10 juin 2011): 875-89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.017>.
- Torres-Padilla, Maria-Elena, David-Emlyn Parfitt, Tony Kouzarides, et Magdalena Zernicka-Goetz. « Histone Arginine Methylation Regulates Pluripotency in the Early Mouse Embryo ». *Nature* 445, n° 7124 (11 janvier 2007): 214-18. <https://doi.org/10.1038/nature05458>.
- Torres-Padilla, Maria-Elena, Lucy Richardson, Paulina Kolasinska, Sigolène M. Meilhac, Merlin Verena Luetke-Eversloh, et Magdalena Zernicka-Goetz. « The Anterior Visceral Endoderm of the Mouse Embryo Is Established from Both Preimplantation Precursor Cells and by de Novo Gene Expression after Implantation ». *Developmental Biology* 309, n° 1 (1 septembre 2007): 97-112. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.06.020>.
- Tosic, Jelena, Gwang-Jin Kim, Mihael Pavlovic, Chiara M. Schröder, Sophie-Luise Mersiowsky, Margareta Barg, Alexis Hofherr, et al. « Eomes and Brachyury Control Pluripotency Exit and Germ-Layer Segregation by Changing the Chromatin State ». *Nature Cell Biology* 21, n° 12 (décembre 2019): 1518-31. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0423-1>.
- Tosolini, Matteo, Vincent Brochard, Pierre Adenot, Martine Chebrou, Giacomo Grillo, Violette Navia, Nathalie Beaujean, Claire Francastel, Amélie Bonnet-Garnier, et Alice Jouneau. « Contrasting Epigenetic States of Heterochromatin in the Different Types of Mouse Pluripotent Stem Cells ». *Scientific Reports* 8, n° 1 (10 avril 2018): 5776. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23822-4>.
- Touboul, Thomas, Nicholas R. F. Hannan, Sébastien Corbineau, Amélie Martinez, Clémence Martinet, Sophie Branchereau, Sylvie Mainot, et al. « Generation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells under Chemically Defined Conditions That Recapitulate Liver Development ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51, n° 5 (mai 2010): 1754-65. <https://doi.org/10.1002/hep.23506>.
- Tropepe, V., S. Hitoshi, C. Sirard, T. W. Mak, J. Rossant, et D. van der Kooy. « Direct Neural Fate Specification from Embryonic Stem Cells: A Primitive Mammalian Neural Stem Cell Stage Acquired through a Default Mechanism ». *Neuron* 30, n° 1 (avril 2001): 65-78. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00263-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00263-x).
- Tuano, Natasha K., Jun Okabe, Mark Ziemann, Mark E. Cooper, et Assam El-Osta. « Set7 Mediated Interactions Regulate Transcriptional Networks in Embryonic Stem Cells ». *Nucleic Acids Research* 44, n° 19 (2 novembre 2016): 9206-17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw621>.
- Tyser, Richard C.V., Elmir Mahammadov, Shota Nakanoh, Ludovic Vallier, Antonio Scialdone, et Shankar Srinivas. « A Spatially Resolved Single Cell Atlas of Human Gastrulation ». Preprint. *Developmental Biology*, 21 juillet 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.07.21.213512>.
- Urrutia, Guillermo, Ann Salmonson, Jorge Toro-Zapata, Thiago M. de Assuncao, Angela Mathison, Nelson Duseti, Juan Iovanna, Raul Urrutia, et Gwen Lomberk. « Combined Targeting of G9a and Checkpoint Kinase 1 Synergistically Inhibits Pancreatic Cancer Cell Growth by Replication

- Fork Collapse ». *Molecular Cancer Research: MCR* 18, n° 3 (mars 2020): 448-62. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0490>.
- Vallier, Ludovic, Morgan Alexander, et Roger A. Pedersen. « Activin/Nodal and FGF Pathways Cooperate to Maintain Pluripotency of Human Embryonic Stem Cells ». *Journal of Cell Science* 118, n° Pt 19 (1 octobre 2005): 4495-4509. <https://doi.org/10.1242/jcs.02553>.
- Vallier, Ludovic, Sasha Mendjan, Stephanie Brown, Zhenzhi Chng, Adrian Teo, Lucy E. Smithers, Matthew W. B. Trotter, et al. « Activin/Nodal Signalling Maintains Pluripotency by Controlling Nanog Expression ». *Development (Cambridge, England)* 136, n° 8 (avril 2009): 1339-49. <https://doi.org/10.1242/dev.033951>.
- Van der Jeught, Margot, Björn Heindryckx, Thomas O'Leary, Galbha Duggal, Sabitri Ghimire, Sylvie Lierman, Nadine Van Roy, et al. « Treatment of Human Embryos with the TGFβ Inhibitor SB431542 Increases Epiblast Proliferation and Permits Successful Human Embryonic Stem Cell Derivation ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 29, n° 1 (janvier 2014): 41-48. <https://doi.org/10.1093/humrep/det400>.
- Varelas, Xaralabos, Bryan W. Miller, Richelle Sopko, Siyuan Song, Alex Gregorieff, Frederic A. Fellouse, Rui Sakuma, et al. « The Hippo Pathway Regulates Wnt/Beta-Catenin Signaling ». *Developmental Cell* 18, n° 4 (20 avril 2010): 579-91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.03.007>.
- Varlet, I., J. Collignon, et E. J. Robertson. « Nodal Expression in the Primitive Endoderm Is Required for Specification of the Anterior Axis during Mouse Gastrulation ». *Development (Cambridge, England)* 124, n° 5 (mars 1997): 1033-44.
- Veillard, Anne-Clémence, Hendrik Marks, Andreia Sofia Bernardo, Luc Jouneau, Denis Laloë, Laurent Boulanger, Anita Kaan, et al. « Stable Methylation at Promoters Distinguishes Epiblast Stem Cells from Embryonic Stem Cells and the in Vivo Epiblasts ». *Stem Cells and Development* 23, n° 17 (1 septembre 2014): 2014-29. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0639>.
- VerMilyea, Matthew D., Laura P. O'Neill, et Bryan M. Turner. « Transcription-Independent Heritability of Induced Histone Modifications in the Mouse Preimplantation Embryo ». *PLoS One* 4, n° 6 (30 juin 2009): e6086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006086>.
- Vinot, Stéphanie, Tran Le, Shigeo Ohno, Tony Pawson, Bernard Maro, et Sophie Louvet-Vallée. « Asymmetric Distribution of PAR Proteins in the Mouse Embryo Begins at the 8-Cell Stage during Compaction ». *Developmental Biology* 282, n° 2 (15 juin 2005): 307-19. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.03.001>.
- Voncken, Jan Willem, Bernard A. J. Roelen, Mieke Roefs, Stijn de Vries, Els Verhoeven, Silvia Marino, Jacqueline Deschamps, et Maarten van Lohuizen. « Rnf2 (Ring1b) Deficiency Causes Gastrulation Arrest and Cell Cycle Inhibition ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, n° 5 (4 mars 2003): 2468-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.0434312100>.
- Waddington, C.H. « The epigenotype ». *Endeavor*, 1942, 18-20.
- Wagner, Ryan T., Xueping Xu, Fei Yi, Bradley J. Merrill, et Austin J. Cooney. « Canonical Wnt/β-Catenin Regulation of Liver Receptor Homolog-1 Mediates Pluripotency Gene Expression ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28, n° 10 (octobre 2010): 1794-1804. <https://doi.org/10.1002/stem.502>.
- Wamaitha, Sissy E., et Kathy K. Niakan. « Human Pre-Gastrulation Development ». *Current Topics in Developmental Biology* 128 (2018): 295-338. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.11.004>.
- Wang, Qiong, Yilong Zou, Sonja Nowotschin, Sang Yong Kim, Qing V. Li, Chew-Li Soh, Jie Su, et al. « The P53 Family Coordinates Wnt and Nodal Inputs in Mesendodermal Differentiation of Embryonic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 20, n° 1 (5 janvier 2017): 70-86. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.10.002>.
- Wang, Shufen, Xianghui Tang, Yuyu Niu, Hongwei Chen, Bin Li, Tianqing Li, Xiuzhen Zhang, Zhixin Hu, Qi Zhou, et Weizhi Ji. « Generation and Characterization of Rabbit Embryonic Stem

- Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25, n° 2 (février 2007): 481-89. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0226>.
- Wang, Xiao Qi, Chung Mau Lo, Lin Chen, Elly S.-W. Ngan, Aimin Xu, et Randy Yc Poon. « CDK1-PDK1-PI3K/Akt Signaling Pathway Regulates Embryonic and Induced Pluripotency ». *Cell Death and Differentiation* 24, n° 1 (janvier 2017): 38-48. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.84>.
- Wang, Xinyi, Denghui Liu, Dajian He, Shengbao Suo, Xian Xia, Xiechao He, Jing-Dong J. Han, et Ping Zheng. « Transcriptome Analyses of Rhesus Monkey Preimplantation Embryos Reveal a Reduced Capacity for DNA Double-Strand Break Repair in Primate Oocytes and Early Embryos ». *Genome Research* 27, n° 4 (avril 2017): 567-79. <https://doi.org/10.1101/gr.198044.115>.
- Ware, C. B., M. C. Horowitz, B. R. Renshaw, J. S. Hunt, D. Liggitt, S. A. Koblar, B. C. Gliniak, H. J. McKenna, T. Papayannopoulou, et B. Thoma. « Targeted Disruption of the Low-Affinity Leukemia Inhibitory Factor Receptor Gene Causes Placental, Skeletal, Neural and Metabolic Defects and Results in Perinatal Death ». *Development (Cambridge, England)* 121, n° 5 (mai 1995): 1283-99.
- Ware, Carol B., Angelique M. Nelson, Brigham Mecham, Jennifer Hesson, Wenyu Zhou, Erica C. Jonlin, Antonio J. Jimenez-Caliani, et al. « Derivation of Naive Human Embryonic Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, n° 12 (25 mars 2014): 4484-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319738111>.
- Ware, Carol B., Linlin Wang, Brigham H. Mecham, Lanlan Shen, Angelique M. Nelson, Merav Bar, Deepak A. Lamba, et al. « Histone Deacetylase Inhibition Elicits an Evolutionarily Conserved Self-Renewal Program in Embryonic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 4, n° 4 (3 avril 2009): 359-69. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.03.001>.
- Warmflash, Aryeh, Benoit Sorre, Fred Etoc, Eric D. Siggia, et Ali H. Brivanlou. « A Method to Recapitulate Early Embryonic Spatial Patterning in Human Embryonic Stem Cells ». *Nature Methods* 11, n° 8 (août 2014): 847-54. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3016>.
- Weber, Susanne, Dawid Eckert, Daniel Nettersheim, Ad J. M. Gillis, Sabine Schäfer, Peter Kuckenber, Julia Ehlermann, et al. « Critical Function of AP-2 Gamma/TCFAP2C in Mouse Embryonic Germ Cell Maintenance ». *Biology of Reproduction* 82, n° 1 (janvier 2010): 214-23. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078717>.
- Wen, Bing-Qiang, Jun Li, Jun-Jie Li, Shu-Jun Tian, Shu-Chun Sun, Xin Qi, Wen-Tao Cai, et Qing-Ling Chang. « The Histone Deacetylase Inhibitor Scriptaid Improves in Vitro Developmental Competence of Ovine Somatic Cell Nuclear Transferred Embryos ». *Theriogenology* 81, n° 2 (15 janvier 2014): 332-39. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.032>.
- White, Josephine, Elaine Stead, Renate Faast, Simon Conn, Peter Cartwright, et Stephen Dalton. « Developmental Activation of the Rb-E2F Pathway and Establishment of Cell Cycle-Regulated Cyclin-Dependent Kinase Activity during Embryonic Stem Cell Differentiation ». *Molecular Biology of the Cell* 16, n° 4 (avril 2005): 2018-27. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-12-1056>.
- Whyte, Warren A., Steve Bilodeau, David A. Orlando, Heather A. Hoke, Garrett M. Frampton, Charles T. Foster, Shaun M. Cowley, et Richard A. Young. « Enhancer Decommissioning by LSD1 during Embryonic Stem Cell Differentiation ». *Nature* 482, n° 7384 (1 février 2012): 221-25. <https://doi.org/10.1038/nature10805>.
- Whyte, Warren A., David A. Orlando, Denes Hnisz, Brian J. Abraham, Charles Y. Lin, Michael H. Kagey, Peter B. Rahl, Tong Ihn Lee, et Richard A. Young. « Master Transcription Factors and Mediator Establish Super-Enhancers at Key Cell Identity Genes ». *Cell* 153, n° 2 (11 avril 2013): 307-19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.035>.
- Wianny, F., F. X. Real, C. L. Mummery, M. Van Rooijen, J. Lahti, J. Samarut, et P. Savatier. « G1-Phase Regulators, Cyclin D1, Cyclin D2, and Cyclin D3: Up-Regulation at Gastrulation and Dynamic Expression during Neurulation ». *Developmental Dynamics: An Official Publication*

- of the American Association of Anatomists* 212, n° 1 (mai 1998): 49-62. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199805\)212:1<49::AID-AJA5>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199805)212:1<49::AID-AJA5>3.0.CO;2-2).
- Wianny, Florence, Agnieszka Bernat, Cyril Huissoud, Guillaume Marcy, Suzy Markossian, Véronique Cortay, Pascale Giroud, et al. « Derivation and Cloning of a Novel Rhesus Embryonic Stem Cell Line Stably Expressing Tau-Green Fluorescent Protein ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26, n° 6 (juin 2008): 1444-53. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0953>.
- Wicklow, Eryn, Stephanie Blij, Tristan Frum, Yoshikazu Hirate, Richard A. Lang, Hiroshi Sasaki, et Amy Ralston. « HIPPO Pathway Members Restrict SOX2 to the Inner Cell Mass Where It Promotes ICM Fates in the Mouse Blastocyst ». *PLoS Genetics* 10, n° 10 (octobre 2014): e1004618. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004618>.
- Wigger, M., K. Kisielewska, K. Filimonow, B. Plusa, M. Maleszewski, et A. Suwińska. « Plasticity of the Inner Cell Mass in Mouse Blastocyst Is Restricted by the Activity of FGF/MAPK Pathway ». *Scientific Reports* 7, n° 1 (9 novembre 2017): 15136. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15427-0>.
- Winston, N., F. Bourgain-Guglielmetti, M. A. Ciemerych, J. Z. Kubiak, C. Senamaud-Beaufort, M. Carrington, C. Bréchet, et J. Sobczak-Thépot. « Early Development of Mouse Embryos Null Mutant for the Cyclin A2 Gene Occurs in the Absence of Maternally Derived Cyclin A2 Gene Products ». *Developmental Biology* 223, n° 1 (1 juillet 2000): 139-53. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9721>.
- Wooldridge, Lydia K., Sally E. Johnson, Rebecca R. Cockrum, et Alan D. Ealy. « Interleukin-6 Requires JAK to Stimulate Inner Cell Mass Expansion in Bovine Embryos ». *Reproduction (Cambridge, England)* 158, n° 4 (octobre 2019): 303-12. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0286>.
- Wossidlo, Mark, Toshinobu Nakamura, Konstantin Lepikhov, C. Joana Marques, Valeri Zakhartchenko, Michele Boiani, Julia Arand, Toru Nakano, Wolf Reik, et Jörn Walter. « 5-Hydroxymethylcytosine in the Mammalian Zygote Is Linked with Epigenetic Reprogramming ». *Nature Communications* 2 (2011): 241. <https://doi.org/10.1038/ncomms1240>.
- Wray, Jason, Tüzer Kalkan, Sandra Gomez-Lopez, Dominik Eckardt, Andrew Cook, Rolf Kemler, et Austin Smith. « Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 Alleviates Tcf3 Repression of the Pluripotency Network and Increases Embryonic Stem Cell Resistance to Differentiation ». *Nature Cell Biology* 13, n° 7 (19 juin 2011): 838-45. <https://doi.org/10.1038/ncb2267>.
- Wray, Jason, Tuzer Kalkan, et Austin G. Smith. « The Ground State of Pluripotency ». *Biochemical Society Transactions* 38, n° 4 (août 2010): 1027-32. <https://doi.org/10.1042/BST0381027>.
- Wu, Guangming, Luca Gentile, Takuya Fuchikami, Julien Sutter, Katherina Psathaki, Telma C. Esteves, Marcos J. Araúzo-Bravo, et al. « Initiation of Trophectoderm Lineage Specification in Mouse Embryos Is Independent of Cdx2 ». *Development (Cambridge, England)* 137, n° 24 (décembre 2010): 4159-69. <https://doi.org/10.1242/dev.056630>.
- Wu, Guangming, Dong Han, Yu Gong, Vittorio Sebastiano, Luca Gentile, Nishant Singhal, Kenjiro Adachi, et al. « Establishment of Totipotency Does Not Depend on Oct4A ». *Nature Cell Biology* 15, n° 9 (septembre 2013): 1089-97. <https://doi.org/10.1038/ncb2816>.
- Wu, Jun, Daiji Okamura, Mo Li, Keiichiro Suzuki, Chongyuan Luo, Li Ma, Yupeng He, et al. « An Alternative Pluripotent State Confers Interspecies Chimaeric Competency ». *Nature* 521, n° 7552 (21 mai 2015): 316-21. <https://doi.org/10.1038/nature14413>.
- Wu, Shaoyuan, Wenyu Wu, Fuchun Zhang, Jie Ye, Xijun Ni, Jimin Sun, Scott V. Edwards, Jin Meng, et Chris L. Organ. « Molecular and Paleontological Evidence for a Post-Cretaceous Origin of Rodents ». *PloS One* 7, n° 10 (2012): e46445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046445>.
- Xiang, Lifeng, Yu Yin, Yun Zheng, Yanping Ma, Yonggang Li, Zhigang Zhao, Junqiang Guo, et al. « A Developmental Landscape of 3D-Cultured Human Pre-Gastrulation Embryos ». *Nature* 577, n° 7791 (janvier 2020): 537-42. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1875-y>.

- Xiao, Lei, Xuan Yuan, et Saul J. Sharkis. « Activin A Maintains Self-Renewal and Regulates Fibroblast Growth Factor, Wnt, and Bone Morphogenic Protein Pathways in Human Embryonic Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24, n° 6 (juin 2006): 1476-86. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0299>.
- Xie, Huirong, Susanne Tranguch, Xiangxu Jia, Hao Zhang, Sanjoy K. Das, Sudhansu K. Dey, Calvin J. Kuo, et Haibin Wang. « Inactivation of Nuclear Wnt-Beta-Catenin Signaling Limits Blastocyst Competency for Implantation ». *Development (Cambridge, England)* 135, n° 4 (février 2008): 717-27. <https://doi.org/10.1242/dev.015339>.
- Xu, Ren-He, Tori L. Sampsell-Barron, Feng Gu, Sierra Root, Ruthann M. Peck, Guangjin Pan, Junying Yu, et al. « NANOG Is a Direct Target of TGFbeta/Activin-Mediated SMAD Signaling in Human ESCs ». *Cell Stem Cell* 3, n° 2 (7 août 2008): 196-206. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.001>.
- Yamaji, Masashi, Yoshiyuki Seki, Kazuki Kurimoto, Yukihiro Yabuta, Mihoko Yuasa, Mayo Shigeta, Kaori Yamanaka, Yasuhide Ohinata, et Mitunori Saitou. « Critical Function of Prdm14 for the Establishment of the Germ Cell Lineage in Mice ». *Nature Genetics* 40, n° 8 (août 2008): 1016-22. <https://doi.org/10.1038/ng.186>.
- Yamamoto, Masamichi, Hideyuki Beppu, Katsuyoshi Takaoka, Chikara Meno, En Li, Kohei Miyazono, et Hiroshi Hamada. « Antagonism between Smad1 and Smad2 Signaling Determines the Site of Distal Visceral Endoderm Formation in the Mouse Embryo ». *The Journal of Cell Biology* 184, n° 2 (26 janvier 2009): 323-34. <https://doi.org/10.1083/jcb.200808044>.
- Yamamoto, Masamichi, Yukio Saijoh, Aitana Perea-Gomez, William Shawlot, Richard R. Behringer, Siew-Lan Ang, Hiroshi Hamada, et Chikara Meno. « Nodal Antagonists Regulate Formation of the Anteroposterior Axis of the Mouse Embryo ». *Nature* 428, n° 6981 (25 mars 2004): 387-92. <https://doi.org/10.1038/nature02418>.
- Yamanaka, Yojiro, Fredrik Lanner, et Janet Rossant. « FGF Signal-Dependent Segregation of Primitive Endoderm and Epiblast in the Mouse Blastocyst ». *Development (Cambridge, England)* 137, n° 5 (mars 2010): 715-24. <https://doi.org/10.1242/dev.043471>.
- Yang, Jian, Anouk L. van Oosten, Thorold W. Theunissen, Ge Guo, Jose C. R. Silva, et Austin Smith. « Stat3 Activation Is Limiting for Reprogramming to Ground State Pluripotency ». *Cell Stem Cell* 7, n° 3 (3 septembre 2010): 319-28. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.022>.
- Yang, Shen-Hsi, Munazah Andrabi, Rebecca Biss, Syed Murtuza Baker, Mudassar Iqbal, et Andrew D. Sharrocks. « ZIC3 Controls the Transition from Naive to Primed Pluripotency ». *Cell Reports* 27, n° 11 (11 juin 2019): 3215-3227.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.026>.
- Yang, Shen-Hsi, Tüzer Kalkan, Claire Morissroe, Hendrik Marks, Hendrik Stunnenberg, Austin Smith, et Andrew D. Sharrocks. « Otx2 and Oct4 Drive Early Enhancer Activation during Embryonic Stem Cell Transition from Naive Pluripotency ». *Cell Reports* 7, n° 6 (26 juin 2014): 1968-81. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.037>.
- Yang, Yang, Bei Liu, Jun Xu, Jinlin Wang, Jun Wu, Cheng Shi, Yaxing Xu, et al. « Derivation of Pluripotent Stem Cells with In Vivo Embryonic and Extraembryonic Potency ». *Cell* 169, n° 2 (6 avril 2017): 243-257.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.005>.
- Ye, Shoudong, Ping Li, Chang Tong, et Qi-Long Ying. « Embryonic Stem Cell Self-Renewal Pathways Converge on the Transcription Factor Tfcp2l1 ». *The EMBO Journal* 32, n° 19 (2 octobre 2013): 2548-60. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.175>.
- Ye, Shoudong, Dongming Zhang, Fei Cheng, Daniel Wilson, Jeffrey Mackay, Kan He, Qian Ban, et al. « Wnt/ β -Catenin and LIF-Stat3 Signaling Pathways Converge on Sp5 to Promote Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal ». *Journal of Cell Science* 129, n° 2 (15 janvier 2016): 269-76. <https://doi.org/10.1242/jcs.177675>.

- Yeo, Jia-Chi, Jianming Jiang, Zi-Ying Tan, Guo-Rong Yim, Jia-Hui Ng, Jonathan Göke, Petra Kraus, et al. « Klf2 Is an Essential Factor That Sustains Ground State Pluripotency ». *Cell Stem Cell* 14, n° 6 (5 juin 2014): 864-72. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.04.015>.
- Yeom, Y. I., G. Fuhrmann, C. E. Ovitt, A. Brehm, K. Ohbo, M. Gross, K. Hübner, et H. R. Schöler. « Germline Regulatory Element of Oct-4 Specific for the Totipotent Cycle of Embryonal Cells ». *Development (Cambridge, England)* 122, n° 3 (mars 1996): 881-94.
- Ying, Qi Long, Jennifer Nichols, Ian Chambers, et Austin Smith. « BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3 ». *Cell* 115, n° 3 (31 octobre 2003): 281-92. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00847-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00847-x).
- Ying, Qi-Long, Jason Wray, Jennifer Nichols, Laura Battle-Morera, Bradley Doble, James Woodgett, Philip Cohen, et Austin Smith. « The Ground State of Embryonic Stem Cell Self-Renewal ». *Nature* 453, n° 7194 (22 mai 2008): 519-23. <https://doi.org/10.1038/nature06968>.
- Yoshida, K., T. Taga, M. Saito, S. Suematsu, A. Kumanogoh, T. Tanaka, H. Fujiwara, et al. « Targeted Disruption of Gp130, a Common Signal Transducer for the Interleukin 6 Family of Cytokines, Leads to Myocardial and Hematological Disorders ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, n° 1 (9 janvier 1996): 407-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.407>.
- Yoshida, Michio, Eriko Kajikawa, Daisuke Kurokawa, Tomoyuki Tokunaga, Akira Onishi, Shigenobu Yonemura, Kensaku Kobayashi, Hiroshi Kiyonari, et Shinichi Aizawa. « Conserved and Divergent Expression Patterns of Markers of Axial Development in Eutherian Mammals ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 245, n° 1 (janvier 2016): 67-86. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24352>.
- Yoshinaga, K., et C. E. Adams. « Delayed Implantation in the Spayed, Progesterone Treated Adult Mouse ». *Journal of Reproduction and Fertility* 12, n° 3 (décembre 1966): 593-95. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0120593>.
- Yu, Bo, Helena T. A. van Tol, Tom A. E. Stout, et Bernard A. J. Roelen. « Initiation of X Chromosome Inactivation during Bovine Embryo Development ». *Cells* 9, n° 4 (19 avril 2020): E1016. <https://doi.org/10.3390/cells9041016>.
- Yu, Yongxin, Peng Deng, Bo Yu, John M. Szymanski, Tara Aghaloo, Christine Hong, et Cun-Yu Wang. « Inhibition of EZH2 Promotes Human Embryonic Stem Cell Differentiation into Mesoderm by Reducing H3K27me3 ». *Stem Cell Reports* 9, n° 3 (12 septembre 2017): 752-61. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.07.016>.
- Yuri, Shunsuke, Sayoko Fujimura, Keisuke Nimura, Naoki Takeda, Yayoi Toyooka, Yu-Ichi Fujimura, Hiroyuki Aburatani, et al. « Sall4 Is Essential for Stabilization, but Not for Pluripotency, of Embryonic Stem Cells by Repressing Aberrant Trophectoderm Gene Expression ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27, n° 4 (avril 2009): 796-805. <https://doi.org/10.1002/stem.14>.
- Zenker, Jennifer, Melanie D. White, Maxime Gasnier, Yanina D. Alvarez, Hui Yi Grace Lim, Stephanie Bissiere, Maté Biro, et Nicolas Plachta. « Expanding Actin Rings Zipper the Mouse Embryo for Blastocyst Formation ». *Cell* 173, n° 3 (19 avril 2018): 776-791.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.035>.
- Zernicka-Goetz, M. « Activation of Embryonic Genes during Preimplantation Rat Development ». *Molecular Reproduction and Development* 38, n° 1 (mai 1994): 30-35. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080380106>.
- Zhang, Hui, Srimonta Gayen, Jie Xiong, Bo Zhou, Avinash K. Shanmugam, Yuqing Sun, Hacer Karatas, et al. « MLL1 Inhibition Reprograms Epiblast Stem Cells to Naive Pluripotency ». *Cell Stem Cell* 18, n° 4 (7 avril 2016): 481-94. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.004>.
- Zhang, Jinqiu, Wai-Leong Tam, Guo Qing Tong, Qiang Wu, Hsiao-Yun Chan, Boon-Seng Soh, Yuefei Lou, et al. « Sall4 Modulates Embryonic Stem Cell Pluripotency and Early Embryonic

- Development by the Transcriptional Regulation of Pou5f1 ». *Nature Cell Biology* 8, n° 10 (octobre 2006): 1114-23. <https://doi.org/10.1038/ncb1481>.
- Zhang, Xiaofei, Juan Zhang, Tao Wang, Miguel A. Esteban, et Duanqing Pei. « Esrrb Activates Oct4 Transcription and Sustains Self-Renewal and Pluripotency in Embryonic Stem Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 283, n° 51 (19 décembre 2008): 35825-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803481200>.
- Zhao, Bo, Yi-Xian Cun, Xie-Chao He, et Ping Zheng. « Maternal-Effect Floped Gene Is Essential for the Derivation of Embryonic Stem Cells in Mice ». *Dong Wu Xue Yan Jiu = Zoological Research* 34, n° E3 (juin 2013): E82-86.
- Zhao, Panpan, Huanan Wang, Han Wang, Yanna Dang, Lei Luo, Shuang Li, Yan Shi, et al. « Essential Roles of HDAC1 and 2 in Lineage Development and Genome-Wide DNA Methylation during Mouse Preimplantation Development ». *Epigenetics* 15, n° 4 (avril 2020): 369-85. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1669375>.
- Zheng, Hui, Bo Huang, Bingjie Zhang, Yunlong Xiang, Zhenhai Du, Qianhua Xu, Yuanyuan Li, et al. « Resetting Epigenetic Memory by Reprogramming of Histone Modifications in Mammals ». *Molecular Cell* 63, n° 6 (15 septembre 2016): 1066-79. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.032>.
- Zhou, Fan, Rui Wang, Peng Yuan, Yixin Ren, Yunuo Mao, Rong Li, Ying Lian, et al. « Reconstituting the Transcriptome and DNA Methylome Landscapes of Human Implantation ». *Nature* 572, n° 7771 (août 2019): 660-64. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1500-0>.
- Zhou, Wenyu, Michael Choi, Daciana Margineantu, Lilyana Margaretha, Jennifer Hesson, Christopher Cavanaugh, C. Anthony Blau, et al. « HIF1 α Induced Switch from Bivalent to Exclusively Glycolytic Metabolism during ESC-to-EpiSC/HESC Transition ». *The EMBO Journal* 31, n° 9 (2 mai 2012): 2103-16. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.71>.
- Zhou, Xingliang, Jean Paul Chadarevian, Bryan Ruiz, et Qi-Long Ying. « Cytoplasmic and Nuclear TAZ Exert Distinct Functions in Regulating Primed Pluripotency ». *Stem Cell Reports* 9, n° 3 (12 septembre 2017): 732-41. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.07.019>.
- Ziomek, C. A., C. L. Chatot, et C. Manes. « Polarization of Blastomeres in the Cleaving Rabbit Embryo ». *The Journal of Experimental Zoology* 256, n° 1 (octobre 1990): 84-91. <https://doi.org/10.1002/jez.1402560111>.
- Zylicz, Jan J., Maud Borensztein, Frederick Ck Wong, Yun Huang, Caroline Lee, Sabine Dietmann, et M. Azim Surani. « G9a Regulates Temporal Preimplantation Developmental Program and Lineage Segregation in Blastocyst ». *ELife* 7 (10 mai 2018): e33361. <https://doi.org/10.7554/eLife.33361>.
- Zylicz, Jan J., Sabine Dietmann, Ufuk Günesdogan, Jamie A. Hackett, Delphine Cougot, Caroline Lee, et M. Azim Surani. « Chromatin Dynamics and the Role of G9a in Gene Regulation and Enhancer Silencing during Early Mouse Development ». *ELife* 4 (9 novembre 2015): e09571. <https://doi.org/10.7554/eLife.09571>.
- Żylicz, Jan Jakub, Aurélie Bousard, Kristina Žumer, Francois Dossin, Eusra Mohammad, Simão Teixeira da Rocha, Björn Schwalb, et al. « The Implication of Early Chromatin Changes in X Chromosome Inactivation ». *Cell* 176, n° 1-2 (10 janvier 2019): 182-197.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.041>.

Annexes

Article 2 : Tapponnier, Yann, Marielle Afanassieff, Irène Aksoy, Maxime Aubry, Anaïs Moulin, Lucas Medjani, **Wilhelm Bouchereau**, et al. « Reprogramming of Rabbit Induced Pluripotent Stem Cells toward Epiblast and Chimeric Competency Using Krüppel-like Factors ». *Stem Cell Research* 24 (octobre 2017): 106-17.

Article 3 : Afanassieff, Marielle, Florence Perold, **Wilhelm Bouchereau**, Antoine Cadiou, et Nathalie Beaujean. « Embryo-Derived and Induced Pluripotent Stem Cells: Towards Naive Pluripotency and Chimeric Competency in Rabbits ». *Experimental Cell Research* 389, no 2 (15 avril 2020): 111908.

Tableau 1 : Liste des séquences d’amorces utilisées pour l’analyse qPCR Biomark en cellule-unique d’embryon traités par des inhibiteurs épigénétiques.