



HAL
open science

Caractérisation de l'expression de facteurs potentiellement impliqués dans la spécification en épiblaste dans l'embryon de souris préimplantatoire

Victor Nowak

► To cite this version:

Victor Nowak. Caractérisation de l'expression de facteurs potentiellement impliqués dans la spécification en épiblaste dans l'embryon de souris préimplantatoire. Biologie du développement. Université Clermont Auvergne, 2023. Français. NNT : 2023UCFA0033 . tel-04599841

HAL Id: tel-04599841

<https://theses.hal.science/tel-04599841v1>

Submitted on 4 Jun 2024

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

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

Ecole Doctorale de Sciences de la Vie, Santé,
Agronomie et Environnement

**Caractérisation de l'expression de facteurs potentiellement
impliqués dans la spécification en épiblaste dans l'embryon de
souris préimplantatoire**

Victor Nowak

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne
Pour l'obtention du grade de
Docteur d'Université
(Décret du 5 Juillet 1984)

Spécialité : Biologie du développement
Soutenue le 31 Mai 2023

Président :

Dr Philippe ARNAUD, Directeur de recherche, Institut de Génétique, Reproduction et Développement

Rapporteurs :

Dr Nathalie BEAUJEAN, Directrice de recherche, Institut Cellules Souches et Cerveau

Dr Alice JOUNEAU, Chargée de recherche, Biologie de la Reproduction, Environnement Epigénétique et Développement

Dr. Michel COHEN-TANNOUDJI, Directeur de recherche, Institut Pasteur

Examineurs :

Dr Laurent DAVID, Maître de conférences des universités-praticien hospitalier, Centre de Recherche Translationnelle en Transplantation et Immunologie

Directrice de thèse :

Dr Claire CHAZAUD, Directrice de recherche, Institut de Génétique, Reproduction et Développement

Remerciements

Le 31 Mai de cette année 2023 se finiront mes 4 années et demi de thèse au sein de l'iGReD. Mais hélas 4 ans et demi ce fut un temps trop court à passer en compagnie de si excellents et si admirables Gredins et Gredines. Je ne connais pas la moitié d'entre vous autant que je le voudrais, mais j'aime moins la moitié d'entre vous à moitié moins que vous ne le méritez.

Mais dans un premier temps, je souhaite remercier les membres de mon jury de thèse. Merci à Nathalie Beaujean, Michel Cohen-Tannoudji et Laurent David pour avoir accepté mon invitation et merci d'avoir consacré de votre temps précieux à l'évaluation de mes travaux de thèse. Merci à Alice Jouneau, qui en plus d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, m'a aussi accompagné tout au long de ma thèse en faisant partie de mes différents comités de thèse. J'en profite alors pour remercier aussi Irène Aksoy qui faisait elle aussi partie de ces comités de thèse, et qui m'a en plus apporté une aide précieuse avec l'élaboration des cellules ES. Enfin je remercie Philippe Arnaud d'avoir accepté le rôle de Président du jury, mais aussi merci pour ton implication dans l'animation du GReD, un véritable exemple pour nous les GReDuates.

A tous, merci pour votre temps, merci pour les discussions passées et merci pour celles à venir.

Je ne remercierais jamais assez Claire pour m'avoir proposé de rejoindre l'équipe, déjà en tant que M2, mais surtout en tant que doctorant. Tout ce temps passé dans ton équipe aura été une expérience incroyable. Merci de ta confiance, merci de ton support, merci de tes conseils, merci de m'avoir transmis tes connaissances, ton expérience, merci de m'avoir fait grandir en tant que scientifique. J'ai toujours été impressionné par ta passion pour la science, par ta façon de réfléchir, par ton esprit critique. J'ai toujours pris énormément de plaisir à discuter résultats avec toi, que ce soit les miens ou non d'ailleurs. Merci de m'avoir encouragé, et merci pour m'avoir poussé quand il le fallait et quand j'en avais besoin.

Merci aux différents membres de l'équipe. Merci à Katia, merci à Pourria, merci à Christian, aka l'oiseau siffleur, dont le sifflement et la blagues résonnent toujours dans les couloirs et dans nos cœurs. Merci à Pierre pour toutes les fois où je suis venu t'embêter avec des questions de statistiques ou des histoires de quantif bien chiantes.

Merci aux deux autres Zozos aka maître Zozo et Zozo2 aka Boule et Bill aka beau.gosse@gred-clermont.fr et Le petit phoque de la montagne noire aka Nico et Ronan. Profitez-en, c'est une des rares fois où je vais m'exprimer. Je sais que je ne suis pas très causant, qu'il faut me tirer les vers du nez etc, mais bon, vous avez réussi à faire avec. Pis ça va, je me suis amélioré depuis. Merci pour toutes ces bières et tous ces rhums et toutes ces chichas et toutes ces verveines (vous m'avez pourris la santé avec vos conneries). Merci pour toutes ces soirées finies à danser sur Lonely Boy ou sur de la Tektonik, merci pour les randos, pour cette incroyable séjour à l'Oktoberfest et toutes ces Maß. Bon, je pourrai parler boulot aussi, avec Nico qui est la mémoire technique de l'équipe et Ronan qui était mon compagnon d'aventure durant cette thèse, mais ce n'est pas assez perso, donc ça vous intéresse pas. Plus sérieusement, vous avez un support indéfectible. Votre bonne humeur, votre humour, vos conseils, tout ça a

été essentiel pour moi dans la vie de tous les jours. Ces simples, plus que des collègues ou des amis, j'ai trouvé des frères. Pour finir ce paragraphe je citerai simplement The Black Keys chantant: "Your team is lookin' good, but not as good as ours"

Merci au Lieutenant Blanchard et au Commissaire MaiGReD aka le « Té » bleue et le « Biais » rose aka les Cop's aka Lisa et Marine. Merci pour les litrons de café bu, merci de m'avoir initié aux mots fléchés, merci pour toutes les soirées, GReDuates ou non (du coup je ne sais pas si je dois l'intégrer LUI dans les remerciements ?). Merci pour les tonnes de sushis/makis englouties au Mokoo, merci pour l'Urbex. Merci Marine de m'avoir expliqué tant de choses sur la gym ou sur l'équitation que je n'ai absolument pas retenu, merci Lisa pour toutes ces blagues et jeux de mot exceptionnelles, un véritable modèle pour moi. Par contre, je suis toujours dans l'attente d'une choucroute, donc pour ça je ne te remercie pas. Merci à vous deux de m'avoir accompagné comme vous l'avez fait tout au long de ma thèse.

Merci à tous les GReDuates, passés, présents de longues dates et présent depuis peu : Marianne pour cette irradiante joie de vivre, Bistan pour tes muscles saillants, Blandine et Elodie pour votre aide sur l'écriture, Laura, Mélusine, Fanny, Aline, Margot, Tony aka Vinc' de Nice aka Vincent, Sarah, Guerric et tes photos montages splendides, Fabiana, Erwan, et j'en oublie probablement, my bad la d'sus.

Merci à la Guillot Team, merci Charlène pour tes conseils en Lab Meeting. Merci Jonas pour ton humour, tes gossips, ton franc parlé et ton côté diva. Thank you Prikshit, wish you arrived sooner to spend more time with you. I wish you the best for the next of your thesis.

Merci aux services communs du GReD : merci Corinne Nadège et Eric à la laverie, merci au service administratif, et particulièrement à Maryse et MJ. Désolé de vous avoir rendu visite au 2 seulement quand il faisait beau et chaud. Et MJ, je suis sûr que ça va te manquer de ne plus m'entendre crier « HEY MJ » dès que tu passes dans le couloir. Merci à la plateforme CLIC et notamment Caro pour toutes les fois où je suis venu t'embêter pour le nombre incalculable de problèmes que j'ai eu avec le SPE et le SP8. Et merci à tout le GReD en général.

Bon, il n'y avait pas que le labo non plus pendant tout ce temps. Donc dans un ordre aléatoire :

Merci à mon Tom, mon barman préféré. Merci pour toutes ces bières découvertes, toutes ces soirées, ces discussions et pour l'OWL. Hâte de te retrouver à ton retour de Nouvelle Zélande. Merci Florian, notamment de m'avoir accueilli dans ton humble demeure lors de mon passage à Lyon, merci pour toutes ces citations de film de façon aléatoire et pour ces débats dont je ne me lasse jamais. Et au passage : Coucou. Merci Coco pour avoir toujours été à l'écoute quand j'en avais besoin, de toujours m'avoir soutenu. C'est fou ce que nos soirées jeudi Riverdale me manquent ! Merci à mon Lapin, aka le fils Laporte, aka Alexandre. Merci d'avoir partagé des soirées charrettes avec moi à distance. Merci Laura. Maintenant que j'ai fini, on va peut-être enfin réussir à se faire ce séjour à Besace City. Merci Clara pour les quelques squashes mais surtout ces Domacs entrecoupé de citations de la Cité de la Peur. Merci Kim (ou Océane, je sais jamais), merci Simon, Julien, Gaby, Isadora (Flore VI), ma Coloc de mon cœur (encore félicitations pour ton mariage).

Un incommensurable merci à The Lofi Girl pour m'avoir tenu compagnie pendant ces longues, très longues, sessions d'écriture, mais aussi toutes les fois où j'ai fini de bosser mes présentations la veille pour le lendemain à 3h du mat.

Merci Romane, merci pour tout. D'abord merci pour m'avoir rejoint en tant que consommateur de Twitch, je me sentais vraiment seul au labo ! Merci pour le ZEvent, pour les soirées du Lundi, les « Ouais Ouais Ouais ». Merci pour les animés, même si je n'en ai pas vu tant que ça dont tu m'as parlé, mais ça va se faire. Par contre, pas merci de n'avoir jamais continué Jojo's. Mais au-delà de tout ça, merci d'avoir été à mes côtés pendant ces derniers mois, on va dire compliqué, et de m'avoir soutenu comme tu l'as fait chaque jour. Merci infiniment.

Enfin pour finir, merci à ma famille. Vous n'en avez peut-être pas l'impression parce que je n'en parle jamais et que je le montre jamais mais sans vous tout cela n'aurait jamais été possible. Votre amour et votre soutien au jour le jour m'ont amené jusqu'ici et je n'aurai jamais réussi sans vous. Cette thèse n'est pas parfaite (pis toute façon vous allez rien comprendre), mais vous, vous l'êtes, et j'ai une chance unique de faire partie de cette famille. Donc j'ai envie de dire « À la vie ! »

Voilà, les remerciements sont terminés, maintenant vous pouvez fermer cette thèse et reprendre une activité normale. A ciao, bon dimanche.

Résumé

Après la fécondation, l'embryon de souris effectue deux phases de différenciation avant l'implantation. La première permet la formation de cellules externes qui donnent le Trophectoderme (TE) et de cellules internes qui donnent la Masse Cellulaire Interne (MCI). La deuxième se déroule dans la MCI produisant les cellules de l'Epiblaste (Epi) et l'Endoderme Primitif (EPr) disposées en « poivre et sel » au sein de la MCI. Des études récentes montrent que le facteur NANOG est nécessaire pour la spécification des cellules EPI, mais qu'il n'est pas suffisant, suggérant alors que d'autres facteurs sont impliqués dans l'initiation de cette différenciation.

Mon objectif a été d'identifier d'autres facteurs qui pourraient être impliqués, comme NANOG, dans l'initiation de cette spécification en Epi. Je me suis intéressé au gène *Fgf4*, connu comme étant un marqueur de l'Epi ainsi qu'un gène cible de NANOG, pour identifier *in silico* plusieurs facteurs potentiellement impliqués : TEAD4, SOX2, SOX21 et OCT4. L'étude de leurs expressions a mis en avant l'hétérogénéité de ces facteurs à différents stades, ainsi qu'une expression inversement corrélée entre SOX2 et SOX21 au cours du développement. Ces résultats, en plus d'une veille bibliographique, m'a fait émettre l'hypothèse que TEAD4 et SOX21 seraient des répresseurs alors que NANOG et SOX2 seraient des activateurs de l'expression de *Fgf4* et de la spécification en Epi. Il y aurait alors des mécanismes de compétition entre ces facteurs. Mais à ce jour, mes travaux sur l'étude de la surexpression de SOX21 dans l'embryon ne m'ont pas permis de valider cette hypothèse. En parallèle j'ai commencé à développer des cellules souches embryonnaires permettant une surexpression de SOX21 ou de TEAD4. Grâce à ces cellules, nous pourrions étudier les mécanismes de liaisons à l'ADN de ces facteurs et leur impact sur les gènes cibles, ainsi que la potentielle compétition entre eux.

Abstract

After fertilization the mouse embryo performs two rounds of differentiation before implantation. The first allows the formation of outer cells, which give the Trophectoderm (TE) and the inner cells, which give the Inner Cell Mass (ICM). The second step takes place within the ICM by producing the Epiblast (Epi) and the Primitive Endoderm (PrE) cells positioning in a “salt and pepper” pattern in the ICM. Recent studies show that NANOG is necessary for Epi specification, but not sufficient, suggesting that other factors may be involved in the initiation of this differentiation.

My goal was to identify other factors that could be involved, as NANOG, in the initiation of Epi specification. I focused on the *Fgf4* gene, which is a known Epi marker and a target gene of NANOG, to identify *in-silico* several potentially implicated factors: TEAD4, SOX2, SOX21 and OCT4. Analysis of their expressions highlighted the heterogeneity of those factors at different stages and an inverted correlation between SOX2 and SOX21 expressions during the development. Those results and data from literature made me hypothesize that TEAD4 and SOX21 would be repressors while NANOG and SOX2 would be activators of *Fgf4* expression and Epi specification. There would be then a competition between those factors. But nowadays, my work on the analysis of SOX21 overexpression in the embryo didn't allow me to validate this hypothesis. In parallel, I started to develop embryonic stem cells allowing an overexpression of SOX21 or TEAD4. Thanks to these cells, we will be able to study the DNA binding mechanisms of those factors and the impact on the target genes, and also the putative competition between them.

Tables des matières

Introduction	16
I. Développement pré-implantatoire de l'embryon murin.....	18
A. Du stade zygote au stade 16-cellules.....	20
1. La ZGA	20
2. La compaction	20
3. Polarisation et internalisation	22
4. Implication de la voie HIPPO et de la voie Notch	24
5. Prédétermination de la première différenciation	26
B. Du stade 16-cellules au blastocyste.....	30
1. Le blastocèle.....	30
2. Les mécanismes de la deuxième différenciation.....	30
3. Origines de la spécification en Epi.....	34
4. Mécanismes de la spécification en Epi	38
5. Après la deuxième différenciation	40
C. Modèle <i>In vitro</i> de l'épiblaste	42
1. Les cellules ES	44
II. Facteurs de transcription impliqués dans les premières différenciations cellulaires....	52
A. 1 ^{ère} Différenciation	52
1. TEAD4	52
2. SOX21.....	58
B. 2 ^{ème} différenciation	64
1. NANOG	64
2. SOX2.....	72
3. OCT4.....	82
Projet.....	94
Résultats	98
Autres résultats.....	132
I. Développement d'outils dans l'étude de la régulation des gènes épiblastiques par TEAD4 et SOX21	134
A. Tentative de mise au point d'un protocole d'électroporation sur embryons.....	134
B. Étude de la surexpression de TEAD4 et SOX21 dans les cellules ES.....	136
II. Induction d'une expression hétérogène avec le système rtTA/Doxycycline	142
Matériels et Méthodes additionnels.....	144

Discussion	148
I. TEAD4 est-il impliqué dans la régulation des gènes épiblastiques ?	150
II. La spécification de l'épiblaste est-elle stochastique ?.....	152
A. Les facteurs du site STONK sont-ils exprimés de manière hétérogène ?	152
B. Les expressions des facteurs du site STONK sont-elles corrélées entre elles ?.....	153
III. Rôle de SOX21 dans le développement précoce	155
IV. Conclusion.....	157
Bibliographie	158

Listes des figures

Figure 1: Développement de l'embryon préimplantatoire de souris (Adapté de Saiz & Hadjantonakis 2020)	17
Figure 2: Activation du génome zygotique (Adapté de Schultz & Harrison 2019).....	19
Figure 3: Internalisation des cellules par constriction apicale (Adapté de Samarage et al. 2015).....	21
Figure 4: Mécanismes de compaction des blastomères (Adapté de Chazaud & Yamanaka 2016).....	21
Figure 5 : Internalisation des cellules en fonction du fuseau mitotique (Adapté de Cockburn & Rossant 2010)	21
Figure 6: Rôle de la signalisation HIPPO dans la première différenciation (Adapté de Wicklow et al. 2014)	23
Figure 7: Impacte de la délétion des gènes <i>Tead4</i> ou <i>Cdx2</i> sur l'expression de SOX2 dans le blastocyste (Issu de Wicklow et al. 2014)	23
Figure 8: Rôle de la signalisation Notch dans la première différenciation (Issu de Rayon et al. 2014)	25
Figure 9: Impacte de la délétion des gènes <i>Nanog</i> ou <i>Gata6</i> dans le blastocyste.....	31
Figure 10: Expression coordonnée des marqueurs de l'Epi entre les stades 16 et 32-cellules (Adapté de Allègre et al. 2022).....	31
Figure 11: Modèle de différenciation de la MCI en Epi et EPr	33
Figure 12: Impacte de la délétion de <i>Nanog</i> et <i>Gata6</i> sur la deuxième différenciation (Adapté de Allègre et al. 2022)	37
Figure 13: Co-expression de <i>Nanog</i> et <i>Fgf4</i> en cellules uniques à différents stades du développement (Adapté de Allègre et al. 2022)	39
Figure 14: Effets des différents milieux de culture sur les cellules ES	43
Figure 15: Exemple d'une partie du réseau de gènes impliqués dans la pluripotence	47
Figure 16 : Impacte de la délétion du gène <i>Tead4</i> dans le blastocyste (Issu de Yagi et al. 2007).....	53
Figure 17: Modèle de l'altération de la localisation nucléaire de TEAD4 dans les cellules de la MCI.....	55
Figure 18: Altération de la localisation nucléaire de TEAD4 dans les cellules ES (Adapté de Home et al. 2012)	55
Figure 19: Impacte de l'inhibition de l'expression de SOX21 dans le blastocyste (Issu de Goolam et al. 2016).....	59
Figure 20: Effet de l'inhibition de SOX21 lors de la surexpression de SOX2 dans les cellules ES ou d'OSKM dans les iPSC (Issu de Kuzmichev et al. 2012)	59
Figure 21: Effet de la surexpression de SOX21 dans les cellules ES (Issu de Mallanna et al. 2010)	61

Figure 22: Impacte de la délétion de <i>Nanog</i> sur la formation du TE et la maturation de l'EPr (Adapté de Messerschmidt et al. 2010).....	63
Figure 23 : Expression hétérogène de NANOG dans les cellules ES	69
Figure 24: Expression allélique de <i>Nanog</i> dans les cellules ES et l'embryon (Adapté de Miyanari et al. 2012)	69
Figure 25: Mise en place de l'expression de SOX2 au cours du développement.....	73
Figure 26: Effet de la voie HIPPO sur la restriction de SOX2 dans le blastocyste.....	73
Figure 27: Impacte de la déplétion de <i>Sox2</i> dans les cellules ES (Adapté de Adachi et al. 2013).....	79
Figure 28: Effet de la délétion d'<i>Oct4</i> sur l'expression de NANOG et GATA6 dans le blastocyste (Adapté de Le Bin et al. 2014)	83
Figure 29 : Traitement d'embryons contrôles et <i>Oct4</i>^{-/-} avec du FGF4.....	85
Figure 30: Différence de pluripotence entre les cellules ES <i>Oct4</i>^{+/+} et <i>Oct4</i>^{+/-} (Adapté de Karwacki-Neisius et al. 2013).....	89
Figure 31: Surexpression de TEAD4 et SOX21 dans les cellules ES.....	135
Figure 32: Cinétique de la surexpression de SOX21 et TEAD4 dans les cellules ES.....	137
Figure 33: Etude de l'expression de l'ARNm de <i>rtTA</i>.....	141
Figure 34: Représentation schématique des plasmides utilisés pour la génération des lignées de cellule ES iTead4 et iSox21	145

Introduction

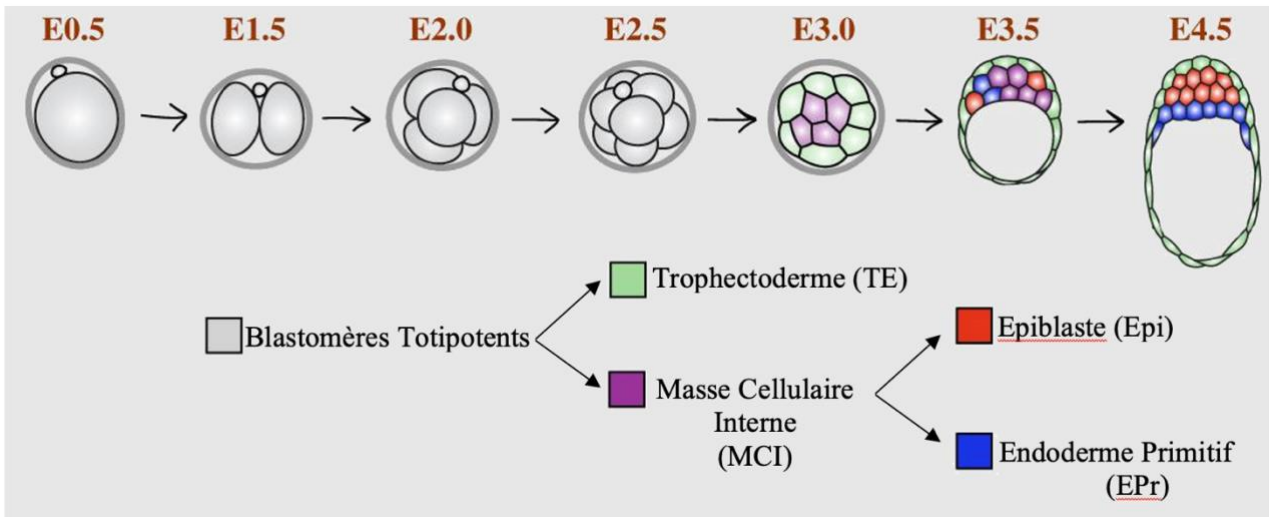


Figure 1: Développement de l'embryon préimplantatoire de souris (Adapté de Saiz & Hadjantonakis 2020)

I. Développement pré-implantatoire de l'embryon murin

La période de développement pré-implantatoire de l'embryon murin va de la fécondation au jour 0 (E0) jusqu'à l'implantation de l'embryon dans la corne utérine 4,5 jours plus tard (E4,5).

Au cours de cette période, l'embryon effectue trois vagues de divisions cellulaires, se développant ainsi du stade 1 cellule, ou zygote, au stade 8-cellules. Lors de la transition du stade 8-cellules au stade 16-cellules, l'embryon effectue une première différenciation cellulaire. Cette première différenciation donne deux types cellulaires : les cellules internes, qui forment la Masse Cellulaire Interne (MCI) et les cellules externes, qui vont alimenter en cellules la MCI pendant les deux vagues de divisions cellulaire suivantes, et deviendront plus tard le Trophectoderme (TE). Le développement se poursuit avec la formation d'une cavité et l'embryon effectue alors une deuxième différenciation qui se produit au sein de la MCI jusqu'au stade 90-cellules. Cette différenciation donne deux types de cellules, suivant un patron dit en poivre et sel : l'Epiblaste (Epi) et l'Endoderme Primitif (EPr) (**Figure 1**).

Juste avant l'implantation, l'embryon est composé de trois tissus distincts avec des devenir différents. Le TE participera entre autres à la formation du placenta. L'Epi formera le fœtus dans son ensemble, et participera également à l'élaboration des annexes extra-embryonnaires. Enfin, l'EPr, tissu extra-embryonnaire, formera une partie du sac vitellin.

Malgré sa simplicité apparente de par sa taille et le faible nombre de cellule, l'embryon présente un grand nombre de mécanismes complexes. On y retrouve des processus mécaniques comme la compaction, où les cellules augmentent leurs contacts inter-cellulaires, ou bien moléculaires tels que la spécification cellulaire, avec notamment la différenciation en Epi ou en EPr. Bien qu'étudiée depuis longtemps, encore beaucoup d'aspects de cette différenciation restent méconnus, notamment du point de vue de la différenciation de l'Epi.

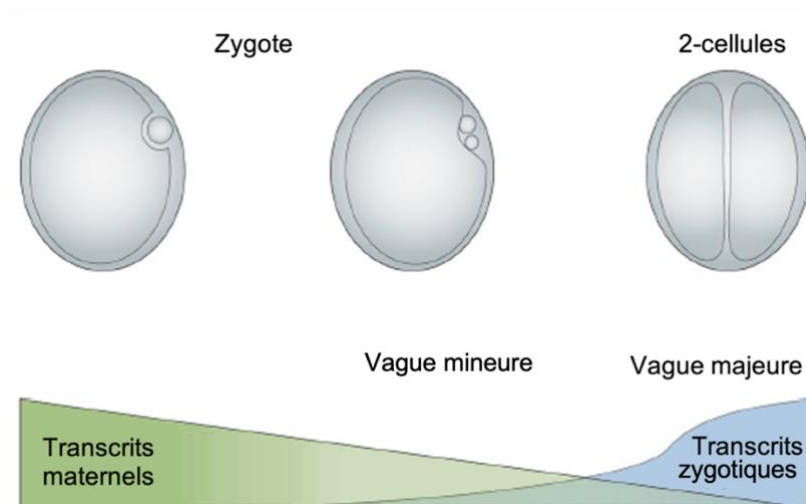


Figure 2: Activation du génome zygotique (Adapté de Schultz & Harrison 2019)
La quantité d'ARNm déposés maternellement diminue au cours du développement après la formation du zygote en même temps que l'embryon active la transcription de son génome.
La ZGA se fait en deux vagues, une mineure avant le stade 2-cellules, et une majeure au stade 2-cellules.

A. Du stade zygote au stade 16-cellules

Après la fécondation, l'embryon effectue trois vagues de divisions asynchrones, passant alors de 1-cellule à 2-cellules, 4-cellules et 8-cellules. C'est pendant cette période que l'embryon procède à l'activation du génome zygotique (ZGA) (Flach et al. 1982). Une fois au stade 8-cellules, l'embryon est composé de huit cellules sphériques, appelées blastomères. Ces blastomères sont dits totipotents car ils peuvent participer à la formation de n'importe quel type cellulaire de l'embryon (Kelly 1977). Il y a un mécanisme de compaction de l'embryon et s'engage alors la première différenciation qui donnera le TE et la MCI (Sasaki 2010).

1. La ZGA

Au début de son développement, l'embryon n'est pas transcriptionnellement actif. Il survit grâce aux ARN messagers (ARNm) et protéines déposés maternellement lors de la formation de l'ovocyte (Braude 1979). L'embryon procède ensuite à l'activation de son propre génome, ou ZGA. Cette ZGA se fait en deux vagues. Une vague dite mineure qui a lieu peu de temps avant le stade 2-cellules, où l'embryon commence à exprimer une centaine de gènes de son génome (Hamatani et al. 2004). Une deuxième vague dite majeure qui a lieu pendant le stade 2-cellules, et majoritairement au stade 2-cellules tardif, où l'embryon active l'expression de plusieurs milliers de ses propres gènes (**Figure 2**) (Xue et al. 2013). Mais les mécanismes à l'origine de cette ZGA restent encore très peu connus. Cependant, de manière intéressante, la ZGA pourrait se faire de manière hétérogène entre les blastomères. En effet, de manière concomitante à la mise en place de la ZGA, on observe l'apparition d'une hétérogénéité transcriptomique entre les blastomères au stade 2-cellules (Piras, Tomita, et Selvarajoo 2014).

2. La compaction

La compaction est la première étape de la différenciation en TE et MCI. Pendant ce processus, les blastomères qui étaient alors sphériques augmentent leurs contacts inter-cellulaires et réduisent leur surface de contact avec le milieu environnant. L'augmentation

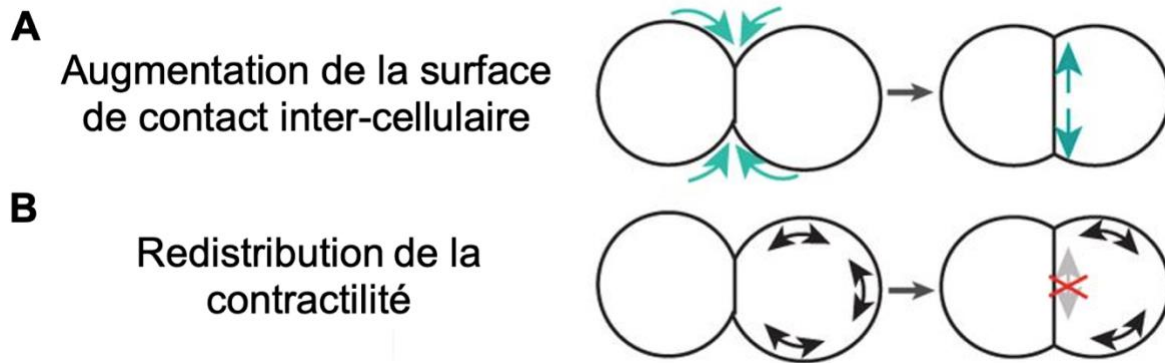


Figure 3: Mécanismes de compaction des blastomères (Adapté de Chazaud & Yamanaka 2016)
(A) Augmentation des contacts inter-cellulaires entre les blastomères (flèches vertes).
(B) Redirection des forces de contraction (flèches noires) au niveau du domaine apical suite à l'augmentation des contacts inter-cellulaires (flèches grises).

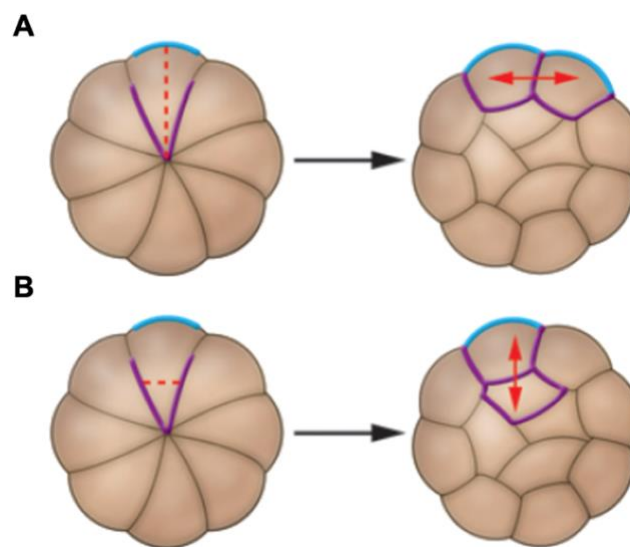


Figure 4 : Internalisation des cellules en fonction du fuseau mitotique (Adapté de Cockburn & Rossant 2010)
 Représentation d'une division symétrique **(A)** ou asymétrique **(B)** d'un blastomère au stade 8-cellules.

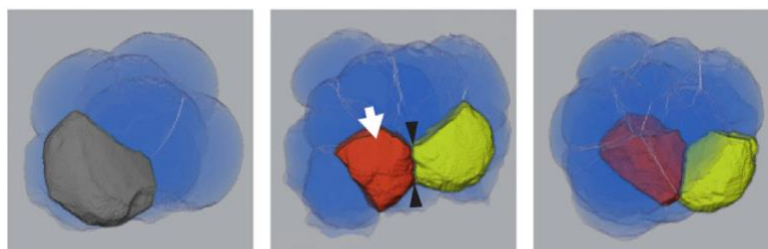


Figure 5: Internalisation des cellules par constriction apicale (Adapté de Samarage et al. 2015)
 Après une division symétrique, une des cellules filles (cellule rouge) peut être internalisée par des constriction apicales (flèche blanche).

des contacts inter-cellulaires est dépendante de la molécule d'adhésion E-cadhérine (Cdh1) (**Figure 3A**) (Shirayoshi, Okada, et Takeichi 1983). En plus de cette augmentation des contacts cellulaires, il y a aussi une augmentation de la contractilité qui est dépendante du cortex d'actomyosine (Maître et al. 2015). Du fait de la présence de l'E-cadhérine, les tensions corticales sont redirigées au domaine apical, ce qui a pour conséquence d'aplatir la membrane en contact avec l'environnement et donc de faciliter la compaction (**Figure 3B**) (Maître et al. 2015). De manière concomitante, les blastomères se polarisent. Une réorganisation des protéines à la membrane permet la formation d'une région polaire au domaine apical des cellules, composée entre autres des protéines Ezrin, aPKC (atypical Protein Kinase C) et PARD6 (Par-6 family cell polarity regulator alpha) (Louvet et al. 1996; Pauken et Capco 2000; Vinot et al. 2005).

3. Polarisation et internalisation

La mise en place de cette polarisation a un impact direct sur la suite du développement. En effet, en fonction de l'axe du fuseau mitotique, deux résultats peuvent être obtenus. Si le fuseau est parallèle à l'axe apico-basal, alors les deux cellules filles sont des cellules externes, héritant chacune d'une partie du domaine apical. Cette division est dite symétrique (**Figure 4A**). Si le fuseau est perpendiculaire à l'axe apico-basal, alors une des cellules filles est apolaire et est internalisée tandis que l'autre, qui aura hérité du domaine apical, reste à la surface et devient une cellule externe. Cette division est dite asymétrique (**Figure 4B**) (Johnson et McConnell 2004). La cellule fille apolaire, en plus d'être internalisée lors de la division, présente une différence de contractilité suite à la distribution asymétrique du domaine apical, ce qui lui permet de rester activement au sein de l'embryon (Anani et al. 2014).

Cependant il arrive aussi qu'une cellule externe soit internalisée après une division symétrique. C'est alors une différence de force de contraction au niveau apical entre cette cellule et les cellules voisines qui engendre l'internalisation (**Figure 5**) (Samarage et al. 2015).

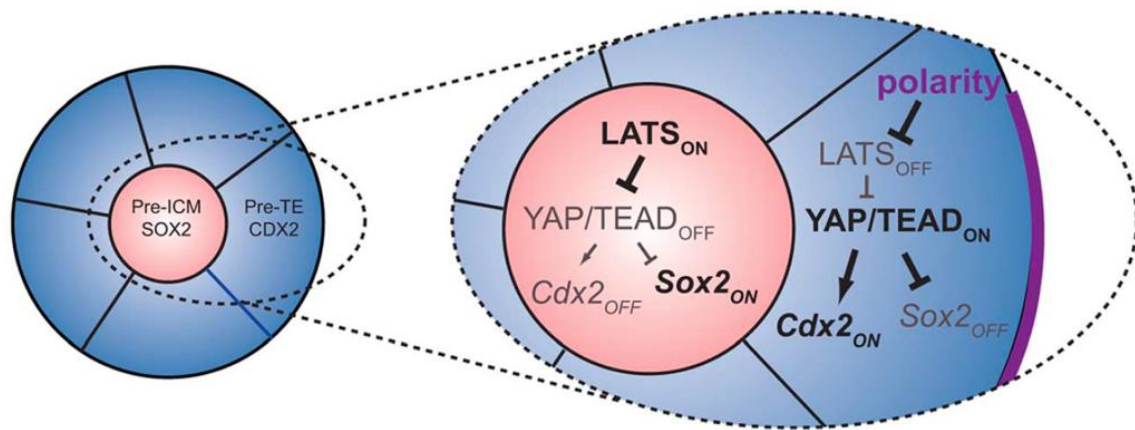


Figure 6: Rôle de la signalisation HIPPO dans la première différenciation (Adapté de Wicklow et al. 2014)

Dans les cellules externes la voie HIPPO est inactivée. La polarité inhibe la protéine LATS qui ne peut donc pas phosphoryler YAP. YAP transloque alors dans le noyau pour activer la transcription des gènes du TE avec TEAD4 et inhiber des gènes de la MCI comme SOX2. A l'inverse dans les cellules internes, la voie HIPPO est activée. YAP est alors phosphorylé par LATS. Il ne peut pas transloquer dans le noyau et donc il n'y a pas d'activation des gènes du TE ni d'inhibition des gènes de la MCI.

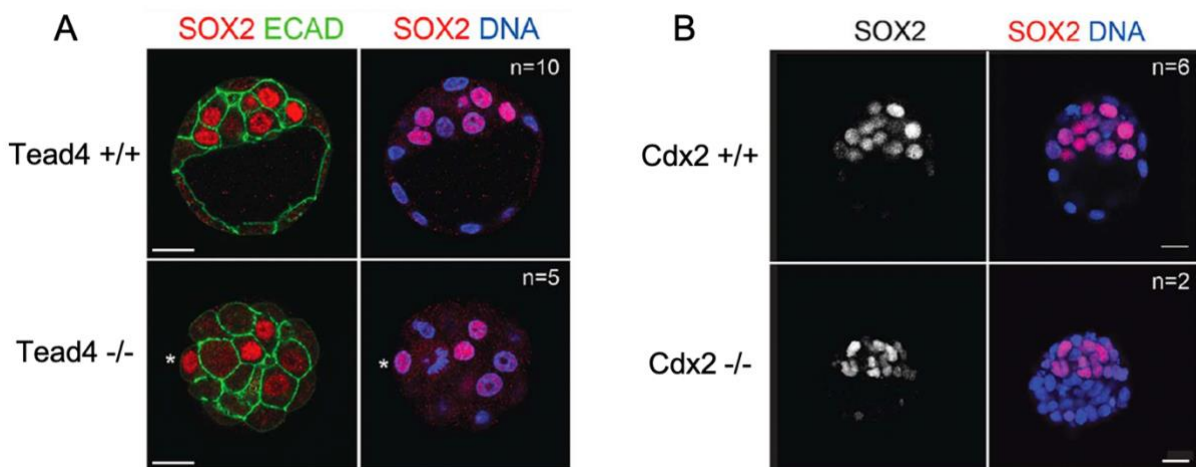


Figure 7: Impacte de la délétion des gènes *Tead4* ou *Cdx2* sur l'expression de SOX2 dans le blastocyste (Issu de Wicklow et al. 2014)

Immunomarquage de SOX2 dans des embryons *Tead4*^{+/+} et *Tead4*^{-/-} (A) ou *Cdx2*^{+/+} et *Cdx2*^{-/-} (B) au stade 64-cellules. L'expression ectopique de SOX2 est indiquée par des astérisques. L'E-cadhérine marque les membranes. n = nombre d'embryon, bar = 20 µm.

4. Implication de la voie HIPPO et de la voie Notch

Après ce processus d'internalisation, la cellule acquiert son identité de cellule de la MCI ou du TE en fonction de sa position. C'est la voie HIPPO qui a un rôle déterminant dans cette différenciation. Elle est régulée par les contacts inter-cellulaires et par la polarité (Anani et al. 2014; Cockburn et al. 2013; Hirate et al. 2015). Dans les cellules externes, qui n'ont des contacts cellulaires qu'en baso-latéral et un domaine apical, la voie HIPPO est inactive. De ce fait, le co-activateur YAP (Yes-Associated Protein) n'est pas phosphorylé par la protéine LATS (Large Tumor Suppressor). YAP peut alors transloquer dans le noyau, et, avec l'aide du facteur de transcription TEAD4 (TEA Domain family member 4), activer l'expression de gènes spécifiques au TE comme *Cdx2* (Caudal type homeobox 2) ou *Gata3* (GATA binding protein 3) (Nishioka et al. 2009; Ralston et al. 2010). En plus d'activer des gènes spécifiques au TE, YAP/TEAD4 inhibe l'expression de gènes tels que *Sox2* (**Figure 6**) (Wicklow et al. 2014). Dans des embryons mutants pour *Tead4*, SOX2 est exprimé de manière ectopique dans les cellules externes, c'est-à-dire que SOX2 n'est pas restreint à la MCI (**Figure 7A**). Cependant les embryons mutants pour *Cdx2* ne montrent pas d'expression ectopique de SOX2 (**Figure 7B**) (Wicklow et al. 2014). Cette inhibition ne se fait donc pas par l'intermédiaire de CDX2.

A l'inverse dans les cellules internes, qui sont totalement entourées par d'autres cellules et qui sont apolaires, la voie HIPPO est active. Ainsi, la protéine LATS phosphoryle YAP qui ne peut plus transloquer dans le noyau et est alors dégradé (**Figure 6**). Il n'y a alors pas la formation du complexe YAP/TEAD4 et donc pas d'expression de CDX2 et GATA3 ni d'inhibition de SOX2 (Nishioka et al. 2009; Wicklow et al. 2014). De façon intéressante, la voie HIPPO n'est pas la seule voie impliquée dans cette différenciation. L'utilisation d'un enhancer de *Cdx2* spécifique au TE a permis de mettre en évidence que TEAD4 n'est pas le seul à se fixer et à réguler l'expression de *Cdx2*. La découverte sur cet enhancer d'un site de fixation pour RBPJK (Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J

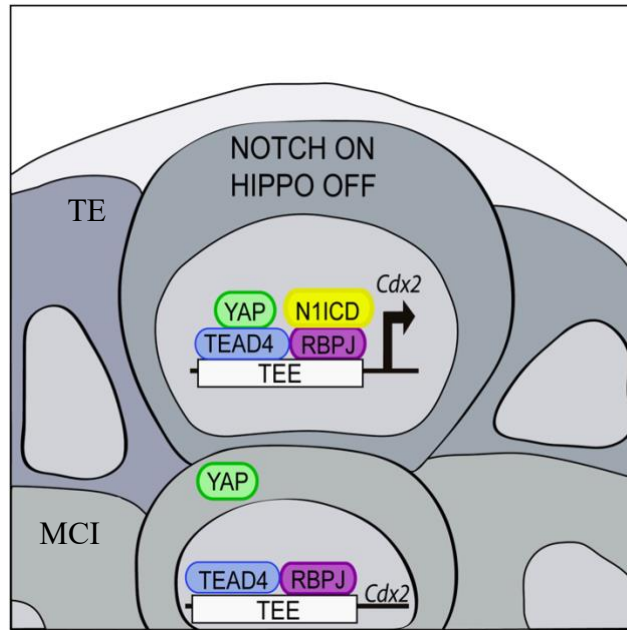


Figure 8: Rôle de la signalisation Notch dans la première différenciation (Issu de Rayon et al. 2014)

Dans les cellules externes la voie Notch est active. N1ICD active l'effecteur transcriptionnel de la voie, RPBJK. RPBJK, en parallèle de YAP/TEAD4, active la transcription des gènes du TE comme *Cdx2*. A l'inverse dans les cellules internes, la voie Notch est inactive. RPBJK n'est alors pas activé par N1ICD.

region), l'effecteur transcriptionnel de la voie Notch, ainsi que l'inactivation de ce gène dans des embryons ont montré alors l'implication de la voie Notch dans cette différenciation (Rayon et al. 2014). Ainsi, dans les cellules externes, la voie Notch est active, ce qui a pour conséquence l'activation de RBPJK par l'intermédiaire de N1ICD (NOTCH1 intracellular domain). RBPJK se fixe alors en coopération avec TEAD4 sur l'enhancer de CDX2 pour activer son expression (**Figure 8**) (Rayon et al. 2014).

5. Prédétermination de la première différenciation

Bien qu'il ait été montré le rôle majeur de la voie HIPPO ainsi que la voie Notch lors de la différenciation entre TE et MCI, d'autres études présentent un autre aspect de cette différenciation. Des données de single cell RNAseq ont montré qu'il existe de l'hétérogénéité entre les blastomères, que ce soit au stade 4-cellules ou au stade 8-cellules (Piras et al. 2014; Shi et al. 2015). En plus du transcriptome, certains marqueurs sont eux aussi retrouvés hétérogènes, comme par exemple des facteurs de transcription, comme SOX21 ou bien des facteurs épigénétiques ainsi que leurs marques, comme CARM1 (Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1) et H3R26me (Goolam et al. 2016; Torres-Padilla et al. 2007). De plus, il a été montré qu'il y a des différences de cinétiques de liaison à l'ADN de certains facteurs entre les blastomères. En effet, selon le blastomère, un même facteur se lie plus ou moins longtemps à l'ADN comme c'est notamment le cas pour les facteurs OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) et SOX2 (Plachta et al. 2011; White et al. 2016).

Le point commun de toutes ces études sur l'hétérogénéité entre les blastomères, que ce soit à 2-cellules (Piotrowska-Nitsche et al. 2005), 4-cellules ou 8-cellules, est qu'elles montrent une implication de cette hétérogénéité dans la différenciation entre TE et MCI. Il a été montré par lignage cellulaire que les blastomères avec une plus forte quantité de H3R26me participent plus souvent à la MCI (Torres-Padilla et al. 2007), de même que ceux qui expriment moins de SOX21 tendent à donner plus souvent du TE (Goolam et al. 2016) et que ceux qui ont un

temps plus long de liaison du dimère OCT4-SOX2 sur l'ADN se différencient préférentiellement en cellules de la MCI (White et al. 2016).

Cependant, il est intéressant de noter que, même si certaines études ont été menées avant qu'il ait été montré l'implication de la voie HIPPO, elles ne font pas de lien entre l'hétérogénéité observée et les mécanismes qui conduisent à la première différenciation, comme la compaction ou l'internalisation. Il serait pourtant intéressant de comprendre comment une différence de cinétique d'OCT4-SOX2 pourrait impacter la signalisation HIPPO, comment les marques épigénétiques pourraient avoir un rôle dans la contractilité des blastomères, ou bien comment les niveaux de SOX21 pourraient réguler la polarisation. Mais des études récentes commencent à relier certains processus. Par exemple, il a été montré que les facteurs de transcription TEAD4 et TFAP2C (Transcription Factor AP-2, gamma) sont nécessaires dans la mise en place de la polarité, notamment en induisant l'expression de régulateurs de l'actine (Zhu et al. 2020).

B. Du stade 16-cellules au blastocyste

Une fois le stade 16-cellules atteint, l'embryon composé alors de deux types cellulaires, TE et MCI, continue son développement. La MCI est alimentée en cellules par deux, voire trois cycles de divisions asymétriques venant des cellules externes (Fleming 1987; Morris et al. 2010; Pedersen, Wu, et BaŁakier 1986). De plus une cavité remplie de liquide se forme. De manière concomitante, les cellules de la MCI engagent leur différenciation entre cellules de l'EPI et de l'EPr. A la fin de cette période, l'embryon, appelé alors blastocyste, est composé d'une cavité et de trois types cellulaires : TE, Epi et EPr.

1. Le blastocèle

Au stade 32-cellules, la symétrie radiale de l'embryon est cassée par la formation d'une cavité appelée blastocèle, qui sépare une partie du TE de la MCI. Il a été montré qu'initialement plusieurs micro cavités se forment un peu partout dans l'embryon, mais que subséquemment, toutes disparaissent, sauf une, qui est toujours localisée entre des cellules de la MCI et du TE. Cette localisation spécifique est due à des différences de contractilité, mais il se pourrait aussi que des différences d'adhésion inter-cellulaires médiées par l'E-cadhérine aient un rôle dans ce positionnement (Dumortier et al. 2019). Les cellules de la MCI sont alors regroupées à un pôle de l'embryon et il y a la formation d'un nouvel axe, l'axe embryonnaire-abembryonnaire.

2. Les mécanismes de la deuxième différenciation

De manière concomitante à la formation de la cavité, il se produit la deuxième différenciation au sein de la MCI. Elle est médiée par deux facteurs de transcription clés, NANOG et GATA6 (GATA binding protein 6), qui seront respectivement à l'origine de la formation de l'Epi et de l'EPr. Initialement ces deux facteurs sont exprimés au stade 8-cellules et ils sont coexprimés dans tous les blastomères (Dietrich et Hiiragi 2007; Plusa et al. 2008).

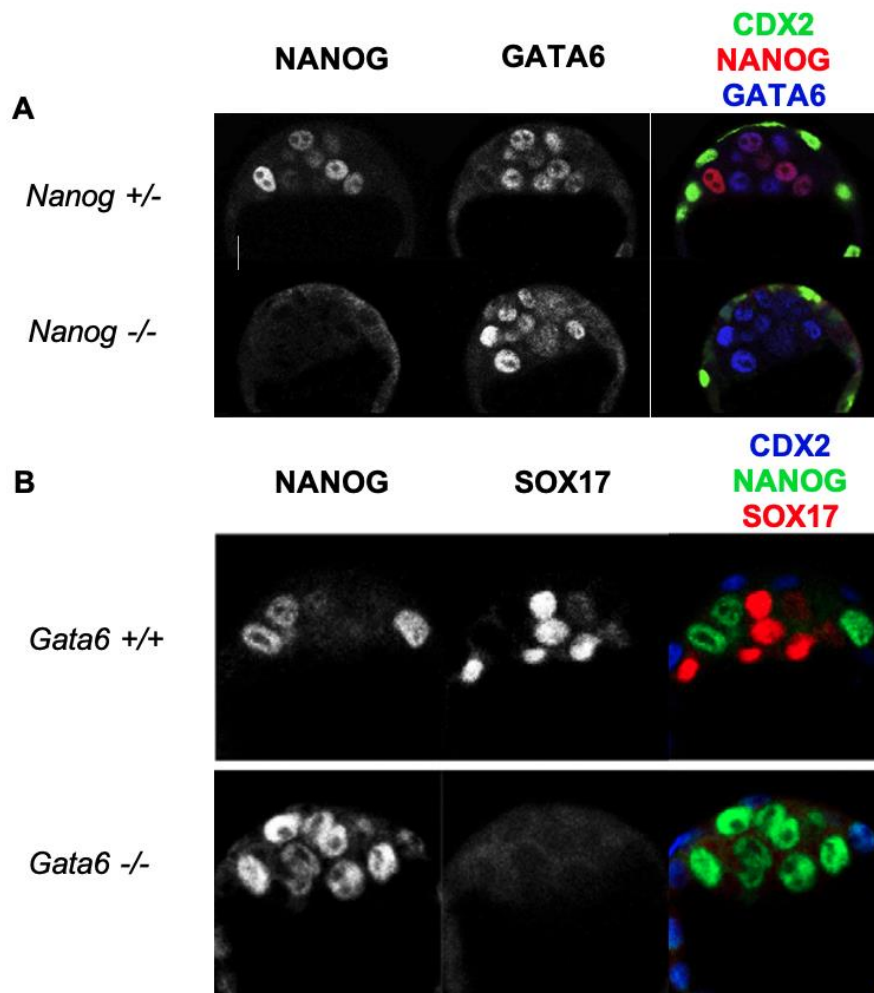


Figure 9: Impacte de la délétion des gènes *Nanog* ou *Gata6* dans le blastocyste

(A) Immunomarquage des protéines NANOG, GATA6 et CDX2 dans des embryons *Nanog*^{+/+} ou *Nanog*^{-/-} à 90-cellules (Adapté de Frankenberg et al. 2011). (B) Immunomarquage des protéines NANOG, SOX17, qui est un marqueur de l'EPr, et CDX2 dans des embryons *Gata6*^{+/+} ou *Gata6*^{-/-} à 90-cellules (Adapté de Bessonard et al. 2014).

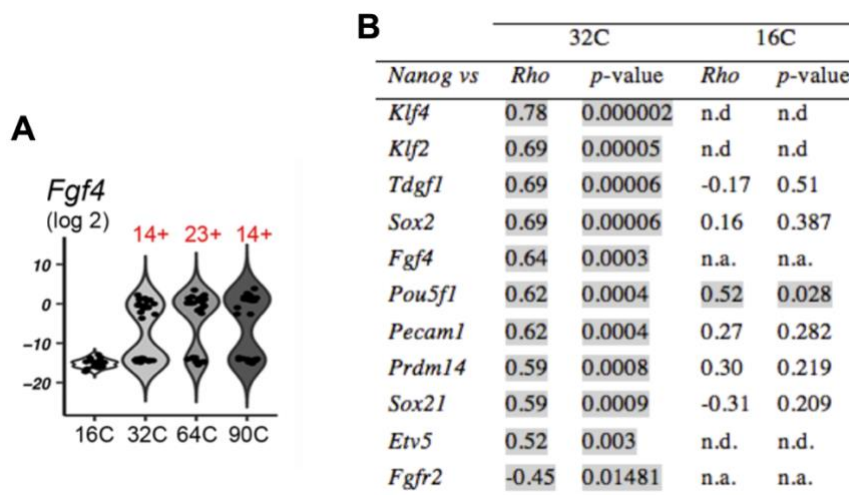


Figure 10: Expression coordonnée des marqueurs de l'Epi entre les stades 16 et 32-cellules (Adapté de Allègre et al. 2022)

(A) Violin plot de l'expression de *Fgf4* dans des cellules uniques de MCI à différent stade. Les valeurs indiquées en rouge représentent les cellules exprimant *Fgf4* à chaque stade. (B) Corrélation de Spearman entre l'expression de *Nanog* et l'expression de gènes Epi à 16 et 32-cellules. n.d : non déterminé. n.a : non analysé

Entre les stades 16 et 32-cellules, il y a une différenciation asynchrone entre les cellules de l'Epi et les cellules de l'EPr, jusqu'au stade 90-cellules où l'on retrouve deux populations bien distinctes, suivant un patron dit en poivre et sel. Les facteurs de transcription NANOG et GATA6 sont alors restreints à un type cellulaire : NANOG est exprimé exclusivement dans les cellules de l'Epi et GATA6 exclusivement dans les cellules de l'EPr. En plus de cette expression exclusive, des expériences d'inactivation génique ont montré le rôle clé de ces deux facteurs dans leur lignage respectif. Dans les embryons mutants pour *Nanog*, les cellules de la MCI au stade blastocyste sont uniquement des cellules exprimant GATA6, donc de l'EPr (**Figure 9A**) (Frankenberg et al. 2011). A l'inverse dans les embryons mutants pour *Gata6*, les cellules de la MCI expriment uniquement NANOG, ce sont donc des cellules de l'Epi (**Figure 9B**) (Bessonard et al. 2014).

Des modèles mathématiques et des expériences dans l'embryon ont montré que les cellules de l'Epi sont les premières à se différencier (Bessonard et al. 2014; Tosenberger et al. 2017). Une fois différenciées, les cellules de l'Epi expriment et sécrètent un facteur de croissance, le FGF4 (Fibroblast Growth Factor 4) (Frankenberg et al. 2011). FGF4 n'est pas exprimé au stade 16-cellules mais l'est au stade 32-cellules (**Figure 10A**) (Allègre et al. 2022). Il a aussi été montré aussi que plusieurs gènes épiblastiques sont exprimés à ce stade-là, et qu'en plus, leurs expressions sont corrélées entre elles et avec l'expression de *Fgf4* (Allègre et al. 2022). La corrélation de l'expression des gènes et l'expression de *Fgf4* donnent leur identité épiblastique à ces cellules. Certains de ces gènes épiblastiques sont déjà exprimés au stade 16-cellules mais ne présentent pas d'expressions corrélées entre elles (**Figure 10B**) (Allègre et al. 2022). Ceci indique une absence d'identité épiblastique, et donc que la spécification de cellules de la MCI en cellules Epi se fait entre les stades 16 et 32-cellules.

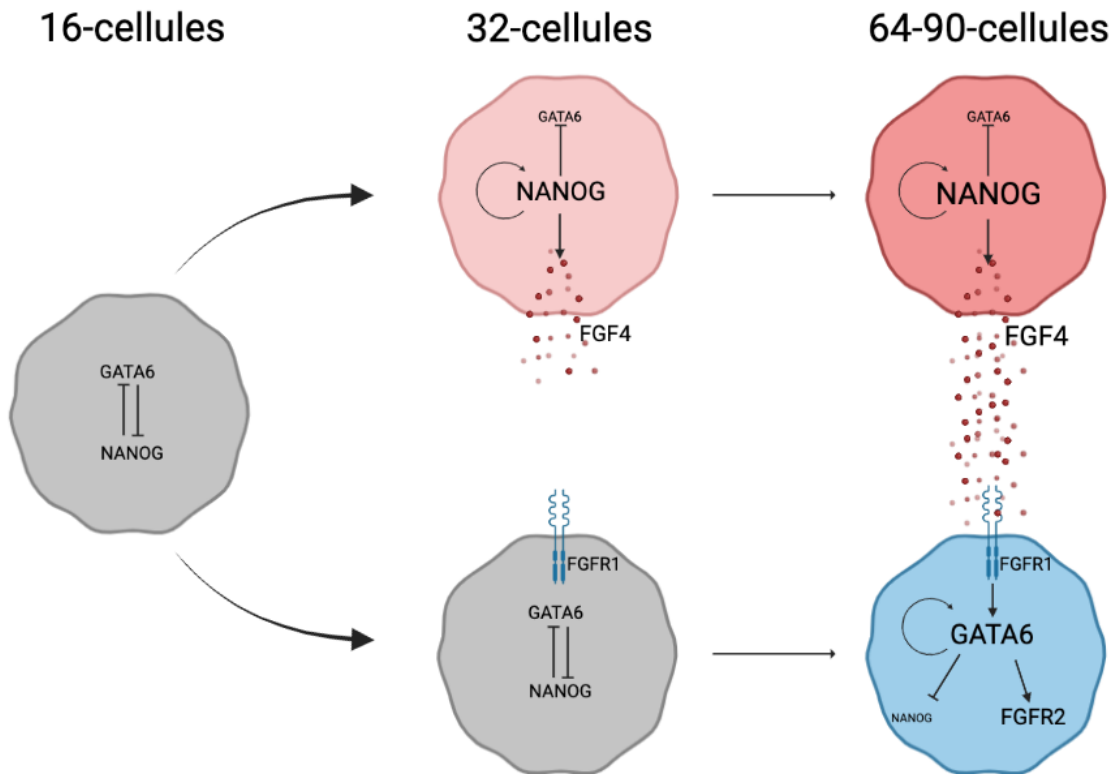


Figure 11: Modèle de différenciation de la MCI en Epi et EPr

Les cellules précurseuses (cellule grise) ont la possibilité de devenir soit des cellules Epi (cellule rouge) soit de l'EPr (cellule bleue). Les cellules Epi se différencient en premier. Une fois différenciées, les cellules Epi répriment l'expression de GATA6 et expriment et sécrètent FGF4. FGF4 agit sur les cellules adjacentes encore indifférenciées. Par le récepteur FGFR1, FGF4 induit alors la différenciation de ces cellules en EPr.

Une fois l'Epi différencié et le FGF4 sécrété, celui-ci agit sur les cellules adjacentes via ses récepteurs. Deux récepteurs au FGF, les FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor), sont exprimés dans l'embryon, FGFR1 et FGFR2. FGFR1 est exprimé de manière homogène entre les cellules de la MCI alors que FGFR2 est exprimé majoritairement dans les cellules de l'EPr. Mais c'est FGFR1 qui a un rôle prédominant pour la spécification en EPr, alors que FGFR2 a un rôle dans le renforcement de cette spécification (**Figure 11**) (Kang, Garg, et Hadjantonakis 2017; Molotkov et al. 2017). Il a été montré que le FGF4 est nécessaire à l'induction de la spécification en EPr. Si la signalisation FGF4 est bloquée, que ce soit par des inhibiteurs de la voie ou par des mutations sur des acteurs de cette voie, les cellules de la MCI se différencient alors toutes en Epi (Chazaud et al. 2006; Kang et al. 2013, 2017; Molotkov et al. 2017; Nichols et al. 2009; Yamanaka, Lanner, et Rossant 2010). Et à l'opposé, si des embryons sont traités avec du FGF4 recombinant, alors ces embryons présentent une MCI composée uniquement de cellules de l'EPr (Yamanaka et al. 2010).

3. Origines de la spécification en Epi

Certains processus de différenciation, comme par exemple dans le lignage hématopoïétique (Kimmel 2014), se font de manière stochastique, c'est-à-dire que le destin de la cellule dépend de la variation transcriptionnelle aléatoire d'un ou de plusieurs facteurs. Des variations aléatoires de la transcription entraîneraient une expression préférentielle de NANOG dans une ou plusieurs cellules. Cette différence serait ensuite amplifiée par un réseau de régulation entre NANOG, GATA6 et FGF4. Cependant des modèles mathématiques montrent que la variation des niveaux de NANOG et GATA6 seuls de manière stochastique ne suffit pas à reproduire ce qui est observé *in vivo* (De Mot et al. 2016). Par conséquent, soit les bruits de fond transcriptionnels de NANOG et de GATA6 ne sont pas impliqués dans l'initiation de la spécification en Epi, soit d'autres facteurs sont à prendre en compte dans ce modèle. De plus,

il reste toujours à comprendre d'où provient cette variation aléatoire de la transcription.

Une autre hypothèse est que la spécification est liée au passé de la cellule. Par exemple entre les stades 8 et 32-cellules, la MCI est alimentée en cellule par deux vagues successives de divisions asymétriques. Il a alors été proposé que la spécification était en lien avec le fait que la cellule venait de la première ou de la deuxième vague de division. Des expériences de traçage cellulaire dans l'embryon ont montré que les cellules issues de la première vague participent en plus grande proportion à l'Epi, alors que des cellules issues de la deuxième division deviennent majoritairement de l'EPr (Morris et al. 2010). L'idée est alors que les cellules issues de la première division hériteraient de facteurs non présents dans les cellules de la deuxième vague, ou inversement, ce qui crée une différence entre les cellules de la première division et celles de la deuxième. Néanmoins, d'autres expériences de traçage cellulaire ne montrent aucune relation entre la vague d'origine de la cellule et sa participation en Epi ou EPr (Yamanaka et al. 2010). De plus, des expériences d'agrégations de cellules issues de la première vague de division ou de la seconde ne montrent pas de lien entre l'origine des cellules et leur devenir en tant que cellules Epi ou EPr (Krupa et al. 2014). Les auteurs supposent que les résultats observés par Morris et al. 2010 sont dus à un nombre faible de cellules internalisées durant la première vague de divisions asymétriques. Le faible nombre de cellules présentes ne suffit pas à atteindre des niveaux d'expression de FGF4 suffisant pour initier la spécification en EPr. Ainsi, les cellules issues de la première vague deviennent majoritairement des cellules Epi.

Une autre façon dont le passé de la cellule peut impacter son devenir, c'est si certains facteurs sont exprimés de manière hétérogène au cours des stades précédent. Il existe parfois une hétérogénéité entre les blastomères au stade 4 ou 8-cellules, comme par exemple pour SOX21 (Goolam et al. 2016). Cette hétérogénéité peut être conservée lors de la formation de la MCI créant alors une différence entre les cellules de la MCI, ce qui leur permet, ou non, de s'engager en cellule Epi.

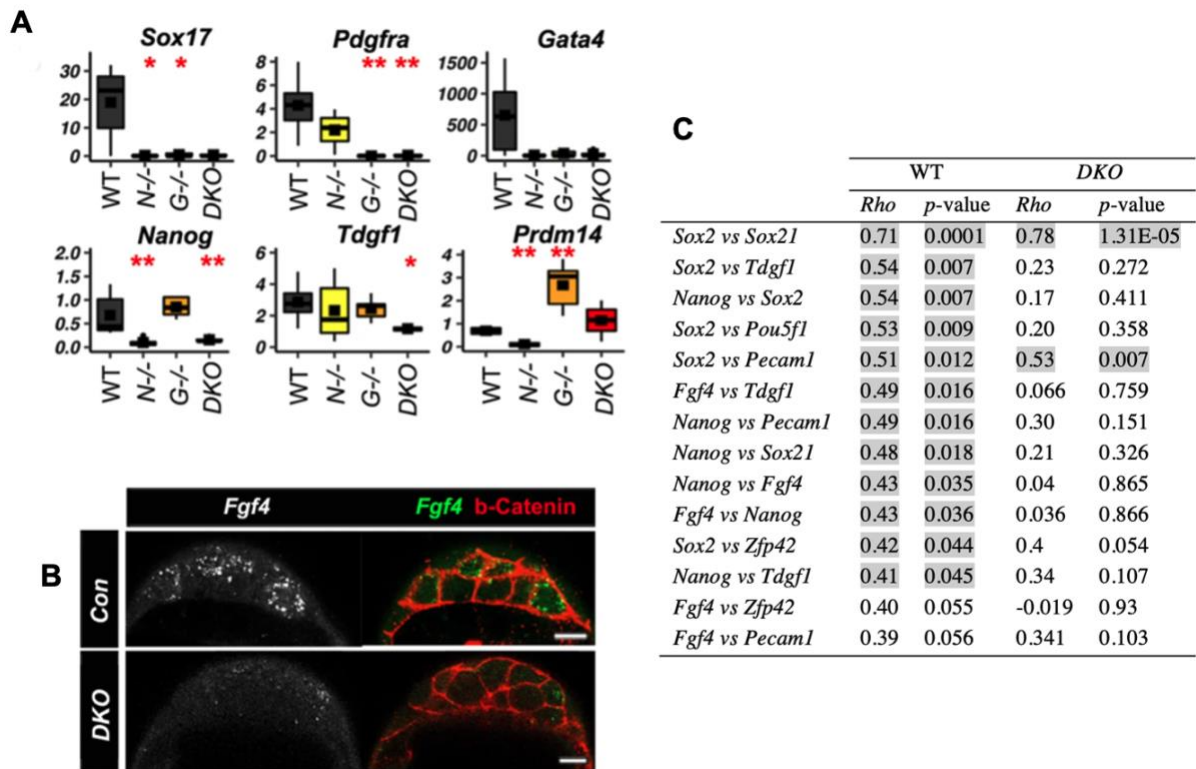


Figure 12: Impacte de la délétion de *Nanog* et *Gata6* sur la deuxième différenciation (Adapté de Allègre et al. 2022)

(A) Niveau d'expression d'ARNm de marqueurs de l'EPI ou de l'EPr dans des embryons sauvages (WT), mutants pour *Nanog* ($N^{-/-}$), mutants pour *Gata6* ($G^{-/-}$) ou doubles mutants (DKO) au stade 90-cellules. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (B) HCR-RNA-FISH pour *Fgf4* et immunomarkage de la β -Catenin dans des embryons sauvages ou DKO au stade 90-cellules. Bar = 10 μ m (C) Corrélation de Spearman de l'expression de marqueurs de l'Epi dans des embryons sauvages ou DKO.

En plus de ces deux hypothèses, une autre possibilité serait que le mécanisme de l'induction épiblastique soit un mécanisme passif. Plutôt qu'un mécanisme actif d'activation, ce serait alors la levée d'une répression qui permettrait à la cellule de se différencier. Il y a notamment l'exemple de *Klf5* (Krüppel Like Factor 5) qui lorsqu'il est délété, induit une forte augmentation de l'expression de FGF4 dans l'embryon au stade 32-cellules (Azami et al. 2017). Dans cette hypothèse, la présence de KLF5 au stade 16-cellules empêcherait une expression précoce de FGF4, et lors du passage au stade 32-cellules il y aurait une levée de cette répression par KLF5, ce qui laisserait à la cellule la possibilité de se spécifier en Epi.

4. Mécanismes de la spécification en Epi

Nanog est le gène clé pour la spécification en Epi, puisque sans lui les cellules de la MCI ne se différencient pas en Epi (Frankenberg et al. 2011). Cependant l'étude de son rôle dans l'initiation de celle-ci est rendue difficile à cause du facteur GATA6. En effet lorsque *Nanog* est muté, la présence de GATA6 force alors les cellules de la MCI à se spécifier en EPr et apporte donc un biais (**Figure 9A**). Ainsi, l'absence d'Epi, serait peut-être due à la présence de *Gata6* et non à l'absence de *Nanog* (Allègre et al. 2022). Dans les embryons DKO, mutants *Nanog* et *Gata6*, au stade 90-cellules, les cellules de la MCI ne présentent pas de marqueurs d'EPr et aussi certains marqueurs d'Epi ne sont pas présent, ce qui indique que ces cellules ne se différencient ni en Epi, ni en EPr, et qu'elles restent au stade précurseur (**Figure 12A**) (Allègre et al. 2022). Notamment il a été montré qu'au stade 90-cellules, il y a une forte réduction de l'expression de *Fgf4* dans les embryons DKO (**Figure 12B**). De plus, les gènes Epi qui ont normalement leurs expressions corrélées entre elles à ce stade, n'ont plus leurs expressions corrélées dans les embryons DKO, comme au stade 16-cellules (**Figure 12C**). Dans ces embryons il y a donc bien une absence de l'identité épiblastique (Allègre et al. 2022). Ces données montrent alors que NANOG est nécessaire pour l'initiation de la spécification en Epi.

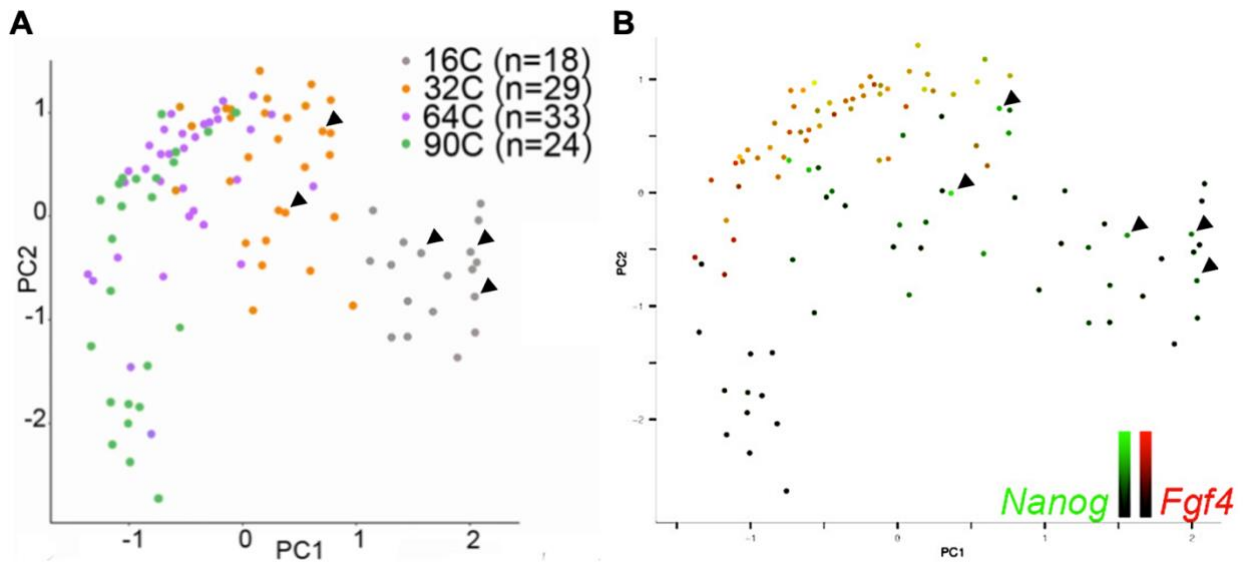


Figure 13: Co-expression de *Nanog* et *Fgf4* en cellules uniques à différents stades du développement (Adapté de Allègre et al. 2022)

(A) PCA de données de RT-qPCR sur cellules uniques issues de MCI d'embryons à différents stades. Les stades sont représentés par les différentes couleurs. (B) Même PCA qu'en (A) avec un gradient de couleur pour les niveaux d'expression de *Nanog* et *Fgf4*. Les flèches indiquent des cellules où *Nanog* est exprimé mais pas *Fgf4*.

Cependant, NANOG ne semble pas suffisant pour cette initiation. En effet, au stade 16-cellules, malgré les niveaux d'expression de NANOG, il n'y pas d'expression de *Fgf4*. De même au stade 32-cellules où certaines cellules expriment NANOG sans exprimer *Fgf4* (**Figure 13**) (Allègre et al. 2022). La seule présence de NANOG n'est donc pas suffisante pour initier l'expression de *Fgf4* et donc la spécification en Epi. D'autres facteurs seraient alors impliqués dans ce processus, que ce soit des partenaires de NANOG ou bien des facteurs répresseurs.

5. Après la deuxième différenciation

Une fois la seconde différenciation finie et que l'Epi est l'EPr sont tous les deux formés, la MCI se trie. Les cellules non différenciées sont éliminées par un processus impliquant entre autres le complexe YAP/TEAD1 (Hashimoto et Sasaki 2019) et de manière simultanée, les cellules de l'Epi et de l'EPr se trient. Les cellules de l'Epi sont internalisées au cœur de la MCI alors que les cellules de l'EPr forment un épithélium qui sépare l'Epi de la cavité. Les mécanismes de ce tri restent encore très peu connus, mais des études récentes montrent l'importance de la variation de la fluidité des membranes cellulaire dans la MCI (Yanagida et al. 2022). Cependant, les mécanismes impliqués dans ces différences de propriété membranaire restent inconnus.

C. Modèle *In vitro* de l'épiblaste

Bien que l'embryon soit très étudié pour un grand nombre d'aspects, beaucoup de mécanismes restent encore incompris, et il en incombe au modèle lui-même. Le faible nombre de cellules pour chaque tissu, et donc la faible quantité de matériel, fait qu'il est parfois très compliqué d'étudier des mécanismes très précis. Pour aider alors à mieux comprendre comment se déroule certains processus dans l'embryon, d'autres modèles issus de l'embryon ont été mis en place. Ainsi, on peut utiliser des cellules souches trophoblastiques (TS) ou des cellules souches de l'endoderme (XEN) si l'on veut étudier les dérivés du TE ou l'EPr respectivement. Il existe aussi différents types de cellules souches qui présentent des caractéristiques communes à l'Epi, les cellules Souches Embryonnaires (ES), les Cellules Souches Épiblastiques (EpiSC) ou encore les Cellules Souches Pluripotentes induites (iPSC). Les cellules ES et les EpiSC sont toutes issues de l'Epi d'embryons aux stades E4,5 et E6,5-E8,0 respectivement. Les iPSC sont issues de la reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes (Takahashi et Yamanaka 2006)

Les cellules ES, les EpiSC et iPS sont notamment définies par deux critères : leur pluripotence et leur nature de cellules souches. La pluripotence est la capacité à former les trois feuilletts embryonnaires à l'origine de n'importe quel tissu de l'individu : l'ectoderme, le mésoderme, l'endoderme ainsi que les cellules germinales. En tant que cellules souches, ces cellules ont la capacité de s'auto-renouveler, c'est à dire de se multiplier à l'infini tout en gardant leur état indifférencié.

Cependant même si ces cellules peuvent aider à comprendre beaucoup de mécanismes dans ces tissus, ce ne sont pas les mêmes cellules que dans l'embryon, *in vivo*. Malgré de fortes similitudes elles présentent aussi des différences qu'il faut prendre en compte lors des expériences.

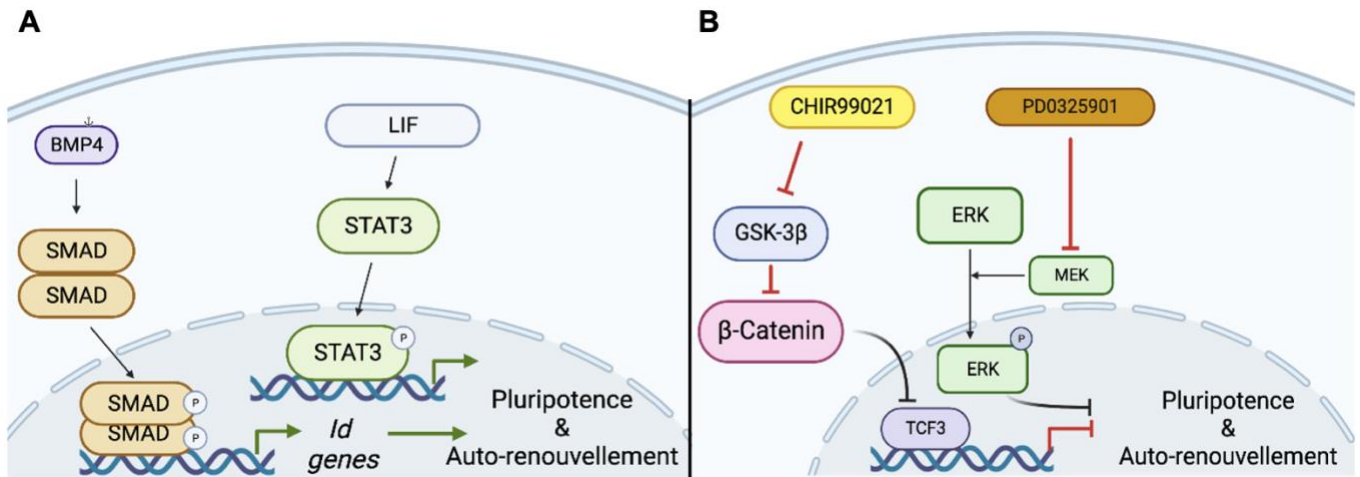


Figure 14: Effets des différents milieux de culture sur les cellules ES

(A) Le LIF active la signalisation médiée par STAT3. Une fois phosphorylé, celui-ci active la transcription de gène de pluripotence. En parallèle, BMP4 active la voie des SMAD qui à leur tour activent la transcription des gènes *Id* qui régulent positivement les gènes de pluripotence.

(B) Le CHIR99021 est un inhibiteur de GSK3β qui inhibe la β-Catenin. Une fois libérée, la β-Catenin transloque dans le noyau pour lever l'inhibition de TCF3 sur les gènes de pluripotence. En parallèle, PD0325901 inhibe MEK qui active ERK en le phosphorylant. Sans p-ERK il n'y a alors pas d'inhibition de la pluripotence. CHIR99021 et PD0325901 forment ensemble le cocktail « 2i ».

1. Les cellules ES

La propriété principale des cellules ES est leur capacité à former des individus chimères lorsque ces cellules sont implantées dans un embryon pré-implantatoire. C'est ce qui est appelé une pluripotence dite « naïve ». Elles ont initialement été isolées de MCI de blastocystes mises en culture sur des fibroblastes embryonnaires et dans du milieu avec du sérum (Evans et Kaufman 1981; Martin 1981). Mais de nos jours, les fibroblastes sont remplacés par la supplémentation du milieu avec du LIF (Leukemia Inhibitory Factor) qui permet de maintenir les cellules ES indifférenciées (Smith et al. 1988; Stewart et al. 1992). De plus, le LIF permet aussi l'isolation des cellules ES depuis les embryons sans fibroblastes (Nichols, Evans, et Smith 1990). L'activation conditionnelle de STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), un acteur de la voie JAK/STAT, permet un maintien des cellules ES même en l'absence de LIF (Matsuda et al. 1999). A l'inverse, l'inhibition de la voie bloque l'action du LIF et alors les cellules ES se différencient (**Figure 13A**) (Niwa et al. 1998). Ainsi, le rôle du LIF se fait par l'intermédiaire de la voie JAK/STAT. Dans les embryons mutants pour les récepteurs du LIF, il n'y a pas de défauts de développement de l'Epi, ce qui indique que la voie LIF n'est pas requise *in vivo* pour le maintien des cellules pluripotentes (Li, Sendtner, et Smith 1995; Yoshida et al. 1996).

De la même façon que le LIF permet de remplacer les fibroblastes, le sérum peut lui aussi être remplacé par du BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) (Ying et al. 2003). De plus, des expériences avec SMAD 6 et 7 qui sont des inhibiteurs des autres protéines SMAD, ainsi qu'une activation constitutive de gènes cibles de la signalisation BMP, les gènes *Id* (*Inhibitor of DNA binding, HLH protein*) ont montré que l'action du BMP4 se fait par l'intermédiaire de ces différents acteurs (**Figure 14A**) (Ying et al. 2003).

En plus des signalisations LIF/STAT3 et BMP/SMAD/Id, d'autres signalisations ont aussi été montrées comme impliquées dans le maintien des cellules ES. L'activation de la voie

WNT et l'inhibition de MAPK/p-ERK permettent chacune un maintien de la pluripotence (Kunath et al. 2007; Sato et al. 2004; Stavridis et al. 2007; Wray et al. 2011). Ainsi, la combinaison d'inhibiteurs, le CHIR99021 et le PD184352, appelée le cocktail « 2i », permet d'activer la voie WNT et d'inhiber la voie MAPK/p-ERK en même temps. Le cocktail « 2i » est suffisant pour maintenir les cellules ES en culture, même sans LIF et sans sérum ou BMP4 (**Figure 14B**) (Ying et al. 2008). De plus, le cocktail « 2i », seul ou couplé avec le LIF, permet un meilleur maintien de la pluripotence (Marks et al. 2012).

Il est possible de dériver des cellules uniques issues de MCI d'embryons au stade E4,5 (Boroviak et al. 2014). Ainsi, il semblerait que la capacité à donner des cellules pluripotentes soit meilleure avec les cellules Epi au stade E4,5. En effet les cellules ES et Epi au stade E4,5 montrent un profil d'expression de gènes très similaire (Boroviak et al. 2014, 2015).

Parmi ces gènes en commun, certains sont caractérisés par leur importance dans le maintien de l'auto-renouvellement et de l'état indifférencié, ils sont alors appelés gènes de pluripotence. Le facteur de transcription OCT4 est l'un des gènes indispensables dans la pluripotence des cellules ES. Sa délétion dans les cellules ES conduit à une perte de l'auto-renouvellement ainsi qu'à la différenciation des cellules (Niwa, Miyazaki, et Smith 2000).

L'autre facteur indispensable dans la pluripotence des cellules ES est le facteur de transcription SOX2. Sa délétion dans les cellules ES induit le même phénotype que les cellules ES délétees pour OCT4 (Masui et al. 2007). De plus, SOX2 et OCT4 sont des partenaires, c'est-à-dire qu'ils se dimérisent pour se lier ensemble sur l'ADN et réguler la transcription des gènes cibles (Ambrosetti et al. 2000; van den Berg et al. 2010). Enfin, et bien qu'il ne soit pas strictement nécessaire, le facteur NANOG permet lui aussi de promouvoir un état de pluripotence (Chambers et al. 2003; Mitsui et al. 2003). De plus NANOG cooccupe la plupart des sites de fixation du dimère OCT4-SOX2 dans les cellules ES.

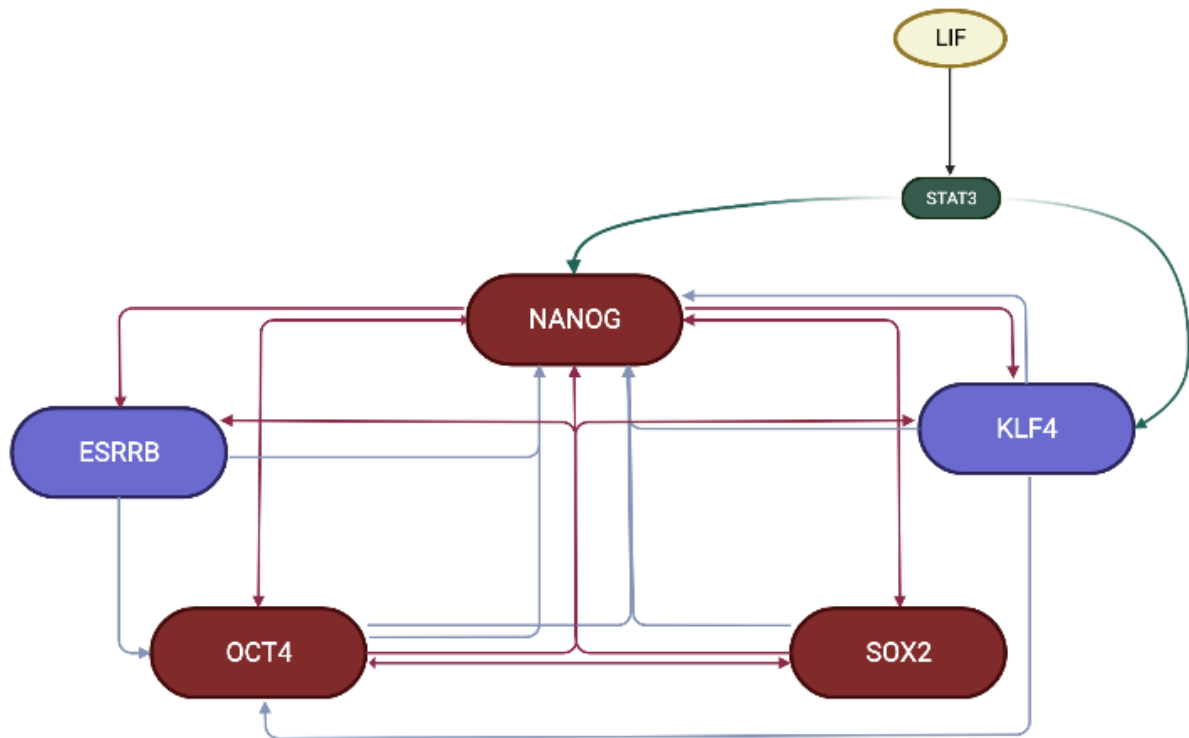


Figure 15: Exemple d'une partie du réseau de gènes impliqués dans la pluripotence

Le noyau de pluripotence constitué de NANOG, OCT4 et SOX2 s'autorégule, mais régule aussi l'expression d'autres facteurs du réseau, comme ESRRB et KLF4. Ces facteurs, seuls ou en coopération avec d'autres facteurs, régulent à leur tour les autres membres du réseau. Il y a aussi l'implication des voies de signalisation, comme par exemple avec la voie LIF/STAT3 qui agit sur les facteurs NANOG et KLF4.

NANOG, OCT4 et SOX2 forment à eux trois le noyau principal qui régule la pluripotence dans les cellules ES (Chen et al. 2008; Kim et al. 2008).

Le réseau des facteurs impliqués dans le maintien de la pluripotence est un réseau très étendu et complexe. On peut noter un premier niveau de complexité avec les trois facteurs NANOG, OCT4 et SOX2. Ces facteurs se régulent les uns les autres pour maintenir la pluripotence (**Figure 15**) (Boyer et al. 2005; Kuroda et al. 2005; Loh et al. 2006; Masui et al. 2007; Rodda et al. 2005). Ensuite, il y a un deuxième niveau de complexité. Chacun de ces trois facteurs régule et est régulé par d'autres gènes de la pluripotence, créant alors un vaste réseau de facteurs interagissant les uns avec les autres, comme par exemple le facteur ESRRB (Estrogen Related Receptor, Beta) qui est impliqué dans la pluripotence, et notamment l'auto-renouvellement (Ivanova et al. 2006). Il a été montré que ESRRB interagit avec NANOG, OCT4 mais aussi SOX2 (van den Berg et al. 2010; Hutchins et al. 2013; Zhang et al. 2008). En plus de se lier avec ces facteurs, ESRRB est aussi impliqué dans la régulation de leur expression, comme par exemple OCT4 ou NANOG (**Figure 15**) (van den Berg et al. 2008; Zhang et al. 2008). Enfin, on peut ajouter un troisième niveau de complexité. Ces facteurs interagissent entre eux mais peuvent aussi être impactés par des voies de signalisation impliquées dans le maintien de la pluripotence. Par exemple, il a été montré que le facteur de transcription KLF4 (Krüppel Like Factor 4) est en aval de la signalisation LIF/STAT3, et qu'il régule positivement l'expression de SOX2 (Niwa et al. 2009). De plus, KLF4 peut se fixer sur les gènes codant pour NANOG et OCT4, et peut également former un complexe avec OCT4 et SOX2 pour promouvoir la pluripotence (Jiang et al. 2008; Wei et al. 2009). Enfin, *Klf4* est lui-même régulé, entre autres, par le complexe ESRRB-SOX2 (**Figure 15**) (Hutchins et al. 2013).

Ce réseau de pluripotence, et notamment l'impact de ces facteurs de transcription, est tellement important, que certains de ces facteurs peuvent à eux seuls induire la pluripotence dans une cellule différenciée. La surexpression d'OCT4, SOX2, KLF4 ainsi qu'un autre facteur

de transcription, c-MYC (Myelocytomatosis oncogene), suffit à elle seule à reprogrammer des fibroblastes en cellules pluripotentes (Takahashi et Yamanaka 2006). Une fois reprogrammées, ces cellules présentent un profil très similaire aux cellules ES. Elles expriment les gènes de pluripotence, et leur transcriptome est identique aux cellules ES (Stadtfield et al. 2010). De plus les iPSC sont elles aussi des cellules pluripotentes naïves car elles ont aussi la capacité de former des individus à part entière lorsqu'elles sont intégrées dans un blastocyste (Boland et al. 2009; Kang et al. 2009; Zhao et al. 2009).

II. Facteurs de transcription impliqués dans les premières différenciations cellulaires

A plusieurs étapes du développement les cellules opèrent un choix dans leur devenir au sein de l'embryon. Lors des deux premières différenciations, elles se spécifient soit en cellules du TE soit de la MCI, puis ensuite, au sein de cette MCI, soit en Epi soit en EPr. Bien que les facteurs de transcription ne soient pas les seuls acteurs impliqués, ils jouent un rôle majeur lors de ces étapes de différenciation. Ces facteurs forment souvent un réseau dans lequel ils se régulent les uns les autres afin de promouvoir et de maintenir la nouvelle identité de la cellule. Il est rare qu'un facteur fonctionne seul dans la régulation de la spécification, cependant certains présentent un rôle prépondérant durant ces processus.

A. 1^{ère} Différenciation

La différenciation des cellules du TE est principalement médiée par la voie Notch et la voie HIPPO avec le facteur de transcription en aval, TEAD4. Lorsque la voie HIPPO est inactive, TEAD4 induit la transcription des gènes spécifiques du TE, dont les facteurs de transcription CDX2 et GATA3 (Ralston et al. 2010; Yagi et al. 2007). Ils sont les trois facteurs clé de la différenciation en TE. Cependant, d'autres facteurs pourraient être impliqués dans la différenciation entre TE et MCI, comme par exemple SOX21 (Goolam et al. 2016; Kuzmichev et al. 2012).

1. TEAD4

TEAD4 est un des facteurs de transcription clé de la spécification du TE. Son ARNm est détecté dès le stade 2 ou 4-cellules selon les études. La protéine commence à être exprimée au stade 4-cellules et est exprimée au stade 8-cellules dans tous les blastomères. Lors de la formation du blastocyste, TEAD4 est restreint dans les cellules du TE et son expression diminue dans les cellules de la MCI (Home et al. 2012; Nishioka et al. 2008; Yagi et al. 2007).

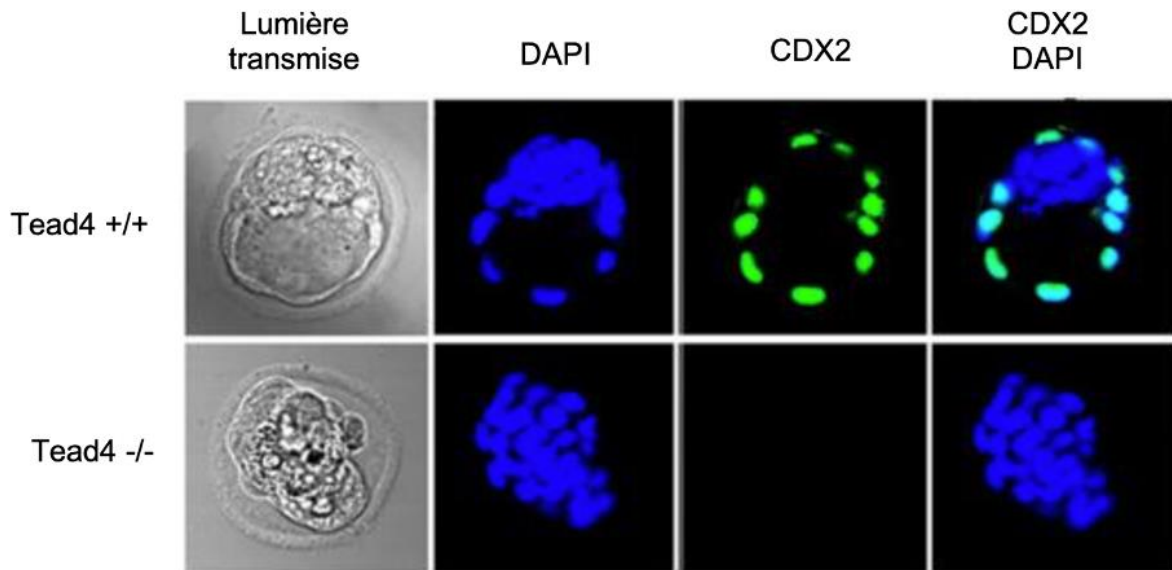


Figure 16 : Impacte de la délétion du gène *Tead4* dans le blastocyste (Issu de Yagi et al. 2007)

Immunomarquage de CDX2 dans des embryons *Tead4*^{+/+} ou *Tead4*^{-/-} au stade 64-cellules. Le DAPI marque l'ADN.

Les embryons mutants pour *Tead4* présentent un défaut de différenciation du TE, il y a une perte de l'expression de CDX2 et de GATA3. De plus il y a un défaut de formation de la cavité et les embryons meurent au stade E6,5 (**Figure 16**) (Nishioka et al. 2008; Ralston et al. 2010; Yagi et al. 2007). Au stade 8-cellules, des expériences dans les embryons *Tead4*^{-/-} ont montré l'expression de SOX2, alors qu'il est absent dans les embryons contrôles. TEAD4 régule donc négativement l'expression de SOX2 à ce stade. De plus, TEAD4 peut se lier directement sur le promoteur de SOX2, cette inhibition pourrait alors se faire de manière directe (Frum, Watts, et Ralston 2019). De plus, lorsque l'expression de TEAD4 est inhibée, il y a un défaut de la régulation de l'actine ainsi que de la mise en place de la polarité dans les blastomères au stade 8-cellules (Zhu et al. 2020). Or la polarité régule, entre autres, la voie HIPPO au stade suivant lors de la différenciation entre TE et MCI (Anani et al. 2014), et cette voie HIPPO régule l'activité transcriptionnelle de TEAD4. Dans les cellules externes, la voie HIPPO est inactive et le cofacteur YAP transloque dans le noyau pour activer, avec TEAD4, l'expression des gènes du TE (**Figure 6**). YAP et TEAD4 sont dépendants l'un de l'autre pour cette activité transcriptionnelle (Nishioka et al. 2009; Zhao et al. 2008).

Il semblerait donc que TEAD4 inhibe l'expression SOX2 au stade 8-cellules, et que lors de la différenciation entre TE et MCI, les cellules externes, via l'inactivation de la voie HIPPO, maintiennent cette inhibition. En revanche, dans les cellules internes, il y a une levée de cette inhibition de SOX2. Cependant les mécanismes de cette dérégulation sont encore inconnus. L'inhibition de l'expression de TEAD4 dans certains blastomères, aux stades 2 ou 8-cellules, montre que les cellules de la MCI issues de ces blastomères se spécifient plus souvent en Epi que les cellules issues des autres blastomères (Mihajlović, Thamodaran, et Bruce 2015). Bien que les auteurs ne formulent pas cette hypothèse, il se pourrait que la levée de l'inhibition médiée par TEAD4 n'impacte pas que SOX2, mais qu'elle jouerait aussi un rôle dans la spécification en Epi.

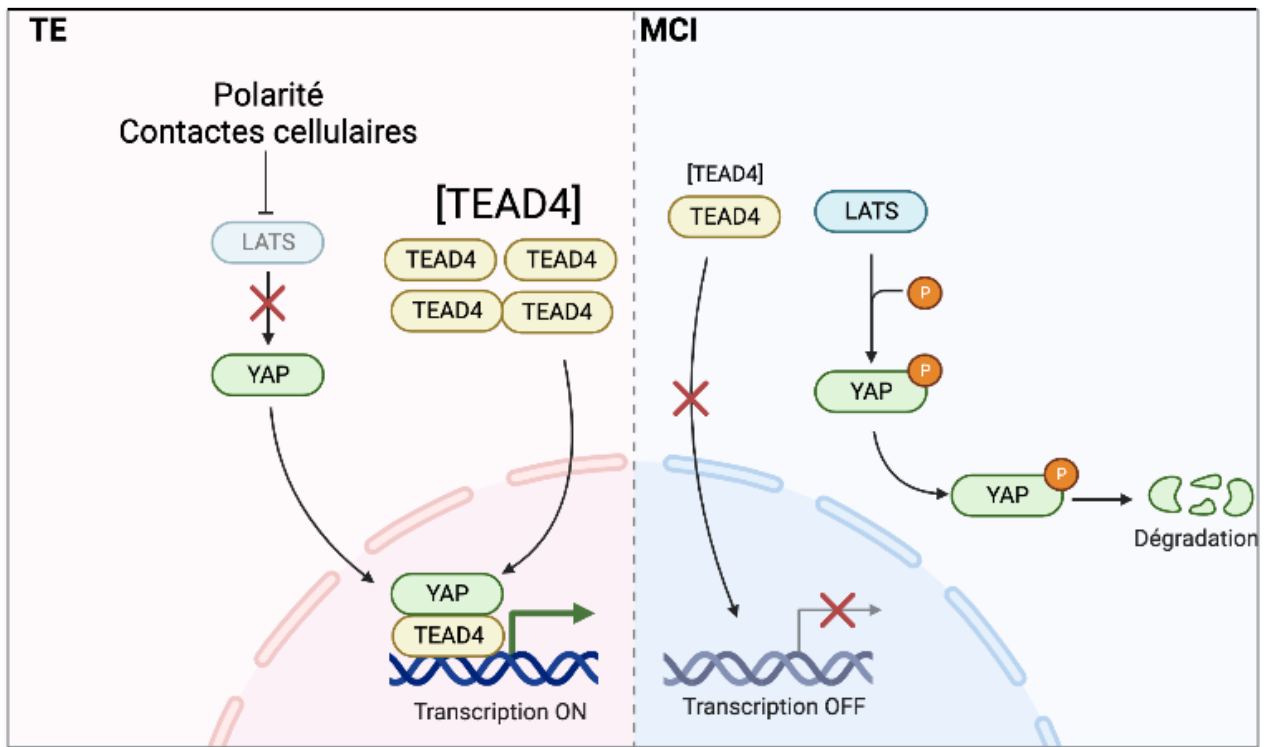


Figure 17: Modèle de l'altération de la localisation nucléaire de TEAD4 dans les cellules de la MCI

Dans les cellules externes, la forte concentration de TEAD4 facilite sa localisation nucléaire. Dans le noyau, TEAD4 se fixe sur ses gènes cibles avec YAP qui n'est pas inhibé par la voie HIPPO, et active la transcription des gènes du TE et l'inhibition de SOX2. Dans les cellules internes, la faible concentration de TEAD4 ne permet pas sa translocation dans le noyau. De plus, YAP est inhibé par la voie HIPPO. Il n'y a alors pas de transcription des gènes du TE et pas d'inhibition de SOX2.

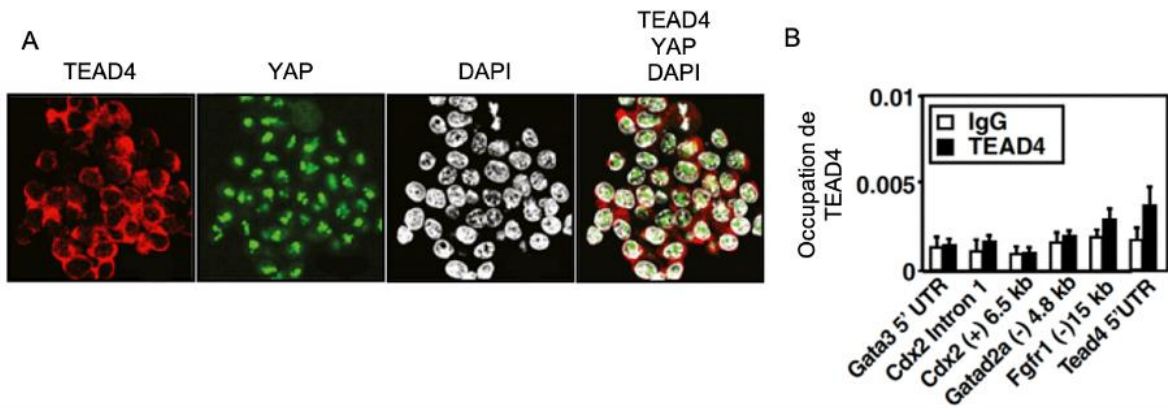


Figure 18: Altération de la localisation nucléaire de TEAD4 dans les cellules ES (Adapté de Home et al. 2012)

(A) Immunofluorescence de TEAD4 et YAP sur cellules ES. (B) Analyse quantitative de l'occupation de TEAD4 sur ses gènes cibles par ChIP dans des cellules ES non différenciées.

Dans les cellules externes, TEAD4 est exprimé et localisé dans le noyau, mais bien qu'il soit toujours exprimé dans les cellules internes, sa localisation subcellulaire est incertaine. Selon certaines études, TEAD4 serait localisé dans le noyau des cellules internes (Nishioka et al. 2008). Mais l'activation de la voie HIPPO dans ces cellules bloque la translocation de YAP dans le noyau. Selon ce modèle, si TEAD4 est dans le noyau, et même s'il est fixé sur le promoteur de *Sox2*, l'absence de YAP empêcherait la répression transcriptionnelle médiée par TEAD4 dans ces cellules (**Figure 17**). Selon une autre étude, TEAD4 serait localisé dans le cytoplasme des cellules internes. Cette exclusion de TEAD4 du noyau serait accompagnée par une baisse de la fixation de TEAD4 sur ses gènes cibles dans les cellules internes comparée aux cellules externes (**Figure 17**) (Home et al. 2012). Dans ce cas, la non-activation des gènes du TE et la dérégulation de SOX2 seraient expliquées par l'absence de TEAD4 dans le noyau et donc l'absence de TEAD4 sur l'ADN. De manière intéressante, si TEAD4 est surexprimé dans les cellules de la MCI, il est observé une expression ectopique de CDX2 dans ces cellules (Home et al. 2012). Il se pourrait alors qu'au-delà de la localisation subcellulaire de TEAD4 et de l'activité co-transcriptionnelle de YAP, les niveaux d'expression de ce facteur soit le véritable élément influençant son activité.

Il est à noter que dans cette même étude, les auteurs observent aussi une localisation cytoplasmique de TEAD4 dans les cellules ES (**Figure 18A**). De plus, comme dans les cellules de la MCI, TEAD4 est faiblement lié à ses gènes cibles tels que *Cdx2* et *Gata3* (**Figure 18B**) (Home et al. 2012). En revanche, l'induction de l'expression de TEAD4 dans les cellules ES entraîne une relocalisation nucléaire de TEAD4 et une forte augmentation de la fixation de celui-ci sur ses gènes cibles (Home et al. 2012). Ainsi, les niveaux de TEAD4 sont importants pour sa localisation subcellulaire et pour sa fixation sur l'ADN. Même si ces résultats semblent être en accord avec ceux de la surexpression de TEAD4 dans la MCI, il n'a pas été étudié si l'augmentation de la fixation de TEAD4 sur ses gènes cibles était suivie d'une augmentation

ou d'une répression de l'expression de ceux-ci.

Contrairement aux cellules ES, TEAD4 est fortement exprimé dans cellules TS. Les embryons *Tead4*^{-/-} ne permettent pas la dérivation de ces cellules, TEAD4 est donc nécessaire dans ce processus (Nishioka et al. 2008; Yagi et al. 2007). Dans les cellules TS, TEAD4 est localisé dans le noyau et se fixe sur les promoteurs de ses gènes cibles comme *Cdx2* et *Gata3* et régule leur expression. TEAD4 peut se fixer aussi sur le promoteur des gènes de pluripotence comme *Nanog* et *Pou5f1* (POU domain, class 5, transcription factor 1), qui code pour le facteur OCT4, mais l'impact de cette fixation n'a pas été étudié (Tomikawa et al. 2020). Il est intéressant de noter que les sites de fixation de TEAD4 sont souvent situés à proximité de sites de fixation de certains de ces facteurs de pluripotence et notamment des facteurs comme NANOG et SOX2 (Home et al. 2012). Il est donc possible que certains gènes régulés par NANOG et SOX2 soient aussi régulés par TEAD4.

TEAD4 est un des facteurs de transcription clé de la différenciation entre le TE et la MCI. Dans le TE, il régule positivement l'expression des facteurs CDX2 et GATA3 et il régule négativement l'expression de SOX2. A l'inverse dans la MCI, la voie HIPPO bloque l'activité de TEAD4, les gènes du TE ne sont pas exprimés et SOX2 n'est pas réprimé. Cependant, certaines données montrent un lien entre TEAD4 et la pluripotence, voir potentiellement avec la spécification en Epi. Il se pourrait donc que TEAD4 ait un rôle dans la deuxième différenciation.

2. SOX21

SOX21 est un répresseur transcriptionnel et il a surtout été étudié dans la différenciation neuronale (Matsuda et al. 2012; Sandberg, Källström, et Muhr 2005; Uchikawa, Kamachi, et Kondoh 1999; Whittington et al. 2015). Mais il a très peu été étudié dans l'embryon préimplantatoire. Il commence à être exprimé au niveau ARNm et protéine à partir du stade 4-

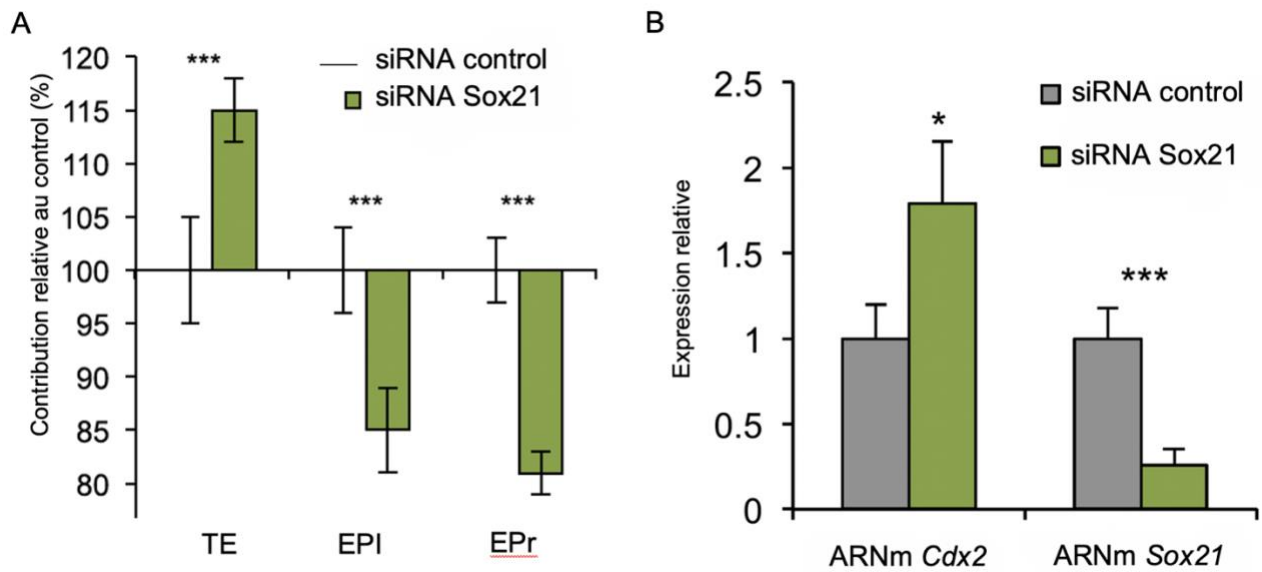


Figure 19: Impacte de l'inhibition de l'expression de SOX21 dans le blastocyste (Issu de Goolam et al. 2016)

(A) Contribution aux différents lignages de blastomères injectés avec un siRNA contre *Sox21* comparés à des blastomères injectés avec un siRNA contrôle. (B) Expression de *Cdx2* et *Sox21* dans des blastomères injectés avec un siRNA contre *Sox21* comparés à des blastomères contrôles.

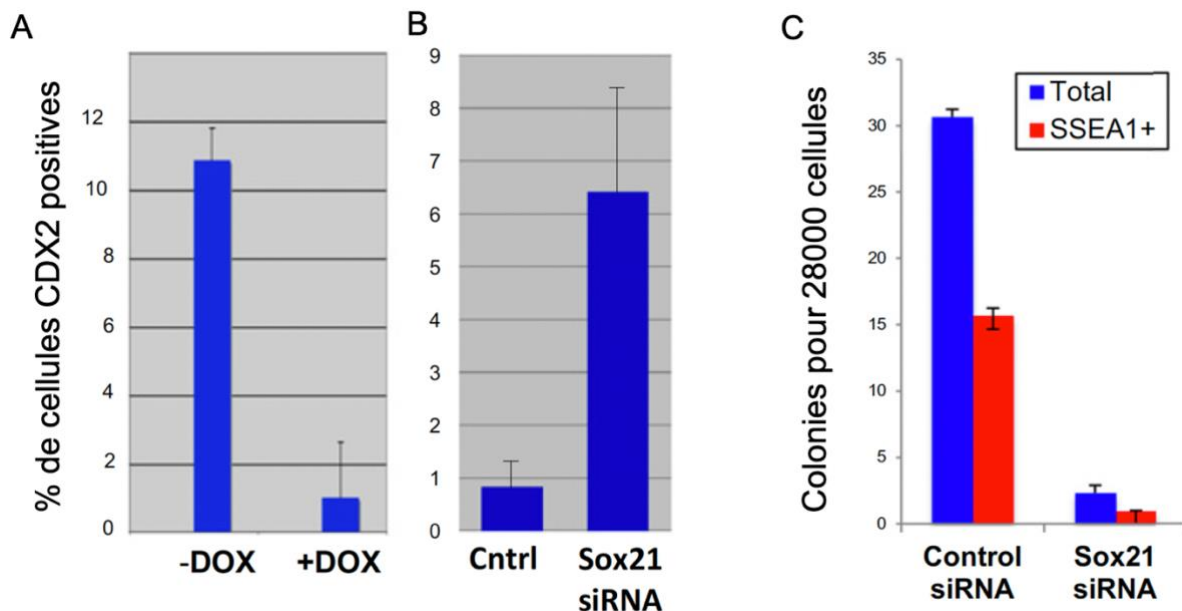


Figure 20: Effet de l'inhibition de SOX21 lors de la surexpression de SOX2 dans les cellules ES ou d'OSKM dans les iPSC (Issu de Kuzmichev et al. 2012)

(A) Pourcentage de cellules CDX2 positives dans des cellules ES traitées au BMP4 pendant 4 jours, sans (-DOX) ou avec (+DOX) surexpression de SOX2. (B) Même graphique qu'en (A) mais dans des cellules +DOX traitées avec un siRNA contrôle ou contre *Sox21*. (C) Nombre de colonies positives pour SSEA1 dans des iPSC traitées avec un siRNA contrôle ou contre *Sox21*. SSEA1 est un marqueur de pluripotence.

cellules. Il est exprimé de manière hétérogène aux stades 4 et 8-cellules et son expression au niveau ARNm diminue à partir de 4-cellules jusqu'au stade 32-cellules où il est exprimé très faiblement (Goolam et al. 2016).

Les embryons mutants pour *Sox21* survivent pendant le développement mais les souris issues de ces embryons naissent avec des défauts au niveau de la peau et des follicules pileux entre autres (Kiso et al. 2009). Les blastomères dans lesquels l'expression de SOX21 a été inhibée participent majoritairement au TE (**Figure 19A**). Ces cellules effectuent moins de divisions asymétriques et elles expriment plus souvent et plus fortement CDX2 (**Figure 19B**) (Goolam et al. 2016). Il semblerait donc que SOX21 joue un rôle lors de la différenciation entre TE et MCI, et que son action inhibe la spécification du TE. Mais on connaît très peu le rôle de SOX21 dans la deuxième différenciation. SOX21 n'est pas exprimé dans les embryons sauvages au stade 90-cellules, mais il est exprimé dans les embryons DKO. De plus, il a été montré que les cellules de la MCI de ces embryons ne se différencient pas (Allègre et al. 2022). Il se pourrait alors que SOX21 ait un rôle dans le maintien de cet état indifférencié.

Des études sur les cellules souches nous ont permis d'étudier un peu plus les liens entre SOX21 et des gènes exprimés pendant le développement embryonnaire. Notamment, il a été montré que SOX21 était en aval de SOX2 pour l'inhibition de CDX2 dans les cellules ES et pour la reprogrammation en iPSC (**Figure 20**) (Kuzmichev et al. 2012).

De manière intéressante, SOX21 est fortement exprimé dans les cellules TS. Sa surexpression induit majoritairement une différenciation en neuroectoderme, mais aussi l'expression de gènes du TE, ce qui confirme le lien entre SOX21 et le lignage du TE. (**Figure 21**) (Chakravarthy et al. 2011; Kualet et al. 2015; Moretto Zita et al. 2015; Ralston et al. 2010). Cependant, ces résultats contrastent avec son rôle dans l'inhibition de CDX2 et montrent que la fonction de SOX21 semble être différente selon le contexte dans lequel il est exprimé. Enfin, la surexpression de SOX21 dans les cellules ES est accompagnée par la baisse de

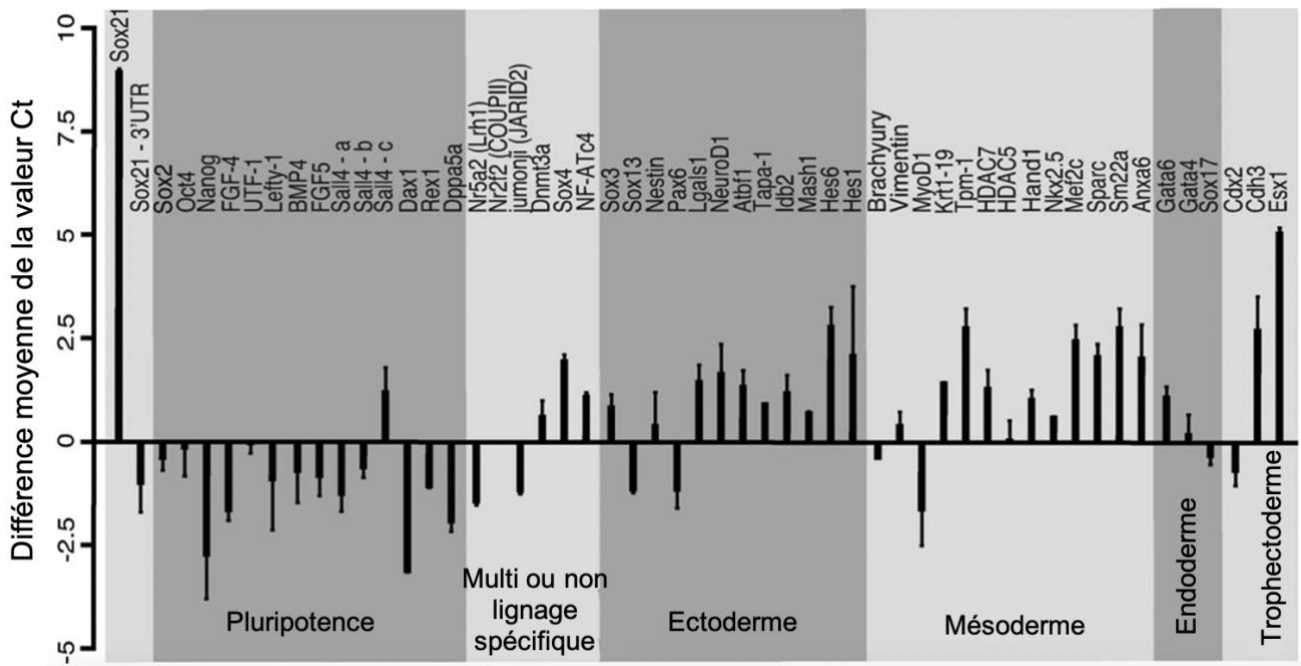


Figure 21: Effet de la surexpression de SOX21 dans les cellules ES (Issu de Mallanna et al. 2010)

Analyse quantitative par RT-qPCR de gènes impliqués dans différents lignages suite à la surexpression de SOX21 dans des cellules ES pendant 48 heures. Les résultats sont montrés en valeur moyenne de la différence de la valeur du Ct (Cycle seuil) entre des cellules non induites et des cellules induites.

l'expression de gènes de pluripotence comme *Nanog* ou *Fgf4* (**Figure 21**) (Mallanna et al. 2010). Il est à noter que SOX21 est un répresseur transcriptionnel, mais aussi qu'il peut se fixer sur les enhancers de *Fgf4* et *Nanog* (Ng et al. 2012). Il se pourrait donc que la répression de ces gènes se fasse de manière directe par SOX21.

Les quelques études sur SOX21 semblent indiquer qu'il joue un rôle dans le lignage du TE, que ce soit lors de sa spécification ou dans ses dérivés. Dans la différenciation neuronale, SOX21 est un facteur qui permet le maintien de l'état progéniteur et inhibe la différenciation (Whittington et al. 2015). Dans les cellules ES, SOX21 peut influencer sur l'expression de *Nanog* et *Fgf4*, et dans les embryons DKO, l'expression de SOX21 est maintenue. Il se pourrait donc qu'il ait un rôle similaire dans l'embryon en bloquant la spécification en Epi et en maintenant donc un état indifférencié des cellules de la MCI.

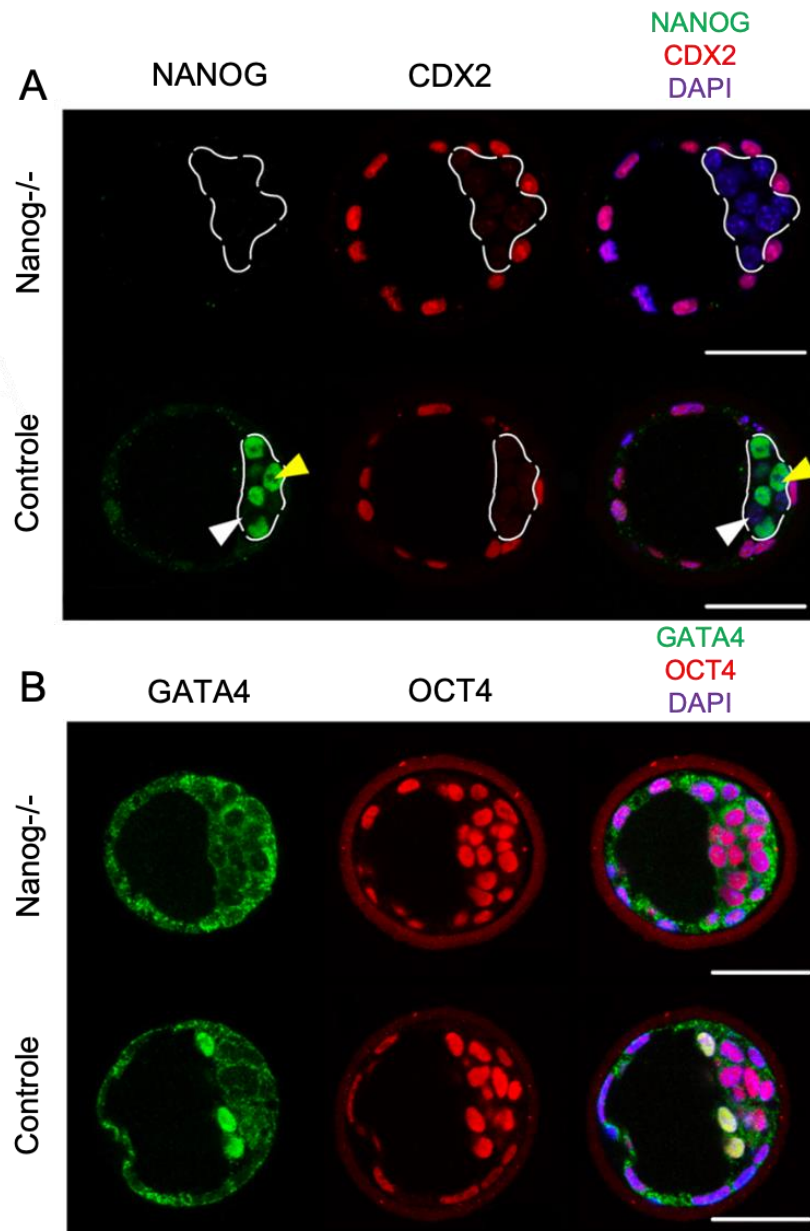


Figure 22: Impacte de la délétion de *Nanog* sur la formation du TE et la maturation de l'EPr (Adapté de Messerschmidt et al. 2010)
Immunofluorescence de NANOG et CDX2 (A) ou GATA4 et OCT4 (B) dans des blastocystes contrôles ou mutants pour *Nanog*. Les lignes en pointillé délimitent la MCI. Les flèches jaunes indiquent les cellules positives pour NANOG et les blanches les futures cellules de l'EPr. Bar = 50μm.

B. 2^{ème} différenciation

Lors de la seconde phase de différenciation, les cellules de la MCI se spécifient soit en EPr soit en Epi. Les facteurs de transcription NANOG, SOX2 et OCT4 sont les acteurs majeurs de la spécification en Epi, NANOG étant strictement nécessaire pour l'initiation de celle-ci (Allègre et al. 2022; Avilion et al. 2003; Frankenberg et al. 2011; Le Bin et al. 2014; Mitsui et al. 2003; Nichols et al. 1998; Wicklow et al. 2014). Ces trois facteurs sont aussi impliqués dans la régulation de la pluripotence dans les cellules ES qui sont issues des cellules Epi (Chambers et al. 2003; Masui et al. 2007; Nichols et al. 1998).

1. NANOG

Dans l'embryon, NANOG est un facteur nécessaire pour la formation de l'Epi. Son ARNm est détecté dès le stade 4-cellules (Guo et al. 2010). Au stade 16-cellules, NANOG est exprimé dans tous les blastomères, internes et externes, et de façon hétérogène, mais à partir des stades 16 et 32-cellules, il commence à être restreint aux cellules de la MCI (Chambers et al. 2003; Dietrich et Hiiragi 2007; Guo et al. 2010; Mitsui et al. 2003). Il est exprimé dans les embryons *Oct4^{-/-}* et les embryons *Sox2^{-/-}*, sa mise en place n'est donc pas dépendante de ces facteurs (Chambers et al. 2003; Wicklow et al. 2014). Dans les blastocystes *Cdx2^{-/-}*, NANOG est exprimé de manière ectopique dans les cellules externes (Strumpf et al. 2005). La restriction de NANOG dans la MCI est donc dépendante de CDX2, même si au stade 8-cellules le profil d'expression de NANOG est indépendant de celui de CDX2 (Dietrich et Hiiragi 2007). Mais dans les embryons *Nanog^{-/-}*, le blastocyste se forme correctement, et CDX2 est restreint aux cellules du TE (**Figure 22A**). De plus, il y a autant de cellules dans la MCI des embryons mutants que dans les embryons contrôles (Frankenberg et al. 2011; Messerschmidt et Kemler 2010). NANOG n'a donc pas de rôle dans la formation du blastocyste ni dans la première différenciation.

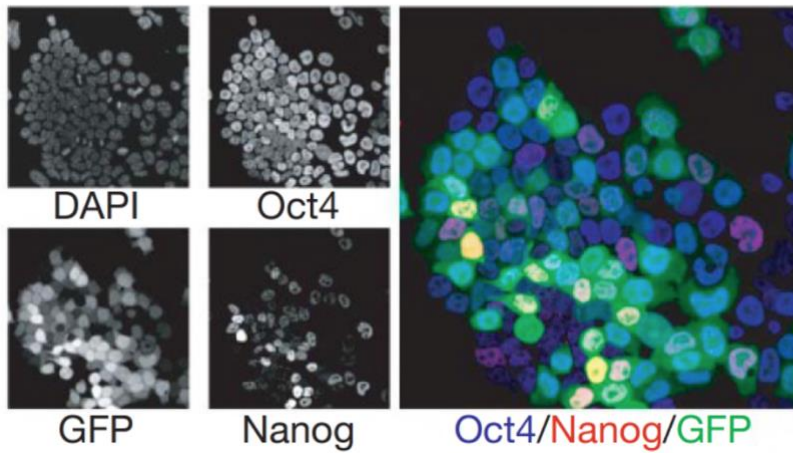
Aux stade 16-cellules NANOG et GATA6 sont coexprimés. Lors de la deuxième différenciation ils sont restreints de manière exclusive dans l'Epi et l'EPr, respectivement, suivant un patron dit en « poivre & sel » (Chazaud et al. 2006; Guo et al. 2010; Plusa et al. 2008). NANOG est strictement nécessaire pour l'initiation de la spécification en Epi, mais pas suffisant (**Figure 13**) (Allègre et al. 2022). Dans les embryons *Nanog*^{-/-}, toutes les cellules de la MCI expriment GATA6, mais peu de cellules expriment SOX17, GATA4 ou PDGFRA, ce qui indique un défaut de maturation de l'EPr (**Figure 22B**) (Frankenberg et al. 2011; Messerschmidt et Kemler 2010). L'injection de cellules ES dans le blastocyste d'embryons *Nanog*^{-/-} permet un sauvetage phénotypique de l'Epi mais aussi de l'EPr (Messerschmidt et Kemler 2010). De plus, les cellules de l'EPr expriment SOX7 et GATA4 même lorsque l'expression de *Nanog* est inhibée de façon mosaïque (Frankenberg et al. 2011). Ces résultats montrent que NANOG est aussi nécessaire de manière non-autonome à la cellule pour la maturation de l'EPr. La formation et la maturation de l'EPr sont dépendantes de la signalisation FGF (Chazaud et al. 2006; Kang et al. 2017; Krawchuk et al. 2013; Nichols et al. 2009; Yamanaka et al. 2010). Dans les embryons *Nanog*^{-/-}, il y a une absence de l'expression de *Fgf4* (Frankenberg et al. 2011). Enfin, le traitement d'embryons *Nanog*^{-/-} avec du FGF4 permet de rétablir la maturation de l'EPr, avec l'expression de SOX17 ou GATA4 (Frankenberg et al. 2011). Le rôle non autonome à la cellule de NANOG sur l'EPr se fait donc par l'expression et la sécrétion de FGF4.

Dans les cellules ES, NANOG est impliqué dans le maintien de la pluripotence (Mitsui et al. 2003). Il se fixe sur les promoteurs de plusieurs gènes de pluripotence pour réguler positivement leur expression, comme *Rex1*, *Sox2* ou *Esrrb* (Loh et al. 2006; Shi et al. 2006). Mais NANOG réprime aussi l'expression de gènes de différenciation tels que *Gata6* ou *Cdx2* (Chen et al. 2009; Singh et al. 2007). Il a été montré que NANOG peut se dimériser, que ce soit pour former des homodimères, ou bien des hétérodimères, comme avec les facteurs OCT4,

SOX2, DAX1 ou ZFP281 (Gagliardi et al. 2013; Wang et al. 2006). De plus, la mutation de la séquence codant pour la région de la protéine impliquée dans cette dimérisation entraîne une perte de l'activité transcriptionnelle de NANOG. Cette capacité de formation d'homodimère ou d'hétérodimère est donc nécessaire à l'activité de NANOG (Gagliardi et al. 2013; Mullin et al. 2008; Wang, Levasseur, et Orkin 2008).

La délétion de *Nanog* dans les cellules ES entraîne une différenciation de ces cellules principalement en endoderme avec l'expression de GATA6 et GATA4, mais aussi en trophoctoderme avec l'expression de CDX2, en mésoderme avec l'expression T (Brachyury, T-box transcription factor T), ou en neuroectoderme avec l'expression de NRP2 (Neuropilin 2) (Chambers et al. 2007; Chen et al. 2009; Loh et al. 2006; Mitsui et al. 2003; Singh et al. 2007). De plus, les cellules de la MCI d'embryons *Nanog*^{-/-} donnent des cellules endodermiques lorsqu'elles sont mises en culture (Frankenberg et al. 2011; Mitsui et al. 2003). Cependant il est important de noter que la délétion de *Nanog* n'entraîne pas toujours la différenciation. Certaines cellules ES *Nanog*^{-/-} maintiennent un état de pluripotence malgré l'absence de NANOG. Bien que ces cellules présentent une baisse de la capacité d'auto-renouvellement, elles sont capables de coloniser les blastocystes et de participer à la formation des trois feuilletts embryonnaires, mais pas des PGCs (Progéniteurs des Cellules Germinales) (Chambers et al. 2007; Silva et al. 2009). Ainsi, bien qu'il soit impliqué dans le maintien de la pluripotence, NANOG n'est pas strictement nécessaire pour celle-ci. Néanmoins, les cellules ES *Nanog*^{+/-} ont une pluripotence instable et se différencient plus souvent comparées à des cellules *Nanog*^{+/+} (Hatano et al. 2005). La surexpression de NANOG dans ces cellules ES permet le maintien de la pluripotence même en l'absence de LIF dans le milieu de culture et même lors d'une différenciation forcée avec un traitement à l'acide rétinoïque. Cependant elle n'est pas suffisante pour maintenir un état indifférencié dans les cellules ES si le facteur OCT4 est déplété (Chambers et al. 2003; Loh et al. 2006; Mitsui et al. 2003).

A



B

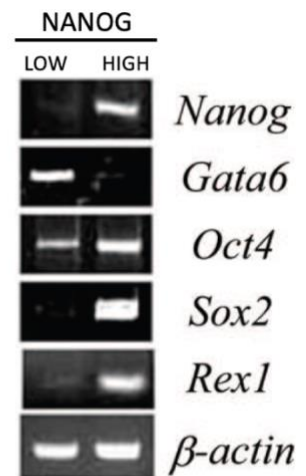
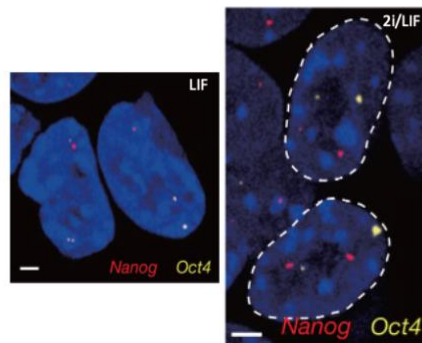


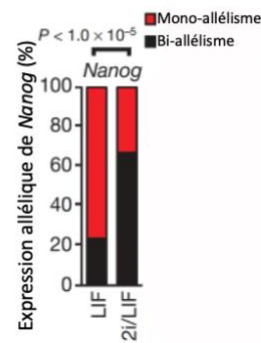
Figure 23 : Expression hétérogène de NANOG dans les cellules ES

(A) Immunofluorescence de NANOG et OCT4 sur cellules ES *Nanog*⁺/*GFP* où un des allèles codant pour *Nanog* a été remplacé par la séquence codante de la GFP (Issu de Chambers et al. 2007). (B) RT-qPCR sur les populations de cellules ES *Nanog*^{LOW} et *Nanog*^{HIGH} (Adapté de Singh et al. 2007).

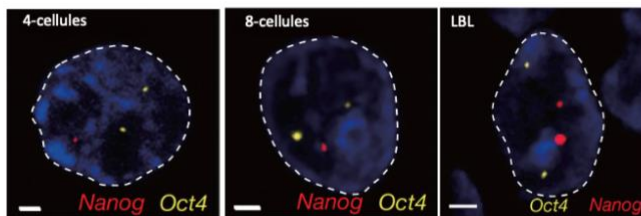
A



A'



B



B'

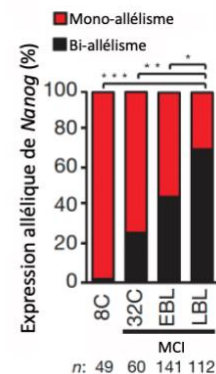


Figure 24: Expression allélique de *Nanog* dans les cellules ES et l'embryon (Adapté de Miyanari et al. 2012)

RNA-FISH de l'ARNm naissant de *Nanog* et *Oct4* sur cellules ES cultivées en Serum/LIF ou 2i/LIF (A) ou sur blastomères d'embryons à différents stades (B). Les proportions de l'expression allélique de *Nanog* dans les cellules ES et les blastomères sont présentées en A' et B', respectivement. EBL et LBL signifient Blastocyste précoce et Blastocyste tardif respectivement. *, $p = 8.8 \times 10^{-5}$; **, $p < 3.1 \times 10^{-3}$; ***, $p = 1.0 \times 10^{-13}$. Les lignes en pointillé délimitent le noyau, n = nombre d'embryon et bar = 2 μ m.

Il a été montré que la surexpression de NANOG est suivie d'une augmentation de l'expression d'OCT4, ESRRB et NR0B1 (Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1), qui est un autre facteur impliqué dans le maintien de la pluripotence. Cette surexpression est aussi accompagnée de la répression de GATA6, mais les facteurs de pluripotence SOX2 et REST (RE1-silencing transcription factor) ne sont pas impactés (Loh et al. 2006; Singh et al. 2007).

Il est intéressant de remarquer que NANOG est exprimé de manière hétérogène entre les cellules dans une colonie de cellule ES cultivée en Serum /LIF (**Figure 23A**) (Chambers et al. 2007; Kalmar et al. 2009; Miyanari et Torres-Padilla 2010; Ochiai et al. 2014; Singh et al. 2007). Il existe alors deux populations, des cellules exprimant fortement NANOG, appelées Nanog^{HIGH}, et des cellules exprimant des niveaux faibles de NANOG, appelées Nanog^{LOW} (Singh et al. 2007). Ces deux populations ne présentent pas le même profil d'expression de gènes. Les cellules Nanog^{HIGH} expriment aussi OCT4, SOX2 et REX1, mais pas GATA6, alors que les cellules Nanog^{LOW} expriment GATA6 et OCT4, mais pas SOX2 ni REX1 (**Figure 23B**). De plus, ces différentes populations n'ont pas le même potentiel de différenciation. Les cellules Nanog^{HIGH} peuvent se différencier en endoderme, mésoderme ou ectoderme, alors que les cellules Nanog^{LOW} ne se différencient qu'en endoderme (Singh et al. 2007). Il a été proposé un modèle où les cellules Nanog^{HIGH} transitionnent en cellules Nanog^{LOW} de manière stochastique, mais que cet état Nanog^{LOW} est un état instable et que le réseau de pluripotence redirige alors la cellule vers l'état Nanog^{HIGH} (Kalmar et al. 2009).

Il a été montré que l'expression de *Nanog* était principalement mono-allélique dans les cellules ES (Miyanari et Torres-Padilla 2012). Cependant, lorsque les cellules sont mises en culture avec du « 2i », la plupart des cellules expriment *Nanog* de manière bi-allélique (**Figure 24A**) et NANOG est exprimé de manière plus homogène entre les cellules (Miyanari et Torres-Padilla 2012). L'expression mono-allélique de NANOG est donc un facteur à l'origine de son expression hétérogène. Cependant, même si l'expression de NANOG est plus homogène,

il existe toujours des fluctuations (Abranches et al. 2014). Il a été montré par RNA-FISH de l'ARN naissant qu'aux stades 2, 4 et 8-cellules l'expression de *Nanog* est mono-allélique et qu'elle est hétérogène entre les blastomères, mais lors de la spécification en Epi, elle devient bi-allélique (**Figure 24B**). Il y a donc un profil similaire entre l'embryon et les cellules ES. De plus, dans les embryons *Nanog*^{+/-} il est observé un retard dans la formation de l'EPr et moins de cellules dans la MCI des blastocystes tardifs (Miyanari et Torres-Padilla 2012). Une expression bi-allélique de *Nanog* est nécessaire pour la bonne mise en place de l'Epi dans l'embryon, mais permet aussi un meilleur maintien de la pluripotence dans les cellules ES.

Les niveaux d'expression de NANOG ont un impact sur son rôle dans les cellules ES, c'est pourquoi il est étroitement régulé par d'autres facteurs de pluripotence comme ESRRB, KLF4, TCF3 (van den Berg et al. 2008; Pereira, Yi, et Merrill 2006; Zhang et al. 2010). La voie FGF régule négativement l'expression de NANOG et la signalisation LIF, via le facteur TBX3, la régule positivement (Hamazaki et al. 2006; Niwa et al. 2009; Silva et al. 2009). De manière intéressante NANOG effectue un rétrocontrôle négatif sur sa propre expression (Navarro et al. 2012).

NANOG joue un rôle majeur dans les cellules ES et le développement de l'embryon. Il n'est pas strictement indispensable dans les cellules ES. Cependant, dans l'embryon, il n'est pas suffisant pour initier la spécification de l'Epi, et les facteurs qui agissent autour de lui sont encore inconnus (Allègre et al. 2022).

2. SOX2

SOX2 est impliqué dans le maintien de la pluripotence à la fois dans l'embryon et dans les cellules ES. Il fait partie de la même famille que SOX21, mais contrairement à ce dernier, SOX2 est un activateur de la transcription (Uchikawa et al. 1999). Les embryons mutants pour *Sox2* forment un blastocyste mais meurent peu de temps après l'implantation au stade E6,5.

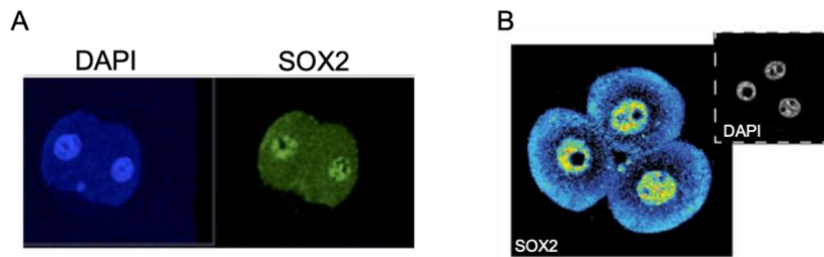


Figure 25: Mise en place de l'expression de SOX2 au cours du développement

Immunofluorescence de SOX2 aux stades 2-cellules (A, Issu de Pan & Schultz, 2011) et 4-cellules (B, Issu de White et al. 2016).

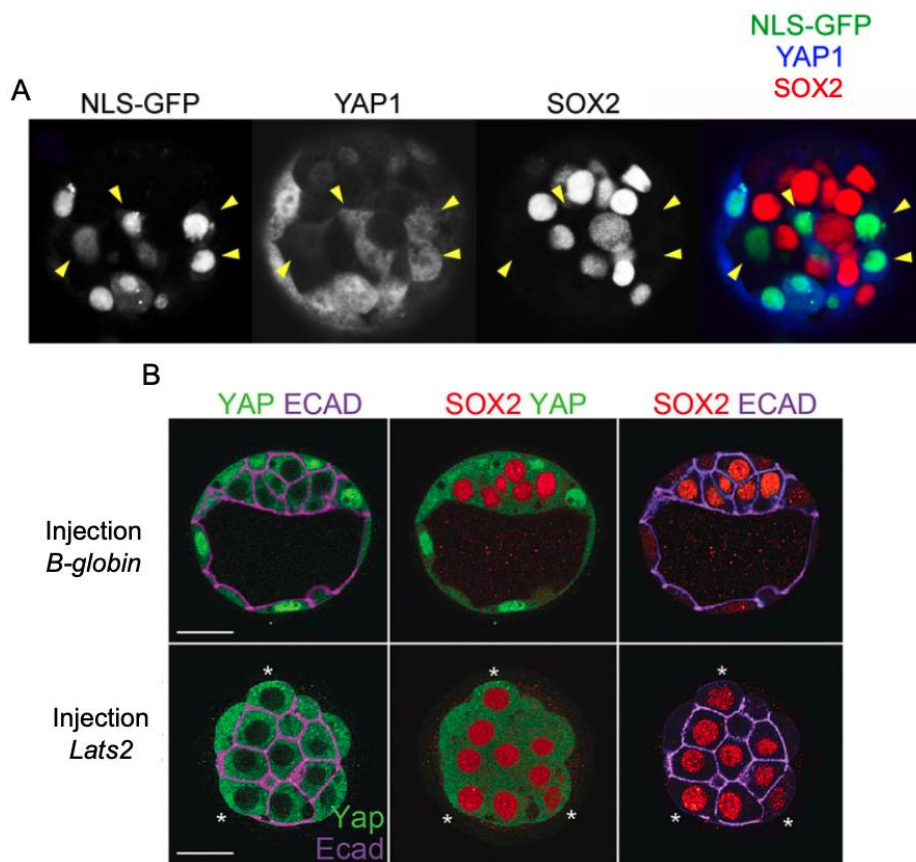


Figure 26: Effet de la voie HIPPO sur la restriction de SOX2 dans le blastocyste

(A) Immunofluorescence sur embryons dans lesquels il a été injecté, dans un des deux blastomères au stade 2-cellules, de l'ARNm d'une forme de YAP1 constitutivement active et d'ARNm pour une GFP localisée dans le noyau (NLS-GFP). Le NLS-GFP permet de suivre les cellules issues du blastomère injecté. Les flèches indiquent les cellules injectées dans lesquels SOX2 n'est pas exprimé (Adapté de Frum et al. 2018). (B) Immunofluorescence de YAP, SOX2 et E-Cadhérine au stade 64-cellules dans des embryons injectés au stade 2-cellules avec de l'ARNm de β -Globin ou *Lats2*. *Lats2* permet d'activer la voie HIPPO et β -Globin sert de contrôle à l'injection. Les astérisques indiquent une expression ectopique de SOX2. Bar = 20 μ m (Adapté de Wicklow et al. 2014).

L'injection de cellules ES dans des blastocystes mutants pour *Sox2* permet de réaliser un sauvetage phénotypique de ces embryons, ce qui montre que les embryons *Sox2*^{-/-} présentent un défaut de formation de l'Epi (Avilion et al. 2003). SOX2 est détecté dès le stade 2-cellules (**Figure 25A**) (Pan et Schultz 2011), et ensuite aux stades 4-cellules, 8-cellules et 16-cellules (**Figure 25B**) (Avilion et al. 2003; Frum et al. 2019; Mistri et al. 2018; White et al. 2016).

SOX2 est présent au stade 2-cellules, cependant, la délétion maternelle et zygotique de *Sox2* n'impacte pas les premiers stades du développement (Wicklow et al. 2014). Au stade 4-cellules, il se lie à l'ADN de manière hétérogène entre les blastomères. Les blastomères avec un plus long temps de liaison de SOX2 à l'ADN participent majoritairement à la MCI (White et al. 2016).

SOX2 est exprimé au stade 16-cellules, stade auquel il est restreint aux cellules de la MCI. La délétion de *Tead4* induit une expression ectopique de SOX2 (**Figure 7A**) (Wicklow et al. 2014) et la surexpression d'une forme constitutivement active de YAP dans les cellules internes entraîne une inhibition de SOX2 (**Figure 26A**) (Frum, Murphy, et Ralston 2018). De plus l'activation forcée de la voie HIPPO dans les cellules externes, par surexpression de LATS2, induit une expression ectopique de SOX2 (**Figure 26B**) (Wicklow et al. 2014). La restriction de SOX2 dans les cellules internes est donc, entre autres, régulée par la voie HIPPO et le complexe TEAD4/YAP.

La présence d'une cavité et l'absence d'expression ectopique de gènes du TE dans la MCI des embryons mutants pour *Sox2* montrent qu'il n'est pas nécessaire ni pour la formation du blastocyste ni pour la différenciation entre TE et MCI (Avilion et al. 2003; Wicklow et al. 2014). L'expression de l'ARNm de *Sox2* augmente fortement à partir du stade 16-cellules ainsi que l'expression de la protéine (Guo et al. 2010; White et al. 2016). Il est d'abord exprimé dans toutes les cellules de la MCI et il est ensuite restreint aux cellules exprimant uniquement NANOG, mais plus tardivement que celui-ci (Wicklow et al. 2014).

Comme pour NANOG, dans les embryons traités au FGF4, il n'y a pas d'expression de SOX2, et à l'inverse, dans les embryons traités avec des inhibiteurs de cette voie, SOX2 est exprimé dans toute la MCI (Wicklow et al. 2014). SOX2 est donc un marqueur de l'Epi. SOX2 est exprimé dans les embryons mutants pour *Nanog* mais aussi de manière hétérogène dans les embryons DKO au stade 64-cellules (Allègre et al. 2022; Frum et al. 2019), ce qui montre que NANOG n'est pas nécessaire pour la mise en place de son expression. Cependant, dans les embryons *Nanog*^{-/-}, la quantité de protéine SOX2 est fortement réduite au stade E4,25. Le maintien de l'expression de SOX2 est donc dépendant de NANOG. Les mêmes résultats ont été observés avec des embryons *Oct4*^{-/-}. Mais il est observé un phénotype encore plus sévère dans les embryons *Nanog*^{-/-} et *Oct4*^{-/-}. Ces embryons présentent une forte réduction de l'expression de SOX2 dès le stade 64-cellules (Frum et al. 2019), montrant une redondance ou une complémentarité entre NANOG et OCT4 dans la régulation de SOX2 à ce stade du développement.

De la même façon, dans les embryons mutants pour *Sox2*, les expressions de NANOG et d'OCT4 ne sont pas impactées au stade 64-cellules, mais SOX2 est nécessaire pour le maintien de l'Epi au stade E4,5 (Mistri et al. 2018; Wicklow et al. 2014). En revanche, la délétion de *Sox2* induit une diminution de l'expression de *Fgf4* ainsi que le nombre de cellules positives pour SOX17 de manière non autonome à la cellule, alors que le nombre de cellules de la MCI reste inchangé (Mistri et al. 2018; Wicklow et al. 2014). Ces résultats suggèrent alors que SOX2 est impliqué dans la deuxième différenciation, cependant il n'a pas été étudié s'il impacte seulement l'expression de FGF4 ou s'il a un impact plus général sur la spécification en Epi.

Comme NANOG, SOX2 est exprimé dans les cellules ES dans lesquelles il est nécessaire pour le maintien de la pluripotence et de l'auto-renouvellement. De plus, les embryons mutants pour *Sox2* ne permettent pas de dériver les cellules ES (Avilion et al. 2003).

Il a notamment été montré qu'il se lie avec OCT4 et que cette liaison nécessite la présence d'ADN avec le motif de fixation du dimère, Oct:Sox (Ambrosetti et al. 2000; Mistri et al. 2018).

Le complexe SOX2-OCT4 régule un grand nombre de gènes impliqués dans la pluripotence comme *Fgf4*, *Nanog*, *Utf1* (Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1) mais aussi *Sox2* et *Oct4* eux même (Chen et al. 2008; Chew et al. 2005; Kuroda et al. 2005; Nishimoto et al. 1999; Okumura-Nakanishi et al. 2005; Rodda et al. 2005; Tomioka et al. 2002). La mutation de son site de fixation sur le promoteur de *Nanog* induit une baisse de l'activité du promoteur (Mistri et al. 2018). De plus, la liaison à l'ADN du dimère SOX2/OCT4 peut dépendre du niveau d'expression de SOX2. En effet il a été montré que la formation du complexe SOX2-OCT4 sur l'enhancer de *Fgf4* nécessite une plus forte concentration de SOX2 comparée à la formation du complexe sur les gènes *Nanog* ou *Utf1* (Mistri et al. 2018).

L'interaction de SOX2 avec ses différents partenaires a aussi un rôle dans la régulation des gènes par SOX2. Par exemple, SOX2 peut se fixer seul mais ne peut pas activer seul la transcription de *Fgf4*, il a besoin d'OCT4 (Yuan et al. 1995). De la même façon, SOX2 peut interagir physiquement avec NANOG, mais la mutation sur SOX2 du site de liaison entre les deux protéines induit une baisse de l'expression de gènes de pluripotence tels que *Rex1* (Gagliardi et al. 2013). Enfin, en plus de NANOG et d'OCT4, SOX2 peut agir avec d'autres facteurs de pluripotence comme ESRRB, avec lequel il active l'expression de *Nr0b1* qui permet le maintien de l'état naïf des cellules ES (Hutchins et al. 2013).

En plus d'impacter sa liaison avec OCT4, les niveaux d'expression de SOX2 sont importants dans le maintien de la pluripotence des cellules ES. L'augmentation de l'expression de SOX2 induit une différenciation des cellules ES en neuroectoderme avec entre autres l'expression de gènes tels que *Six6* (Six oculis-related homeobox 6) et *Neuropilin* (Kopp et al. 2008; Zhao et al. 2004). En plus de cette différenciation, il est aussi observé une baisse de l'expression des gènes de pluripotence comme *Nanog*, *Fgf4* mais aussi *Sox2* lui-même

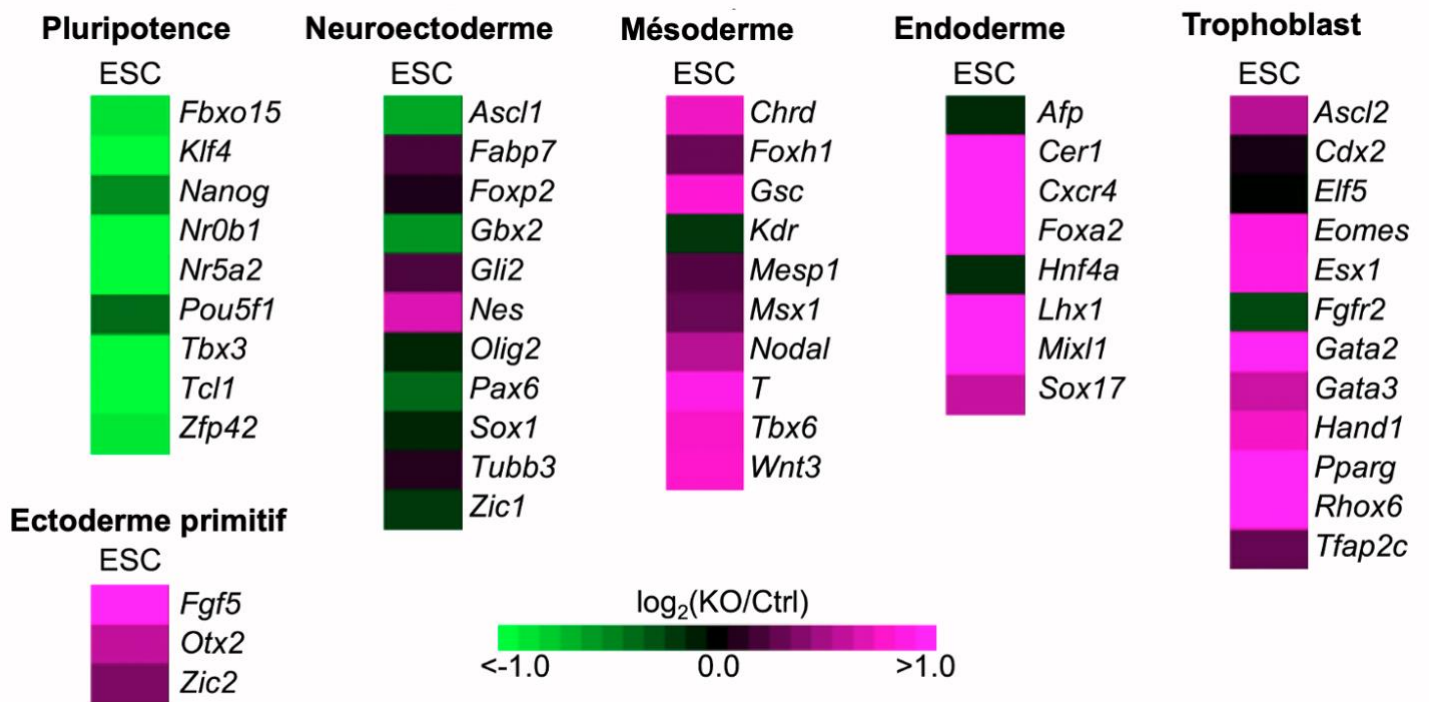


Figure 27: Impacte de la déplétion de *Sox2* dans les cellules ES (Adapté de Adachi et al. 2013)

Changement des niveaux d'expression de marqueurs de différents lignages après déplétion de *Sox2* dans des cellules ES comparé à des cellules ES contrôles.

(Boer et al. 2007; Kopp et al. 2008).

SOX2 fait partie du groupe de facteurs de transcription impliqués dans la reprogrammation en iPSC, OSKM (OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC) (Takahashi et Yamanaka 2006). Il est intéressant de noter que la surexpression d'OSKM dans les cellules ES induit une inhibition du gène *Sox2* endogène, et que cette inhibition se fait par l'inhibition de l'effecteur de la voie PI3K/AKT, FOXO1 (Forkhead box O1) (Ormsbee Golden, Wuebben, et Rizzino 2013).

La déplétion de *Sox2* dans les cellules ES induit principalement une différenciation en trophoctoderme avec l'expression de marqueur comme *Cdh3* ou *Krt7* (Keratin 7), en mésoderme avec l'expression de *T*, ou en endoderme avec l'expression de *Sox17* (**Figure 27**) (Adachi et al. 2013; Masui et al. 2007). De manière intéressante, les gènes de pluripotence sont maintenus dans les premiers temps de la différenciation suite à la déplétion de SOX2. La surexpression d'OCT4 dans ces cellules ES *Sox2*^{-/-} permet un maintien de la pluripotence, ce qui indique alors qu'il y a une redondance entre l'activité de SOX2 et celle d'OCT4 (Masui et al. 2007). Il est intéressant de remarquer que suite à la déplétion de *Sox2* il est observé une augmentation de l'expression de *Nr2f2* (Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2) et une diminution de *Nr5a2* (Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2) (Masui et al. 2007). NR2F2 et NR5A2 régulent *Oct4* négativement et positivement respectivement. Les auteurs émettent l'hypothèse que SOX2 régule *Oct4*, entre autres, en réprimant l'expression de *Nr2f2* et en activant l'expression *Nr5a2*.

SOX2 est un facteur de pluripotence nécessaire dans les cellules ES. Il interagit entre autres avec NANOG et OCT4 pour le maintien d'un état indifférencié. Dans l'embryon, SOX2 est nécessaire pour le maintien de l'Epi, mais ne semble pas être nécessaire pour l'initiation de sa spécification, mais son rôle dans ce processus reste à être étudié. Sans être nécessaire, SOX2 pourrait agir au côté de NANOG pour réguler la bonne mise en place de cette spécification.

3. OCT4

Avec NANOG et SOX2, OCT4 est le troisième facteur qui forme le noyau principal du réseau de la pluripotence (Chen et al. 2008; Kim et al. 2008). Les embryons mutants pour *Oct4* se développent jusqu'au stade blastocyste mais meurent en période péri-implantatoire et ces embryons ne permettent pas la dérivation de cellules ES (Nichols et al. 1998). OCT4 commence à être exprimé dès le stade 2-cellules (Guo et al. 2010; White et al. 2016). Comme pour SOX2, la dynamique de fixation d'OCT4 sur l'ADN au stade 4-cellules joue un rôle sur le devenir des blastomères. De la même manière que SOX2, les blastomères qui présentent une plus longue fixation d'OCT4 sur l'ADN donnent majoritairement des cellules de la MCI (Plachta et al. 2011; White et al. 2016).

Aux stades 8-cellules et 16-cellules OCT4 est exprimé dans tous les blastomères, mais son expression est restreinte aux cellules de la MCI au fur et à mesure du développement (Nichols et al. 2009; Palmieri et al. 1994). Aux stades 32 et 64-cellules, OCT4 est encore exprimé dans le TE, mais à partir du stade 90-cellules, il est exprimé uniquement dans la MCI (Dietrich et Hiiragi 2007; Guo et al. 2010; Wicklow et al. 2014).

Dans les embryons mutants pour *Oct4*, le blastocyste se forme correctement et l'expression de CDX2 est restreinte aux cellules du TE au stade 64-cellules (Frum et al. 2013; Nichols et al. 1998; Ralston et al. 2010). Cependant, au stade E4,5, les cellules de la MCI des embryons *Oct4*^{-/-} présentent une identité de TE avec notamment l'expression de CDX2 et GATA3 (Nichols et al. 1998; Ralston et al. 2010). Les embryons *Oct4*^{-/-} au stade E4,5 ont moins de cellules du TE et de la MCI comparés à des embryons sauvages. De plus, les proportions entre TE et MCI sont aussi impactées, au détriment de la MCI (Frum et al. 2013). Ces résultats indiquent qu'OCT4 n'est donc pas impliqué pour la formation du blastocyste et la différenciation entre TE et MCI, cependant il est nécessaire pour le maintien de l'identité de la MCI ainsi que le maintien de la prolifération.

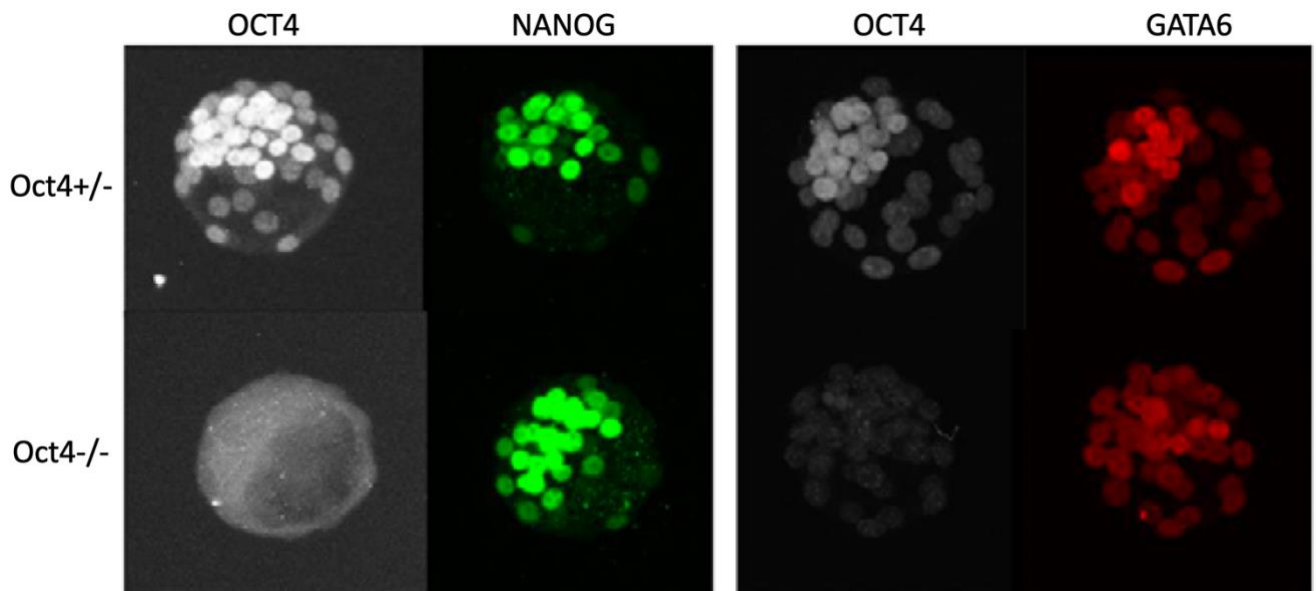


Figure 28: Effet de la délétion d'*Oct4* sur l'expression de NANOG et GATA6 dans le blastocyste (Adapté de Le Bin et al. 2014)

Projection d'immunofluorescence d'OCT4 et NANOG ou OCT4 et GATA6 dans des embryons *Oct4*^{+/-} ou *Oct4*^{-/-} au stade 64-cellules.

OCT4 n'est pas nécessaire pour la mise en place de l'expression de NANOG ou de GATA6, mais sa déplétion entraîne une augmentation et une baisse des niveaux d'expression de NANOG et GATA6, respectivement (**Figure 28**) (Frum et al. 2013; Le Bin et al. 2014). De plus, il y a moins de cellules exprimant GATA6 au stade 90-cellules, alors qu'il y a le même nombre de cellules exprimant NANOG dans les embryons *Oct4*^{-/-}. Il est à noter qu'il est observé aussi une augmentation du nombre de cellules sans expression ni de NANOG ni de GATA6, ce qui indique que les cellules censées se différencier en EPr ne se sont pas différenciées en cellules Epi (Frum et al. 2013).

L'augmentation des niveaux d'expression de NANOG dans les embryons mutants pour *Oct4* suggère qu'il joue un rôle dans la spécification en Epi en régulant l'expression de NANOG. Cependant, dans les embryons *Oct4*^{-/-}, alors que l'expression de NANOG augmente, l'expression de *Fgf4* est diminuée (Frum et al. 2013; Le Bin et al. 2014; Nichols et al. 1998; Stirparo et al. 2021). Bien que certains marqueurs de l'Epi, comme SOX2, ne sont pas impactés dans les embryons mutants, d'autres marqueurs sont dérégulés, comme par exemple les facteurs *Utf1* ou *Rex1* (Frum et al. 2013; Stirparo et al. 2021). Dans les embryons mutants pour *Oct4* il est donc observé une baisse de l'expression de *Fgf4* mais aussi d'autres facteurs induits lors de la spécification en Epi comme *Utf1*. Il serait alors intéressant d'étudier si dans les embryons *Oct4*^{-/-}, en plus des faibles niveaux d'expression, on observe aussi une perte de la corrélation entre les expressions des gènes Epi. Il est intéressant de noter que dans les embryons *Oct4*^{-/-} traités avec des inhibiteurs de la voie FGF, NANOG est exprimé dans toute la MCI, comme dans les embryons sauvages, mais que l'expression de GATA6 est elle aussi maintenue (Frum et al. 2013). La répression de GATA6 par NANOG lors de l'inhibition de la FGF est donc dépendante de la présence d'OCT4.

Au stade 64-cellules, les embryons mutants pour *Oct4* présentent de manière significative moins de cellules exprimant SOX17 et GATA4, avec en plus des niveaux plus

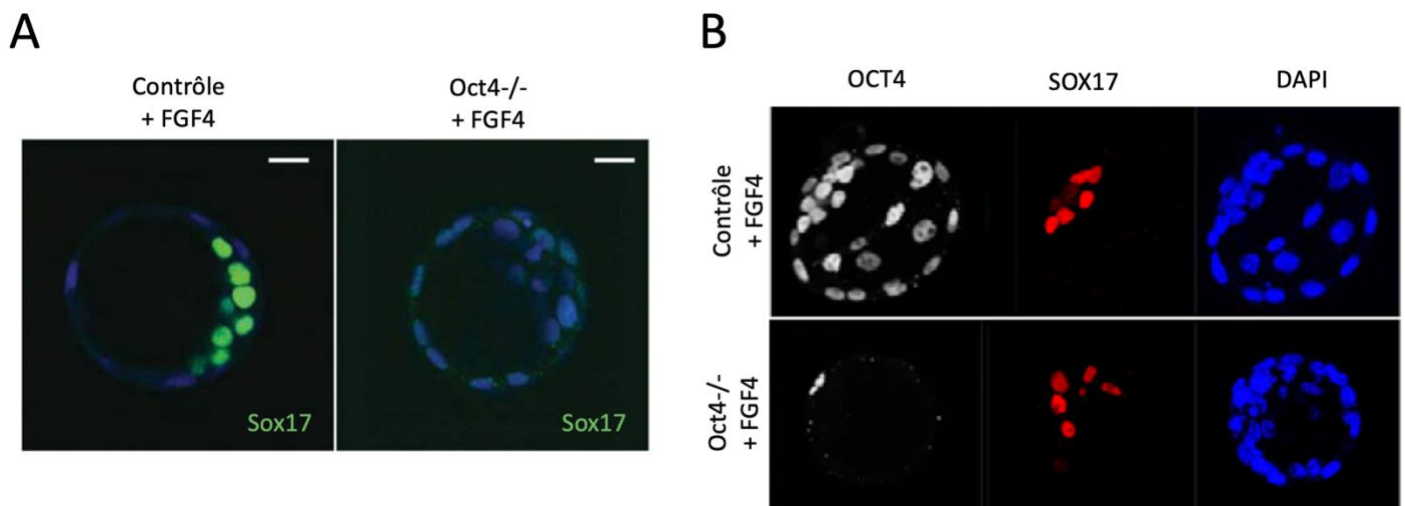


Figure 29 : Traitement d'embryons contrôles et *Oct4*^{-/-} avec du FGF4

(A) Immunofluorescence de SOX17 sur des embryons contrôles ou *Oct4*^{-/-} traités avec du FGF4 à partir du stade 16-cellules et pendant 48 heures. Bar = 20µm (Adapté de Frum et al. 2013).

(B) Immunofluorescence d'OCT4 et SOX17 sur des embryons contrôles ou *Oct4*^{-/-} traités avec du FGF4 à partir du stade 8-cellules et pendant 48 heures (Adapté de Le Bin et al. 2014).

faibles que dans les embryons contrôles (Frum et al. 2013; Le Bin et al. 2014). Lorsque des embryons non mutants sont traités avec du FGF4, toutes les cellules de la MCI expriment GATA6 ainsi que SOX17. Dans les embryons mutants pour *Oct4*, le traitement au FGF4 n'induit qu'une faible expression de SOX17 (**Figure 30A**) (Frum et al. 2013). Une autre étude montre des niveaux d'expression de SOX17 similaires entre des embryons contrôles et des embryons délétés pour *Oct4* et traités au FGF4 (**Figure 30B**) (Le Bin et al. 2014). Mais dans cette étude, *Oct4* a été délété à partir du stade 8-cellules, et il est possible que la protéine déjà présente à ce stade suffise pour le maintien de l'expression de SOX17. Cependant, les cellules EPr issues de ces embryons ne permettent pas la dérivation de cellules endodermiques (Le Bin et al. 2014). OCT4 est donc nécessaire pour la maturation de l'EPr. De plus, l'injection de cellules ES non mutantes pour *Oct4* ne permet pas un sauvetage phénotypique de l'EPr (Frum et al. 2013; Le Bin et al. 2014), ce qui indique qu'OCT4 est nécessaire de manière autonome à la cellule pour la maturation de l'EPr.

OCT4 reste exprimé dans toutes les cellules la MCI à 90-cellules. Il est impliqué de manière autonome à la cellule dans la différenciation des cellules Epi et EPr. De manière intéressante, SOX2 et SOX17, qui sont des marqueurs de l'Epi et de l'EPr respectivement, peuvent tous les deux interagir avec OCT4 (Ng et al. 2012). De plus, il a été montré dans les cellules ES que le complexe OCT4/SOX2 se fixe principalement sur les promoteurs de gènes de pluripotence alors que le complexe OCT4/SOX17 principalement sur celui de gènes de l'endoderme (Aksoy et al. 2013). L'hypothèse a alors été émise que dans les cellules Epi, au côté de NANOG, le complexe OCT4/SOX2 active l'expression et la sécrétion de FGF4. Ce dernier induit la spécification en EPr sur les cellules adjacentes, qui expriment alors SOX17 et ne maintiennent pas l'expression de SOX2. Dans ces cellules, OCT4 change de partenaire, il se dimérise alors avec SOX17, et ce complexe se fixe et active l'expression des gènes nécessaire à la maturation de l'EPr (Aksoy et al. 2013).

OCT4 est exprimé dans les cellules ES dans lesquels il est nécessaire pour le maintien de la pluripotence (Nichols et al. 1998; Rosner et al. 1990). Dans les cellules ES, OCT4 agit principalement en liaison avec SOX2 avec lequel il régule un grand nombre de gènes (Ambrosetti et al. 2000; Chew et al. 2005; Kuroda et al. 2005; Nishimoto et al. 2005; Okumura-Nakanishi et al. 2005; Rodda et al. 2005; Tomioka et al. 2002; Yuan et al. 1995). En plus de se lier avec SOX2, OCT4 peut aussi se dimériser avec d'autres facteurs de transcription pour réguler la pluripotence, comme par exemple KLF4 ou ESRRB (van den Berg et al. 2008; Wei et al. 2009). Il peut également se fixer seul sur les promoteurs de certains gènes comme par exemple celui de *Nanog* ou celui de *Fgf4* (Ng et al. 2012), même si pour ce dernier, OCT4 seul ne suffit pas pour induire son expression (Yuan et al. 1995). Bien qu'OCT4 soit indispensable pour le maintien des cellules ES, l'augmentation des niveaux d'expression d'OCT4 ne suffit pas à maintenir l'auto-renouvellement lorsque l'expression de *Nanog* est inhibée (Pan et al. 2006).

L'augmentation des niveaux d'expression d'OCT4 en fait une différenciation des cellules ES en endoderme avec entre autres l'expression de GATA4 (Niwa et al. 2000; Pan et al. 2006). Cette surexpression d'OCT4 est accompagnée d'une baisse de l'expression de NANOG, suggérant alors que l'induction en endoderme se fait notamment par la répression de l'expression de ce facteur (Pan et al. 2006). Dans les cellules *Oct4^{-/-}*, il est observé une surexpression de marqueurs du TE comme CDX2, CLDN4 (Claudin 4) ou HAND1 (Heart and neural crest derivatives expressed 1) (Loh et al. 2006; Niwa et al. 2000). La perte d'OCT4 induit donc une différenciation en cellules TS. Il est intéressant de remarquer que ces résultats sur cellules ES sont en accord avec les résultats obtenus dans les embryons *Oct4^{-/-}* où des gènes du TE sont exprimés dans les cellules de la MCI au stade E4,5 (Nichols et al. 1998; Ralston et al. 2010). Que ce soit in vitro ou in vivo, OCT4 maintient la pluripotence et réprime la différenciation en TE.

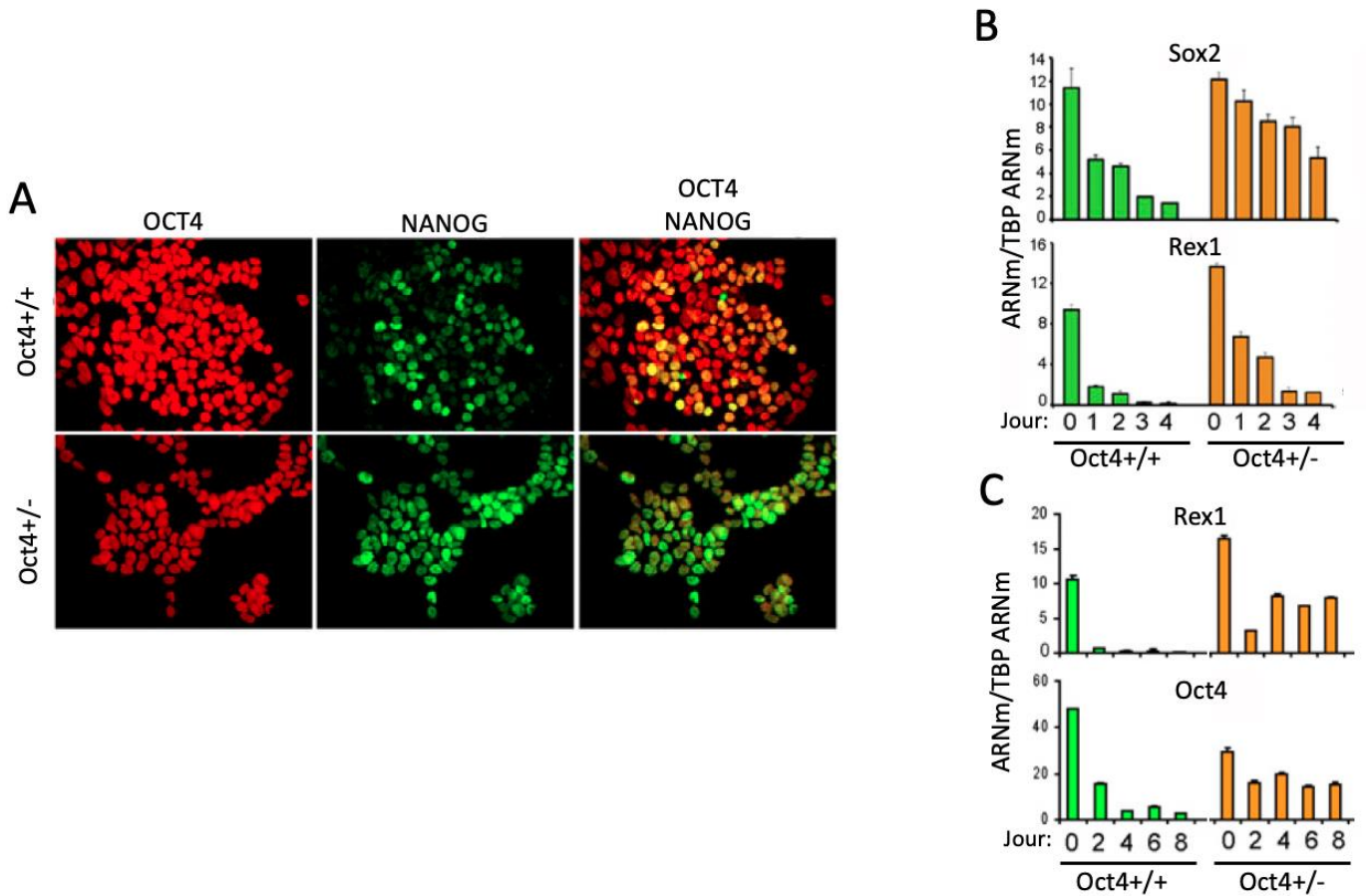


Figure 30: Différence de pluripotence entre les cellules ES $Oct4^{+/+}$ et $Oct4^{+/-}$ (Adapté de Karwacki-Neisius et al. 2013)

(A) Immunofluorescence d'OCT4 et NANOG sur cellules ES $Oct4^{+/+}$ ou $Oct4^{+/-}$. Analyse quantitative par RT-qPCR des marqueurs de pluripotence sur cellules ES $Oct4^{+/+}$ ou $Oct4^{+/-}$ après retrait du LIF du milieu de culture (B) ou après induction de différenciation neurale (C).

Comme pour NANOG, l'expression d'OCT4 dans les cellules ES est hétérogène (Thomson et al. 2011). Les cellules ES *Oct4*^{+/-} ont des niveaux d'expression plus faibles d'OCT4 comparées à des cellules ES *Oct4*^{+/+}, cependant, elles présentent une expression plus homogène d'OCT4 entre cellules (**Figure 30A**) (Karwacki-Neisius et al. 2013). Ces cellules expriment aussi NANOG de manière plus homogène et plus forte (Karwacki-Neisius et al. 2013). Lorsque des cellules avec des niveaux plus faibles d'OCT4, comparées à des cellules ES contrôles, sont cultivées dans un milieu déplété en LIF, elles se différencient moins vite que des cellules ES *Oct4*^{+/+} (**Figure 30B**) (Karwacki-Neisius et al. 2013; Radzisheuskaya et al. 2013a). A l'inverse, lorsqu'une différenciation neurale est induite dans les cellules *Oct4*^{+/-}, ces cellules maintiennent un état indifférencié plus longtemps que les cellules *Oct4*^{+/+} (**Figure 30C**) (Karwacki-Neisius et al. 2013).

De plus, les cellules *Oct4*^{+/-} ont une capacité d'auto-renouvellement plus importante que les cellules *Oct4*^{+/+}. Enfin, il y a une augmentation de la fixation des facteurs OCT4 et NANOG sur les promoteurs des gènes de pluripotence, tels que *Esrrb* et *Tbx3*, ce qui est accompagnée par une surexpression de ces gènes (Karwacki-Neisius et al. 2013). Ces résultats suggèrent qu'une baisse des niveaux d'expression d'OCT4 dans les cellules ES permet un état de pluripotence plus stable. Karwacki-Neisius et al. 2013 suggèrent que ce maintien de la pluripotence est permis grâce à l'expression plus forte et plus homogène de NANOG. Cette hypothèse est en accord avec le fait que la surexpression de NANOG permet de maintenir les cellules ES en culture même sans LIF ou lors d'une différenciation induite. Dans les cellules ES *Oct4*^{+/-} il est observé une phosphorylation plus importante de STAT3. Les auteurs émettent alors l'hypothèse que l'augmentation de STAT3 phosphorylée permet cette expression homogène de NANOG (Karwacki-Neisius et al. 2013). Cependant, il reste encore à comprendre comment les niveaux d'expression d'OCT4 régulent la phosphorylation de STAT3.

OCT4 est régulé par les gènes impliqués dans la pluripotence comme *Nanog*, *Esrrb* ou *Sox2* (Masui et al. 2007; Zhang et al. 2008), par la voie de signalisation LIF/STAT3 (Do et al. 2013), et par OCT4 lui-même en effectuant un rétrocontrôle négatif sur sa propre expression (Pan et al. 2006). OCT4 permet aussi le maintien de la pluripotence entre autres en régulant négativement l'expression de facteurs de différenciation comme CDX2 (Niwa et al. 2005). La surexpression de CDX2 induit une différenciation des cellules ES en cellules TS, et cette différenciation est accompagnée d'une baisse de l'expression d'OCT4. Il est intéressant de remarquer que lors de cette répression, CDX2 et OCT4 se fixent ensemble sur le promoteur d'*Oct4*, formant alors un complexe répresseur (Niwa et al. 2005).

OCT4 est un facteur nécessaire au maintien de la pluripotence. Dans les cellules ES et dans les cellules de la MCI il prévient l'acquisition d'une identité TE. De plus, dans la MCI il est impliqué dans la deuxième différenciation. Dans l'EPr, il permet la bonne expression des gènes nécessaire à la maturation de manière autonome et non autonome à la cellule. Cependant, son rôle dans la spécification en Epi reste encore incertain. OCT4 semble important pour l'expression correcte de certains marqueurs Epi, mais il n'est pas encore connu s'il est nécessaire pour l'expression coordonnée de ces marqueurs, et donc pour l'initiation de la spécification en Epi.

Projet

Caractérisation de l'expression de facteurs potentiellement impliqués dans la spécification en épiblaste dans l'embryon de souris préimplantatoire

Au stade 16-cellules, les cellules de la MCI coexpriment NANOG et GATA6. Lors de la seconde différenciation, entre le stade 16 et 32-cellules, les cellules Epi commencent à se différencier en premier. Ces cellules répriment l'expression de GATA6 et continuent d'exprimer NANOG et activent l'expression de FGF4. Ce dernier agit alors sur les cellules adjacentes encore indifférenciées pour induire la spécification en EPr dans ces cellules. Dans les embryons mutants pour *Nanog*, toutes les cellules de la MCI expriment GATA6 et se spécifient en EPr. A l'inverse, dans les embryons mutants pour *Gata6*, toutes les cellules de la MCI expriment NANOG et se spécifient en Epi. Ainsi, pour étudier le rôle de NANOG dans l'initiation de la spécification de l'Epi, l'équipe a étudié des embryons double mutants, pour *Nanog* et *Gata6*. Ils ont alors montré que NANOG était nécessaire pour cette initiation, mais que cependant, il n'était pas suffisant.

Initialement, mon projet était de caractériser des facteurs qui agiraient en coopération avec NANOG dans cette initiation. Mais une étude *in silico* du gène *Fgf4* a mis en avant, en plus de partenaires potentiels de NANOG, des facteurs potentiellement répresseurs de l'expression de *Fgf4*. Mon projet a alors été d'étudier l'expression de certains de ces facteurs au cours du développement en parallèle de l'expression de NANOG par immunofluorescence. J'ai aussi réalisé des expériences de surexpression d'un de ces facteurs dans l'embryon pour étudier son implication dans la deuxième différenciation. Enfin, j'ai commencé à développer deux lignées de cellules ES pour surexprimer deux facteurs d'intérêt. Il sera alors possible d'analyser leur liaison à l'ADN et notamment sur les promoteurs des gènes Epi, et d'étudier comment ces facteurs régulent les gènes Epi.

Résultats

Initiation of epiblast specification is independent of SOX21 activity and of coordinated expression of NANOG and SOX2 proteins

Victor Nowak, Nicolas Allègre, Pierre Pouchin and Claire Chazaud*

Université Clermont Auvergne, CNRS, INSERM, GReD Institute, Faculté de Médecine, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

* Corresponding author: claire.chazaud@uca.fr

The epiblast is the source of all embryonic tissues and embryonic stem cells. Its specification is regulated by the pluripotency factor NANOG, that has been shown to be necessary to initiate epiblast specification, however NANOG is not sufficient. Here, we identified several transcription factors that could regulate *Fgf4* expression, an epiblast marker, alongside NANOG during epiblast specification. Among these transcription factors there are two SOX family proteins, SOX2 and SOX21. We show that SOX2 expression increases during development meanwhile SOX21 expression decreases. We also found also that SOX2 and NANOG are not expressed in a coordinated manner to induce epiblast specification. Finally, we show that SOX21 ectopic expression neither impairs epiblast specification nor *Fgf4* expression. Altogether our results reinforce the hypothesis that epiblast specification is stochastic and indicate that SOX21 does not play a role in this specification.

Introduction

During preimplantation development, the mouse embryo performs two rounds of differentiation before implantation. The first round takes place at the 16-cell stage by differentiating the inner cells, which form the Inner Cell Mass (ICM), and the outer cells, which will form the Trophectoderm (TE). Then, the second differentiation occurs within the ICM, producing the Epiblast (Epi) and the Primitive Endoderm (PrE). The Epi is the source of all embryonic tissues and embryonic stem (ES) cells, while the PrE is an extraembryonic tissue, which participates to the formation of the yolk sac.

At the 16-cell stage, the transcription factors NANOG and GATA6 are co-expressed in ICM cells (Dietrich et al. 2007; Plusa et al. 2008). From the 16-cell stage there is an asynchronous differentiation between Epi and PrE until the 90-cell stage where there are two distinct population following a salt and pepper pattern (Chazaud et al. 2006; Saiz et al. 2016). NANOG is then expressed only in Epi, while GATA6 is only expressed in PrE cells. Once specified, Epi cells express and secrete FGF4 which acts on undifferentiated neighboring cells to promote PrE differentiation (Chazaud et al. 2006; Frankenberg et al. 2011; Kang et al. 2013; Krawchuk et al. 2013; Nichols et al. 2009; Yamanaka et al. 2010).

Because all ICM cells become PrE cells in *Nanog* mutant embryos (Frankenberg et al. 2011), how NANOG is implicated in Epi lineage initiation has long been an unanswered question. However, it has been shown that in double mutant embryos (DKO), for *Nanog* and *Gata6*, there is a loss of the coordinated expression of Epi markers which define the Epi state and also a loss of the *Fgf4* proper expression. This demonstrates that NANOG is necessary for Epi specification (Allègre et al. 2022). However, NANOG does not seem to be sufficient for this specification. Indeed, some cells express *Nanog* but not *Fgf4* at the 16 and 32-cell stages, implying that one or more partners are involved.

Here, we aim to explore which factors could act with NANOG to regulate initiation of Epi specification. We focus on the regulation of *Fgf4* expression because it is an Epi marker and is also not expressed before Epi specification (Guo et al. 2010; Ohnishi et al. 2014). We identify other transcription factors that could regulate *Fgf4* expression during Epi specification. Among them, SOX21, which has been shown to repress *Fgf4* expression in the ES cells (Mallanna et al. 2010) and OCT4 and SOX2 which have both been independently showed to be involved in *Fgf4* expression during Epi specification (Le Bin et al. 2014; Wicklow et al. 2014). However, how those transcription factors are expressed together with NANOG has never been studied.

Using quantitative immunofluorescence at the single cell level, we show that NANOG, SOX2, SOX21 and OCT4 are dynamically expressed during preimplantation stages. The presence of these factors is not or poorly coordinated before the 90-cell stage; this reinforces the hypothesis of a stochastic mechanism for Epi cells differentiation. We also show that SOX21 is not involved in Epi/PrE differentiation.

Results

D) SOX, KLF, NANOG, TEAD4, OCT4 binding sites are clustered in a *Fgf4* enhancer

In order to find putative NANOG partners involved for the initiation of Epi specification we looked at transcription factor binding sites close to NANOG ones on *Fgf4* locus. As *Fgf4* starts to be expressed upon Epi differentiation, to narrow the study, we focused on the transcription factors which have a correlated expression with that of *Fgf4* at the 32-cells stage in mouse and human embryos (Allègre et al. 2022). To this list, we also added transcription factors that are expressed before Epi specification and those expressed in DKO embryos, as their expression is not regulated by NANOG. Finally, we added transcription factors that could negatively regulate *Fgf4* expression, such as TE markers (**Fig 1A**). By using the online software Genomatix, we mapped the transcription factor binding sites of these factors on *Fgf4* sequence in several species, mainly mammals but also chicken, zebrafish and xenopus.

We first focused on NANOG binding sites. A comparison between species (Mouse, Rat, Human and Chimpanzee) highlights that there is a NANOG binding site conserved in the same region among those species (**Fig 1B**). This site is located in the 3'UTR region (1427bp after the STOP codon), in a previously reported enhancer, Hom3b (Curatola et Basilico 1990; Dailey, Yuan, et Basilico 1994). An *in-silico* motif analysis shows that close to this NANOG binding site, there are putative binding sites for SOX2, TEAD4, which overlap with NANOG binding site and for OCT4 and KLF4. Moreover, ChIP-seq experiments indicate that KLF5 can also bind to this region, on the same site as KLF4 (Azami et al. 2017). SOX2 has been shown to bind the Hom3b enhancer (Yuan et al. 1995). SOX2 shares the same motif with SOX21, and a competition can occur between those two factors on enhancers (Matsuda et al. 2012). In addition, SOX2 and SOX21 regulate positively and negatively *Fgf4*, respectively (Mallanna et al. 2010; Yuan et al. 1995). TEAD4 activity is downstream of the HIPPO pathway to induce TE differentiation (Nishioka et al. 2009). OCT4 can bind to SOX2 and SOX21, and it has been

shown that there can be a competition between SOX proteins to bind to OCT4 (Aksoy et al. 2013). And finally, KLF4 is a pluripotency factor, such as NANOG and SOX2, and is expressed in early embryo before Epi specification (Dhaliwal, Abatti, et Mitchell 2019; Morgani et Brickman 2015). KLF5, which can bind to the same site as KLF4, can prevent precocious *Fgf4* expression in the blastocyst (Azami et al. 2017). By the presence of all these factors, we decided to name this site “STONK”, for **SOX-TEAD4-OCT4-NANOG-KLF**.

A BLAST analysis of the STONK site reveals a high sequence homology between the mouse and the other eutherian mammals. However no homology was found when compared to the chicken, zebrafish or xenopus (**Fig 2**). This is very interesting since TE/ICM differentiation is a process conserved through the mammals but absent in the other analyzed species. Thus, the STONK site is potentially only dedicated to TE/ICM differentiation. However, it has been shown by additive transgenesis that the Hom3b enhancer is sufficient for *Fgf4* expression in the blastocyst and that the SOX2/OCT4 binding site in this region is necessary (Fraidenraich, Lang, et Basilico 1998).

All these data combined together indicate that the STONK site and the factors that are predicted to bind to this region are most likely involved in the regulation of *Fgf4* expression during the Epi specification.

II) NANOG, SOX2 and SOX21 display a dynamic expression profile during preimplantation development

To explore the potential implication of those factors alongside NANOG for the induction of *Fgf4* expression and Epi specification, we have performed single-cell protein quantification by immunofluorescence on embryos from the 4-cell stage to the 90-cell stage. For each stage embryos were co-labelled for SOX2, SOX21 and NANOG or SOX2, SOX21 and OCT4 to assess correlation(s) of expression(s) (**Fig 3A**) and we quantified their expression

levels (**Fig 3B, C**). Due to cell-to-cell heterogeneities of these factors, we ranked the cells for their level of expression to be able to compare within the embryo and between stages. The four factors are already expressed at the 4-cell stage. The quantification of the most expressing cells shows that there is a high increase in NANOG expression between 4-cell stage and uncompact 8-cell stage, then the levels remain relatively stable until the 90-cell stage.

SOX2 expression gradually increases until the 90-cell stage. Interestingly, as for NANOG, there is a little burst in SOX2 expression at 16-cell stage. As for NANOG, SOX2 is heterogeneously expressed within the same embryo. Conversely, SOX21 is highly expressed at the 8-cell stages and then decreases until the 32-cell stage where it is no longer detectable.

Finally, OCT4 is highly heterogeneously expressed between the stages. It is highly expressed at the 8-cell stages and then severely decreases at the 32 and 64-cell stages, to finally increase at the 90-cell stage. Interestingly, OCT4 is homogeneously expressed within the same stages, but its expression varies between the stages. To our knowledge, this expression variation between stages has never been shown previously. To sum up, NANOG, SOX2, SOX21 and OCT4 are already expressed at the 4-cell stage. Until the 90-cell stage, SOX2 expression, globally increases meanwhile SOX21 expression decreases.

III) NANOG and SOX2 protein levels are not correlated during early preimplantation stages

Thanks to the co-labelling of SOX2, SOX21 and NANOG, we were able to calculate the cell-to-cell correlation of expressions throughout stages (**Fig 4**). We took cells with highest levels of NANOG because this factor is required for Epi specification. In those cells we looked at the correlation between NANOG expression and SOX2 or SOX21 expressions. We did the same in cells with highest levels of SOX2, in which we calculated the correlation between SOX2 and SOX21 expressions. There is no correlation between NANOG and SOX2

expressions until the 90-cell stage, even at the 16-cell stage where they both show a little peak (**Fig 4A, B**). Surprisingly, expressions of NANOG and SOX2 are both strongly correlated with SOX21 expression at the 16-cell stage (**Fig 4A, C**) but not between them. Thus, these results indicate that NANOG and SOX2 expressions are not coordinated at the time of Epi specification *i.e* around the 32-cell stage.

Considering our results from the in-silico study and quantification of NANOG, SOX2 and SOX21 in the embryo, together with published data, we hypothesized the mechanism regulating *Fgf4* expression at the STONK site. At the 16-cell stage, TEAD4 and SOX21 would bind to the STONK site and block *Fgf4* expression. From the 16 to the 32-cell stage, due to the decrease of TEAD4 and SOX21 levels with the increase of NANOG and SOX2 levels in the inner cells, there would be an exchange of factors on the STONK site, and NANOG with SOX2 would activate *Fgf4* expression (**Fig 5**).

IV) SOX21 does not play a role in ICM formation

To explore the hypothesis that SOX21 prevents Epi specification, we used a doxycycline-inducible *Sox21* transgene (iSox21, Eenjes et al. 2021) associated to a ROSA26-driven *rtTA* transgene (rtTA, Beard et al. 2006). Different timings of induction at different stages were carried out to test the role of SOX21 ectopic expression on Epi specification. We treated the embryos from the 8-cell stage to maintain high SOX21 expression levels and from the 16-cell stage when SOX21 expression levels are already strongly decreased. From the crosses between rtTA and iSox21 heterozygotes males (rtTA^{+/-}; iSox21^{+/-}) with CD1 females only the embryos with the two transgenes (rtTA^{+/-}; iSox21^{+/-}) show an overexpression of SOX21 when treated with doxycycline (SOX21 OE) (**Fig S1A**). We confirmed this overexpression for the three treatment windows by quantification (**Fig S1B**). However, surprisingly, there is a high heterogeneity in SOX21 induced expression between the cells

within the same embryo (**Fig S1A, B**). Finally, treated littermate embryos, *i.e* embryos with none or only one of the transgenes, show no developmental differences compare to CD1 embryos (**Fig S1C**). Thus, those embryos were used as the control group.

We first checked if SOX21 ectopic expression has an impact on TE/ICM differentiation. When embryos are treated from the 8 to the 32-cell stage, SOX21 overexpression neither impacts the total number of cells in the embryo nor the number of TE or ICM cells (**Fig 6A**). The same results are observed when embryos are treated from the 8 to the 64-cell stage (**Fig 6B**). When embryos are treated from the 16 to the 64-cell stage, no difference is observed in the total number of cells between the two groups. Surprisingly, SOX21 OE embryos show more TE cells and less ICM cells compare to control embryos (**Fig 6C**). However, even if this difference is statistically significant, this represents only 15% of difference for both populations *i.e* around 5 more cells out of 40 in TE and around 3 less cells out of 23 in ICM. Thus, SOX21 ectopic expression has a moderate impact on TE/ICM differentiation when embryos are treated from 16 to 64-cell stage. All these results indicate that when SOX21 is maintained at high level, it does not play a major role on the number of TE or ICM cells.

V) SOX21 overexpression has no impact on EPI/PRE differentiation

We then aimed to analyze if the second differentiation is impaired by SOX21 ectopic expression. If our hypothesis is true (**Fig 5**), then SOX21 overexpression would prevent Epi and PrE differentiation. We classified ICM cells into four populations using a thresholding approach on NANOG and GATA6 fluorescence intensity: EPI (cells expressing only NANOG), PRE (cells expressing only GATA6), DP (Double Positive, expressing both NANOG and GATA6) and DN (Double Negative, expressing none of the markers) (Saiz et al. 2016) (**Fig 7A, D, G**). There is no significant difference in the proportions of each population between ICM of control and SOX21 OE embryos (**Fig 7B, E, H**). There is also no difference in the mean

number of cells for each population per ICM between control and SOX21 OE embryos (**Fig 7C, F, I**). Furthermore, there is a minor effect of SOX21 overexpression on NANOG and GATA6 expressions levels, either in the whole ICM or in each population (**Fig S2**). It only seems that SOX21 overexpression prevents extreme expression values for both factors, and thus, tends to homogenize their expression. Altogether, those results indicate that SOX21 overexpression does not have a major impact on Epi/PrE differentiation.

However, SOX21 is induced heterogeneously with this transgenic system (**Fig S1**), thus, it is possible that the lack of effect is due to too low number of SOX21 overexpressing cells. We selected the cells that overexpress SOX21 the most, to analyze their relative contribution to the four populations in each embryo. When embryos are treated from the 8 to the 32-cell stage, SOX21 overexpressing cells are more biased to become Epi cells (**Fig 8A, B**). Furthermore, NANOG is expressed at slightly higher levels in those cells while GATA6 is slightly underexpressed (**Fig 8C**). However, no bias is observed in the four populations when embryos are treated from the 8 to the 64-cell stage or from the 16 to the 64-cell stage (**Fig 8D, E, G, H**). Thus, if SOX21 overexpression biases cells to become Epi at the 32-cell stage, this overexpression is not sufficient to impair Epi/PrE balance over the development. Interestingly, there is no correlation between NANOG and GATA6 expression and SOX21 expression (**Fig 9**). Those results indicate that SOX21 overexpression has a minor effect on NANOG and GATA6 expression levels and on Epi/PrE differentiation.

VI) SOX21 overexpression does not inhibit *Fgf4* expression

To further explore the role of SOX21 on Epi specification, we looked at *Fgf4* expression levels to identify Epi cells. According to our initial hypothesis (**Fig 5**), an overexpression of SOX21 would lead to a reduced expression of *Fgf4*. Embryos were treated from the 8 to the 64-cell stage and then *Fgf4* expression was observed by RNA-FISH with co-labelling for SOX21.

Both control and SOX21 OE embryos express *Fgf4* (**Fig 10**). Moreover, in SOX21 OE embryos, ectopically SOX21 expressing cells express also *Fgf4*. Thus, SOX21 does not inhibit *Fgf4*.

Discussion

This work highlights a possible common mechanism between mammals for *Fgf4* regulation during Epi differentiation. The characterization of the STONK site and expression pattern analysis of specific transcription factors through the development led us to hypothesize that *Fgf4* could be regulated by an exchange between repressing and activating factors upon Epi specification.

It has already been shown that most of these factors can physically bind to the STONK site in ES cells, supporting both our results and hypothesis. Our work focused on *Fgf4* locus as it is an Epi marker and NANOG target gene. Thus, a deeper analysis of other genes correlated to *Fgf4* at the 32-cell stage, such as *Tdglf1* or *Utf1*, will be necessary to better understand their regulation during the Epi specification.

Eutherian mammals have in common the TE/ICM differentiation in which TEAD4 is implicated. Furthermore, in those species, TEAD4 is preferentially expressed in TE cells during blastocyst formation (Home et al. 2012). Increase of TEAD4 expression in outer cells is therefore required for TE differentiation. Thus, it is possible that those species also share a common mechanism within the ICM cell, requiring low levels of TEAD4.

Our work shows that NANOG, SOX2, OCT4 and SOX21 are dynamically expressed during preimplantation stages. It is noteworthy that those results agree with what has been shown at the mRNA level and protein level (Allègre et al. 2022; Blakeley et al. 2015; Dietrich et al. 2007; Goolam et al. 2016; Guo et al. 2010; White et al. 2016). The co-labelling of factors and their quantification enables to compare expressions within and in between stages. After inner cell production, NANOG levels are relatively constant while SOX2 levels gradually increase. Surprisingly, OCT4 levels are highly reduced at the 32 and 64-cell stages. In ES cells, high expression levels of OCT4 induce endoderm differentiation while low expression levels enhance the maintenance an undifferentiated state (Karwacki-Neisius et al. 2013; Niwa et al.

2000; Pan et al. 2006; Radziszheuskaya et al. 2013b). Thus, it is possible that OCT4 expression levels are decreased in ICM cells to prevent fortuitous differentiation.

Furthermore, we show that NANOG, SOX2 and SOX21 are heterogeneously expressed during the development. To explore cell-to-cell heterogeneity, we analyzed gene expression correlation. Unexpectedly, SOX21 expression is correlated to both NANOG and SOX2 expression at the 16-cell stage, while NANOG and SOX2 expressions being not correlated. Importantly, NANOG and SOX2 expressions are not correlated until the 90-cell stage. Absence of correlation between NANOG and SOX2 expressions at the 16, 32 and 64-cell stages implies that their co-expression occurs randomly within the ICM at the time of Epi specification. Those results fit with the model proposed by Allègre et al. 2022. Indeed, in this model, Epi markers are heterogeneously and randomly expressed between ICM cells at the 16-cell stage and stochastic coexpression of some of those Epi markers with NANOG initiate the Epi specification. Correlation between SOX2 and NANOG at the protein level occurs later than at the mRNA level due to translation delays.

SOX21 ectopic expression shows only minor effect on the embryonic development. First of all, when this overexpression is induced from the 8-cell stage to the 32 or 64-cell stage, there number of TE and ICM cells is no affected. However, there are more TE cells and less ICM cells when the embryos are treated from the 16 to the 64-cell stage. This result disagrees with study where *Sox21* inhibition, with siRNA injection at the 2-cell stage, promotes TE differentiation over ICM (Goolam et al. 2016). However, SOX21 was inhibited at an earlier stage. Furthermore, in both studies, the difference of cells impacted is low (around 15%) Thus, SOX21 role during TE/ICM differentiation is still unclear and needs to be more thorough.

SOX21 ectopic induction is highly heterogeneous within the ICM possibly diluting an eventual effect. In the subpopulation of SOX21 most expressing cells, there is an effect when embryos are treated with dox from 8 to 32-cell stage compared to control. These cells are biased

to become Epi cells. Moreover, an increase of NANOG expression and a decrease of GATA6 expression levels can be observed in those cells. However, if those cells were Epi cells, we would expect to have also this bias at the 64-cell stage, which is not the case. Thus, this imbalance is probably due to stronger NANOG expression levels and if those cells were truly Epi cells remains to be determined. And indeed, *Fgf4* expression, a robust Epi marker, is neither activated nor inhibited in cells overexpressing SOX21. Altogether, these results indicate that SOX21 is not implicated in Epi specification. It is interesting to note that our results are different than what has been found with ES cells, as SOX21 overexpression is followed by a reduced expression of *Nanog* and *Fgf4* also by an increased expression of *Gata6* (Mallanna et al. 2010).

To conclude, this work highlights novel putative factors implicated in the *Fgf4* regulation via the STONK site. SOX2 is heterogeneously expressed and is coexpressed with NANOG in a stochastic manner. On the other side, SOX21 is neither involved in *Fgf4* expression nor in epiblast specification.

Material & Methods

Mice and embryos

Experiments were performed in accordance with the French and EU guidelines for the care and use of laboratory animals (Ethical Committee C2EA-02, file #26479–2020100111292271). Animals were housed in a pathogen-free facility under a 12-hour light cycle and had access to standard food and water. Males homozygous for *Sox2I*-inducible transgene (*iSox2I*^{+/+}, Eenjes et al. 2021) were kindly donated by Robert J Rottier, from Erasmus Medical Center, Rotterdam, Netherlands. Females homozygous for *rtTA* transgene and for OSKM-inducible transgene (*rtTA*^{+/+}; *OSKM*^{+/+}, Carey et al. 2010) were kindly donated by Fabrice Lavial, from CRCL, France. Females *rtTA*^{+/+}; *OSKM*^{+/+} were crossed with *iSox2I*^{+/+} males to obtain *rtTA*^{+/-}; *iSox2I*^{+/-} males.

All embryos used in this study were produced by natural mating. WT embryos were from the CD1 strain (Charles River or Janvier Labs) and *rtTA*^{+/-}; *iSox2I*^{+/-} embryos were from CD1 females mated with *rtTA*^{+/-}; *iSox2I*^{+/-} males. Embryos were staged according to the date of the vaginal plug (E0.5) at noon. Embryos were collected at the 4, 8, 16, 32, 64, and 90-cell stage, corresponding to 2.0, 2.5, 2.75, 3.25, 3.5 and 3.75 days of embryonic development respectively. Embryos were collected by flushing the oviducts or the uterus with M2 media (Sigma Aldrich).

Embryos were cultured in KSOM (Milipore) at 37°C, 5% CO₂. Doxycycline (D9891, Sigma) was used at the final concentration 1 µg/ml. Embryos were cultured until the wanted stage based on their morphology.

Immunostaining

For immunostaining, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes. Embryos were rinsed three times in PBS-Triton 0.1% for at least 5 minutes each time. Permeabilization were done in PBS-Triton 0.5%, 5 min. Embryos were rinsed again in PBS-Triton 0.1% and were blocked in PBS-Triton 0.1%, FBS 10% for at least 30 minutes. Embryos were incubated at 4°C overnight with primary antibody (Table 1). After washes with PBS-Triton 0.1%, embryos were incubated with secondary antibody (Table2) and DAPI (1/1000, Sigma Aldrich) for at least 1h. Images were acquired by using Leica SP8 confocal microscope (40X objective, z-steps = 2µm).

HCR RNA-FISH

For hybridization chain reaction (HCR) fluorescent in situ hybridization (FISH), the *Fgf4* probe set was designed and purchased from Molecular Instruments. Briefly the embryos were fixed in 4% PFA for 10 minutes. After PBS-Tween20 0.1% (Sigma Aldrich) washes, they were dehydrated in graded series of Methanol/PBS-Tween20 0.1%. Embryos were rehydrated in degraded series of Methanol/PBS-Tween20 0.1% and postfixed in 4% PFA. Prehybridization, hybridization, amplification steps were carried out according to Molecular Instruments protocol. Immunostaining with beta-Catenin and p-ERM was performed to label cell membrane and to allow cell segmentation. Images were acquired by using Zeiss LSM980 confocal microscope (40X objective, z-steps = 0.35µm).

Fluorescence quantification

Images were analyzed with Imaris (Bitplane). Cells were counted in a semiautomated manner with Imaris (Bessonnard et al. 2014). The total number of cells was counted with DAPI staining, TE cells were counted with CDX2 staining, and ICM cells were counted by subtraction

of TE cells number to total cell number. In embryos without CDX2 staining, ICM and TE cells were counted with DAPI staining according to their shape and their position in the embryo.

Fluorescence intensity in nuclei was quantified with the “Spots” tool from Imaris. Spots were created in each nucleus (spots N). Then three spots were created outside of the nucleus, each 8µm in the z axis (spots C). Spots C were used to quantify the background according to the position on the z-axis. The intensity of for each channel in spots N was then retrieved, and divided by background intensity corresponding on the z-axis. Another normalization was performed with the mean intensity of the corresponding embryo, and then with the mean of all embryos at the same stage to be able to compare fluorescence intensity between stages. Fluorescence quantification from experiments with SOX21 OE embryos was carried out according to Saiz et al. 2016. The threshold is determined with a k-means of 2.

In silico analysis

Fgf4 sequence from different species were analyzed with the MatInspector tool from the Genomatix online software. Sequences and transcription factor matrices were extracted from Genomatix databases. Only sites with a score between 0.8 and 1 (1 is maximum) were analyzed. Genomatix considers that a score of 0.8 is the minimum above which predicted site is potentially bound by the transcription factor. Sequence homology were assessed with BLAST tool from NCBI.

Genotyping

Embryos genotyping was performed after confocal microscopy by PCR. Embryos were lysed in 10µl of DNA solution with proteinase K for 2h at 55°C and then 10 minutes at 94°C to inactivate proteinase K. 2µl of DNA were used for one reaction. Primers for iSox21 genotyping were 5'-GCAGAAGCTGATCTCGGAGG-3' with 5'-

GGGTTCGCGAGCAGAGACTC-3'. The PCR program was the following: 5min at 95°C; 40 cycles of 30s at 94°C, 30s at 58°C, 1min at 72°C; 5min at 72°C.

Graphs and statistical analysis

Graphs were made with Prism9 (GraphPad), except for the scatterplots which were made with RStudio. The edges of the box represent the 25th and 75th quartiles. The median is represented by the centrer line. The whiskers extend to the Min and Max. Cells are plotted individually in single-cell experiments. Mann-Whitney test and Spearman correlation were performed by Prism9 and Chi-square and Chi-square post-hoc tests were performed by RStudio. *p*.values less than 0.05 are considered significant.

References

- Aksoy, Irene, Ralf Jauch, Jiaxuan Chen, Mateusz Dyla, Ushashree Divakar, Gireesh K. Bogu, Roy Teo, Calista Keow Leng Ng, Wishva Herath, Sun Lili, Andrew P. Hutchins, Paul Robson, Prasanna R. Kolatkar, et Lawrence W. Stanton. 2013. « Oct4 Switches Partnering from Sox2 to Sox17 to Reinterpret the Enhancer Code and Specify Endoderm ». *The EMBO Journal* 32(7):938-53. doi: 10.1038/emboj.2013.31.
- Allègre, Nicolas, Sabine Chauveau, Cynthia Dennis, Yoan Renaud, Dimitri Meistermann, Lorena Valverde Estrella, Pierre Pouchin, Michel Cohen-Tannoudji, Laurent David, et Claire Chazaud. 2022. « NANOG initiates epiblast fate through the coordination of pluripotency genes expression ». *Nature Communications* 13:3550. doi: 10.1038/s41467-022-30858-8.
- Azami, Takuya, Tsuyoshi Waku, Ken Matsumoto, Hyojung Jeon, Masafumi Muratani, Akihiro Kawashima, Jun Yanagisawa, Ichiro Manabe, Ryoza Nagai, Tilo Kunath, Tomonori Nakamura, Kazuki Kurimoto, Mitinori Saitou, Satoru Takahashi, et Masatsugu Ema. 2017. « Klf5 Maintains the Balance of Primitive Endoderm versus Epiblast Specification during Mouse Embryonic Development by Suppression of Fgf4 ». *Development* 144(20):3706-18. doi: 10.1242/dev.150755.
- Beard, Caroline, Konrad Hochedlinger, Kathrin Plath, Anton Wutz, et Rudolf Jaenisch. 2006. « Efficient Method to Generate Single-Copy Transgenic Mice by Site-Specific Integration in Embryonic Stem Cells ». *Genesis* 44(1):23-28. doi: 10.1002/gene.20180.
- 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. 2015. « Defining the Three Cell Lineages of the Human Blastocyst by Single-Cell RNA-Seq ». *Development* 142(18):3151-65. doi: 10.1242/dev.123547.
- Carey, Bryce W., Styliani Markoulaki, Caroline Beard, Jacob Hanna, et Rudolf Jaenisch. 2010. « A single-gene transgenic mouse strain for reprogramming adult somatic cells ». *Nature methods* 7(1):56-59. doi: 10.1038/nmeth.1410.
- Chambers, Ian, Douglas Colby, Morag Robertson, Jennifer Nichols, Sonia Lee, Susan Tweedie, et Austin Smith. 2003. « Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells ». *Cell* 113(5):643-55. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00392-1.
- Chazaud, Claire, Yojiro Yamanaka, Tony Pawson, et Janet Rossant. 2006. « Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway ». *Developmental Cell* 10(5):615-24. doi: 10.1016/j.devcel.2006.02.020.
- Curatola, A. M., et C. Basilico. 1990. « Expression of the K-fgf proto-oncogene is controlled by 3' regulatory elements which are specific for embryonal carcinoma cells. » *Molecular and Cellular Biology* 10(6):2475-84.
- Dailey, L., H. Yuan, et C. Basilico. 1994. « Interaction between a novel F9-specific factor and octamer-binding proteins is required for cell-type-restricted activity of the fibroblast growth factor 4 enhancer. » *Molecular and Cellular Biology* 14(12):7758-69.
- Dhaliwal, Navroop K., Luis E. Abatti, et Jennifer A. Mitchell. 2019. « KLF4 Protein Stability Regulated by Interaction with Pluripotency Transcription Factors Overrides Transcriptional Control ». *Genes & Development* 33(15-16):1069-82. doi: 10.1101/gad.324319.119.
- Dietrich, Jens-Erik, et Takashi Hiiragi. 2007. « Stochastic Patterning in the Mouse Pre-Implantation

- Embryo ». *Development* 134(23):4219-31. doi: 10.1242/dev.003798.
- Eenjes, Evelien, Marjon Buscop-van Kempen, Anne Boerema-de Munck, Gabriela G. Edel, Floor Benthem, Lisette de Kreij-de Bruin, Marco Schnater, Dick Tibboel, Jennifer Collins, et Robbert J. Rottier. 2021. « SOX21 modulates SOX2-initiated differentiation of epithelial cells in the extrapulmonary airways » édité par M. Königshoff, E. E. Morrisey, S. De Langhe, et F. Hawkins. *eLife* 10:e57325. doi: 10.7554/eLife.57325.
- Fraidenraich, Diego, Richard Lang, et Claudio Basilico. 1998. « Distinct Regulatory Elements Govern Fgf4 Gene Expression in the Mouse Blastocyst, Myotomes, and Developing Limb ». *Developmental Biology* 204(1):197-209. doi: 10.1006/dbio.1998.9053.
- Frankenberg, Stephen, François Gerbe, Sylvain Bessonard, Corinne Belville, Pierre Pouchin, Olivier Bardot, et Claire Chazaud. 2011. « Primitive Endoderm Differentiates via a Three-Step Mechanism Involving Nanog and RTK Signaling ». *Developmental Cell* 21(6):1005-13. doi: 10.1016/j.devcel.2011.10.019.
- Goolam, Mubeen, Antonio Scialdone, Sarah J. L. Graham, Iain C. Macaulay, Agnieszka Jedrusik, Anna Hupalowska, Thierry Voet, John C. Marioni, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2016. « Heterogeneity in Oct4 and Sox2 Targets Biases Cell Fate in 4-Cell Mouse Embryos ». *Cell* 165(1):61-74. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.047.
- Guo, Guoji, Mikael Huss, Guo Qing Tong, Chaoyang Wang, Li Li Sun, Neil D. Clarke, et Paul Robson. 2010. « Resolution of Cell Fate Decisions Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst ». *Developmental Cell* 18(4):675-85. doi: 10.1016/j.devcel.2010.02.012.
- Home, Pratik, Biswarup Saha, Soma Ray, Debasree Dutta, Sumedha Gunewardena, Byunggil Yoo, Arindam Pal, Jay L. Vivian, Melissa Larson, Margaret Petroff, Patrick G. Gallagher, Vincent P. Schulz, Kenneth L. White, Thaddeus G. Golos, Barry Behr, et Soumen Paul. 2012. « Altered subcellular localization of transcription factor TEAD4 regulates first mammalian cell lineage commitment ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(19):7362-67. doi: 10.1073/pnas.1201595109.
- Kang, Minjung, Anna Piliszek, Jérôme Artus, et Anna-Katerina Hadjantonakis. 2013. « FGF4 Is Required for Lineage Restriction and Salt-and-Pepper Distribution of Primitive Endoderm Factors but Not Their Initial Expression in the Mouse ». *Development* 140(2):267-79. doi: 10.1242/dev.084996.
- Krawchuk, Dayana, Nobuko Honma-Yamanaka, Shihadeh Anani, et Yojiro Yamanaka. 2013. « FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst ». *Developmental Biology* 384(1):65-71. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.09.023.
- Le Bin, Gloryn Chia, Silvia Muñoz-Descalzo, Agata Kurowski, Harry Leitch, Xinghua Lou, William Mansfield, Charles Etienne-Dumeau, Nils Grabole, Carla Mulas, Hitoshi Niwa, Anna-Katerina Hadjantonakis, et Jennifer Nichols. 2014. « Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst ». *Development (Cambridge, England)* 141(5):1001-10. doi: 10.1242/dev.096875.
- Mallanna, Sunil K., Briana D. Ormsbee, Michelina Iacovino, Joshua M. Gilmore, Jesse L. Cox, Michael Kyba, Michael P. Washburn, et Angie Rizzino. 2010. « Proteomic Analysis of Sox2-Associated Proteins During Early Stages of Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation Identifies Sox21 as a Novel Regulator of Stem Cell Fate ». *STEM CELLS* 28(10):1715-27. doi: 10.1002/stem.494.

- Matsuda, Satoru, Ken-ichiro Kuwako, Hiroataka James Okano, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Yumiko Saga, Yumi Matsuzaki, Akinori Akaike, Hachiro Sugimoto, et Hideyuki Okano. 2012. « Sox21 Promotes Hippocampal Adult Neurogenesis via the Transcriptional Repression of the Hes5 Gene ». *Journal of Neuroscience* 32(36):12543-57. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5803-11.2012.
- Mitsui, Kaoru, Yoshimi Tokuzawa, Hiroaki Itoh, Kohichi Segawa, Mirei Murakami, Kazutoshi Takahashi, Masayoshi Maruyama, Mitsuyo Maeda, et Shinya Yamanaka. 2003. « The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells ». *Cell* 113(5):631-42.
- Morgani, Sophie M., et Joshua M. Brickman. 2015. « LIF Supports Primitive Endoderm Expansion during Pre-Implantation Development ». *Development* 142(20):3488-99. doi: 10.1242/dev.125021.
- Nichols, Jennifer, Jose Silva, Mila Roode, et Austin Smith. 2009. « Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo ». *Development (Cambridge, England)* 136(19):3215-22. doi: 10.1242/dev.038893.
- Nishioka, Noriyuki, Ken-ichi Inoue, Kenjiro Adachi, Hiroshi Kiyonari, Mitsunori Ota, Amy Ralston, Norikazu Yabuta, Shino Hirahara, Robert O. Stephenson, Narumi Ogonuki, Ryosuke Makita, Hiroki Kurihara, Elizabeth M. Morin-Kensicki, Hiroshi Nojima, Janet Rossant, Kazuki Nakao, Hitoshi Niwa, et Hiroshi Sasaki. 2009. « The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass ». *Developmental Cell* 16(3):398-410. doi: 10.1016/j.devcel.2009.02.003.
- Plusa, Berenika, Anna Piliszek, Stephen Frankenberg, Jérôme Artus, et Anna-Katerina Hadjantonakis. 2008. « Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst ». *Development (Cambridge, England)* 135(18):3081-91. doi: 10.1242/dev.021519.
- Saiz, Néstor, Kiah M. Williams, Venkatraman E. Seshan, et Anna-Katerina Hadjantonakis. 2016. « Asynchronous fate decisions by single cells collectively ensure consistent lineage composition in the mouse blastocyst ». *Nature Communications* 7. doi: 10.1038/ncomms13463.
- Uchikawa, Masanori, Yusuke Kamachi, et Hisato Kondoh. 1999. « Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken ». *Mechanisms of Development* 84(1):103-20. doi: 10.1016/S0925-4773(99)00083-0.
- Wicklow, Eryn, Stephanie Blij, Tristan Frum, Yoshikazu Hirate, Richard A. Lang, Hiroshi Sasaki, et Amy Ralston. 2014. « HIPPO Pathway Members Restrict SOX2 to the Inner Cell Mass Where It Promotes ICM Fates in the Mouse Blastocyst ». *PLoS Genetics* 10(10). doi: 10.1371/journal.pgen.1004618.
- Yamanaka, Yojiro, Fredrik Lanner, et Janet Rossant. 2010. « FGF Signal-Dependent Segregation of Primitive Endoderm and Epiblast in the Mouse Blastocyst ». *Development* 137(5):715-24. doi: 10.1242/dev.043471.
- Yuan, H., N. Corbi, C. Basilico, et L. Dailey. 1995. « Developmental-Specific Activity of the FGF-4 Enhancer Requires the Synergistic Action of Sox2 and Oct-3. » *Genes & Development* 9(21):2635-45. doi: 10.1101/gad.9.21.2635.

Legends

Figure 1: Characterization of the STONK site on the *Fgf4* locus

(A) List of TFs analyzed for an *in-silico* motif analysis on *Fgf4* sequence. (B) Localization of NANOG binding sites on the *Fgf4* locus given by the software Genomatix. The red box zooms on the Hom3b locus that displays a NANOG binding site within a 105bp region conserved between eutherian species. The black box details binding site locations of TEAD4, SOX2, OCT4 and KLF4. Green sequence is the 5'UTR region, red sequences represent the exons and the purple sequence is the 3'UTR.

Figure 2: The STONK site is highly conserved in the mammals

(A) Sequence alignments of the mouse STONK site at *Fgf4* locus. The sequences are aligned with ClustalWS performed by the Jalview software. Each color represents a nucleotide. (B) Homology percentage and *E*-values from BLAST analysis of the mouse STONK site with *Fgf4* sequence of each species.

Figure 3: Expression profile of NANOG, SOX2, SOX21 and OCT4 during the development

(A) Immunofluorescence for NANOG, SOX2, SOX21 and OCT4 from the 4-cell stage to the 90-cell stage. One representative embryo per line and per panel. Scale bar = 10µm. (B) Quantification of fluorescence intensity for each marker : each marker was quantified in each cell for each embryo. For each embryo, cells were ranked according to their intensity. The heatmap boxes represent the mean fluorescence intensity per rank in all embryos at the same stage. (C) represent the mean intensity of the 25% most expressing cells for each marker at each stage. Error bars represent \pm S.E.M. N = number of embryos

Figure 4: NANOG, SOX2 and SOX21 expressions correlations

Comparisons of the graphs from **Fig3C**. Spearman correlation test was between NANOG expression and SOX2 (A) and SOX21 expressions (B) in the 25% most NANOG expressing cells or between SOX2 and SOX21 expressions in the 25% most SOX2 expressing cells (C). Asterisks represent significant correlation between expression of the two factors at the corresponding stage (* <0.05, ** < 0.01, *** < 0.001). Error bars represent \pm S.E.M

Figure 5: Hypothesis for *Fgf4* regulation by the STONK site

At the 16-cell stage, TEAD4 and SOX21 are bound to the STONK site and inhibit *Fgf4* expression. During the transition from the 16 to 32-cell stage, TEAD4 and SOX21 expression levels decrease and those of NANOG and SOX2 increase. Thus, NANOG and SOX2 replace TEAD4 and SOX21 on the STONK site and enhance its expression.

Figure 6: SOX21 overexpression has no major effect on TE/ICM differentiation

Immunofluorescence for NANOG, SOX21 and GATA6 on embryos treated with Doxycycline at 1µg/ml at different window times (A) 8-cell stage to 32-cell stage, 8-cell stage to 64-cell stage (B) or 16-cell stage to 64-cell stage (C). Scale bar = 10µm. B, D et E show the Total, TE and ICM cell number for each conditions in A, C et E respectively. *p*.values are from Mann-Whitney test. N = number of embryos.

Figure 7: SOX21 overexpression does not impair populations distribution in the whole ICM

(A, D, G) Scatter plots for NANOG and GATA6 expression levels, represented as logarithm, in individual ICM cells of control or SOX21 OE embryos treated from 8 to 32-cell stage, 8 to 64-cell stage and 16 to 64-cell stage, respectively. Cell identity was assigned using a k-means approach. (B, E, H) Percentage of each population in control or SOX21 embryos from 8 to 32-cell stage, 8 to 64-cell stage and 16 to 64-cell stage respectively. Chi-square test show no significant difference. (C, F, I) Cell number in each population in ICM of control or SOX21 OE embryos from 8 to 32-cell stage, 8 to 64-cell stage and 16 to 64-cell stage, respectively. Multiple t-test show no significant difference. N = number of embryos, n = number of cells

Figure 8: SOX21 overexpression has no effect on cell fate and NANOG or GATA6 expression level

(A-B, D-E, C-E) Relative contribution to the four population for whole ICM cells (ICM) or for the 25% of cells expressing the most SOX21 (Top25) in SOX21 OE embryos treated from 8 to 32 cell stage, from 8 to 64-cell stage and 16 to 64-cell stage, respectively. Chi-square post-hoc test shows significant difference between Epi populations in B, *p*.value < 0,0001. (C, F, I) NANOG and GATA6 expression levels in the whole ICM cells (ICM) or in the 25% of cells expressing the most SOX21 (Top25) in SOX21 OE embryos treated from 8 to 32 cell stage, from 8 to 64-cell stage and 16 to 64-cell stage, respectively.

Figure 9: SOX21, NANOG and GATA6 expressions correlations in SOX21 OE embryos

Scatter plot of SOX21 and NANOG or GATA6 expression levels, represented as logarithm, in individual cells from the 25% most SOX21 expressing cells the in SOX21 OE embryos treated from 8 to 32-cell stage (A, B), 8 to 64-cell stage (C, D) or from 16 to 64-cell stage (E, F). Linear regression line is shown in red. *p*.values indicate correlation.

Figure 10: *Fgf4* is expressed in cells overexpressing SOX21

HCR-RNA-FISH for *Fgf4* and immunofluorescence for SOX21 and pERM/B-Cat in control embryos or SOX21 OE embryos. The red arrows show a cell overexpressing SOX21 but with no *Fgf4* expression, the green arrows show a cell overexpressing SOX21 and expressing *Fgf4* and the white arrows show a cell with no SOX21 but with *Fgf4* expression. Scale bar = 10µm

Figure S1: SOX21 ectopic expression in preimplantation embryo

(A) Immunofluorescence for SOX21 in rtTA^{+/-}; iSox21^{+/-} embryo (red arrows) and a littermate embryo (white arrows). Scale bar = 10µm. (B) SOX21 expression levels in rtTA^{+/-}; iSox21^{+/-} and their littermate embryos after treatment with doxycycline from 8 to 32-cell stage (Littermate embryos; N=27, SOX21 OE embryos; N=15), 8 to 64-cell stage (Littermate embryos; N=27, SOX21 OE embryos; N=8) or 16 to 64-cell stage (Littermate embryos; N=31, SOX21 OE embryos; N=12). *p*.values are from a Mann-Whitney test. (C) Total cell number and TE and ICM cell number in CD1 embryos and treated rtTA^{+/-}; iSox21^{+/-} littermate embryos. CD1 embryos; N=8, Littermate embryos; N=8. Multiple t test shows no significant difference.

Figure S2: SOX21 overexpression has a minor impact on NANOG and GATA6 expression levels in the ICM.

NANOG and GATA6 expression levels in whole ICM and in each population of control or SOX21 OE embryos treated from 8 to 32-cell stage (Control embryos; N=27, SOX21 OE embryo; N=15) (A, B), 8 to 64-cell stage (Control embryos; N=27, SOX21 OE embryo; N=8) (C, D) or from 16 to 64-cell stage (Control embryos; N=31, SOX21 OE embryo; N=12) (E, F). *p*.values are from Mann-Whitney test.

Figures and tables

Figure 1

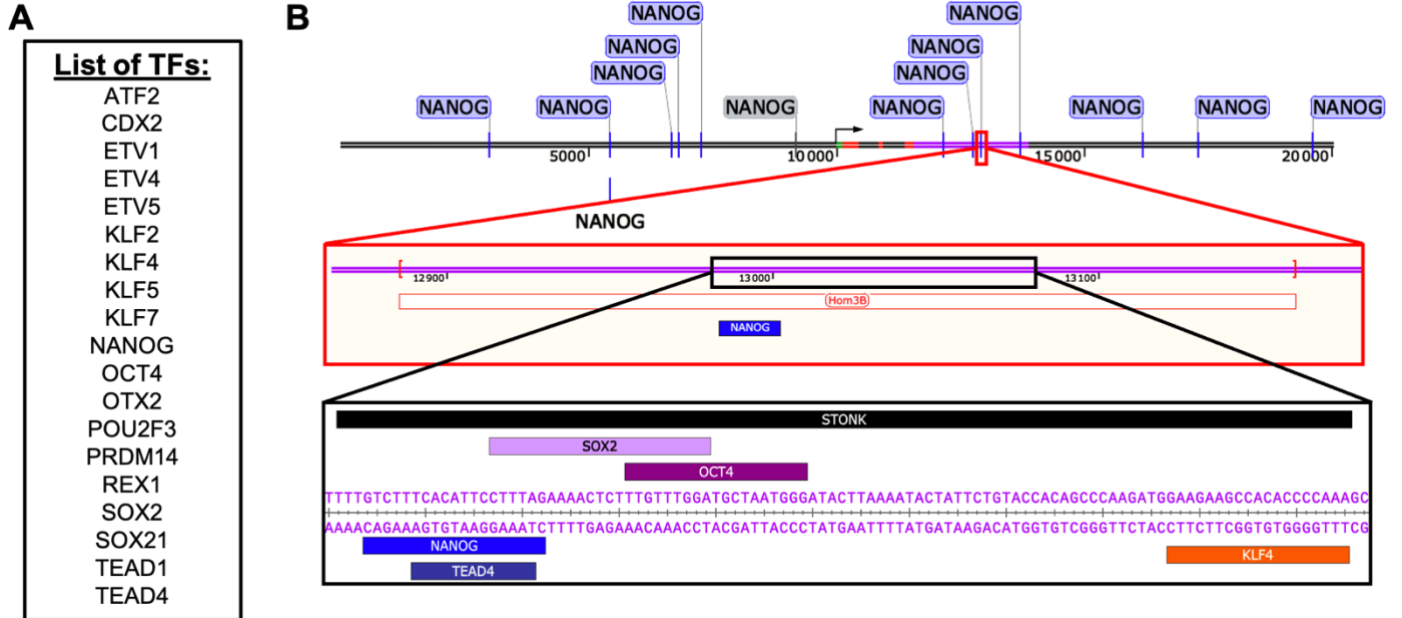


Figure 2

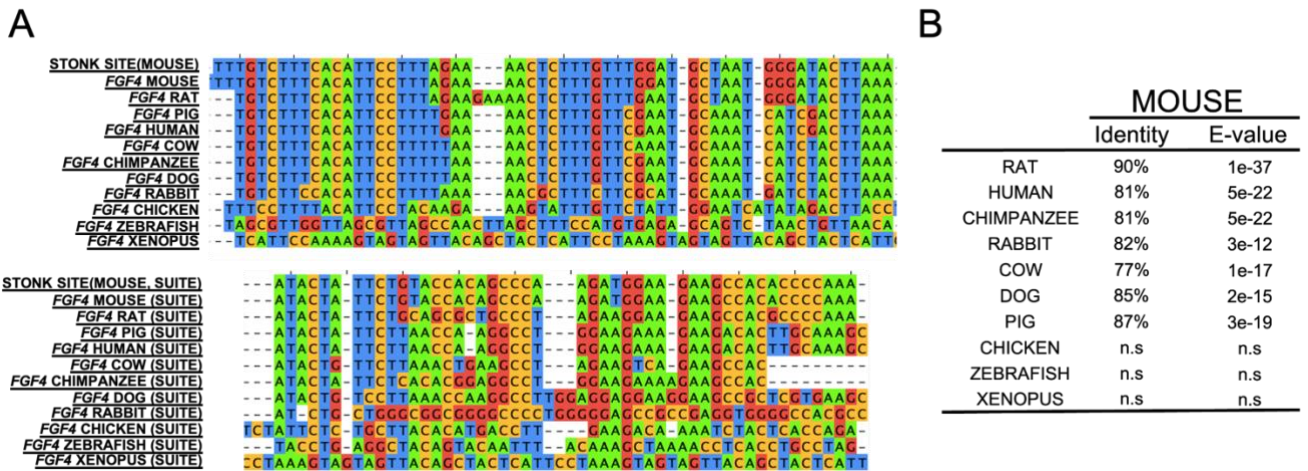


Figure 3

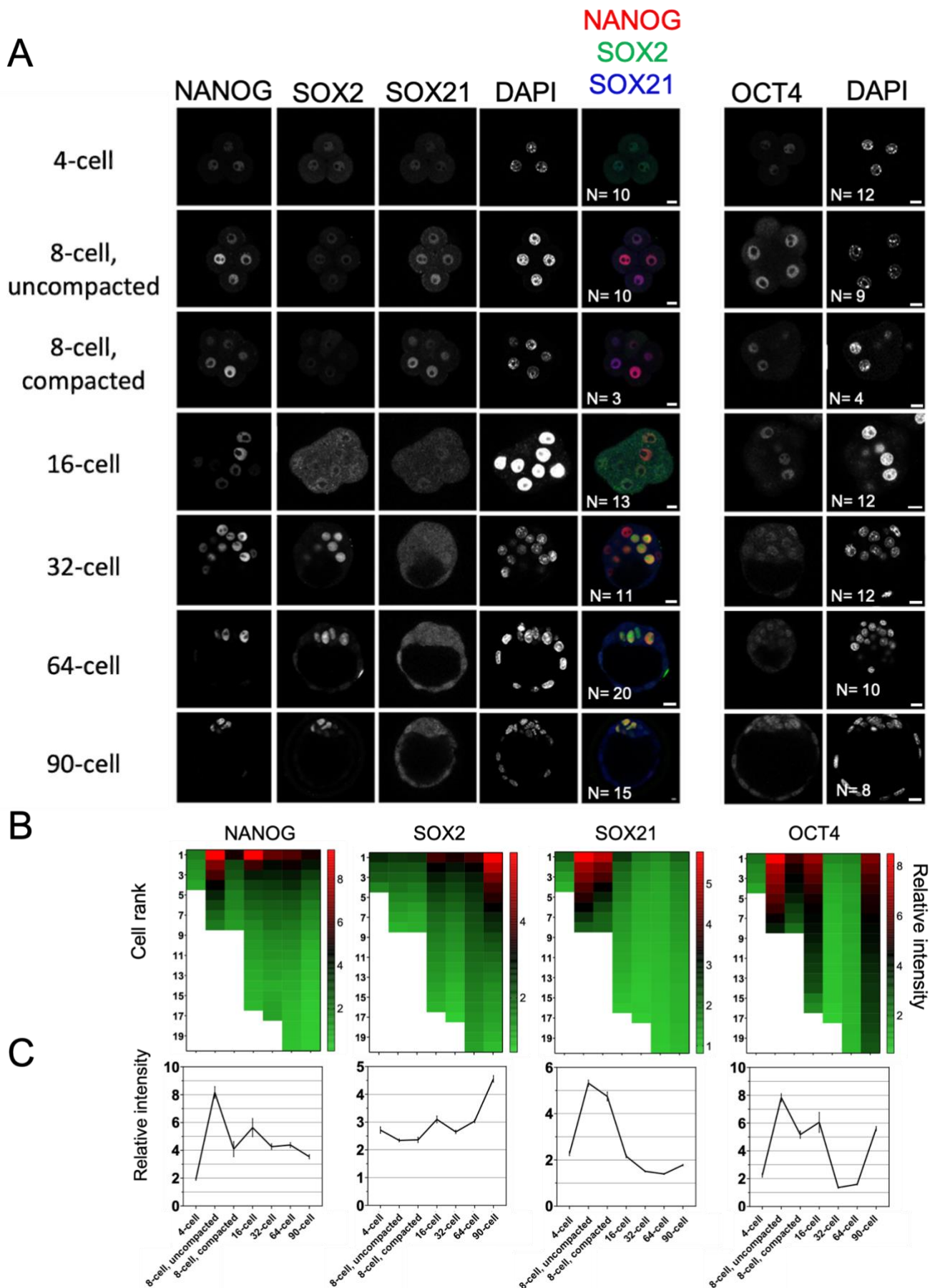


Figure 4

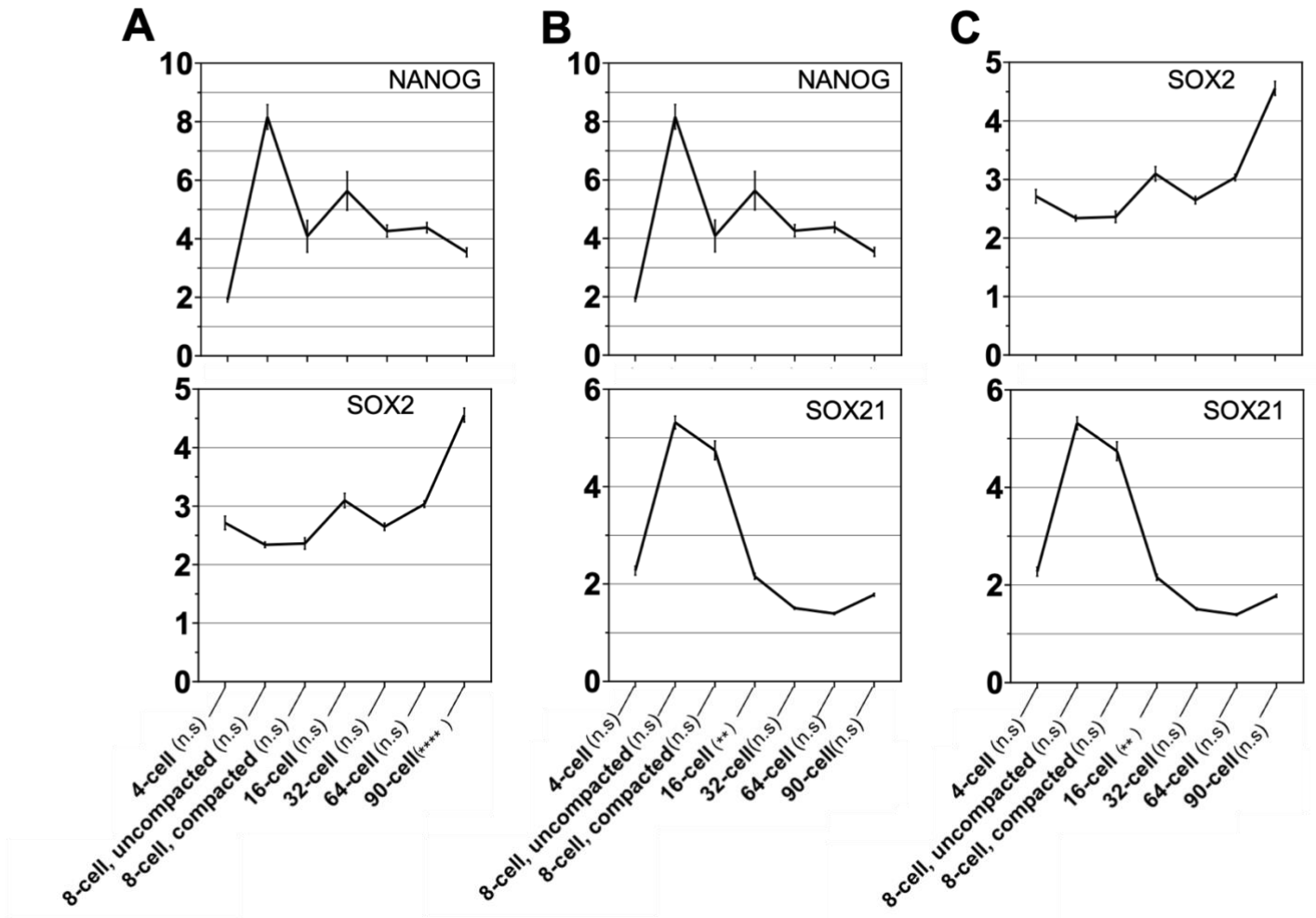


Figure 5

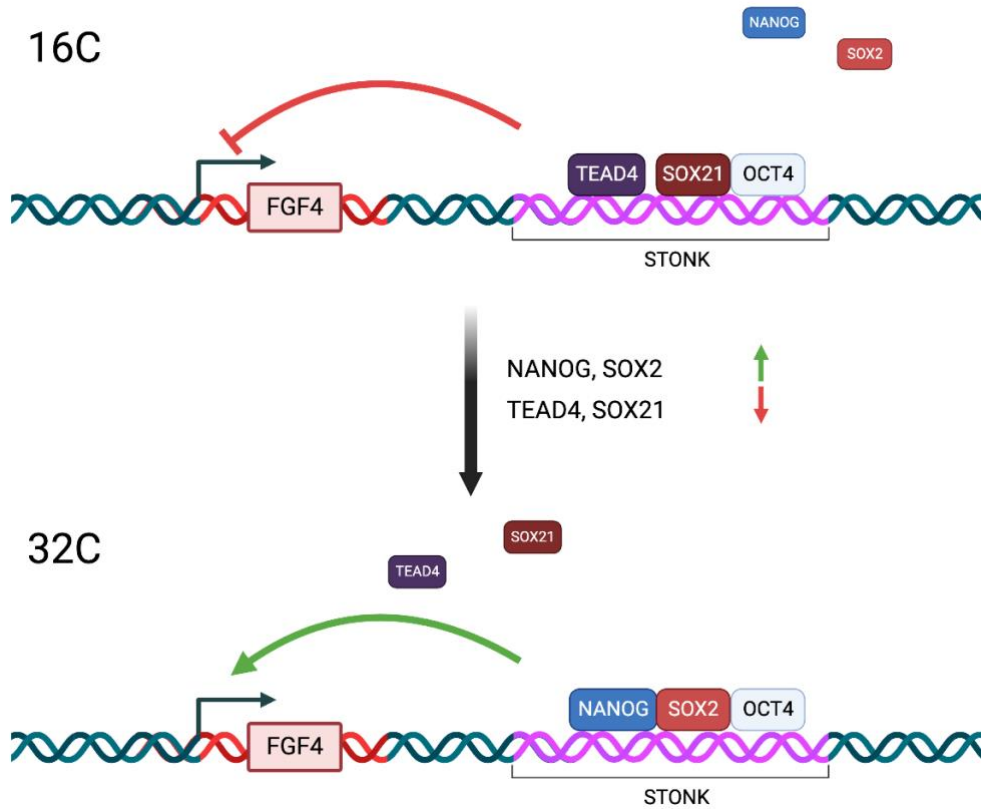


Figure 5

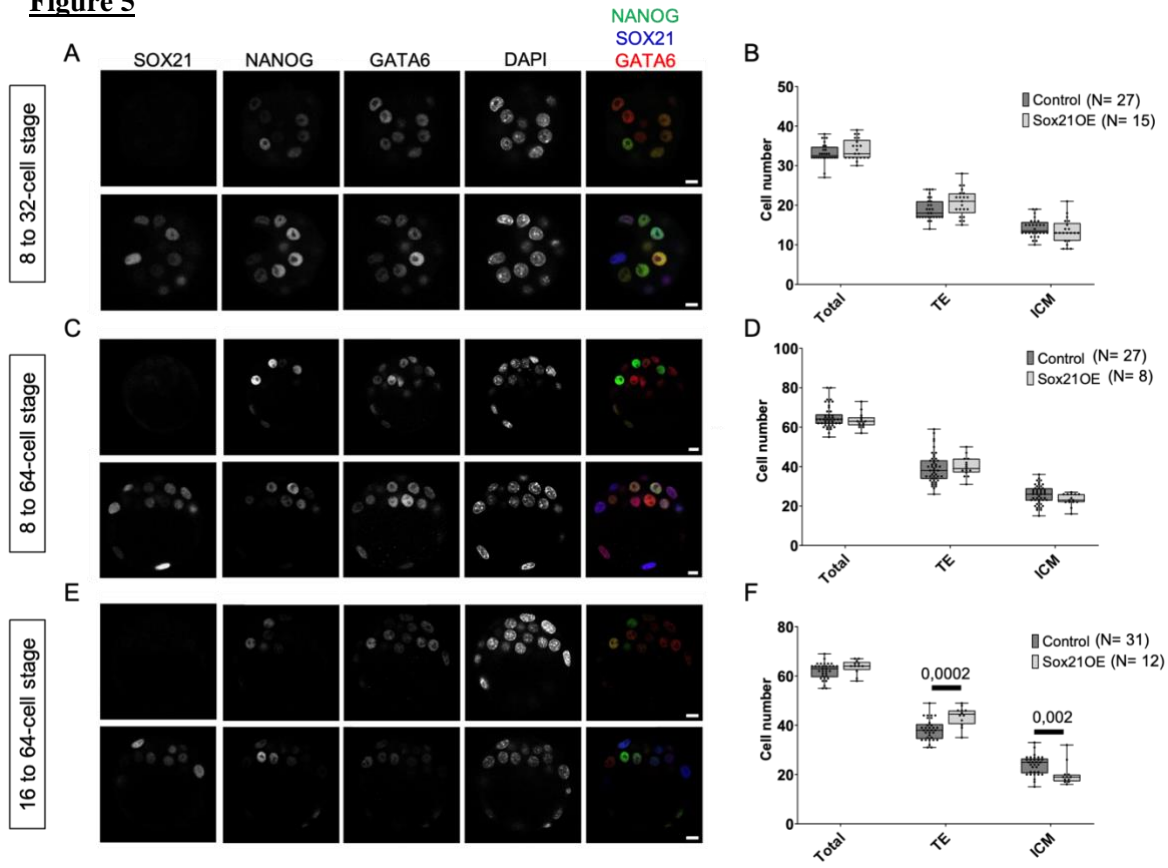


Figure 6

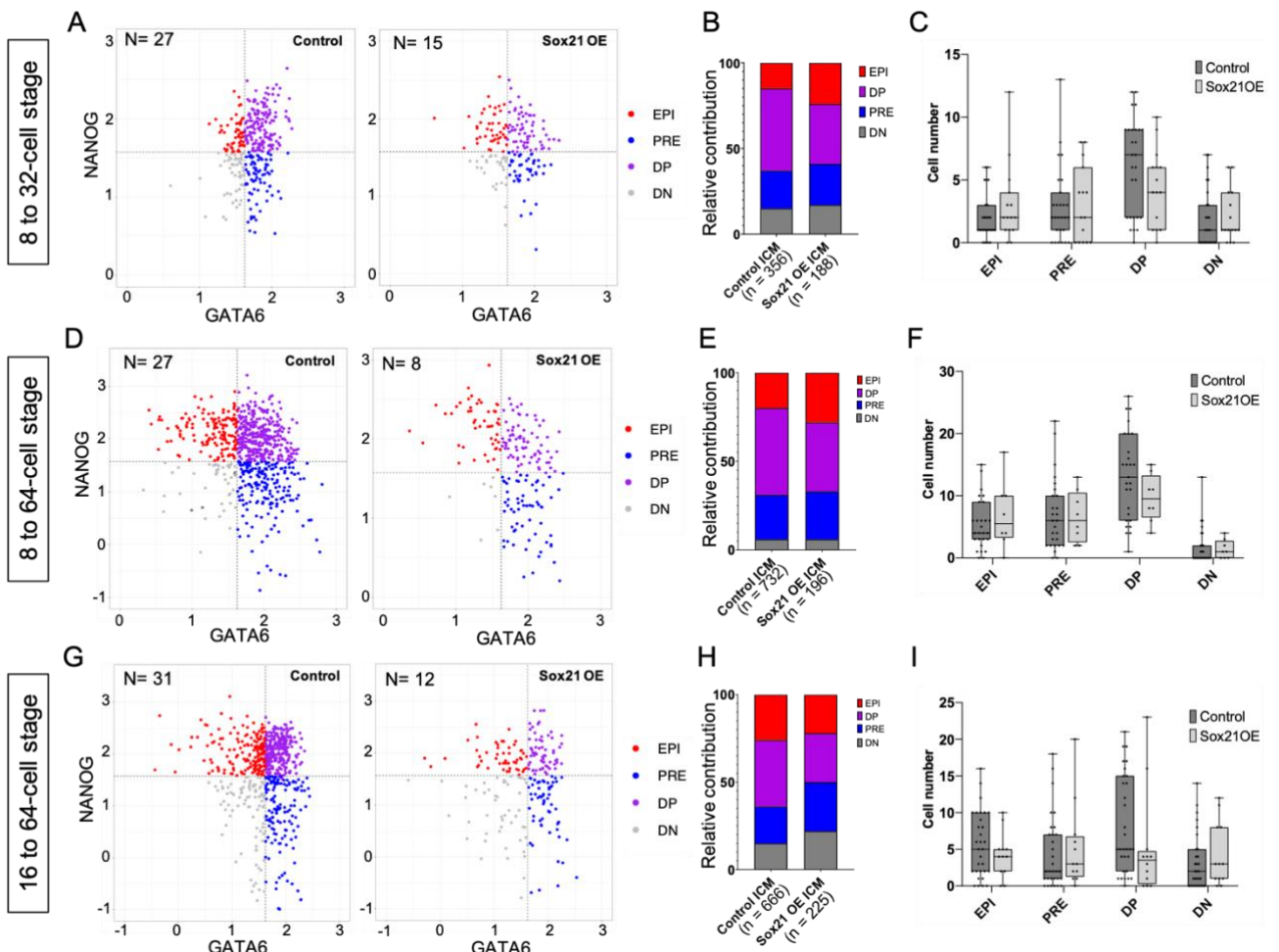


Figure 7

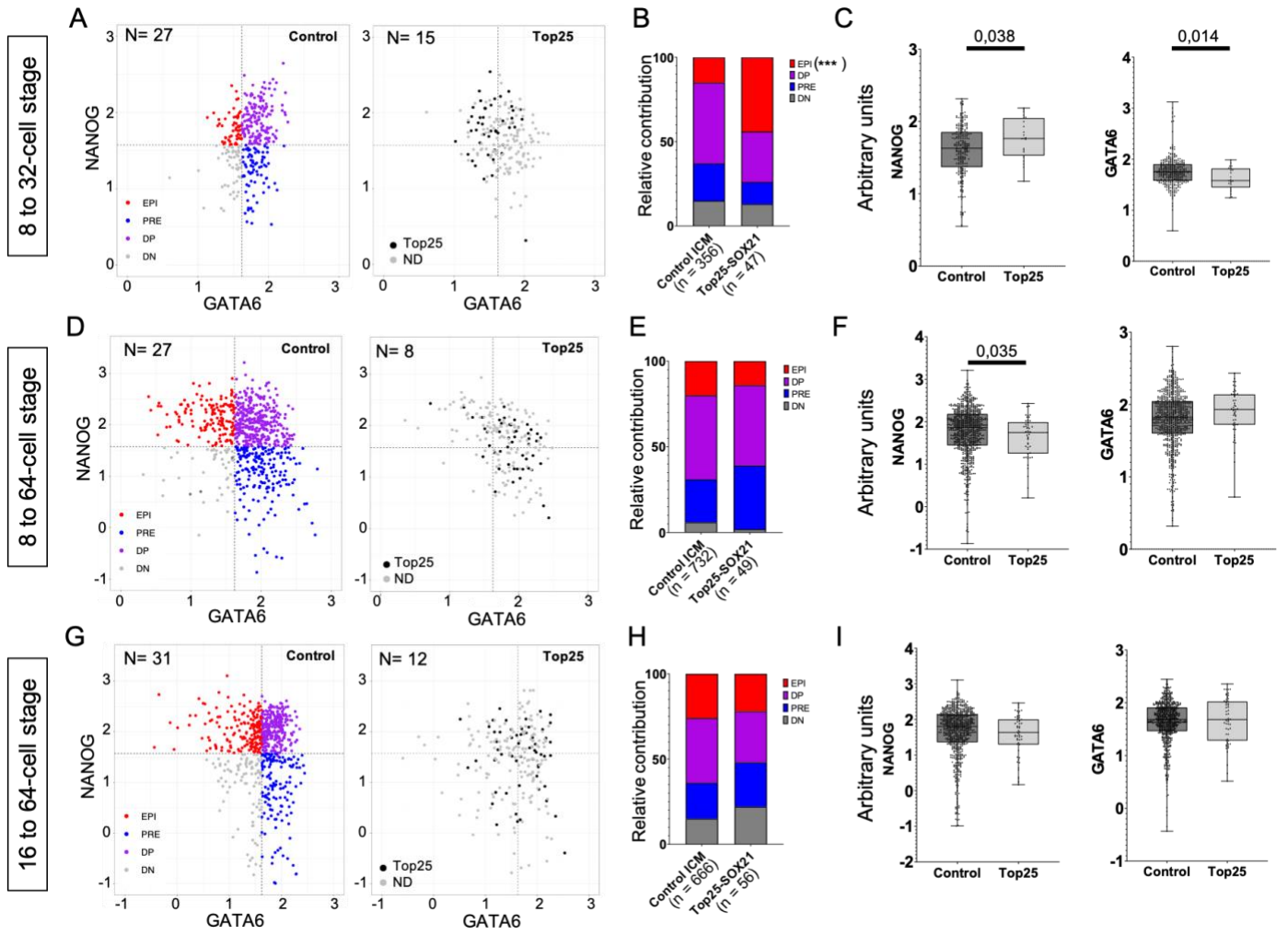


Figure 8

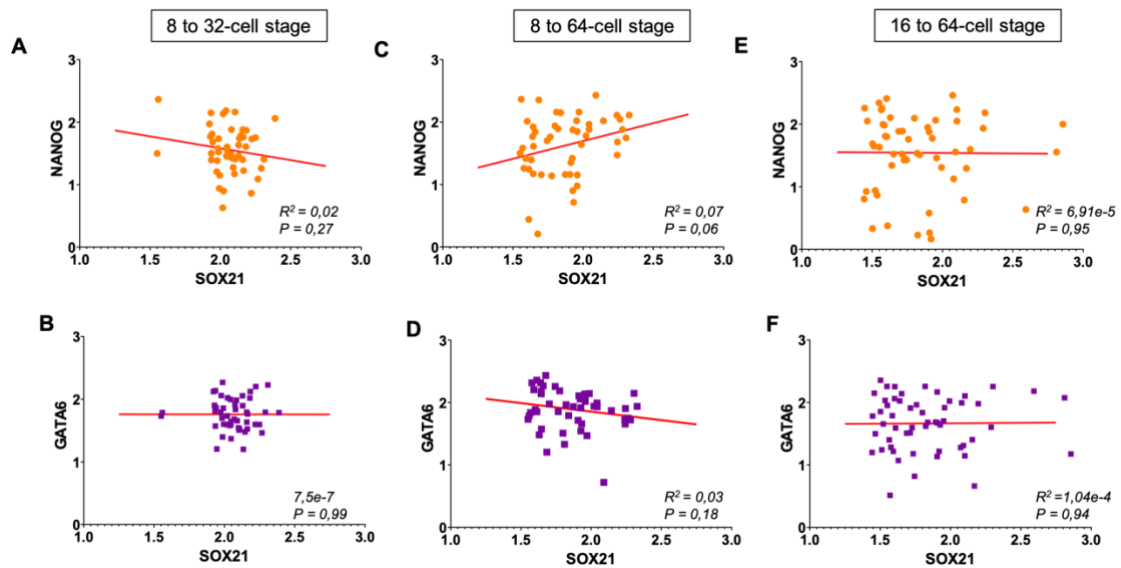


Figure 9

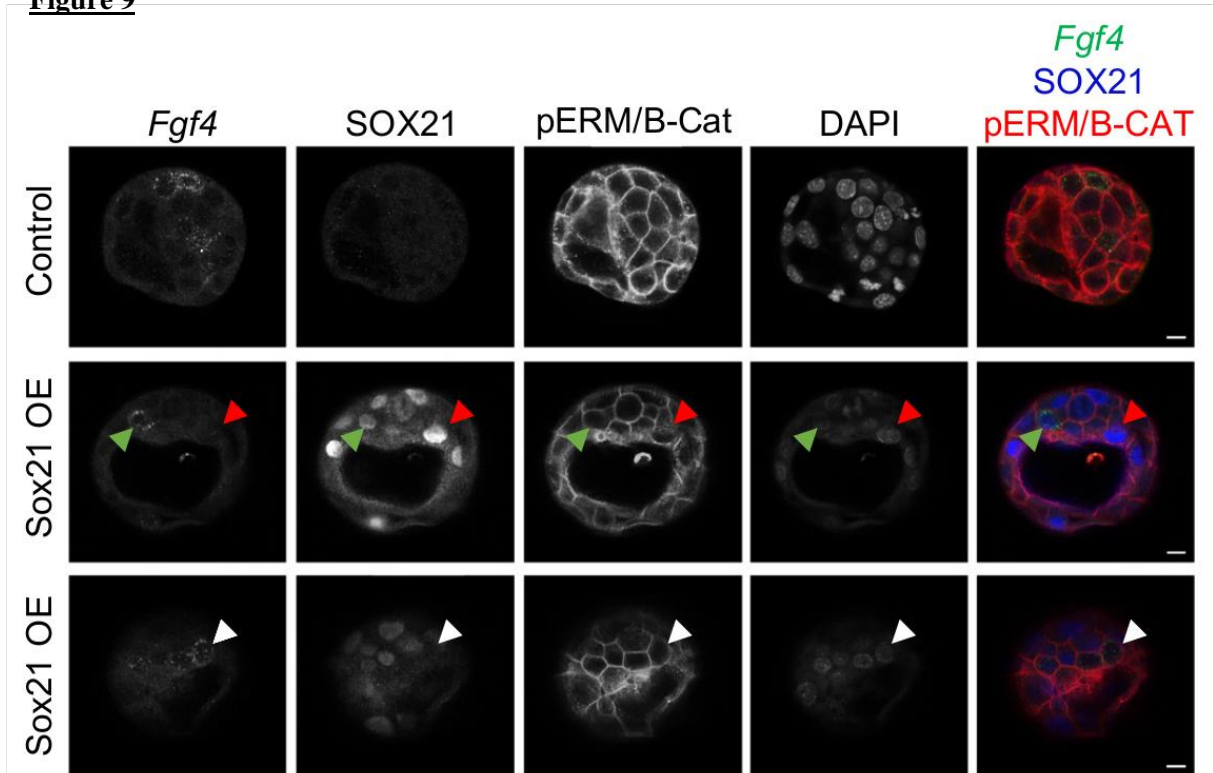


Figure S1

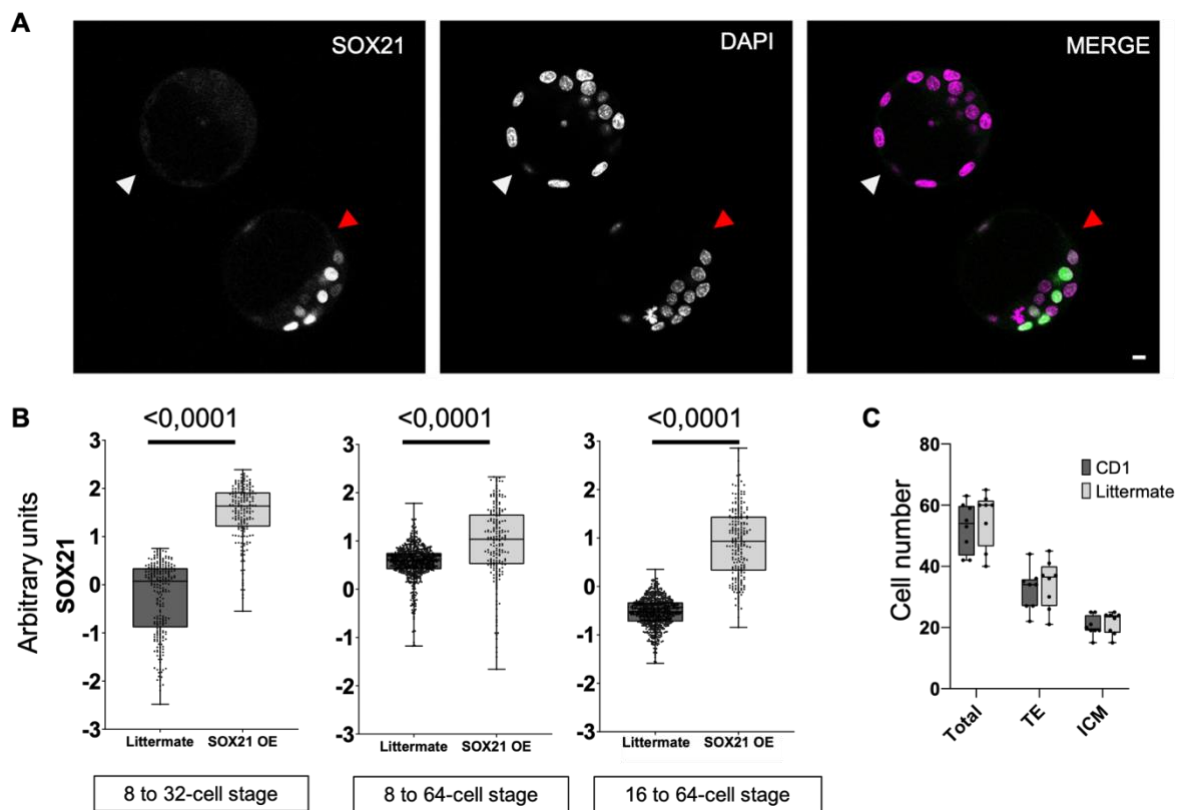


Figure S2

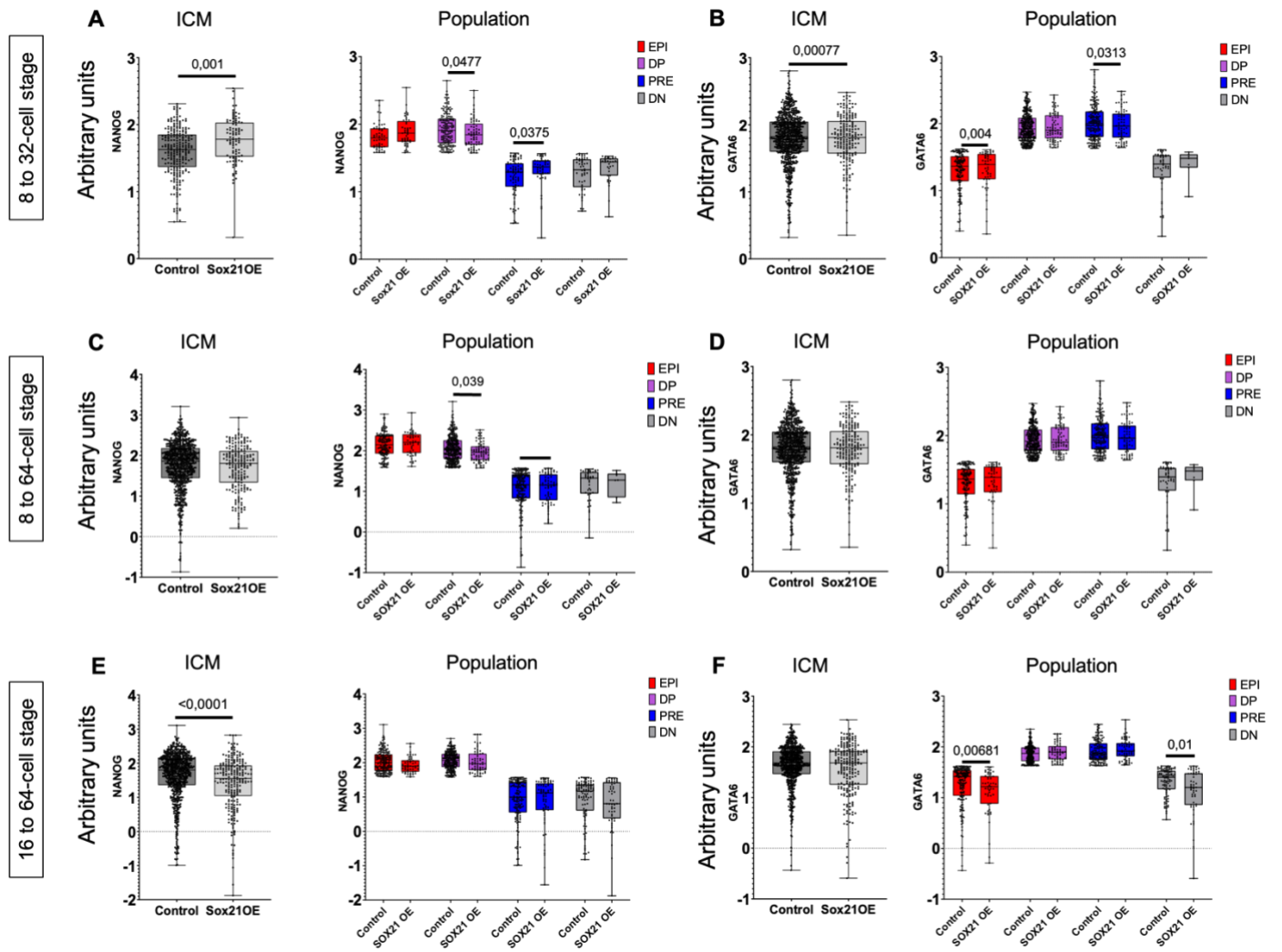


Table 1: List of primary antibodies

<u>Protein</u>	<u>Host</u>	<u>Dilution</u>	<u>Manufacturer</u>	<u>Reference</u>
OCT3/4 (C-10)	Mouse	1/300	Santa cruz	sc-5279
B CATENIN	Rabbit	1/300	Sigma-aldrich	C2206
CDX2	Mouse	1/1	Abcam	ab86949
GATA6	Rabbit	1/300	Cell signaling	#5851
NANOG	Rabbit	1/100	Abcam	ab80892
NANOG	Rat	1/100	Ebioscience	14-5761
SOX2	Mouse	1/100	Millipore	MAB4423
SOX21	Goat	1/100	R&d systems	AF3538
TEAD4	Mouse	1/100	Abcam	ab58310

Table 2: List of secondary antibodies

<u>Target</u>	<u>Host</u>	<u>Conjugate</u>	<u>Dilution</u>	<u>Manufacturer</u>	<u>Reference</u>
Mouse	Donkey	Alexa 488	1/300	Life tech	A21202
Rat	Donkey	Alexa 488	1/300	Life tech	A21208
Goat	Donkey	Cy5	1/300	Jackson Immunoresearch	711-165-152
Rabbit	Donkey	Cy3	1/300	Jackson Immunoresearch	705-175-147
Rat	Donkey	Cy5	1/300	Jackson Immunoresearch	712-175-153

Autres résultats

<u>Référence</u>	<u>Répétition</u>	<u>Voltage (V)</u>	<u>Temps de pulse (ms)</u>	<u>Nb pulse</u>	<u>Uni/Bipolaire</u>	<u>Matériel</u>	<u>Embryons survécus</u>	<u>Fluorescence</u>
<i><u>Peng, Wu, et Zhang 2012</u></i>	1	33	1	2	Uni	Plasmide	17/21	0
<i><u>Grabarek et al. 2002</u></i>	1	33	1	4	Uni	Plasmide	5/9	0
<i><u>Hashimoto et Sasaki 2019</u></i>	2	25	3	5	Bi	Plasmide	0	0
<i><u>Adaptation de Hashimoto et Sasaki 2019</u></i>	1	25	3	5	Uni	Plasmide	8/8	0
<i><u>Adaptation de Hashimoto et Sasaki 2019</u></i>	2	20	3	5	Bi	Plasmide	7/7	0
<i><u>Kaneko et Mashimo 2015</u></i>	1	225	30	4	Uni	Plasmide	0	0
	2	20	50	5	Bi			
<i><u>Adaptation de Kaneko et Mashimo 2015</u></i>	1	25	2	4	Uni	Plasmide	12/23	0
	2	7	50	4	Bi			
<i><u>Hashimoto, Yamashita, et Takemoto 2016</u></i>	1	30	3	7	Uni	ARNm	9/41	41/41
<i><u>Adaptation de Hashimoto, Yamashita, et Takemoto 2016</u></i>	1	25	3	7	Uni	ARNm	8/36	36/36

Tableau 3 : Tableau des différents protocoles d'électroporation expérimentés

I. Développement d'outils dans l'étude de la régulation des gènes épiblastiques par TEAD4 et SOX21

A. Tentative de mise au point d'un protocole d'électroporation sur embryons

En parallèle de l'impact de la surexpression de SOX21 dans le développement précoce de l'embryon, il serait intéressant d'étudier l'effet de la délétion de SOX21 et de TEAD4 sur la spécification de l'épiblaste. A ce stade du développement, le rôle de SOX21 a seulement été étudié par inhibition de son expression avec un système de siARN (Goolam et al. 2016) avec très peu de données sur la différenciation Epi/EPr. Quant à TEAD4, les embryons *Tead4*^{-/-} ont permis de comprendre son rôle dans la différenciation entre TE et MCI (Nishioka et al. 2008; Yagi et al. 2007). De plus, son inhibition par un système de siARN semble impacter la différenciation Epi/EPr (Mihajlović et al. 2015), mais ce lien n'a jamais clairement été établi.

J'ai testé plusieurs protocoles d'électroporation afin de délivrer le système CRISPR-Cas9 et déléter *Tead4* ou *Sox21* au niveau du zygote. Dans un premier temps, un plasmide codant pour l'histone H2B couplée à la GFP dans des embryons au stade 2-cellules a été choisi, l'équipe l'ayant utilisé auparavant lors d'électroporations au stade 8-cellules. J'ai fait varier plusieurs paramètres (**Tableau 3**), cependant, soit les embryons ne survivent pas au choc électrique ou à la mise en culture, soit les embryons ayant survécu ne présentent pas de fluorescence.

Il est possible alors que le plasmide était de trop grande taille pour être électroporé dans l'embryon. Ainsi, il a été choisi d'électroporer de l'ARNm codant pour de la GFP à la place du plasmide. Bien que tous les embryons électroporés présentent une fluorescence, le taux de survie des embryons est bas (20%). De plus, même si l'embryon survit, il arrive fréquemment qu'un des deux blastomères soit endommagé durant l'électroporation, créant alors un défaut de croissance de l'embryon.

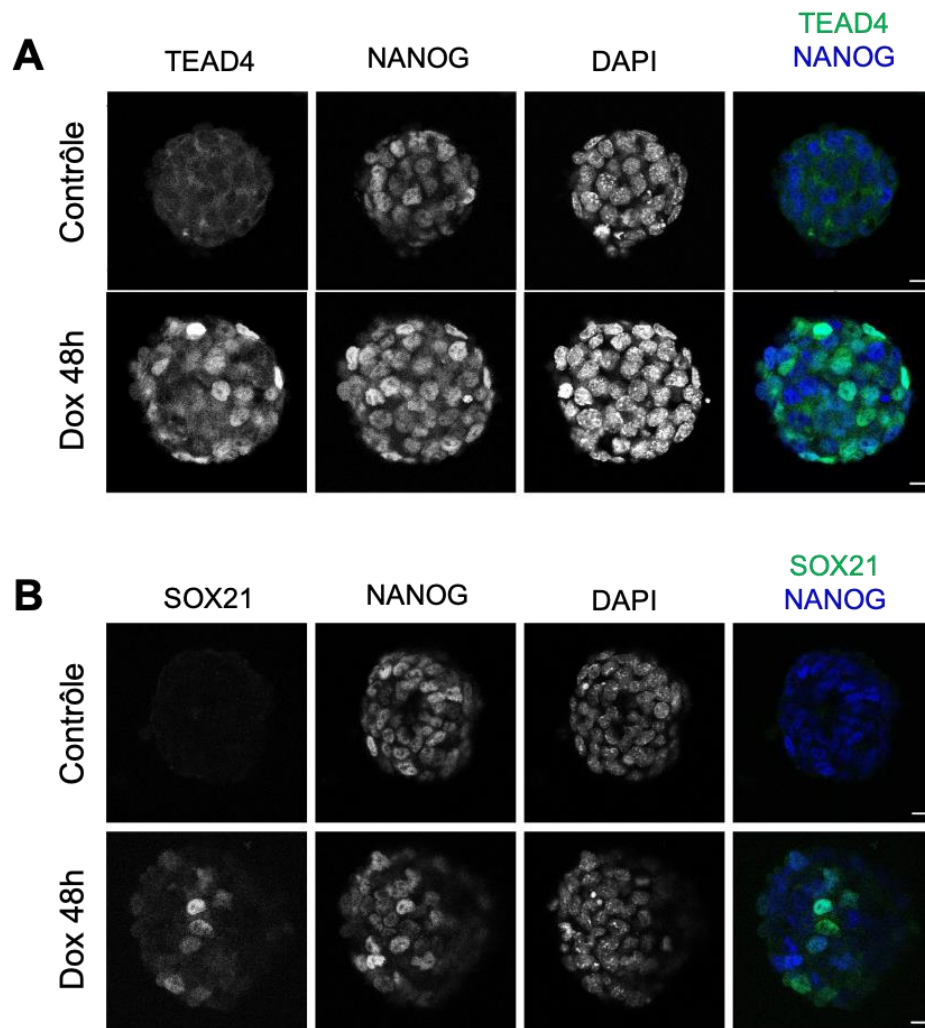


Figure 31: Surexpression de TEAD4 et SOX21 dans les cellules ES

Immunomarquage de TEAD4 et NANOG ou SOX21 et NANOG dans des cellules ES iTead4 (A) et iSox21 (B). Les cellules ont été cultivées pendant 48h sans (Contrôle) ou en présence de doxycycline (Dox 48h). Echelle = 10 μ m.

Pour pallier ce problème, il a alors été décidé d'électroporer des zygotes. Cependant, il est connu que le stade 2-cellules est une étape difficile à passer *in vitro* (« 2-cell block » (Biggers, Gwatkin, et Brinster 1962; Whitten 1957)). Utiliser des fonds génétiques différents, notamment des hybrides F1 B6D2F1 (Chatot et al. 1990) permet de contourner ce problème. Des résultats préliminaires montrent que les embryons issus de femelles B6D2F1 présentent de la fluorescence lorsqu'ils sont électroporés avec de l'ARNm GFP et survivent tous à l'électroporation et à la culture.

B. Étude de la surexpression de TEAD4 et SOX21 dans les cellules ES

En parallèle de l'analyse du rôle de SOX21 et de TEAD4 dans la spécification de l'épiblaste *in vivo*, j'ai étudié la fixation de ces facteurs sur l'enhancer de *Fgf4*. Malheureusement, il est difficile d'analyser ces mécanismes dans l'embryon à cause du faible nombre de cellules présentes. J'ai donc utilisé les cellules ES, bien qu'elles soient déjà dans un état d'Epi (Boroviak et al. 2014). Afin d'étudier ces mécanismes, des lignées de cellules ES avec un transgène *Sox21* (iSox21) ou *Tead4* (iTead4) inductible à la doxycycline ont été générées (collaboration avec I. Aksoy, SBRI Lyon) avec le système KH2 (Beard et al. 2006). Lorsque les cellules ES iSox21 et iTead4 sont cultivées sans doxycycline, il n'y a pas de marquage nucléaire pour SOX21 ou TEAD4 respectivement (**Figure 33**), car les gènes endogènes ne sont pas exprimés dans les cellules ES ou Epi. Cependant, il est observé un marquage faible et diffus autour du noyau dans les cellules iTead4, ce qui pourrait peut-être indiquer une présence cytoplasmique de TEAD4 (**Figure 33A**) (Home et al. 2012). Lorsque les deux lignées sont traitées avec de la doxycycline pendant 48h, il est observé un fort marquage nucléaire, que ce soit dans les cellules iTead4 et iSox21 (**Figure 33**). Cependant, il est intéressant de noter que de la même façon que dans les embryons $rtTA^{+/-}; iSox21^{+/-}$, les facteurs TEAD4 et SOX21 sont induits de manière très hétérogène entre les cellules.

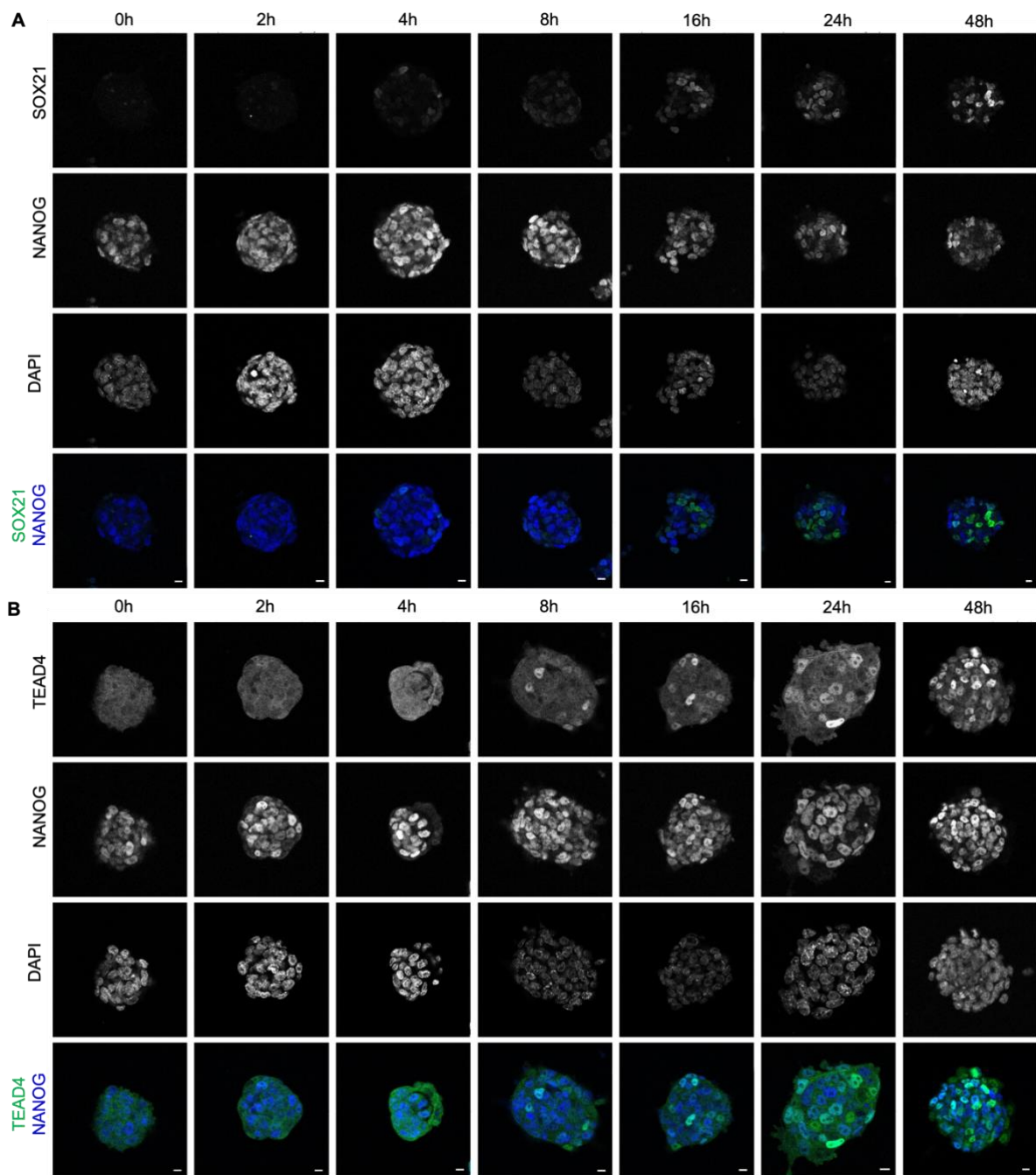


Figure 32: Cinétique de la surexpression de SOX21 et TEAD4 dans les cellules ES

Immunomarquage de SOX21 et NANOG ou TEAD4 et NANOG dans des cellules ES iSox21 (A) et iTead4 (B). Les cellules ont été cultivées pendant 48h sans doxycycline (0h) ou en présence de doxycycline pendant le temps indiqué. Echelle = 10 μ m.

Selon notre hypothèse, il y a une compétition entre les facteurs de transcription TEAD4 et SOX21 avec NANOG et SOX2, respectivement, pour se fixer sur l'enhancer de *Fgf4*. Avec les cellules iTead4 et iSox21 il est possible de suivre l'évolution de la fixation de ces facteurs au cours du temps lors de l'induction de TEAD4 ou de SOX21. Une cinétique d'induction de l'expression de TEAD4 et SOX21 a été réalisée afin de déterminer les délais de production des protéines. Les cellules ES iSox21 et iTead4 ont été traitées avec de la doxycycline pendant différentes périodes, allant de 2h jusqu'à 48h. Dans les cellules iSox21, SOX21 commence à être détecté dans quelques cellules à partir de 4h de traitement. Ensuite, de 8h à 24h, il y a une augmentation de cellules exprimant SOX21 et aussi avec une plus forte intensité (**Figure 34A**). La quantification du nombre de cellules induites ainsi que la quantification de la fluorescence sont encore à réaliser. Dans les cellules iTead4, l'expression de TEAD4 est induite à partir de 8h de traitement et atteint un plateau après 24h de traitement (**Figure 34B**). Mais comme pour les cellules iSox21, des quantifications doivent être réalisées pour confirmer ces résultats. De plus, que ce soit dans les cellules iSox21 ou iTead4, la surexpression est hétérogène à tous les temps de traitement.

Sur ces lignées, des expériences Cut&Run seront réalisées pour étudier la dynamique de fixation de ces facteurs ainsi que celles de NANOG et SOX2. Les analyses de cinétiques indiquent de réaliser ces expériences après 4h et 16h d'induction pour les cellules iSox21, et 8h et 16h pour les cellules iTead4, afin d'étudier la compétition potentielle entre ces facteurs. De plus, mes travaux se sont focalisés sur le gène *Fgf4*, mais les expériences de Cut&Run permettront aussi d'étudier les autres gènes épiblastiques. Dans les cellules ES, il a déjà été montré pour plusieurs d'entre eux, tels que *Prdm14* (PR domain containing 14), *Zscan10* (Zinc finger and SCAN domain containing 10) et *Klf2*, qu'ils pouvaient être liés par les facteurs de pluripotence NANOG, SOX2 et OCT4 (Chen et al. 2008; Festuccia et al. 2019; Kim et al. 2008; Loh et al. 2006). Toutefois, comme pour *Fgf4*, peu de données montrent la présence de TEAD4

sur les séquences régulatrices de ces gènes. En outre, l'analyse de la liaison de TEAD4 sur ces gènes et de leur expression dans les cellules ES iTead4 permettra d'approfondir les connaissances sur la régulation potentielle de TEAD4 sur la spécification en Epi. Cependant à cause de l'hétérogénéité observée, il se peut que des expériences faites sur colonies entières ne représentent pas ce qu'il se passe réellement dans les cellules induites. Il sera alors judicieux de réaliser un tri cellulaire au préalable afin d'étudier uniquement les cellules qui surexpriment TEAD4 ou SOX21.

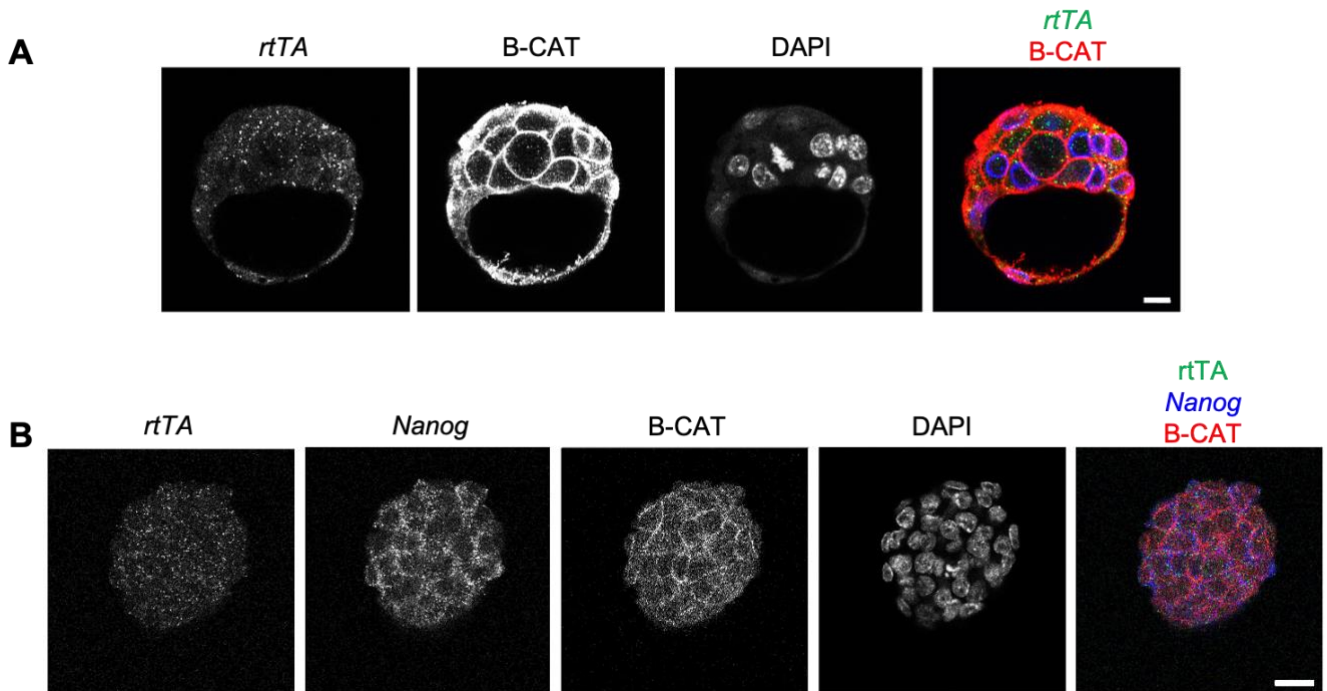


Figure 33: Etude de l'expression de l'ARNm de *rtTA*

(A) HCR-RNA-FISH contre *rtTA* et immunomarquage de la B-CAT dans des embryons *rtTA*^{+/-}; *iSox21*^{+/-} au stade 64-cellules. (B) HCR-RNA-FISH contre *rtTA* et *Nanog* et immunomarquage de B-CAT sur des cellules ES *iSox21*. Echelle = 10µm.

II. Induction d'une expression hétérogène avec le système rtTA/Doxycycline

Dans nos expériences *in vivo* et *in vitro*, le système d'induction à la doxycycline a montré une forte hétérogénéité dans l'expression des facteurs SOX21 ou TEAD4. Dans les embryons $rtTA^{+/-}$; $iSox21^{+/-}$, les cellules $iSox21$ et les cellules $iTead4$ le transgène $rtTA$ est inséré au locus ROSA26, réputé pour son expression ubiquitaire. Une hypothèse serait que la surexpression hétérogène de SOX21 ou de TEAD4 dans l'embryon ou dans les cellules provienne d'une expression hétérogène de $rtTA$.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé du HCR-RNA-FISH contre l'ARNm de $rtTA$ dans des embryons $rtTA^{+/-}$; $iSox21^{+/-}$ ainsi que sur les cellules $iTead4$ ou $iSox21$. Les résultats préliminaires indiquent que $rtTA$ est exprimée de manière hétérogène dans l'embryon au stade 64-cellules (**Figure 35**). Les expériences sur les cellules $iTead4$ ou $iSox21$ montrent une expression plus faible de $rtTA$ mais qui semble plus homogène entre les cellules que dans l'embryon. Cependant, il sera nécessaire de quantifier ces résultats pour savoir plus précisément comment $rtTA$ est exprimé dans ces cellules.

Le locus ROSA26 dans lequel le transgène est inséré est connu pour être ubiquitaire, ce qui indique qu'il n'est à priori pas soumis à des régulations par modification de la chromatine (Chen et al. 2011; Li et al. 2018; Zambrowicz et al. 1997). Il se pourrait alors que cette hétérogénéité soit simplement expliquée par des variations stochastiques de la transcription de $rtTA$ (Raj et van Oudenaarden 2008).

Cependant, d'autres hypothèses existent pour expliquer cette induction hétérogène, que ce soit dans les cellules ou dans l'embryon. Dans l'embryon, il est observé une induction de SOX21 plus forte dans les cellules du TE. Il est possible alors que la doxycycline ne soit pas distribuée de manière homogène entre toutes les cellules de l'embryon. De plus, la localisation

de l'insertion du transgène inductible pour *Sox21* dans l'embryon n'est pas connue (Eenjes et al. 2021), et pourrait être soumise à des modifications de la chromatine. Dans les cellules iTead4 et iSox21, les transgènes sont insérés au locus du gène *Col11a1* (Collagen, type XI, alpha 1) (Beard et al. 2006). Cependant, il n'est pas connu comment ce locus est régulé dans les cellules ES. Enfin, même si la protéine rtTA est exprimée de façon homogène entre les cellules, son activité transcriptionnelle sur les transgènes inductibles pourrait se faire de façon stochastique, ce qui induirait alors une expression discontinue des transgènes et donc de l'hétérogénéité (Becskei, Kaufmann, et van Oudenaarden 2005).

Matériels et Méthodes additionnels

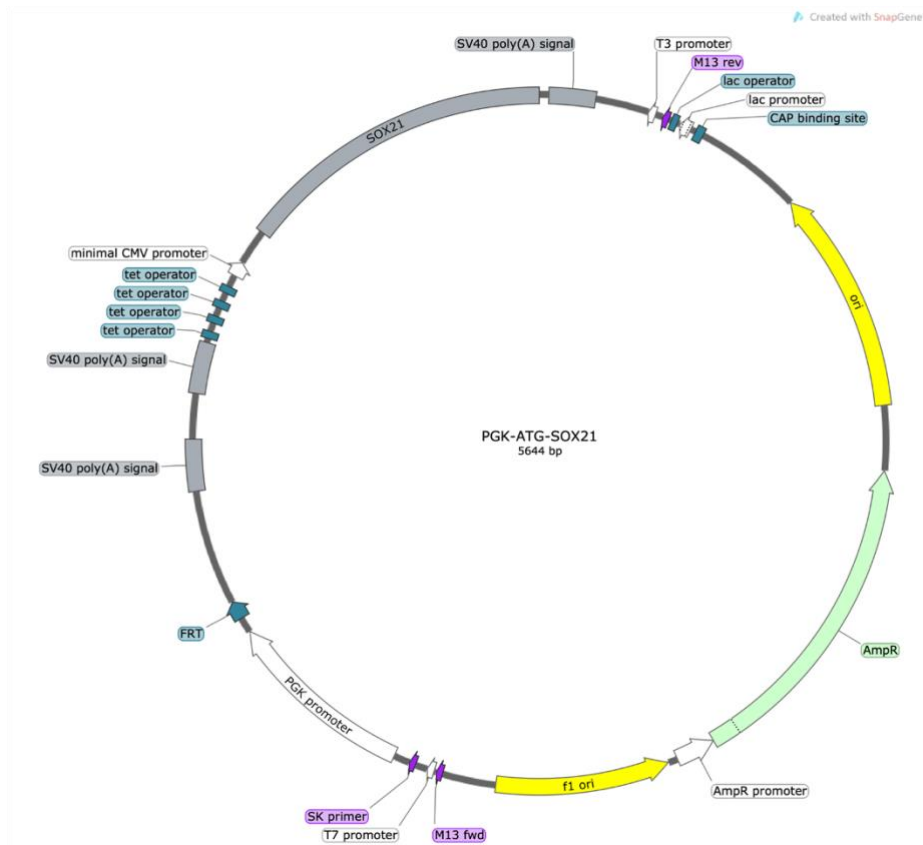


Figure 34: Représentation schématique des plasmides utilisés pour la génération des lignées de cellule ES iTea4 et iSox21

Cellules ES

Le plasmide PGK-ATG-Tead4 (**Figure 36**) a été généré par introduction de l'ADNc de *Tead4*, cloné à partir du plasmide pcDNA3.1-pA83-Tead4 (Riken, Cat N° : RDB12185), dans le vecteur pgk-ATG-frt (Addgene, Plasmid #20734) au niveau des sites EcoR1. L'ADNc de *Tead4* a été introduit à l'aide du NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (E5520S). Le plasmide PGK-ATG-Sox21 (**Figure 36**) a été généré par introduction de l'ADNc de *Sox21*, cloné à partir du plasmide pcDNA3.1-Sox21 (Genscript, Clone ID : OMu58566), dans le vecteur pgk-ATG-frt (Addgene, Plasmid #20734) au niveau des sites EcoR1. La génération du plasmide PGK-ATG-Sox21 a été sous-traité par la société Eurofins Genomics.

Les cellules ES KH2-iTead4 et KH2-iSox21 ont été générées sous la supervision d'Irène Aksoy (SBRI, Lyon). Les plasmides PGK-ATG-Tead4 ou PGK-ATG-Sox21 et le plasmide pCAG-Flpe (Addgene, Plasmid #13787) ont été électroporés dans les cellules ES KH2 (2 pulses de 20ms à 1300V). Les clones ont ensuite été sélectionnés à l'hygromycine 100µg/ml.

Les cellules ont été maintenues en culture sur boîtes plastiques de 60mm préalablement traitées avec de la gélatine porcine diluée dans de l'eau stérile à 0,1% (Sigma Aldrich) avec du milieu DMEM supplémenté avec 15% de FBS décomplémenté, 1mM de Sodium Pyruvate, 1mM de Glutamax, 100µM β-mercaptoéthanol et 1000U/ml LIF. Le traitement à la doxycycline (Doxycycline D9891, Sigma) est réalisé avec une concentration finale de 1µg/ml. Pour les immunomarquages et l'HCR-RNA-FISH, les cellules ont été cultivées selon les mêmes conditions mais sur lamelles en plastique (SPL, Coverslips #20012) dans des plaques 4 puits. Avant immunomarquage ou HCR-RNA-FISH, le milieu a été retiré des puits et les cellules ont été délicatement rincées deux fois avec du PBS, puis fixées dans le PFA.

Électroporation sur embryons

Les embryons au stade 2-cellules ont été collectés par injection de M2 dans les oviductes. Les zygotes ont été récupérés en ouvrant l'ampoule. Pour retirer les cellules du cumulus, les zygotes ont été traités avec de la hyaluronidase diluée à 300 μ g/ml dans du M2, puis rincés dans des gouttes successives de M2. Les embryons ont ensuite été rincés dans 3 gouttes successives d'Opti-MEM, puis déposés entre les électrodes dans 5 μ l d'OptiMEM contenant le plasmide pCX-H2B-GFP à 50ng/ μ l ou l'ARNm GFP à 100ng/ μ l (Miltenyl Biotec, 130-101-114). Après électroporation (**Tableau 3**) les embryons sont rincés dans 3 gouttes successives de M2 puis mis en culture dans du KSOM équilibré à 37°C, 5% CO₂. Les embryons sont cultivés jusqu'au stade blastocyste. Les embryons n'atteignant pas le stade blastocyste après 3 jours de culture sont comptés comme morts.

Immunomarquage sur cellules

Les cellules ont été fixées pendant 10 minutes dans de la PFA 4%. Ensuite elles ont été rincées trois fois avec du PBS-Triton 0,1%. Les cellules ont été perméabilisées dans du PBS-Triton 0,5% pendant 30 minutes, puis rincées avec du PBS-Triton 0,1%. La saturation a été faite dans du PBS-Triton 0,1%, FBS 10% pendant au moins 30 minutes. Les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires à 4°C sur la nuit. Après rinçage avec du PBS-Triton 0,1%, les cellules ont été incubées avec les anticorps secondaires et le DAPI pendant au moins 1h. Les lamelles ont été montées sur lame avec du Vectashield (Eurobio H-1000). Les acquisitions ont été faites au microscope confocal Leica SP8.

Discussion

I. TEAD4 est-il impliqué dans la régulation des gènes épiblastiques ?

Avec la caractérisation du site STONK, mes travaux ont mis en avant une régulation possible de *Fgf4* par le facteur du TE TEAD4. A notre connaissance, il n'a encore jamais été montré que TEAD4 puisse se fixer sur cette région ou qu'il est impliqué dans la régulation de *Fgf4*.

Bien que le rôle de FGF4 ne soit pas précisément défini chez tous les différents mammifères, il est exprimé chez la majorité d'entre eux, et spécifiquement dans l'Epi comme par exemple chez l'Homme, le Cochon, la Vache, ou chez le Lapin (Bouchereau et al. 2022; Fujii et al. 2013; McLean et al. 2014; Petropoulos et al. 2016). Puisque l'expression de *Fgf4* est conservée à travers ces espèces, et que son expression reste restreinte aux cellules Epi, il est possible que l'expression de *Fgf4* ainsi que la spécification en Epi soient régulées par un mécanisme commun chez les mammifères.

Le site STONK est hautement conservé chez les mammifères. La différenciation entre le TE et la MCI est un processus qui est propre à ces espèces et dans lequel TEAD4 est impliqué. De plus, TEAD4 présente un profil d'expression similaire entre ces espèces, comme par exemple chez l'Homme, la Vache ou le Cochon où il est aussi restreint aux cellules du TE. (Berg et al. 2011; EMURA et al. 2019; Gerri et al. 2020; Home et al. 2012). La conservation de la régulation des niveaux d'expression de TEAD4 au sein de la MCI indique que ces espèces partagent un mécanisme similaire dans ces cellules et pour lequel il est nécessaire d'avoir des niveaux d'expression de TEAD4 faible.

Au niveau de l'ADN, les régions fréquemment liées par TEAD4 présentent une forte abondance de site de fixation pour des facteurs de pluripotence comme NANOG et SOX2, à l'image du site STONK (Home et al. 2012). Enfin, dans l'embryon, il a été observé que l'inhibition de TEAD4 semble entraîner une augmentation du nombre de cellules Epi, ce qui

indique un lien potentiel entre TEAD4 et la spécification en Epi (Mihajlović et al. 2015). Ainsi, il est possible que les gènes épiblastiques, en plus d'être régulés positivement par NANOG et SOX2, soient aussi régulés négativement par TEAD4. Il pourrait avoir une activité répressive sur la transcription de ces gènes ou bien il pourrait prévenir la fixation des facteurs NANOG et SOX2.

Ensemble, toutes ces données renforcent la prédiction d'une régulation de *Fgf4* par TEAD4 via le site STONK.

II. La spécification de l'épiblaste est-elle stochastique ?

A. Profil d'expression des facteurs du site STONK

Mes travaux ont mis en évidence que certains facteurs pouvant lier le site STONK sont exprimés de manière hétérogène dans la MCI à différents stades du développement. C'est notamment le cas pour les facteurs NANOG et SOX2 aux stades 16 et 32-cellules. Cette hétérogénéité peut alors créer une différence d'expression des gènes épiblastiques entre les cellules, et donc déterminer si la cellule engage ou non la spécification en Epi. A l'inverse, au stade 16-cellules, OCT4 est exprimé de façon hétérogène alors qu'aux stades 32 et 64-cellules, au-delà des niveaux d'expressions qui diminuent, il est exprimé de façon plus homogène. Cette homogénéité indique que les niveaux seuls d'OCT4 ne créent pas de différence entre les cellules de la MCI, et donc qu'OCT4 n'est pas déterminant dans la cellule pour initier la spécification en Epi. Cependant, il peut être nécessaire à l'activité d'autres facteurs exprimés de façon hétérogène, et donc être nécessaire à la spécification en Epi.

Mes travaux ont montré comment sont exprimés les facteurs NANOG, SOX2, SOX21 et OCT4, mais il reste encore à déterminer le profil d'expression des facteurs TEAD4, KLF4 et 5. Il n'y a, à ma connaissance, aucune étude sur les niveaux d'expression de TEAD4 à l'échelle de la cellule dans l'embryon. Il a été observé que TEAD4 nucléaire est préférentiellement exprimé dans les cellules du TE. De plus, la localisation de TEAD4 au niveau subcellulaire dans les cellules de la MCI est encore discutée (Home et al. 2012; Nishioka et al. 2008). Il faudra alors analyser l'expression de TEAD4 plus précisément dans la MCI, et notamment si son expression, bien que diminuée, est hétérogène ou non.

De la même façon que pour TEAD4, il existe peu de données sur les niveaux d'expression de KLF5. Comme pour TEAD4, KLF5 est préférentiellement exprimé dans les cellules du TE lors de la formation du blastocyste (Lin et al. 2010). Toutefois, dans les

embryons mutants pour KLF5, il y a une surexpression de *Fgf4*, ce qui indique que KLF5 régule négativement l'expression de *Fgf4* (Azami et al. 2017). Il est possible que KLF5 ne régule que l'expression de *Fgf4* et pas des autres gènes épiblastiques. Ainsi, la délétion de *Klf5* induirait une expression précoce de *Fgf4* mais sans induire une expression coordonnée des autres gènes épiblastiques. La présence de FGF4 de façon précoce force alors les cellules à se spécifier en EPr avant de pouvoir initier la spécification en Epi. Il sera alors très intéressant de savoir si KLF5 n'agit que sur *Fgf4* ou s'il est impliqué aussi dans la régulation d'autres gènes épiblastiques.

Enfin, KLF4 est exprimé de façon hétérogène dans la MCI (Morgani et Brickman 2015). Cependant le rôle de KLF4 dans la seconde différenciation n'a jamais été précisément étudié. Les embryons mutants pour *Klf4* sont viables, bien qu'ils présentent des défauts à la naissance (Katz et al. 2002). La présence de KLF4 ne semble alors pas être nécessaire pour le bon développement des premiers stades du développement. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'expression d'un autre membre de la famille des KLFs, KLF2, qui a une activité redondante avec celle de KLF4 (Jiang et al. 2008). Le rôle de KLF4, et aussi de KLF2, sur la régulation de l'expression de *Fgf4* et de la spécification de l'épiblaste reste encore à être étudiée.

B. Les expressions des facteurs du site STONK sont-elles corrélées entre elles ?

Il a été montré qu'au niveau ARNm 32-cellules, l'expressions de *Nanog* est corrélée avec celles de certains facteurs du site STONK, comme *Sox2*, *Klf4*, *Klf2* et *Pou5f1*, et que cette corrélation donne l'identité épiblastique aux cellules (Allègre et al. 2022). De plus, NANOG est nécessaire mais pas suffisant pour cette corrélation et donc pour l'initiation de la spécification en Epi. Il aurait alors besoin d'un ou de plusieurs partenaires pour cette initiation. Il a été montré que NANOG peut interagir avec SOX2 dans les cellules Epi (Allègre et al. 2022). Cette interaction pourrait alors être nécessaire pour l'initiation de la spécification en Epi. Or, mes travaux montrent que NANOG et SOX2 sont coexprimés de manière aléatoire aux

stade 32 et 64-cellules. Donc, la coopération de NANOG et de SOX2 dans l'initiation de la spécification de l'épiblaste se ferait de manière stochastique.

De manière intéressante, les résultats ne montrent une corrélation entre NANOG et SOX2 qu'à partir du stade 90-cellules. Il est probable que le délai entre ce qui est observé au niveau ARNm et protéine est dû au temps de traduction, et que la corrélation de l'expression des protéines NANOG et SOX2 au stade 90-cellules reflète la corrélation observée à 32/64-cellules en ARNm. Il serait alors intéressant d'étudier si l'on observe les mêmes résultats pour les autres facteurs du site STONK. Il a déjà été montré que l'expression de NANOG est corrélée à celle de KLF4 (Morgani et Brickman 2015), mais il reste à déterminer si l'expression de NANOG et de KLF2 ou d'OCT4 sont corrélées.

III. Rôle de SOX21 dans le développement précoce

Selon notre hypothèse, la surexpression de SOX21 aurait dû induire une inhibition, au moins partielle, de l'expression de *Fgf4* et potentiellement un délai dans la différenciation des cellules la MCI en cellules épiblastiques. Or, mes résultats montrent que la surexpression de SOX21 n'a que peu d'effet sur la spécification en épiblaste et sur l'expression de *Fgf4*, même si certaines analyses complémentaires doivent être réalisées. Il serait notamment intéressant d'étudier l'effet de la surexpression de SOX21 sur un autre marqueur Epi que *Fgf4*, comme *Utf1* par exemple. De plus, à cause des limitations techniques de la culture d'embryon, les embryons n'ont pas pu être analysés à des stades plus tardifs que 64-cellules. Aussi, il est possible que le temps de traitement des embryons n'était pas assez long, il faudrait alors traiter des embryons du stade 4-cellules au stade 90-cellules pour pouvoir définitivement confirmer ces résultats.

Il est à noter que l'induction de l'expression ectopique SOX21 dans l'embryon ou dans les cellules ES donne des résultats très différents. Dans les cellules ES, la surexpression de SOX21 induit la diminution de l'expression de *Fgf4* et de *Nanog* et une augmentation de l'expression de *Gata6*. De plus, les cellules qui surexpriment SOX21 se différencient en neuroectoderme (Mallanna et al. 2010). Les cellules ES sont issues d'un état plus mature de l'épiblaste (Boroviak et al. 2014), ce qui pourrait expliquer cette différence de résultat. Cela pourrait être vérifié en surexprimant SOX21 à un stade plus tardif, comme par exemple au stade E4,5, et d'étudier si l'on observe des résultats similaires aux cellules ES. De plus, je n'ai pas analysé les marqueurs de différenciation en neuroectoderme.

Une seule étude a mis en avant un rôle de SOX21 dans l'embryon préimplantatoire (Goolam et al. 2016). Les auteurs ont montré que l'inhibition de SOX21 promeut la différenciation en TE alors que mes résultats montrent qu'une surexpression de SOX21 favorise la différenciation du TE. Cependant, dans mes travaux comme dans la littérature, l'effet est

mineur. Que ce soit avec une inhibition de SOX21 ou une surexpression, l'augmentation du nombre de cellules dans le TE n'est que de 15%, soit en moyenne 5 cellules de différences sur une moyenne de 38-40 cellules (Goolam et al. 2016, Figure 4). Bien que certains de mes résultats montrent un rôle de SOX21 dans cette différenciation, de nouveau, ces résultats sont en contradictions avec la littérature. Même s'il est intéressant de comprendre pourquoi cette différence de résultat est observée dans les deux études, SOX21 ne semble pas avoir un effet majeur sur la différenciation TE/MCI.

IV. Conclusion

Bien que beaucoup de questions sur l'initiation de la spécification en épiblaste restent encore non élucidées, mes travaux apportent certains éléments de réponse ainsi que de nouvelles pistes à explorer. L'hétérogénéité de l'expression de NANOG et de SOX2, ainsi que l'absence de corrélation entre l'expression de ces deux facteurs renforce l'hypothèse d'une induction stochastique de la spécification en Epi. De plus, la caractérisation du site STONK comme séquence régulatrice de *Fgf4* met en avant la possibilité d'une répression directe de son expression dans l'embryon. SOX21 ne semble pas faire partie de ces facteurs répresseurs, mais le rôle de TEAD4 reste à être déterminé et celui de KLF5 précisé.

Ainsi, dans les précurseurs, NANOG et SOX2 sont exprimés de manière hétérogène et non coordonnée. La coexpression stochastique de ces deux facteurs permet la formation d'un complexe d'initiation de la spécification, auquel pourrait s'ajouter OCT4, KLF4 ou KLF2. De manière concomitante, la baisse des niveaux d'expression de TEAD4 et de KLF5 libère les séquences régulatrices des marqueurs Epi. Le complexe d'initiation peut alors se fixer sur ces séquences, comme le site STONK, et activer l'expression coordonnée des marqueurs de l'Epi.

Bibliographie

- Abranches, Elsa, Ana M. V. Guedes, Martin Moravec, Hedia Maamar, Petr Svoboda, Arjun Raj, et Domingos Henrique. 2014. « Stochastic NANOG fluctuations allow mouse embryonic stem cells to explore pluripotency ». *Development (Cambridge, England)* 141(14):2770-79. doi: 10.1242/dev.108910.
- Adachi, Kenjiro, Itoshi Nikaido, Hiroshi Ohta, Satoshi Ohtsuka, Hiroki Ura, Mitsutaka Kadota, Teruhiko Wakayama, Hiroki R. Ueda, et Hitoshi Niwa. 2013. « Context-Dependent Wiring of Sox2 Regulatory Networks for Self-Renewal of Embryonic and Trophoblast Stem Cells ». *Molecular Cell* 52(3):380-92. doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.002.
- Aksoy, Irene, Ralf Jauch, Jiaxuan Chen, Mateusz Dyla, Ushashree Divakar, Gireesh K. Bogu, Roy Teo, Calista Keow Leng Ng, Wishva Herath, Sun Lili, Andrew P. Hutchins, Paul Robson, Prasanna R. Kolatkar, et Lawrence W. Stanton. 2013. « Oct4 Switches Partnering from Sox2 to Sox17 to Reinterpret the Enhancer Code and Specify Endoderm ». *The EMBO Journal* 32(7):938-53. doi: 10.1038/emboj.2013.31.
- Allègre, Nicolas, Sabine Chauveau, Cynthia Dennis, Yoan Renaud, Dimitri Meistermann, Lorena Valverde Estrella, Pierre Pouchin, Michel Cohen-Tannoudji, Laurent David, et Claire Chazaud. 2022. « NANOG initiates epiblast fate through the coordination of pluripotency genes expression ». *Nature Communications* 13:3550. doi: 10.1038/s41467-022-30858-8.
- Ambrosetti, Davide-Carlo, Hans R. Schöler, Lisa Dailey, et Claudio Basilico. 2000. « Modulation of the Activity of Multiple Transcriptional Activation Domains by the DNA Binding Domains Mediates the Synergistic Action of Sox2 and Oct-3 on the Fibroblast Growth Factor-4Enhancer ». *Journal of Biological Chemistry* 275(30):23387-97. doi: 10.1074/jbc.M000932200.
- Anani, Shihadeh, Shivani Bhat, Nobuko Honma-Yamanaka, Dayana Krawchuk, et Yojiro Yamanaka. 2014. « Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo ». *Development* 141(14):2813-24. doi: 10.1242/dev.107276.
- Avilion, Ariel A., Silvia K. Nicolis, Larysa H. Pevny, Lidia Perez, Nigel Vivian, et Robin Lovell-Badge. 2003. « Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function ». *Genes & Development* 17(1):126-40. doi: 10.1101/gad.224503.
- Azami, Takuya, Tsuyoshi Waku, Ken Matsumoto, Hyojung Jeon, Masafumi Muratani, Akihiro Kawashima, Jun Yanagisawa, Ichiro Manabe, Ryoza Nagai, Tilo Kunath, Tomonori Nakamura, Kazuki Kurimoto, Mitinori Saitou, Satoru Takahashi, et Masatsugu Ema. 2017. « Klf5 Maintains the Balance of Primitive Endoderm versus Epiblast Specification during Mouse Embryonic Development by Suppression of Fgf4 ». *Development* 144(20):3706-18. doi: 10.1242/dev.150755.
- Beard, Caroline, Konrad Hochedlinger, Kathrin Plath, Anton Wutz, et Rudolf Jaenisch. 2006. « Efficient Method to Generate Single-Copy Transgenic Mice by Site-Specific Integration in Embryonic Stem Cells ». *Genesis* 44(1):23-28. doi: 10.1002/gene.20180.
- Becskei, Attila, Benjamin B. Kaufmann, et Alexander van Oudenaarden. 2005.

- « Contributions of Low Molecule Number and Chromosomal Positioning to Stochastic Gene Expression ». *Nature Genetics* 37(9):937-44. doi: 10.1038/ng1616.
- van den Berg, Debbie L. C., Tim Snoek, Nick P. Mullin, Adam Yates, Karel Bezstarosti, Jeroen Demmers, Ian Chambers, et Raymond A. Poot. 2010. « An Oct4-Centered Protein Interaction Network in Embryonic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 6(4):369-81. doi: 10.1016/j.stem.2010.02.014.
- van den Berg, Debbie L. C., Wensheng Zhang, Adam Yates, Erik Engelen, Katalin Takacs, Karel Bezstarosti, Jeroen Demmers, Ian Chambers, et Raymond A. Poot. 2008. « Estrogen-Related Receptor Beta Interacts with Oct4 To Positively Regulate Nanog Gene Expression ». *Molecular and Cellular Biology* 28(19):5986-95. doi: 10.1128/MCB.00301-08.
- Berg, Debra K., Craig S. Smith, David J. Pearton, David N. Wells, Ric Broadhurst, Martyn Donnison, et Peter L. Pfeffer. 2011. « Trophectoderm Lineage Determination in Cattle ». *Developmental Cell* 20(2):244-55. doi: 10.1016/j.devcel.2011.01.003.
- Bessonnard, Sylvain, Laurane De Mot, Didier Gonze, Manon Barriol, Cynthia Dennis, Albert Goldbeter, Geneviève Dupont, et Claire Chazaud. 2014. « Gata6, Nanog and Erk Signaling Control Cell Fate in the Inner Cell Mass through a Tristable Regulatory Network ». *Development* 141(19):3637-48. doi: 10.1242/dev.109678.
- Biggers, J. D., R. B. L. Gwatkin, et R. L. Brinster. 1962. « Development of Mouse Embryos in Organ Cultures of Fallopian Tubes on A Chemically Defined Medium ». *Nature* 194(4830):747-49. doi: 10.1038/194747a0.
- 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. 2015. « Defining the Three Cell Lineages of the Human Blastocyst by Single-Cell RNA-Seq ». *Development* 142(18):3151-65. doi: 10.1242/dev.123547.
- Boer, Brian, Janel Kopp, Sunil Mallanna, Michelle Desler, Harini Chakravarthy, Phillip J. Wilder, Cory Bernadt, et Angie Rizzino. 2007. « Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2:Oct-3/4 target genes† ». *Nucleic Acids Research* 35(6):1773-86. doi: 10.1093/nar/gkm059.
- Boland, Michael J., Jennifer L. Hazen, Kristopher L. Nazor, Alberto R. Rodriguez, Wesley Gifford, Greg Martin, Sergey Kupriyanov, et Kristin K. Baldwin. 2009. « Adult Mice Generated from Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature* 461(7260):91-94. doi: 10.1038/nature08310.
- Boroviak, Thorsten, Remco Loos, Paul Bertone, Austin Smith, et Jennifer Nichols. 2014. « The ability of inner cell mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired upon epiblast specification ». *Nature cell biology* 16(6):516-28. doi: 10.1038/ncb2965.
- Boroviak, Thorsten, Remco Loos, Patrick Lombard, Junko Okahara, Rüdiger Behr, Erika Sasaki, Jennifer Nichols, Austin Smith, et Paul Bertone. 2015. « Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis ». *Developmental Cell* 35(3):366-82. doi: 10.1016/j.devcel.2015.10.011.

- Bouchereau, Wilhelm, Luc Jouneau, Catherine Archilla, Irène Aksoy, Anais Moulin, Nathalie Daniel, Nathalie Peynot, Sophie Calderari, Thierry Joly, Murielle Godet, Yan Jaszczyszyn, Marine Pratlong, Dany Severac, Pierre Savatier, Véronique Duranthon, Marielle Afanassieff, et Nathalie Beaujean. 2022. « Major transcriptomic, epigenetic and metabolic changes underlie the pluripotency continuum in rabbit preimplantation embryos ». *Development* 149(17):dev200538. doi: 10.1242/dev.200538.
- Boyer, Laurie A., Tong Ihn Lee, Megan F. Cole, Sarah E. Johnstone, Stuart S. Levine, Jacob P. Zucker, Matthew G. Guenther, Roshan M. Kumar, Heather L. Murray, Richard G. Jenner, David K. Gifford, Douglas A. Melton, Rudolf Jaenisch, et Richard A. Young. 2005. « Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells ». *Cell* 122(6):947-56. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020.
- Braude, Peter R. 1979. « Control of Protein Synthesis during Blastocyst Formation in the Mouse ». *Developmental Biology* 68(2):440-52. doi: 10.1016/0012-1606(79)90216-1.
- Carey, Bryce W., Styliani Markoulaki, Caroline Beard, Jacob Hanna, et Rudolf Jaenisch. 2010. « A single-gene transgenic mouse strain for reprogramming adult somatic cells ». *Nature methods* 7(1):56-59. doi: 10.1038/nmeth.1410.
- Chakravarthy, Harini, Briana D. Ormsbee, Sunil K. Mallanna, et Angie Rizzino. 2011. « Rapid Activation of the Bivalent Gene Sox21 Requires Displacement of Multiple Layers of Gene-Silencing Machinery ». *The FASEB Journal* 25(1):206-18. doi: 10.1096/fj.10-166926.
- Chambers, Ian, Douglas Colby, Morag Robertson, Jennifer Nichols, Sonia Lee, Susan Tweedie, et Austin Smith. 2003. « Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells ». *Cell* 113(5):643-55. doi: 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. 2007. « Nanog Safeguards Pluripotency and Mediates Germline Development ». *Nature* 450(7173):1230-34. doi: 10.1038/nature06403.
- Chatot, C. L., J. L. Lewis, I. Torres, et C. A. Ziomek. 1990. « Development of 1-Cell Embryos from Different Strains of Mice in CZB Medium1 ». *Biology of Reproduction* 42(3):432-40. doi: 10.1095/biolreprod42.3.432.
- Chazaud, Claire, Yojiro Yamanaka, Tony Pawson, et Janet Rossant. 2006. « Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway ». *Developmental Cell* 10(5):615-24. doi: 10.1016/j.devcel.2006.02.020.
- Chen, Chiann-mun, Jon Krohn, Shoumo Bhattacharya, et Benjamin Davies. 2011. « A Comparison of Exogenous Promoter Activity at the ROSA26 Locus Using a PhiC31 Integrase Mediated Cassette Exchange Approach in Mouse ES Cells ». *PLoS ONE* 6(8):e23376. doi: 10.1371/journal.pone.0023376.
- Chen, Lingyi, Akiko Yabuuchi, Sarah Eminli, Ayumu Takeuchi, Chi-Wei Lu, Konrad Hochedlinger, et George Q. Daley. 2009. « Cross-Regulation of the Nanog and Cdx2 Promoters ». *Cell Research* 19(9):1052-61. doi: 10.1038/cr.2009.79.

- Chen, Xi, Han Xu, Ping Yuan, Fang Fang, Mikael Huss, Vinsensius B. Vega, Eleanor Wong, Yuriy L. Orlov, Weiwei Zhang, Jianming Jiang, Yuin-Han Loh, Hock Chuan Yeo, Zhen Xuan Yeo, Vipin Narang, Kunde Ramamoorthy Govindarajan, Bernard Leong, Atif Shahab, Yijun Ruan, Guillaume Bourque, Wing-Kin Sung, Neil D. Clarke, Chia-Lin Wei, et Huck-Hui Ng. 2008. « Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells ». *Cell* 133(6):1106-17. doi: 10.1016/j.cell.2008.04.043.
- Chew, Joon-Lin, Yuin-Han Loh, Wensheng Zhang, Xi Chen, Wai-Leong Tam, Leng-Siew Yeap, Pin Li, Yen-Sin Ang, Bing Lim, Paul Robson, et Huck-Hui Ng. 2005. « Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells ». *Molecular and Cellular Biology* 25(14):6031-46. doi: 10.1128/MCB.25.14.6031-6046.2005.
- Cockburn, Katie, Steffen Biechele, Jodi Garner, et Janet Rossant. 2013. « The Hippo Pathway Member Nf2 Is Required for Inner Cell Mass Specification ». *Current Biology* 23(13):1195-1201. doi: 10.1016/j.cub.2013.05.044.
- Curatola, A. M., et C. Basilico. 1990. « Expression of the K-fgf proto-oncogene is controlled by 3' regulatory elements which are specific for embryonal carcinoma cells. » *Molecular and Cellular Biology* 10(6):2475-84.
- Dailey, L., H. Yuan, et C. Basilico. 1994. « Interaction between a novel F9-specific factor and octamer-binding proteins is required for cell-type-restricted activity of the fibroblast growth factor 4 enhancer. » *Molecular and Cellular Biology* 14(12):7758-69.
- De Mot, Laurane, Didier Gonze, Sylvain Bessonard, Claire Chazaud, Albert Goldbeter, et Geneviève Dupont. 2016. « Cell Fate Specification Based on Tristability in the Inner Cell Mass of Mouse Blastocysts ». *Biophysical Journal* 110(3):710-22. doi: 10.1016/j.bpj.2015.12.020.
- Dhaliwal, Navroop K., Luis E. Abatti, et Jennifer A. Mitchell. 2019. « KLF4 Protein Stability Regulated by Interaction with Pluripotency Transcription Factors Overrides Transcriptional Control ». *Genes & Development* 33(15-16):1069-82. doi: 10.1101/gad.324319.119.
- Dietrich, Jens-Erik, et Takashi Hirragi. 2007. « Stochastic Patterning in the Mouse Pre-Implantation Embryo ». *Development* 134(23):4219-31. doi: 10.1242/dev.003798.
- Do, Dang Vinh, Jun Ueda, Daniel M. Messerschmidt, Chanchao Lorthongpanich, Yi Zhou, Bo Feng, Guoji Guo, Peiyu J. Lin, Md Zakir Hossain, Wenjun Zhang, Akira Moh, Qiang Wu, Paul Robson, Huck Hui Ng, Lorenz Poellinger, Barbara B. Knowles, Davor Solter, et Xin-Yuan Fu. 2013. « A Genetic and Developmental Pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG Circuit Is Essential for Maintenance of ICM Lineages in Vivo ». *Genes & Development* 27(12):1378-90. doi: 10.1101/gad.221176.113.
- Dumortier, Julien G., Mathieu Le Verge-Serandour, Anna Francesca Tortorelli, Annette Mielke, Ludmilla de Plater, Hervé Turlier, et Jean-Léon Maître. 2019. « Hydraulic Fracturing and Active Coarsening Position the Lumen of the Mouse Blastocyst ». *Science (New York, N.Y.)* 365(6452):465-68. doi: 10.1126/science.aaw7709.
- Eenjes, Evelien, Marjon Buscop-van Kempen, Anne Boerema-de Munck, Gabriela G. Edel,

- Floor Benthem, Lisette de Kreij-de Bruin, Marco Schnater, Dick Tibboel, Jennifer Collins, et Robbert J. Rottier. 2021. « SOX21 modulates SOX2-initiated differentiation of epithelial cells in the extrapulmonary airways » édité par M. Königshoff, E. E. Morrissey, S. De Langhe, et F. Hawkins. *eLife* 10:e57325. doi: 10.7554/eLife.57325.
- EMURA, Natsuko, Kazuki TAKAHASHI, Yuriko SAITO, et Ken SAWAI. 2019. « The necessity of TEAD4 for early development and gene expression involved in differentiation in porcine embryos ». *The Journal of Reproduction and Development* 65(4):361-68. doi: 10.1262/jrd.2018-120.
- Evans, M. J., et M. H. Kaufman. 1981. « Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos ». *Nature* 292(5819):154-56. doi: 10.1038/292154a0.
- Festuccia, Nicola, Nick Owens, Thaleia Papadopoulou, Inma Gonzalez, Alexandra Tachtsidi, Sandrine Vandoermel-Pournin, Elena Gallego, Nancy Gutierrez, Agnès Dubois, Michel Cohen-Tannoudji, et Pablo Navarro. 2019. « Transcription factor activity and nucleosome organization in mitosis ». *Genome Research* 29(2):250-60. doi: 10.1101/gr.243048.118.
- Flach, G., M. h. Johnson, P. r. Braude, R. a. Taylor, et V. n. Bolton. 1982. « The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. » *The EMBO Journal* 1(6):681-86. doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01230.x.
- Fleming, Tom P. 1987. « A Quantitative Analysis of Cell Allocation to Trophectoderm and Inner Cell Mass in the Mouse Blastocyst ». *Developmental Biology* 119(2):520-31. doi: 10.1016/0012-1606(87)90055-8.
- Fraidenraich, Diego, Richard Lang, et Claudio Basilico. 1998. « Distinct Regulatory Elements Govern Fgf4 Gene Expression in the Mouse Blastocyst, Myotomes, and Developing Limb ». *Developmental Biology* 204(1):197-209. doi: 10.1006/dbio.1998.9053.
- Frankenberg, Stephen, François Gerbe, Sylvain Bessonard, Corinne Belville, Pierre Pouchin, Olivier Bardot, et Claire Chazaud. 2011. « Primitive Endoderm Differentiates via a Three-Step Mechanism Involving Nanog and RTK Signaling ». *Developmental Cell* 21(6):1005-13. doi: 10.1016/j.devcel.2011.10.019.
- Frum, Tristan, Michael A. Halbisen, Chaoyang Wang, Hossein Amiri, Paul Robson, et Amy Ralston. 2013. « Oct4 cell-autonomously promotes primitive endoderm development in the mouse blastocyst ». *Developmental cell* 25(6):610-22. doi: 10.1016/j.devcel.2013.05.004.
- Frum, Tristan, Tayler M. Murphy, et Amy Ralston. 2018. « HIPPO signaling resolves embryonic cell fate conflicts during establishment of pluripotency in vivo » édité par E. Robertson et M. E. Bronner. *eLife* 7:e42298. doi: 10.7554/eLife.42298.
- Frum, Tristan, Jennifer L. Watts, et Amy Ralston. 2019. « TEAD4, YAP1 and WWTR1 Prevent the Premature Onset of Pluripotency Prior to the 16-Cell Stage ». *Development* 146(17):dev179861. doi: 10.1242/dev.179861.
- Fujii, Takashi, Nobuyuki Sakurai, Tsubasa Osaki, Gentaro Iwagami, Hiroki Hirayama, Akira Minamihashi, Tsutomu Hashizume, et Ken Sawai. 2013. « Changes in the Expression

- Patterns of the Genes Involved in the Segregation and Function of Inner Cell Mass and Trophectoderm Lineages During Porcine Preimplantation Development ». *The Journal of Reproduction and Development* 59(2):151. doi: 10.1262/jrd.2012-122.
- Gagliardi, Alessia, Nicholas P. Mullin, Zi Ying Tan, Douglas Colby, Anastasia I. Kousa, Florian Halbritter, Jason T. Weiss, Anastasia Felker, Karel Bezstarosti, Rebecca Favaro, Jeroen Demmers, Silvia K. Nicolis, Simon R. Tomlinson, Raymond A. Poot, et Ian Chambers. 2013. « A direct physical interaction between Nanog and Sox2 regulates embryonic stem cell self-renewal ». *The EMBO Journal* 32(16):2231-47. doi: 10.1038/emboj.2013.161.
- Gerri, Claudia, Afshan McCarthy, Gregorio Alanis-Lobato, Andrej Demtschenko, Alexandre Bruneau, Sophie Loubersac, Norah M. E. Fogarty, Daniel Hampshire, Kay Elder, Phil Snell, Leila Christie, Laurent David, Hilde Van de Velde, Ali A. Fouladi-Nashta, et Kathy K. Niakan. 2020. « Initiation of a conserved trophectoderm program in human, cow and mouse embryos ». *Nature* 587(7834):443-47. doi: 10.1038/s41586-020-2759-x.
- Goolam, Mubeen, Antonio Scialdone, Sarah J. L. Graham, Iain C. Macaulay, Agnieszka Jedrusik, Anna Hupalowska, Thierry Voet, John C. Marioni, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2016. « Heterogeneity in Oct4 and Sox2 Targets Biases Cell Fate in 4-Cell Mouse Embryos ». *Cell* 165(1):61-74. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.047.
- Grabarek, Joanna B., Berenika Plusa, David M. Glover, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2002. « Efficient Delivery of DsRNA into Zona-Enclosed Mouse Oocytes and Preimplantation Embryos by Electroporation ». *Genesis* 32(4):269-76. doi: 10.1002/gene.10076.
- Guo, Guoji, Mikael Huss, Guo Qing Tong, Chaoyang Wang, Li Li Sun, Neil D. Clarke, et Paul Robson. 2010. « Resolution of Cell Fate Decisions Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst ». *Developmental Cell* 18(4):675-85. doi: 10.1016/j.devcel.2010.02.012.
- Hamatani, Toshio, Mark G. Carter, Alexei A. Sharov, et Minoru S. H. Ko. 2004. « Dynamics of Global Gene Expression Changes during Mouse Preimplantation Development ». *Developmental Cell* 6(1):117-31. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00373-3.
- Hamazaki, Takashi, Sarah M. Kehoe, Toru Nakano, et Naohiro Terada. 2006. « The Grb2/Mek Pathway Represses Nanog in Murine Embryonic Stem Cells ». *Molecular and Cellular Biology* 26(20):7539-49. doi: 10.1128/MCB.00508-06.
- Hashimoto, Masakazu, et Hiroshi Sasaki. 2019. « Epiblast Formation by TEAD-YAP-Dependent Expression of Pluripotency Factors and Competitive Elimination of Unspecified Cells ». *Developmental Cell* 50(2):139-154.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2019.05.024.
- Hashimoto, Masakazu, Yukiko Yamashita, et Tatsuya Takemoto. 2016. « Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse ». *Developmental Biology* 418(1):1-9. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.07.017.
- Hatano, Shin-ya, Masako Tada, Hironobu Kimura, Shinpei Yamaguchi, Tomohiro Kono, Toru Nakano, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, et Takashi Tada. 2005.

- « Pluripotential Competence of Cells Associated with Nanog Activity ». *Mechanisms of Development* 122(1):67-79. doi: 10.1016/j.mod.2004.08.008.
- Hirate, Yoshikazu, Shino Hirahara, Ken-ichi Inoue, Hiroshi Kiyonari, Hiroshi Niwa, et Hiroshi Sasaki. 2015. « Par-APKC-Dependent and -Independent Mechanisms Cooperatively Control Cell Polarity, Hippo Signaling, and Cell Positioning in 16-Cell Stage Mouse Embryos ». *Development, Growth & Differentiation* 57(8):544-56. doi: 10.1111/dgd.12235.
- Home, Pratik, Biswarup Saha, Soma Ray, Debasree Dutta, Sumedha Gunewardena, Byunggil Yoo, Arindam Pal, Jay L. Vivian, Melissa Larson, Margaret Petroff, Patrick G. Gallagher, Vincent P. Schulz, Kenneth L. White, Thaddeus G. Golos, Barry Behr, et Soumen Paul. 2012. « Altered subcellular localization of transcription factor TEAD4 regulates first mammalian cell lineage commitment ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(19):7362-67. doi: 10.1073/pnas.1201595109.
- Hutchins, Andrew Paul, Siew Hua Choo, Tapan Kumar Mistri, Mehran Rahmani, Chow Thai Woon, Calista Keow Leng Ng, Ralf Jauch, et Paul Robson. 2013. « Co-Motif Discovery Identifies an Esrrb-Sox2-DNA Ternary Complex as a Mediator of Transcriptional Differences Between Mouse Embryonic and Epiblast Stem Cells ». *STEM CELLS* 31(2):269-81. doi: 10.1002/stem.1279.
- Ivanova, Natalia, Radu Dobrin, Rong Lu, Iulia Kotenko, John Levorse, Christina DeCoste, Xenia Schafer, Yi Lun, et Ihor R. Lemischka. 2006. « Dissecting Self-Renewal in Stem Cells with RNA Interference ». *Nature* 442(7102):533-38. doi: 10.1038/nature04915.
- Jiang, Jianming, Yun-Shen Chan, Yui-Han Loh, Jun Cai, Guo-Qing Tong, Ching-Aeng Lim, Paul Robson, Sheng Zhong, et Huck-Hui Ng. 2008. « A Core Klf Circuitry Regulates Self-Renewal of Embryonic Stem Cells ». *Nature Cell Biology* 10(3):353-60. doi: 10.1038/ncb1698.
- Johnson, Martin H., et Josie M. L. McConnell. 2004. « Lineage Allocation and Cell Polarity during Mouse Embryogenesis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15(5):583-97. doi: 10.1016/j.semcdb.2004.04.002.
- Kalmar, Tibor, Chea Lim, Penelope Hayward, Silvia Muñoz-Descalzo, Jennifer Nichols, Jordi Garcia-Ojalvo, et Alfonso Martinez Arias. 2009. « Regulated Fluctuations in Nanog Expression Mediate Cell Fate Decisions in Embryonic Stem Cells ». *PLoS Biology* 7(7):e1000149. doi: 10.1371/journal.pbio.1000149.
- Kaneko, Takehito, et Tomoji Mashimo. 2015. « Simple Genome Editing of Rodent Intact Embryos by Electroporation ». *PLoS ONE* 10(11). doi: 10.1371/journal.pone.0142755.
- Kang, Lan, Jianle Wang, Yu Zhang, Zhaohui Kou, et Shaorong Gao. 2009. « IPS Cells Can Support Full-Term Development of Tetraploid Blastocyst-Complemented Embryos ». *Cell Stem Cell* 5(2):135-38. doi: 10.1016/j.stem.2009.07.001.
- Kang, Minjung, Vidur Garg, et Anna-Katerina Hadjantonakis. 2017. « Lineage establishment and progression within the inner cell mass of the mouse blastocyst requires FGFR1 and FGFR2 ». *Developmental cell* 41(5):496-510.e5. doi:

10.1016/j.devcel.2017.05.003.

- Kang, Minjung, Anna Piliszek, Jérôme Artus, et Anna-Katerina Hadjantonakis. 2013. « FGF4 Is Required for Lineage Restriction and Salt-and-Pepper Distribution of Primitive Endoderm Factors but Not Their Initial Expression in the Mouse ». *Development* 140(2):267-79. doi: 10.1242/dev.084996.
- Karwacki-Neisius, Violetta, Jonathan Göke, Rodrigo Osorno, Florian Halbritter, Jia Hui Ng, Andrea Y. Weiße, Frederick C. K. Wong, Alessia Gagliardi, Nicholas P. Mullin, Nicola Festuccia, Douglas Colby, Simon R. Tomlinson, Huck-Hui Ng, et Ian Chambers. 2013. « Reduced Oct4 Expression Directs a Robust Pluripotent State with Distinct Signaling Activity and Increased Enhancer Occupancy by Oct4 and Nanog ». *Cell Stem Cell* 12(5):531-45. doi: 10.1016/j.stem.2013.04.023.
- Katz, Jonathan P., Nathalie Perreault, Bree G. Goldstein, Catherine S. Lee, Patricia A. Labosky, Vincent W. Yang, et Klaus H. Kaestner. 2002. « The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon ». *Development (Cambridge, England)* 129(11):2619-28.
- Kelly, Susan J. 1977. « Studies of the Developmental Potential of 4- and 8-Cell Stage Mouse Blastomeres ». *Journal of Experimental Zoology* 200(3):365-76. doi: 10.1002/jez.1402000307.
- Kim, Jonghwan, Jianlin Chu, Xiaohua Shen, Jianlong Wang, et Stuart H. Orkin. 2008. « An Extended Transcriptional Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells ». *Cell* 132(6):1049-61. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.039.
- Kimmel, Marek. 2014. « Stochasticity and Determinism in Models of Hematopoiesis ». P. 119-52 in *A Systems Biology Approach to Blood, Advances in Experimental Medicine and Biology*, édité par S. J. Corey, M. Kimmel, et J. N. Leonard. New York, NY: Springer New York.
- Kiso, Makoto, Shigekazu Tanaka, Rie Saba, Satoru Matsuda, Atsushi Shimizu, Manabu Ohyama, Hiroataka James Okano, Toshihiko Shiroishi, Hideyuki Okano, et Yumiko Saga. 2009. « The disruption of Sox21-mediated hair shaft cuticle differentiation causes cyclic alopecia in mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(23):9292-97. doi: 10.1073/pnas.0808324106.
- Kopp, Janel L., Briana D. Ormsbee, Michelle Desler, et Angie Rizzino. 2008. « Small Increases in the Level of Sox2 Trigger the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells ». *STEM CELLS* 26(4):903-11. doi: 10.1634/stemcells.2007-0951.
- Krawchuk, Dayana, Nobuko Honma-Yamanaka, Shihadeh Anani, et Yojiro Yamanaka. 2013. « FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst ». *Developmental Biology* 384(1):65-71. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.09.023.
- Krupa, Magdalena, Ewa Mazur, Katarzyna Szczepańska, Katarzyna Filimonow, Marek Maleszewski, et Aneta Suwińska. 2014. « Allocation of inner cells to epiblast vs primitive endoderm in the mouse embryo is biased but not determined by the round of asymmetric divisions (8→16- and 16→32-cells) ». *Developmental Biology* 385(1):136-48. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.09.008.

- Kuales, Georg, Matthias Weiss, Oliver Sedelmeier, Dietmar Pfeifer, et Sebastian J. Arnold. 2015. « A Resource for the Transcriptional Signature of Bona Fide Trophoblast Stem Cells and Analysis of Their Embryonic Persistence ». *Stem Cells International* 2015:218518. doi: 10.1155/2015/218518.
- Kunath, Tilo, Marc K. Saba-El-Leil, Marwa Almousaillekh, Jason Wray, Sylvain Meloche, et Austin Smith. 2007. « FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment ». *Development* 134(16):2895-2902. doi: 10.1242/dev.02880.
- Kuroda, Takao, Masako Tada, Hiroshi Kubota, Hironobu Kimura, Shin-ya Hatano, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, et Takashi Tada. 2005. « Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional cis Regulation of Nanog Gene Expression ». *Molecular and Cellular Biology* 25(6):2475-85. doi: 10.1128/MCB.25.6.2475-2485.2005.
- Kuzmichev, Andrey N., Suel-Kee Kim, Ana C. D'Alessio, Josh G. Chenoweth, Ina M. Wittko, Loraine Campanati, et Ronald D. McKay. 2012. « Sox2 Acts through Sox21 to Regulate Transcription in Pluripotent and Differentiated Cells ». *Current Biology* 22(18):1705-10. doi: 10.1016/j.cub.2012.07.013.
- Le Bin, Gloryn Chia, Silvia Muñoz-Descalzo, Agata Kurowski, Harry Leitch, Xinghua Lou, William Mansfield, Charles Etienne-Dumeau, Nils Grabole, Carla Mulas, Hitoshi Niwa, Anna-Katerina Hadjantonakis, et Jennifer Nichols. 2014. « Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst ». *Development (Cambridge, England)* 141(5):1001-10. doi: 10.1242/dev.096875.
- Li, Meng, Michael Sendtner, et Austin Smith. 1995. « Essential Function of LIF Receptor in Motor Neurons ». *Nature* 378(6558):724-27. doi: 10.1038/378724a0.
- Li, Shun, Li-xiang Chen, Xiu-hua Peng, Chao Wang, Bo-yin Qin, Dan Tan, Cheng-xiao Han, Hua Yang, Xiao-nan Ren, Fang Liu, Chun-hua Xu, et Xiao-hui Zhou. 2018. « Overview of the reporter genes and reporter mouse models ». *Animal Models and Experimental Medicine* 1(1):29-35. doi: 10.1002/ame2.12008.
- Lin, Suh-Chin J., Maqsood A. Wani, Jeffrey A. Whitsett, et James M. Wells. 2010. « Klf5 Regulates Lineage Formation in the Pre-Implantation Mouse Embryo ». *Development* 137(23):3953-63. doi: 10.1242/dev.054775.
- Loh, Yui-Han, Qiang Wu, Joon-Lin Chew, Vinsensius B. Vega, Weiwei Zhang, Xi Chen, Guillaume Bourque, Joshy George, Bernard Leong, Jun Liu, Kee-Yew Wong, Ken W. Sung, Charlie W. H. Lee, Xiao-Dong Zhao, Kuo-Ping Chiu, Leonard Lipovich, Vladimir A. Kuznetsov, Paul Robson, Lawrence W. Stanton, Chia-Lin Wei, Yijun Ruan, Bing Lim, et Huck-Hui Ng. 2006. « The Oct4 and Nanog Transcription Network Regulates Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Nature Genetics* 38(4):431-40. doi: 10.1038/ng1760.
- Louvet, Sophie, Joël Aghion, Angélica Santa-Maria, Paul Mangeat, et Bernard Maro. 1996. « Ezrin Becomes Restricted to Outer Cells Following Asymmetrical Division in the Preimplantation Mouse Embryo ». *Developmental Biology* 177(2):568-79. doi: 10.1006/dbio.1996.0186.
- Maître, Jean-Léon, Ritsuya Niwayama, Hervé Turlier, François Nédélec, et Takashi Hiiragi.

2015. « Pulsatile Cell-Autonomous Contractility Drives Compaction in the Mouse Embryo ». *Nature Cell Biology* 17(7):849-55. doi: 10.1038/ncb3185.
- Mallanna, Sunil K., Briana D. Ormsbee, Michelina Iacovino, Joshua M. Gilmore, Jesse L. Cox, Michael Kyba, Michael P. Washburn, et Angie Rizzino. 2010. « Proteomic Analysis of Sox2-Associated Proteins During Early Stages of Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation Identifies Sox21 as a Novel Regulator of Stem Cell Fate ». *STEM CELLS* 28(10):1715-27. doi: 10.1002/stem.494.
- Marks, Hendrik, Tüzer Kalkan, Roberta Menafrá, Sergey Denisov, Kenneth Jones, Helmut Hofemeister, Jennifer Nichols, Andrea Kranz, A. Francis Stewart, Austin Smith, et Hendrik G. Stunnenberg. 2012. « The Transcriptional and Epigenomic Foundations of Ground State Pluripotency ». *Cell* 149(3):590-604. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.026.
- Martin, G. R. 1981. « Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(12):7634-38. doi: 10.1073/pnas.78.12.7634.
- Masui, Shinji, Yuhki Nakatake, Yayoi Toyooka, Daisuke Shimosato, Rika Yagi, Kazue Takahashi, Hitoshi Okochi, Akihiko Okuda, Ryo Matoba, Alexei A. Sharov, Minoru S. H. Ko, et Hitoshi Niwa. 2007. « Pluripotency Governed by Sox2 via Regulation of Oct3/4 Expression in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Nature Cell Biology* 9(6):625-35. doi: 10.1038/ncb1589.
- Matsuda, Satoru, Ken-ichiro Kuwako, Hirotaka James Okano, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Yumiko Saga, Yumi Matsuzaki, Akinori Akaike, Hachiro Sugimoto, et Hideyuki Okano. 2012. « Sox21 Promotes Hippocampal Adult Neurogenesis via the Transcriptional Repression of the Hes5 Gene ». *Journal of Neuroscience* 32(36):12543-57. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5803-11.2012.
- Matsuda, T., T. Nakamura, K. Nakao, T. Arai, M. Katsuki, T. Heike, et T. Yokota. 1999. « STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. » *The EMBO Journal* 18(15):4261-69. doi: 10.1093/emboj/18.15.4261.
- McLean, Zachariah, Fanli Meng, Harold Henderson, Pavla Turner, et Björn Öback. 2014. « Increased MAP Kinase Inhibition Enhances Epiblast-Specific Gene Expression in Bovine Blastocysts1 ». *Biology of Reproduction* 91(2):49, 1-10. doi: 10.1095/biolreprod.114.120832.
- Messerschmidt, Daniel M., et Rolf Kemler. 2010. « Nanog Is Required for Primitive Endoderm Formation through a Non-Cell Autonomous Mechanism ». *Developmental Biology* 344(1):129-37. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.04.020.
- Mihajlović, Aleksandar I., Vasanth Thamodaran, et Alexander W. Bruce. 2015. « The First Two Cell-Fate Decisions of Preimplantation Mouse Embryo Development Are Not Functionally Independent ». *Scientific Reports* 5(1):15034. doi: 10.1038/srep15034.
- Mistri, Tapan Kumar, Wibowo Arindrarto, Wei Ping Ng, Choayang Wang, Leng Hiong Lim, Lili Sun, Ian Chambers, Thorsten Wohland, et Paul Robson. 2018. « Dynamic changes in Sox2 spatio-temporal expression promote the second cell fate decision through

- Fgf4/Fgfr2 signaling in preimplantation mouse embryos ». *Biochemical Journal* 475(6):1075-89. doi: 10.1042/BCJ20170418.
- Mitsui, Kaoru, Yoshimi Tokuzawa, Hiroaki Itoh, Kohichi Segawa, Mirei Murakami, Kazutoshi Takahashi, Masayoshi Maruyama, Mitsuyo Maeda, et Shinya Yamanaka. 2003. « The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells ». *Cell* 113(5):631-42.
- Miyanari, Yusuke, et Maria-Elena Torres-Padilla. 2010. « Epigenetic Regulation of Reprogramming Factors towards Pluripotency in Mouse Preimplantation Development ». *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 17(6):500-506. doi: 10.1097/MED.0b013e3283405325.
- Miyanari, Yusuke, et Maria-Elena Torres-Padilla. 2012. « Control of Ground-State Pluripotency by Allelic Regulation of Nanog ». *Nature* 483(7390):470-73. doi: 10.1038/nature10807.
- Molotkov, Andrei, Pierre Mazot, J. Richard Brewer, Ryan M. Cinalli, et Philippe Soriano. 2017. « Distinct Requirements for Fgfr1 and Fgfr2 in Primitive Endoderm Development and Exit from Pluripotency ». *Developmental cell* 41(5):511-526.e4. doi: 10.1016/j.devcel.2017.05.004.
- Moretto Zita, Matteo, Francesca Soncin, David Natale, Donald Pizzo, et Mana Parast. 2015. « Gene Expression Profiling Reveals a Novel Regulatory Role for Sox21 Protein in Mouse Trophoblast Stem Cell Differentiation ». *The Journal of Biological Chemistry* 290(50):30152-62. doi: 10.1074/jbc.M115.659094.
- Morgani, Sophie M., et Joshua M. Brickman. 2015. « LIF Supports Primitive Endoderm Expansion during Pre-Implantation Development ». *Development* 142(20):3488-99. doi: 10.1242/dev.125021.
- Morris, Samantha A., Roy T. Y. Teo, Huiliang Li, Paul Robson, David M. Glover, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2010. « Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(14):6364-69. doi: 10.1073/pnas.0915063107.
- Mullin, Nicholas P., Adam Yates, Arthur J. Rowe, Bianca Nijmeijer, Douglas Colby, Paul N. Barlow, Malcolm D. Walkinshaw, et Ian Chambers. 2008. « The pluripotency rheostat Nanog functions as a dimer ». *Biochemical Journal* 411(2):227-31. doi: 10.1042/BJ20080134.
- Navarro, Pablo, Nicola Festuccia, Douglas Colby, Alessia Gagliardi, Nicholas P. Mullin, Wensheng Zhang, Violetta Karwacki-Neisius, Rodrigo Osorno, David Kelly, Morag Robertson, et Ian Chambers. 2012. « OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells ». *The EMBO Journal* 31(24):4547-62. doi: 10.1038/emboj.2012.321.
- Ng, Calista K. L., Noel X. Li, Sheena Chee, Shyam Prabhakar, Prasanna R. Kolatkar, et Ralf Jauch. 2012. « Deciphering the Sox-Oct Partner Code by Quantitative Cooperativity Measurements ». *Nucleic Acids Research* 40(11):4933-41. doi: 10.1093/nar/gks153.

- Nichols, J., E. P. Evans, et A. G. Smith. 1990. « Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity ». *Development* 110(4):1341-48. doi: 10.1242/dev.110.4.1341.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler, et A. Smith. 1998. « Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4 ». *Cell* 95(3):379-91. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81769-9.
- Nichols, Jennifer, Jose Silva, Mila Roode, et Austin Smith. 2009. « Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo ». *Development (Cambridge, England)* 136(19):3215-22. doi: 10.1242/dev.038893.
- Nishimoto, Masazumi, Akiko Fukushima, Akihiko Okuda, et Masami Muramatsu. 1999. « The Gene for the Embryonic Stem Cell Coactivator UTF1 Carries a Regulatory Element Which Selectively Interacts with a Complex Composed of Oct-3/4 and Sox-2 ». *Molecular and Cellular Biology* 19(8):5453-65. doi: 10.1128/MCB.19.8.5453.
- Nishimoto, Masazumi, Satoru Miyagi, Toshiyuki Yamagishi, Takehisa Sakaguchi, Hitoshi Niwa, Masami Muramatsu, et Akihiko Okuda. 2005. « Oct-3/4 Maintains the Proliferative Embryonic Stem Cell State via Specific Binding to a Variant Octamer Sequence in the Regulatory Region of the UTF1 Locus ». *Molecular and Cellular Biology* 25(12):5084-94. doi: 10.1128/MCB.25.12.5084-5094.2005.
- Nishioka, Noriyuki, Ken-ichi Inoue, Kenjiro Adachi, Hiroshi Kiyonari, Mitsunori Ota, Amy Ralston, Norikazu Yabuta, Shino Hirahara, Robert O. Stephenson, Narumi Ogonuki, Ryosuke Makita, Hiroki Kurihara, Elizabeth M. Morin-Kensicki, Hiroshi Nojima, Janet Rossant, Kazuki Nakao, Hitoshi Niwa, et Hiroshi Sasaki. 2009. « The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass ». *Developmental Cell* 16(3):398-410. doi: 10.1016/j.devcel.2009.02.003.
- Nishioka, Noriyuki, Shinji Yamamoto, Hiroshi Kiyonari, Hiroko Sato, Atsushi Sawada, Mitsunori Ota, Kazuki Nakao, et Hiroshi Sasaki. 2008. « Tead4 is required for specification of trophoctoderm in pre-implantation mouse embryos ». *Mechanisms of Development* 125(3):270-83. doi: 10.1016/j.mod.2007.11.002.
- Niwa, Hitoshi, Tom Burdon, Ian Chambers, et Austin Smith. 1998. « Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3 ». *Genes & Development* 12(13):2048-60.
- Niwa, Hitoshi, Jun-ichi Miyazaki, et Austin G. Smith. 2000. « Quantitative Expression of Oct-3/4 Defines Differentiation, Dedifferentiation or Self-Renewal of ES Cells ». *Nature Genetics* 24(4):372-76. doi: 10.1038/74199.
- Niwa, Hitoshi, Kazuya Ogawa, Daisuke Shimosato, et Kenjiro Adachi. 2009. « A Parallel Circuit of LIF Signalling Pathways Maintains Pluripotency of Mouse ES Cells ». *Nature* 460(7251):118-22. doi: 10.1038/nature08113.
- Niwa, Hitoshi, Yayoi Toyooka, Daisuke Shimosato, Dan Strumpf, Kadue Takahashi, Rika Yagi, et Janet Rossant. 2005. « Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophectoderm Differentiation ». *Cell* 123(5):917-29. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.040.

- Ochiai, Hiroshi, Takeshi Sugawara, Tetsushi Sakuma, et Takashi Yamamoto. 2014. « Stochastic promoter activation affects Nanog expression variability in mouse embryonic stem cells ». *Scientific Reports* 4. doi: 10.1038/srep07125.
- Ohnishi, Yusuke, Wolfgang Huber, Akiko Tsumura, Minjung Kang, Panagiotis Xenopoulos, Kazuki Kurimoto, Andrzej K. Oleś, Marcos J. Araúzo-Bravo, Mitinori Saitou, Anna-Katerina Hadjantonakis, et Takashi Hiragi. 2014. « Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages ». *Nature cell biology* 16(1):27-37. doi: 10.1038/ncb2881.
- Okumura-Nakanishi, Sayaka, Motoki Saito, Hitoshi Niwa, et Fuyuki Ishikawa. 2005. « Oct-3/4 and Sox2 Regulate Oct-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells* ». *Journal of Biological Chemistry* 280(7):5307-17. doi: 10.1074/jbc.M410015200.
- Ormsbee Golden, Briana D., Erin L. Wuebben, et Angie Rizzino. 2013. « Sox2 Expression Is Regulated by a Negative Feedback Loop in Embryonic Stem Cells That Involves AKT Signaling and FoxO1 ». *PLoS ONE* 8(10):e76345. doi: 10.1371/journal.pone.0076345.
- Palmieri, Susan L., Werner Peter, Heike Hess, et Hans R. Schöler. 1994. « Oct-4 Transcription Factor Is Differentially Expressed in the Mouse Embryo during Establishment of the First Two Extraembryonic Cell Lineages Involved in Implantation ». *Developmental Biology* 166(1):259-67. doi: 10.1006/dbio.1994.1312.
- Pan, Guangjin, Jun Li, Yali Zhou, Hui Zheng, Duanqing Pei, Guangjin Pan, Jun Li, Yali Zhou, Hui Zheng, et Duanqing Pei. 2006. « A Negative Feedback Loop of Transcription Factors That Controls Stem Cell Pluripotency and Self-renewal ». *The FASEB Journal* 20(10):1730-32. doi: 10.1096/fj.05-5543fje.
- Pan, Hua, et Richard M. Schultz. 2011. « SOX2 Modulates Reprogramming of Gene Expression in Two-Cell Mouse Embryos ». *Biology of Reproduction* 85(2):409-16. doi: 10.1095/biolreprod.111.090886.
- Pauken, Christine M., et David G. Capco. 2000. « The Expression and Stage-Specific Localization of Protein Kinase C Isoforms during Mouse Preimplantation Development ». *Developmental Biology* 223(2):411-21. doi: 10.1006/dbio.2000.9763.
- Pedersen, Roger A., Kitty Wu, et Hanna BaŁakier. 1986. « Origin of the Inner Cell Mass in Mouse Embryos: Cell Lineage Analysis by Microinjection ». *Developmental Biology* 117(2):581-95. doi: 10.1016/0012-1606(86)90327-1.
- Peng, Hui, Yongyan Wu, et Yong Zhang. 2012. « Efficient Delivery of DNA and Morpholinos into Mouse Preimplantation Embryos by Electroporation ». *PLoS ONE* 7(8). doi: 10.1371/journal.pone.0043748.
- Pereira, Laura, Fei Yi, et Bradley J. Merrill. 2006. « Repression of Nanog Gene Transcription by Tcf3 Limits Embryonic Stem Cell Self-Renewal ». *Molecular and Cellular Biology* 26(20):7479-91. doi: 10.1128/MCB.00368-06.
- Petropoulos, Sophie, Daniel Edsgård, Björn Reinius, Qiaolin Deng, Sarita Pauliina Panula, Simone Codeluppi, Alvaro Plaza Reyes, Sten Linnarsson, Rickard Sandberg, et Fredrik Lanner. 2016. « Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos ». *Cell* 165(4):1012-26. doi:

10.1016/j.cell.2016.03.023.

- Piotrowska-Nitsche, Karolina, Aitana Perea-Gomez, Seiki Haraguchi, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2005. « Four-Cell Stage Mouse Blastomeres Have Different Developmental Properties ». *Development (Cambridge, England)* 132(3):479-90. doi: 10.1242/dev.01602.
- Piras, Vincent, Masaru Tomita, et Kumar Selvarajoo. 2014. « Transcriptome-wide Variability in Single Embryonic Development Cells ». *Scientific Reports* 4. doi: 10.1038/srep07137.
- Plachta, Nicolas, Tobias Bollenbach, Shirley Pease, Scott E. Fraser, et Periklis Pantazis. 2011. « Oct4 Kinetics Predict Cell Lineage Patterning in the Early Mammalian Embryo ». *Nature Cell Biology* 13(2):117-23. doi: 10.1038/ncb2154.
- Plusa, Berenika, Anna Piliszek, Stephen Frankenberg, Jérôme Artus, et Anna-Katerina Hadjantonakis. 2008. « Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst ». *Development (Cambridge, England)* 135(18):3081-91. doi: 10.1242/dev.021519.
- Radzisheuskaya, Aliaksandra, Gloryn Le Bin Chia, Rodrigo L. dos Santos, Thorold W. Theunissen, L. Filipe C. Castro, Jennifer Nichols, et José C. R. Silva. 2013a. « A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages ». *Nature cell biology* 15(6):579-90. doi: 10.1038/ncb2742.
- Radzisheuskaya, Aliaksandra, Gloryn Le Bin Chia, Rodrigo L. dos Santos, Thorold W. Theunissen, L. Filipe C. Castro, Jennifer Nichols, et José C. R. Silva. 2013b. « A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages ». *Nature cell biology* 15(6):579-90. doi: 10.1038/ncb2742.
- Raj, Arjun, et Alexander van Oudenaarden. 2008. « Stochastic gene expression and its consequences ». *Cell* 135(2):216-26. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.050.
- Ralston, Amy, Brian J. Cox, Noriyuki Nishioka, Hiroshi Sasaki, Evelyn Chea, Peter Rugg-Gunn, Guoji Guo, Paul Robson, Jonathan S. Draper, et Janet Rossant. 2010. « Gata3 Regulates Trophoblast Development Downstream of Tead4 and in Parallel to Cdx2 ». *Development (Cambridge, England)* 137(3):395-403. doi: 10.1242/dev.038828.
- Rayon, Teresa, Sergio Menchero, Andres Nieto, Panagiotis Xenopoulos, Miguel Crespo, Katie Cockburn, Susana Cañon, Hiroshi Sasaki, Anna-Katerina Hadjantonakis, Jose Luis de la Pompa, Janet Rossant, et Miguel Manzanares. 2014. « Notch and Hippo Converge on Cdx2 to Specify the Trophectoderm Lineage in the Mouse Blastocyst ». *Developmental Cell* 30(4):410-22. doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.019.
- Rodda, David J., Joon-Lin Chew, Leng-Hiong Lim, Yui-Han Loh, Bei Wang, Huck-Hui Ng, et Paul Robson. 2005. « Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2 ». *Journal of Biological Chemistry* 280(26):24731-37. doi: 10.1074/jbc.M502573200.
- Rosner, Mitchell H., M. Alessandra Vigano, Keiko Ozato, Paula M. Timmons, Francoise Poirie, Peter W. J. Rigby, et Louis M. Staudt. 1990. « A POU-Domain Transcription

- Factor in Early Stem Cells and Germ Cells of the Mammalian Embryo ». *Nature* 345(6277):686-92. doi: 10.1038/345686a0.
- Saiz, Néstor, Kiah M. Williams, Venkatraman E. Seshan, et Anna-Katerina Hadjantonakis. 2016. « Asynchronous fate decisions by single cells collectively ensure consistent lineage composition in the mouse blastocyst ». *Nature Communications* 7. doi: 10.1038/ncomms13463.
- Samarage, Chaminda R., Melanie D. White, Yanina D. Álvarez, Juan Carlos Fierro-González, Yann Henon, Edwin C. Jesudason, Stephanie Bissiere, Andreas Fouras, et Nicolas Plachta. 2015. « Cortical Tension Allocates the First Inner Cells of the Mammalian Embryo ». *Developmental Cell* 34(4):435-47. doi: 10.1016/j.devcel.2015.07.004.
- Sandberg, Magnus, Magdalena Källström, et Jonas Muhr. 2005. « Sox21 Promotes the Progression of Vertebrate Neurogenesis ». *Nature Neuroscience* 8(8):995-1001. doi: 10.1038/nn1493.
- Sasaki, Hiroshi. 2010. « Mechanisms of Trophectoderm Fate Specification in Preimplantation Mouse Development ». *Development, Growth & Differentiation* 52(3):263-73. doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01158.x.
- Sato, Noboru, Laurent Meijer, Leandros Skaltsounis, Paul Greengard, et Ali H. Brivanlou. 2004. « Maintenance of Pluripotency in Human and Mouse Embryonic Stem Cells through Activation of Wnt Signaling by a Pharmacological GSK-3-Specific Inhibitor ». *Nature Medicine* 10(1):55-63. doi: 10.1038/nm979.
- Shi, Junchao, Qi Chen, Xin Li, Xiudeng Zheng, Ying Zhang, Jie Qiao, Fuchou Tang, Yi Tao, Qi Zhou, et Enkui Duan. 2015. « Dynamic Transcriptional Symmetry-Breaking in Pre-Implantation Mammalian Embryo Development Revealed by Single-Cell RNA-Seq ». *Development* 142(20):3468-77. doi: 10.1242/dev.123950.
- Shi, Wenjing, Hui Wang, Guangjin Pan, Yijie Geng, Yunqian Guo, et Duanqing Pei. 2006. « Regulation of the Pluripotency Marker Rex-1 by Nanog and Sox2* ». *Journal of Biological Chemistry* 281(33):23319-25. doi: 10.1074/jbc.M601811200.
- Shirayoshi, Y., T. S. Okada, et M. Takeichi. 1983. « The Calcium-Dependent Cell-Cell Adhesion System Regulates Inner Cell Mass Formation and Cell Surface Polarization in Early Mouse Development ». *Cell* 35(3 Pt 2):631-38. doi: 10.1016/0092-8674(83)90095-8.
- Silva, Jose, Jennifer Nichols, Thorold W. Theunissen, Ge Guo, Anouk L. van Oosten, Ornella Barrandon, Jason Wray, Shinya Yamanaka, Ian Chambers, et Austin Smith. 2009. « Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State ». *Cell* 138(4):722-37. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.039.
- Singh, Amar M., Takashi Hamazaki, Katherine E. Hankowski, et Naohiro Terada. 2007. « A Heterogeneous Expression Pattern for Nanog in Embryonic Stem Cells ». *STEM CELLS* 25(10):2534-42. doi: 10.1634/stemcells.2007-0126.
- Smith, Austin G., John K. Heath, Deborah D. Donaldson, Gordon G. Wong, J. Moreau, Mark Stahl, et David Rogers. 1988. « Inhibition of Pluripotential Embryonic Stem Cell Differentiation by Purified Polypeptides ». *Nature* 336(6200):688-90. doi:

10.1038/336688a0.

- Stadtfield, Matthias, Effie Apostolou, Hidenori Akutsu, Atsushi Fukuda, Patricia Follett, Sridaran Natesan, Tomohiro Kono, Toshi Shioda, et Konrad Hochedlinger. 2010. « Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells ». *Nature* 465(7295):175-81. doi: 10.1038/nature09017.
- Stavridis, Marios P., J. Simon Lunn, Barry J. Collins, et Kate G. Storey. 2007. « A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification ». *Development* 134(16):2889-94. doi: 10.1242/dev.02858.
- Stewart, Colin L., Petr Kaspar, Lisa J. Brunet, Harshida Bhatt, Inder Gadi, Frank Köntgen, et Susan J. Abbondanzo. 1992. « Blastocyst Implantation Depends on Maternal Expression of Leukaemia Inhibitory Factor ». *Nature* 359(6390):76-79. doi: 10.1038/359076a0.
- Stirparo, Giuliano G., Agata Kurowski, Ayaka Yanagida, Lawrence E. Bates, Stanley E. Strawbridge, Siarhei Hladkou, Hannah T. Stuart, Thorsten E. Boroviak, Jose C. R. Silva, et Jennifer Nichols. 2021. « OCT4 Induces Embryonic Pluripotency via STAT3 Signaling and Metabolic Mechanisms ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(3). doi: 10.1073/pnas.2008890118.
- Strumpf, Dan, Chai-An Mao, Yojiro Yamanaka, Amy Ralston, Kallayane Chawengsaksophak, Felix Beck, et Janet Rossant. 2005. « Cdx2 Is Required for Correct Cell Fate Specification and Differentiation of Trophectoderm in the Mouse Blastocyst ». *Development (Cambridge, England)* 132(9):2093-2102. doi: 10.1242/dev.01801.
- Takahashi, Kazutoshi, et Shinya Yamanaka. 2006. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors ». *Cell* 126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Thomson, Matt, Siyuan John Liu, Ling-Nan Zou, Zack Smith, Alexander Meissner, et Sharad Ramanathan. 2011. « Pluripotency circuit members mediate germ layer fate choice of embryonic stem cells ». *Cell* 145(6):875-89. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.017.
- Tomikawa, Junko, Shuji Takada, Kohji Okamura, Miho Terao, Hiroko Ogata-Kawata, Hidenori Akutsu, Satoshi Tanaka, Kenichiro Hata, et Kazuhiko Nakabayashi. 2020. « Exploring Trophoblast-Specific Tead4 Enhancers through Chromatin Conformation Capture Assays Followed by Functional Screening ». *Nucleic Acids Research* 48(1):278-89. doi: 10.1093/nar/gkz1034.
- Tomioka, Mizuho, Masazumi Nishimoto, Satoru Miyagi, Tomoko Katayanagi, Nobutaka Fukui, Hitoshi Niwa, Masami Muramatsu, et Akihiko Okuda. 2002. « Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4–Sox-2 complex ». *Nucleic Acids Research* 30(14):3202-13.
- Torres-Padilla, Maria-Elena, David-Emlyn Parfitt, Tony Kouzarides, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2007. « Histone Arginine Methylation Regulates Pluripotency in the Early Mouse Embryo ». *Nature* 445(7124):214-18. doi: 10.1038/nature05458.
- Tosenberger, Alen, Didier Gonze, Sylvain Bessonard, Michel Cohen-Tannoudji, Claire

- Chazaud, et Geneviève Dupont. 2017. « A Multiscale Model of Early Cell Lineage Specification Including Cell Division ». *Npj Systems Biology and Applications* 3(1):16. doi: 10.1038/s41540-017-0017-0.
- Uchikawa, Masanori, Yusuke Kamachi, et Hisato Kondoh. 1999. « Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken ». *Mechanisms of Development* 84(1):103-20. doi: 10.1016/S0925-4773(99)00083-0.
- Vinot, Stéphanie, Tran Le, Shigeo Ohno, Tony Pawson, Bernard Maro, et Sophie Louvet-Vallée. 2005. « Asymmetric Distribution of PAR Proteins in the Mouse Embryo Begins at the 8-Cell Stage during Compaction ». *Developmental Biology* 282(2):307-19. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.03.001.
- Wang, Jianlong, Dana N. Levasseur, et Stuart H. Orkin. 2008. « Requirement of Nanog dimerization for stem cell self-renewal and pluripotency ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(17):6326-31. doi: 10.1073/pnas.0802288105.
- Wang, Jianlong, Sridhar Rao, Jianlin Chu, Xiaohua Shen, Dana N. Levasseur, Thorold W. Theunissen, et Stuart H. Orkin. 2006. « A Protein Interaction Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells ». *Nature* 444(7117):364. doi: 10.1038/nature05284.
- Wei, Zong, Yang Yang, Peilin Zhang, Rosemary Andrianakos, Kouichi Hasegawa, Jungmook Lyu, Xi Chen, Gang Bai, Chunming Liu, Martin Pera, et Wange Lu. 2009. « Klf4 Interacts Directly with Oct4 and Sox2 to Promote Reprogramming ». *STEM CELLS* 27(12):2969-78. doi: 10.1002/stem.231.
- White, Melanie D., Juan F. Angiolini, Yanina D. Alvarez, Gurpreet Kaur, Ziqing W. Zhao, Esteban Mocskos, Luciana Bruno, Stephanie Bissiere, Valeria Levi, et Nicolas Plachta. 2016. « Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo ». *Cell* 165(1):75-87. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.032.
- Whitten, W. K. 1957. « Culture of Tubal Ova ». *Nature* 179(4569):1081-82. doi: 10.1038/1791081a0.
- Whittington, Niteace, Doreen Cunningham, Kim Le, David De Maria, et Elena M. Silva. 2015. « Sox21 regulates the progression of neuronal differentiation in a dose-dependent manner ». *Developmental biology* 397(2):237-47. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.11.012.
- Wicklow, Eryn, Stephanie Blij, Tristan Frum, Yoshikazu Hirate, Richard A. Lang, Hiroshi Sasaki, et Amy Ralston. 2014. « HIPPO Pathway Members Restrict SOX2 to the Inner Cell Mass Where It Promotes ICM Fates in the Mouse Blastocyst ». *PLoS Genetics* 10(10). doi: 10.1371/journal.pgen.1004618.
- Wray, Jason, Tüzer Kalkan, Sandra Gomez-Lopez, Dominik Eckardt, Andrew Cook, Rolf Kemler, et Austin Smith. 2011. « 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(7):838-45. doi: 10.1038/ncb2267.

- Xue, Zhigang, Kevin Huang, Chaochao Cai, Lingbo Cai, Chun-yan Jiang, Yun Feng, Zhenshan Liu, Qiao Zeng, Liming Cheng, Yi E. Sun, Jia-yin Liu, Steve Horvath, et Guoping Fan. 2013. « Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing ». *Nature* 500(7464):593-97. doi: 10.1038/nature12364.
- Yagi, Rieko, Matthew J. Kohn, Irina Karavanova, Kotaro J. Kaneko, Detlef Vullhorst, Melvin L. DePamphilis, et Andres Buonanno. 2007. « Transcription Factor TEAD4 Specifies the Trophectoderm Lineage at the Beginning of Mammalian Development ». *Development (Cambridge, England)* 134(21):3827-36. doi: 10.1242/dev.010223.
- Yamanaka, Yojiro, Fredrik Lanner, et Janet Rossant. 2010. « FGF Signal-Dependent Segregation of Primitive Endoderm and Epiblast in the Mouse Blastocyst ». *Development* 137(5):715-24. doi: 10.1242/dev.043471.
- Yanagida, Ayaka, Elena Corujo-Simon, Christopher K. Revell, Preeti Sahu, Giuliano G. Stirparo, Irene M. Aspalter, Alex K. Winkel, Ruby Peters, Henry De Belly, Davide A. D. Cassani, Sarra Achouri, Raphael Blumenfeld, Kristian Franze, Edouard Hannezo, Ewa K. Paluch, Jennifer Nichols, et Kevin J. Chalut. 2022. « Cell Surface Fluctuations Regulate Early Embryonic Lineage Sorting ». *Cell* 185(5):777-793.e20. doi: 10.1016/j.cell.2022.01.022.
- Ying, Qi-Long, Jennifer Nichols, Ian Chambers, et Austin Smith. 2003. « BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3 ». *Cell* 115(3):281-92. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00847-X.
- Ying, Qi-Long, Jason Wray, Jennifer Nichols, Laura Batlle-Morera, Bradley Doble, James Woodgett, Philip Cohen, et Austin Smith. 2008. « The ground state of embryonic stem cell self-renewal ». *Nature* 453(7194):519-23. doi: 10.1038/nature06968.
- Yoshida, K., T. Taga, M. Saito, S. Suematsu, A. Kumanogoh, T. Tanaka, H. Fujiwara, M. Hirata, T. Yamagami, T. Nakahata, T. Hirabayashi, Y. Yoneda, K. Tanaka, W. Z. Wang, C. Mori, K. Shiota, N. Yoshida, et T. Kishimoto. 1996. « 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(1):407-11.
- Yuan, H., N. Corbi, C. Basilico, et L. Dailey. 1995. « Developmental-Specific Activity of the FGF-4 Enhancer Requires the Synergistic Action of Sox2 and Oct-3. » *Genes & Development* 9(21):2635-45. doi: 10.1101/gad.9.21.2635.
- Zambrowicz, Brian P., Akira Imamoto, Steve Fiering, Leonard A. Herzenberg, William G. Kerr, et Philippe Soriano. 1997. « Disruption of overlapping transcripts in the ROSA β geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of β -galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(8):3789-94.
- Zhang, Peilin, Rose Andrianakos, Yang Yang, Chunming Liu, et Wange Lu. 2010. « Kruppel-like Factor 4 (Klf4) Prevents Embryonic Stem (ES) Cell Differentiation by Regulating Nanog Gene Expression ». *The Journal of Biological Chemistry* 285(12):9180-89. doi:

10.1074/jbc.M109.077958.

- Zhang, Xiaofei, Juan Zhang, Tao Wang, Miguel A. Esteban, et Duanqing Pei. 2008. « Esrrb Activates Oct4 Transcription and Sustains Self-Renewal and Pluripotency in Embryonic Stem Cells* ». *Journal of Biological Chemistry* 283(51):35825-33. doi: 10.1074/jbc.M803481200.
- Zhao, Bin, Xin Ye, Jindan Yu, Li Li, Weiquan Li, Siming Li, Jianjun Yu, Jiandie D. Lin, Cun-Yu Wang, Arul M. Chinnaiyan, Zhi-Chun Lai, et Kun-Liang Guan. 2008. « TEAD Mediates YAP-Dependent Gene Induction and Growth Control ». *Genes & Development* 22(14):1962-71. doi: 10.1101/gad.1664408.
- Zhao, Suling, Jennifer Nichols, Austin G. Smith, et Meng Li. 2004. « SoxB Transcription Factors Specify Neuroectodermal Lineage Choice in ES Cells ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 27(3):332-42. doi: 10.1016/j.mcn.2004.08.002.
- Zhao, Xiao-yang, Wei Li, Zhuo Lv, Lei Liu, Man Tong, Tang Hai, Jie Hao, Chang-long Guo, Qing-wen Ma, Liu Wang, Fanyi Zeng, et Qi Zhou. 2009. « IPS Cells Produce Viable Mice through Tetraploid Complementation ». *Nature* 461(7260):86-90. doi: 10.1038/nature08267.
- Zhu, Meng, Jake Cornwall-Scoones, Peizhe Wang, Charlotte E. Handford, Jie Na, Matt Thomson, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2020. « Developmental Clock and Mechanism of de Novo Polarization of the Mouse Embryo ». *Science (New York, N.Y.)* 370(6522):eabd2703. doi: 10.1126/science.abd2703.

Résumé

Après la fécondation, l'embryon de souris effectue deux phases de différenciation avant l'implantation. La première permet la formation de cellules externes qui donnent le Trophectoderme (TE) et de cellules internes qui donnent la Masse Cellulaire Interne (MCI). La deuxième se déroule dans la MCI produisant les cellules de l'Epiblaste (Epi) et l'Endoderme Primitif (EPr) disposées en « poivre et sel » au sein de la MCI. Des études récentes montrent que le facteur NANOG est nécessaire pour la spécification des cellules EPI, mais qu'il n'est pas suffisant, suggérant alors que d'autres facteurs sont impliqués dans l'initiation de cette différenciation.

Mon objectif a été d'identifier d'autres facteurs qui pourraient être impliqués, comme NANOG, dans l'initiation de cette spécification en Epi. Je me suis intéressé au gène *Fgf4*, connu comme étant un marqueur de l'Epi ainsi qu'un gène cible de NANOG, pour identifier *in silico* plusieurs facteurs potentiellement impliqués : TEAD4, SOX2, SOX21 et OCT4. L'étude de leurs expressions a mis en avant l'hétérogénéité de ces facteurs à différents stades, ainsi qu'une expression inversement corrélée entre SOX2 et SOX21 au cours du développement. Ces résultats, en plus d'une veille bibliographique, m'a fait émettre l'hypothèse que TEAD4 et SOX21 seraient des répresseurs alors que NANOG et SOX2 seraient des activateurs de l'expression de *Fgf4* et de la spécification en Epi. Il y aurait alors des mécanismes de compétition entre ces facteurs. Mais à ce jour, mes travaux sur l'étude de la surexpression de SOX21 dans l'embryon ne m'ont pas permis de valider cette hypothèse. En parallèle j'ai commencé à développer des cellules souches embryonnaires permettant une surexpression de SOX21 ou de TEAD4. Grâce à ces cellules, nous pourrions étudier les mécanismes de liaisons à l'ADN de ces facteurs et leur impact sur les gènes cibles, ainsi que la potentielle compétition entre eux.

Abstract

After fertilization the mouse embryo performs two rounds of differentiation before implantation. The first allows the formation of outer cells, which give the Trophectoderm (TE) and the inner cells, which give the Inner Cell Mass (ICM). The second step takes place within the ICM by producing the Epiblast (Epi) and the Primitive Endoderm (PrE) cells positioning in a "salt and pepper" pattern in the ICM. Recent studies show that NANOG is necessary for Epi specification, but not sufficient, suggesting that other factors may be involved in the initiation of this differentiation.

My goal was to identify other factors that could be involved, as NANOG, in the initiation of Epi specification. I focused on the *Fgf4* gene, which is a known Epi marker and a target gene of NANOG, to identify *in-silico* several potentially implicated factors: TEAD4, SOX2, SOX21 and OCT4. Analysis of their expressions highlighted the heterogeneity of those factors at different stages and an inverted correlation between SOX2 and SOX21 expressions during the development. Those results and data from literature made me hypothesize that TEAD4 and SOX21 would be repressors while NANOG and SOX2 would be activators of *Fgf4* expression and Epi specification. There would be then a competition between those factors. But nowadays, my work on the analysis of SOX21 overexpression in the embryo didn't allow me to validate this hypothesis. In parallel, I started to develop embryonic stem cells allowing an overexpression of SOX21 or TEAD4. Thanks to these cells, we will be able to study the DNA binding mechanisms of those factors and the impact on the target genes, and also the putative competition between them.