



HAL
open science

Nucléogenèse et régulation de l'expression de l'hétérochromatine péricentromérique dans l'embryon précoce de souris

Maïmouna Koné

► **To cite this version:**

Maïmouna Koné. Nucléogenèse et régulation de l'expression de l'hétérochromatine péricentromérique dans l'embryon précoce de souris. Biologie de la reproduction. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLA030 . tel-02924202

HAL Id: tel-02924202

<https://pastel.hal.science/tel-02924202>

Submitted on 27 Aug 2020

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.

NNT : 2016SACLA030



**THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
AGROPARISTECH (INSTITUT DES SCIENCES ET
INDUSTRIE DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT)**

**ECOLE DOCTORALE N° 581
ABIES : agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé**

Biologie de la reproduction

Par

Melle Maïmouna Coura Koné

**Nucléogenèse et régulation de l'expression de l'hétérochromatine péricentromérique
dans l'embryon précoce de souris**

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 25 Novembre 2016:

Composition du Jury :

M. Christophe ARNOULT	DR, INSERM-Université Grenoble-Alpes	Président
Mme Claire FRANCASTEL	DR, CNRS-Université Paris Diderot	Rapporteur
M. Pascal ROUSSEL	CR, CNRS-Université Paris Diderot	Rapporteur
M. Thomas HEAMS	Mdc, AgroParisTech	Examineur
Mme Amélie BONNET-GARNIER	CR, INRA-ENVA	Examinatrice
Mme Nathalie BEAUJEAN	DR, INSERM-Université Lyon -INRA	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Corinne Cotinot, Directrice de l'unité Biologie du Développement et de la Reproduction de m'avoir accueillie au sein de son unité où tout ce travail a été réalisé. Je remercie Amélie Bonnet-Garnier de m'avoir acceptée en M2 pour mon stage de recherche et de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre en thèse.

Je remercie chaleureusement le Dr. Nathalie Beaujean, ma directrice de thèse. C'est grâce à toi que j'y suis arrivée !! Tu m'as fait confiance et tu as cru en mon potentiel. Tu as toujours su faire ressortir le meilleur de moi. J'ai beaucoup apprécié notre collaboration scientifique. Tes nombreux conseils m'ont permis d'avoir une autre vision de la recherche. La qualité de tes enseignements ont fait de toi mon modèle. Tu m'as donné l'opportunité de m'épanouir au cours de cette thèse et j'espère t'avoir rendue fière. Merci pour ta patience et ton soutien inconditionnel en toutes circonstances. Tu as été bien plus qu'une directrice de thèse pour moi car en dehors du cadre professionnel, tu m'as accompagnée dans toutes les situations difficiles auxquelles j'ai été confrontée. Je n'oublierai jamais les nombreuses lettres pour la préfecture que je t'ai faites rédiger. C'est grâce à toi que j'ai eu un toit pour dormir lors de mon installation en région parisienne et à Lyon mais aussi grâce à toi que mon logement n'était pas vide. Merci pour ta disponibilité et ta bienveillance à mon égard. Tu as rendu mon quotidien plus agréable pour que je sois dans les meilleures conditions. Tu as partagé mes joies et mes peines, tu as toujours su me reconforter et me redonner confiance. Le mot « merci » n'est pas suffisant pour exprimer toute la gratitude que j'ai envers toi.

Je souhaite remercier les membres ayant participé à mes comités de suivi de thèse, Marie-Françoise O'Donohue, Martine Yerle et Philippe Bouvet pour nos discussions fort profitables à l'avancée de mes travaux. Merci également aux membres de mon jury avec une attention particulière pour mes rapporteurs pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Que soient chaleureusement remerciées Tiphaine et Claire, pour le soutien technique et moral qu'elles m'ont apporté et qui continue jusqu'à présent. Vous m'avez supporté au quotidien, partagé mes échecs mais aussi mes succès. Dans la joie comme dans la peine, j'ai toujours pu compter sur vous. J'entrais dans votre bureau avec des problèmes et j'en ressortais toujours avec des solutions, le sourire en plus. De par votre bonne humeur, vous avez rendu la vie au laboratoire plus agréable. Je chéris tous les bons moments passés avec vous. Merci pour vos conseils, grâce à vous j'ai évité des heures de thérapie et économisé de l'argent. Vous avez toujours su trouver les mots pour me remotiver. Tiphaine, merci pour ton aide logistique lors de mes déménagements. Merci pour les heures que tu as accepté de passer au confocal pour moi, toujours dans la bonne humeur. Je n'oublierai jamais tous nos fous rires. Tu as été mon binôme au cours de ces derniers mois. Ton aide m'a permis d'avancer dans mon projet. Merci de m'avoir fait découvrir le groupe MUSE, dont les chansons me remettent de bonne humeur. Je ne peux désormais plus m'en passer !! Claire, ta joie de vivre et tes talents de pâtissière vont beaucoup me manquer. Y'en a pas deux comme toi !

Grand merci à toi Vincent pour ton aide technique. Tu as été mon binôme sur le projet AndroGyne et ton aide a permis de faire avancer le projet. Merci pour tes conseils sur la micromanipulation d'embryons et tes nombreuses connaissances dont tu m'as fait bénéficier. Tu as fait preuve de bienveillance à mon égard. Je n'oublierai jamais toutes les fois où tu es venu me récupérer au labo très tard dans la nuit parce qu'il fallait rester traiter les embryons. Merci pour ta disponibilité et ta gentillesse.

Je remercie Pierre Adenot de m'avoir donné accès à la plateforme MIMA2 et à ses microscopes sur lesquels j'ai passé tant d'heures. Merci à Pascale Debey pour sa disponibilité et sa contribution dans la réalisation de cette thèse. Tes encouragements ont été d'un grand réconfort. Tes précieux conseils m'ont permis d'avancer dans la réalisation de mon projet.

Merci à Renaud avec qui j'ai collaboré au cours de ma thèse. Merci pour ton aide technique et tes conseils, mais aussi pour ta disponibilité et ta gentillesse. Je n'oublierai jamais les fous rires qu'on a eus pendant toutes ces longues heures passées à la plateforme MIMA2. Merci pour tes encouragements. Je garde un bon souvenir de notre collaboration.

Je remercie Martine Chebrout pour sa gentillesse, son aide technique et ses conseils dans la réalisation de ce projet.

Merci aussi à tous les autres membres de l'équipe. En particulier, Eugénie Canon, Nathalie Peynot, Laurent Boulanger, et Nathalie Daniel, Laurence Gall, Ludivine Lafont, Sylvie Ruffini, pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Je remercie Mariam Raliou, ma « grande sœur » pour son soutien tout au long de cette thèse. Tes conseils m'ont aidée et m'ont réconfortée. Tu as été à mon écoute et tu as toujours été là pour moi dans la joie comme dans la peine. Je n'oublierai jamais les bons moments passés avec toi. Tu as rendu mon quotidien au laboratoire plus agréable.

Je tiens à remercier tous les membres de l'unité BDR pour leur accueil et leur gentillesse. Ainsi que toutes les personnes qui ont patiemment accepté de partager leurs compétences avec moi. Petite pensée particulière pour les membres du secrétariat pour leur aide et leur bonne humeur qu'ils m'ont fait partager.

Merci à Sarah-Anne, Lessly avec qui j'ai passé de bons moments dans le bureau des étudiants.

Merci à Clara, Jean-Phillipe, Maxime, Mattéo, et Audrey Prezelin, Hala, et Audrey Lesage. Je n'oublierai jamais les très bons moments avec vous...nos soirées, l'IETS. Merci d'avoir rendu mon quotidien au laboratoire plus agréable.

Je souhaite remercier les directeurs de l'Institut Cellule Souche et Cerveau, Dr. Colette Dehay et Dr. Henri Kennedy pour m'avoir accueillie au sein de l'U846/I208 et permis de finir mon doctorat.

Merci au Dr. Pierre Savatier ainsi qu'à tous les membres de son équipe pour m'avoir accueillie pour poursuivre et rédiger ma thèse. Leur gentillesse et leur bonne humeur ont facilité mon intégration. Je garde un très bon souvenir de mon passage dans cette équipe. Petite pensée particulière pour Chloé, Lucas, Claire, Irène, Anaïs, Antoine, Synara avec qui j'ai passé de très bons moments.

Pour terminer, je tiens à remercier toute ma famille et plus particulièrement mes parents qui m'ont toujours encouragée et soutenue dans mon cursus. Ils m'ont donné les moyens financiers pour me permettre d'arriver là où je suis. Papa, Maman, grâce à vous je n'ai jamais manqué de rien pendant mon aventure «estudiantine» à l'étranger. Merci de m'avoir permis d'atteindre mes objectifs. Pensée particulière à mon père adoré qui malheureusement m'a quittée trop tôt... Papa, je te dédie cette thèse car c'est grâce à toi que j'ai pu la réaliser. Tu n'assisteras pas à ma soutenance, à ma remise de diplôme, et tu ne pourras pas te réjouir de ma réussite mais j'espère t'avoir rendu fier. Sache que tous les sacrifices que tu as faits pour moi n'ont pas été vains.

Table des matières

<i>Remerciements</i>	2
Liste des abréviations	5
INTRODUCTION	11
Chapitre I - l'embryon préimplantatoire	11
I-1) Fécondation et premier cycle embryonnaire chez la souris	11
I-1-1) Les gamètes	11
I-1-2) Fécondation et premier cycle embryonnaire	16
I-2) Organisation du génome dans l'embryon précoce de souris	18
I-2-1) La chromatine : généralités	18
I-2-2) Asymétrie parentale dans l'embryon dès le stade 1-cellule.....	22
I-3) Démarrage des activités transcriptionnelles dans l'embryon de souris	31
I-3-1) Activation « mineure » et « majeure »	32
I-3-2) Régulation de l'activité transcriptionnelle.....	35
I-4) Evolution du développement jusqu'au stade blastocyste	39
Chapitre II/ Les compartiments nucléaires impliqués dans la ribogenèse.....	41
II-1) Le nucléole en cellules somatiques.....	41
II-1-1) Généralités.....	41
II-1-2) Les protéines nucléolaires	45
II-1-3) Dynamique du nucléole pendant le cycle cellulaire	49
II-2) Le nucléole et le NPB dans l'embryon de souris	51
II-2-1) Définition en fonction du stade de développement	51
II-2-2) Origine et structure des NPB dans l'embryon de souris.....	52
II-2-3) Transition entre NPB et nucléole réticulé de type «somatique»	56
II-2-4) Fonctionnement et dynamique nucléolaire dans l'embryon	58
II-3) Le corps de Cajal	59
II-3-1) Composition.....	60
II-3-2) Fonction	61
Chapitre III/ Les séquences centromériques, péricentromériques et ribosomiques.....	63
III-1) L'hétérochromatine péricentromérique.....	63
III-1-1) Organisation, formation et fonction de l'hétérochromatine péri-centromérique.....	63
III-1-2) Transcription et régulation de l'hétérochromatine péricentromérique	69
III-1-3) L'hétérochromatine péri/centromérique dans l'embryon de souris	71
III-2) Les gènes ribosomiques	77

III-2-1) Structure et localisation des gènes ribosomiques.....	77
III-2-2) Transcription des gènes ribosomiques.....	80
III-2-3) Maturation de l'ARN pré-ribosomique et assemblage des ribosomes.....	83
III-2-4) Etat transcriptionnel et régulation.....	85
III-2-5) Proximité des ADNr avec l'hétérochromatine péricentromérique.....	89
III-2-6) Régulation des gènes ribosomiques dans l'embryon de souris.....	91
PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE.....	94
MATERIEL ET METHODES.....	97
Superovulation et autorisation d'expérimentation.....	97
Collecte d'ovocytes en métaphase II et d'embryons au stade 1-cellule.....	97
Production d'embryons parthénotes diploïdes.....	98
Production d'embryons androgénotes par injection de spermatozoïde.....	98
Production d'embryons androgénotes et gynogénotes par échange de pronoyaux.....	99
Immunofluorescence UBF et NOPP140.....	100
Sondes pour l'ADN-FISH.....	101
Sondes pour l'ARN-FISH des séquences satellites majeurs.....	101
ADN-FISH des séquences satellites majeurs et mineurs.....	102
ARN-FISH des séquences satellites majeurs (brin sens et anti-sens).....	103
ADN-FISH des gènes ribosomiques et des séquences satellites majeurs.....	103
Observation et acquisition des images.....	105
Tests statistiques.....	105
RESULTATS.....	109
Partie I- Nucléogenèse embryonnaire.....	109
I-1) Distribution des protéines nucléolaires UBF et NOPP140 au cours du développement embryonnaire précoce.....	109
I-1-1) Introduction.....	109
I-1-2) Article " 3D distribution of UBF & Nopp140 in relationship to rDNA transcription during mouse preimplantation development".....	109
I-2) Distribution et organisation des gènes ribosomiques au cours du développement.....	123
I-2-1) Introduction.....	123
I-2-2) Evolution des NPB au cours du développement.....	123
I-2-3) Organisation des séquences d'ADNr du stade 1-cellule au stade blastocyste.....	125
I-2-4) Interaction entre ADNr et l'hétérochromatine péricentromérique.....	131
I-2-5) Discussion et perspectives.....	133
I-2-5) Perspectives.....	139

II-Organisation de l'hétérochromatine péricentromérique et contribution parentale	142
II-1) Introduction	142
II-2) Résultats.....	145
II-2-1) Organisation des séquences satellites majeurs et mineurs.....	145
II-2-2) Transcription des séquences satellites majeurs	155
II-2-3) Cinétique de développement des embryons.....	158
II-2-4) Discussion	160
CONCLUSION GENERALE	171
BIBLIOGRAPHIE	177

Liste des abréviations

5hmC: 5-hydroxyméthylcytosine

5mC: 5-méthylcytosine

-A-

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNr: ADN ribosomique

ARN pol: ARN polymérase

ARNm: ARN messenger

ARNr: ARN ribosomique

-B-

BrUTP: 5-bromouridine 5'-triphosphate

BSA: bovine serum albumine

-C-

CAF-1: chromatin assembly factor 1

CB: Cajal body

CBX: chromo box

CDX2: caudal type homeobox 2

CENP-A: centromeric protein A

CPE: core promoter element

CpG: cytosine-phosphate-guanine

CSB: cockayne Syndrome protein B

CTD: domaine carboxy-terminal

Cy3/5: cyanine 3/5

-D-

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DFC: dense fibrillar component

DIG: digoxygénine

DNMT: DNA methyltransferase

-E-

EED: embryonic ectoderm development

EGA: embryonic genome activation

ETS: external transcribed spacer

EZH1/2: enhancer of zeste homolog

-F-

FC: fibrillar center

FISH: fluorescent in situ hybridization

FITC: fluorescein isothiocyanate

FSH: follicle stimulating hormone

FRAP: fluorescent recovery after photobleaching

-G-

GC: granular component

GV: germinal vesicle

GVBD: germinal vesicle break down

-H-

H2AK119ub: ubiquitylation de H2A sur la lysine 119

H3K27me1/2/3: mono/di/tri triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27

H3K9me3: mono/di/tri triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9

H4K20me1/2/3: mono/di/tri méthylation H4 sur la lysine 20

HAT: histone acetyltransferase

hCG: human chorionic gonadotropin

HDAC: histone deacetylase

HMG: high mobility group

HMT: histones methyltransferase

HP1: heterochromatin protein 1

hpa: heure post-activation

hphCG: heure post-hCG

hpinj: heure post-injection

-I-

ICM: Inner Cell Mass

ICSI: intra cytoplasmic sperm injection

IGS: intergenic spacer

ITS: internal transcribed spacer

-L-

LH: luteinizing hormone

LNA: locked nucleic acid

-M-

MBD: methyl-CpG binding domain

MII: métaphase II

MLL-1: mixed lineage leukemia 1

MPF: maturing promoting factor

MZT: maternal to zygotic transition

-N-

NLB: nucleolus-like body

NOPP140: nucleolar phospho protein 140

NoRC: nucleolar remodeling complex

NOR: nucleolus organizer region

NPB: nucleolar precursor body

NPM: nucléoplasmine

NSN: non-surrounded nucleolus

NuRD: nucleosome remodeling and deacetylation complex

-O-

Oct4: octamer-binding transcription factor 4

-P-

PAF: pol-I associated factors

PBS: phosphate buffered saline

PCAF: p300/CBP associated factor

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

PEV: position effect variegation

PFA: paraformaldéhyde

PHD: plant homeo domain

PHF8: PHD finger protein 8

PIC: pre-initiation complex

PMSG pregnant mare serum gonadotropin

PN: pronoyau(x)

PNB: prenucleolar body

Pou5f1: POU class 5 homeobox 1

PRC: polycomb group complex

PRM: protamine

PTRF: pol I and transcript release factor

-R-

RNP: ribonucleoprotein

-S-

SET: su(var)3-9, enhancer of zeste, trithorax

SETDB1: SET domain bifurcated 1

siRNA: small interfering RNA

SL1: selectivity factor 1

SN: Surrounded Nucleolus

SNF2h: sucrose non fermenting 2 homolog

SMN: survival of motor neurons

SnoRNA: small nucleolar RNA

snoRNP: small nucleolar ribonucleoprotein

snRNP: small nuclear ribonucleoprotein

SP1: specificity protein 1

SSC: saline sodium citrate

SUZ12: suppressor of zeste 12

-T-

TAF: TBP-associated factor

TBP: TATA box binding protein

TE: trophoctoderme

TEAD4: TEA domain family member 4

TET: ten eleven translocation

TIF-IB: transcription initiation factor

TIF1alpha: transcription intermediary factor 1 alpha

TIP5: TTF-I interacting protein 5

TRC: transcription-requiring complex

TTF-1: transcription termination factor 1

-U-

UBF: upstream binding factor

UCE: upstream control element

-W-

WDHD1: WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1

INTRODUCTION

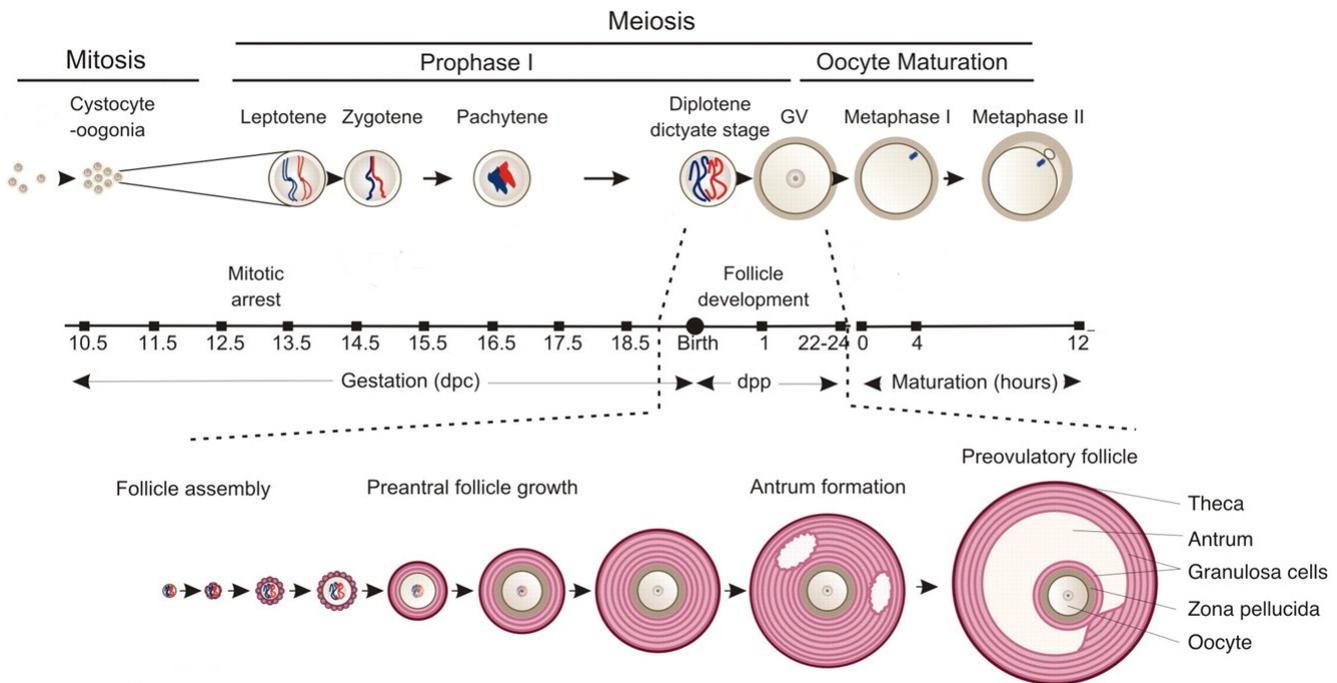


Figure I-1: Croissance ovocytaire et folliculaire chez la souris. Au cours de la vie fœtale, les ébauches gonadiques femelles sont colonisées par les cellules germinales primordiales qui se multiplient activement et donnent naissance aux ovogonies. Lorsque la prolifération mitotique s'arrête, les cellules entrent en méiose et progressent jusqu'en prophase de première division méiotique (stade diplotène). Les chromosomes diplotènes vont alors se décondenser pour former la « vésicule germinative » (GV) qui reste à ce stade jusqu'à la reprise de la méiose. Les ovocytes sont alors entourés par une couche unique de cellules folliculaires (follicules primordiaux). Après la naissance, les follicules primordiaux se transforment en follicules primaires comprenant une couche de cellules cuboïdales, puis en follicules secondaires avec plusieurs couches de cellules. A ce stade, l'ovocyte se recouvre d'une couche protectrice de glycoprotéines (zone pellucide) et la croissance folliculaire se poursuit: les cellules folliculaires se multiplient rapidement et une cavité intrafolliculaire (l'antrum) se forme. A partir de la puberté (22-24 jours après la naissance), les hormones hypophysaires provoquent à chaque cycle la reprise de la méiose : certains follicules secondaires entrent en croissance rapide et l'antrum grossit formant les follicules préovulatoires. La reprise de la méiose dans les ovocytes les fait progresser jusqu'en métaphase II (M II). A l'ovulation, les follicules se déchirent et les ovocytes en MII sont expulsés vers l'oviducte environ 12h après le pic hormonal de LH. Adaptée de Racki and Richter, 2006.

INTRODUCTION

Chapitre I - l'embryon préimplantatoire

I-1) Fécondation et premier cycle embryonnaire chez la souris

I-1-1) Les gamètes

Au cours de la vie fœtale, les cellules germinales primordiales vont coloniser les crêtes génitales (futurs gonades) où elles vont proliférer, s'auto-renouveler et se différencier. Les cellules germinales vont subir un certain nombre de modifications nucléaires et cytoplasmiques dont l'objectif final est la formation de gamètes haploïdes: spermatozoïdes et ovocytes.

L'ovocyte

Chez la souris, l'ovogenèse démarre avant la naissance par la prolifération des ovogonies, qui par la suite entrent en prophase de première division méiotique. Au stade diplotène de cette prophase, les chromosomes vont se décondenser et former un noyau appelé « vésicule germinale » (germinal vesicle en anglais, ou GV). Cet ovocyte au stade GV bloque sa progression méiotique et est entouré d'une couche de cellules de la granulosa pour former un follicule primordial (Figure I-1). Les souris femelles naissent avec un stock défini de follicules primordiaux contenant des ovocytes au stade GV. Ces follicules et ovocytes vont ensuite évoluer de façon synchrone: le follicule primordial croît en taille suite à la multiplication des cellules de la granulosa et à leur organisation en bicouche, formant ainsi un follicule préantral (Figure I-1). Parallèlement, l'ovocyte au stade GV grandit, passant de 15µm à 50~80 µm de diamètre. Au bout de 14 jours, un antrum se forme dans le follicule qui atteint alors une taille de 0,2 mm (Monniaux et al. 1997).

L'observation en microscopie de fluorescence de ces ovocytes, après marquage de l'ADN, a permis de les classer en 2 grands groupes selon l'état de condensation et l'organisation de la chromatine dans la GV (Mattson and Albertini 1990; Wickramasinghe et al. 1991; Debey et al. 1993; Zuccotti et al. 1995). Le premier groupe correspond aux ovocytes de type NSN (non-surrounded nucleolus) dans lesquels la chromatine a une configuration décondensée en périphérie d'une structure ressemblant au nucléole (nucleolus-like body en anglais, ou NLB) (figure I-1). Le deuxième regroupe les ovocytes de type SN (surrounded nucleolus) dont le NLB est entouré d'un anneau de chromatine condensée. Dans le nucléoplasme des ovocytes SN, on retrouve aussi des zones de chromatine condensée en périphérie nucléaire (figure I-2).

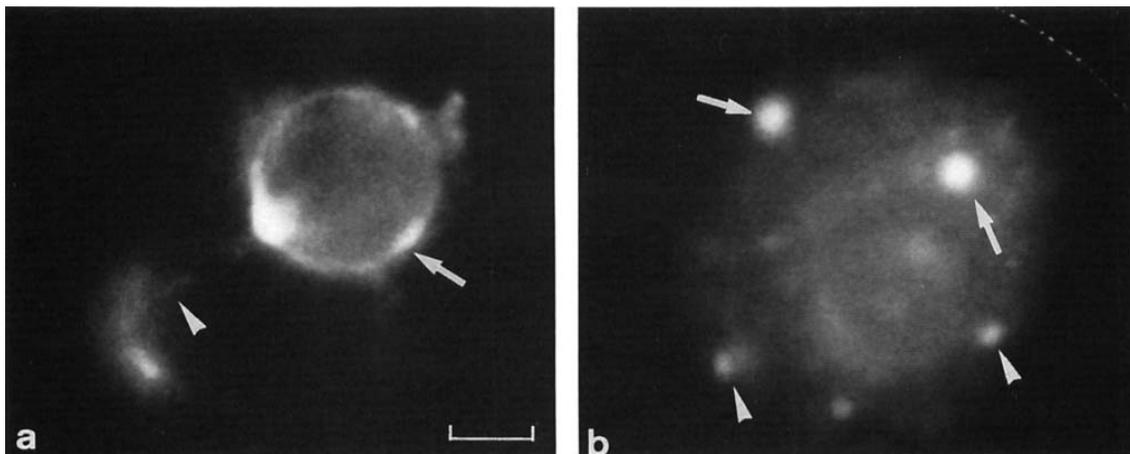


Figure I-2: Images en immunofluorescence de différents ovocytes vivants, fraîchement isolés par ponction folliculaire, après marquage de l'ADN au Hoechst 33342. a: configuration SN avec un anneau périnucléolaire fluorescent (flèche) et des fibres de chromatine condensée (tête de flèche). b: configuration NSN; le nucléole ne se distingue pas en fluorescence ; présence de petites (pointes de flèches) et grandes (flèches) granulosités fluorescentes. Barre d'échelle: 5 μ m. Modifiée à partir de Debey et al. 1993.

La capacité de l'ovocyte à poursuivre sa maturation méiotique ne s'acquiert qu'à la puberté, à partir du 22^{ème} jour après la naissance (Eppig and Schroeder 1989). Les femelles connaissent alors périodiquement des cycles ovulatoires au cours desquels un lot d'ovocytes répond favorablement aux stimuli des gonadotropines hypophysaires, la FSH (follicle stimulating hormone) et la LH (luteinizing hormone), qui réinitient la maturation méiotique. La FSH stimule la croissance de certains follicules secondaires qui se transforment en follicules à antrum plus larges appelés follicules de De Graff ou follicules préovulatoires. C'est le pic préovulatoire de LH qui va entraîner une cascade d'évènements conduisant à la reprise de la méiose et à l'ovulation. Dans les ovocytes au stade GV, la reprise de la méiose va se manifester d'abord par la rupture de la vésicule germinale (germinal vesicle break down en anglais, ou GVBD) et la condensation des chromosomes sous contrôle du MPF (maturing promoting factor) (Rime et al. 1989). L'ovocyte progresse ensuite vers le stade métaphase II (MII), étape de la deuxième division méiotique où il reste bloqué jusqu'à l'ovulation (Figure I-1). Environ 12h après le pic préovulatoire de LH, le follicule se déchire et l'ovocyte en MII est expulsé dans l'oviducte (au niveau de l'ampullae).

Parmi les ovocytes de type SN et NSN, la configuration SN est présentée comme étant le dernier stade de l'ovocyte GV précédant l'ovulation. En effet, les ovocytes de type SN, plus grands que les ovocytes NSN, n'apparaissent qu'à partir du 17^{ème} ou 18^{ème} jour après la naissance (Wickramasinghe et al. 1991; Zuccotti et al. 1995). Par ailleurs, selon les

observations sur coupe ovarienne de souris juvéniles (Mattson and Albertini 1990), les ovocytes de type NSN sont présents essentiellement dans les follicules préantraux alors que les grands follicules à antrum contiennent 100 % d'ovocytes de type SN. Enfin, au cours de la croissance ovocytaire *in vitro*, les ovocytes NSN adoptent parfois la configuration SN par réorganisation et condensation de la chromatine autour du NLB (Mattson and Albertini 1990; Debey et al. 1993; Zuccotti et al. 1995).

La différence d'organisation de la chromatine observée entre ovocyte NSN et SN s'accompagne également d'une différence d'activité transcriptionnelle : les ovocytes NSN présentent une activité transcriptionnelle qui est progressivement réprimée parallèlement à l'acquisition de la configuration SN (Worrada et al. 1994; Bouniol-baly et al. 1999). C'est donc dans l'ovocyte NSN que se déroule une phase de transcription intense avec stockage massif des transcrits essentiels pour la croissance ovocytaire et les premiers stades du développement embryonnaire. Ce stockage participe à la contribution maternelle dans la formation du futur embryon.

L'ovulation est donc précédée par une période de maturation nucléaire et cytoplasmique conduisant à l'obtention d'un œuf fécondable, notamment capable de s'activer, de former des pronoyaux et de poursuivre le développement (Eppig et al. 1994). Cependant, la maturation nucléaire qui s'accompagne d'un arrêt de la transcription dans l'ovocyte est inachevée à l'inverse de la maturation cytoplasmique. En effet, au moment de l'ovulation, les ovocytes sont bloqués en Métaphase II et ne réinitient leur méiose qu'au moment de la fécondation par le spermatozoïde. Parallèlement à ce blocage de la maturation nucléaire, aucune activité transcriptionnelle n'est détectée.

Le spermatozoïde

Chez le mâle, les cellules germinales primordiales vont proliférer puis arrêter leur accroissement numérique avant la naissance. Ces cellules germinales primordiales se différencient alors en spermatogonies de type A à partir du 3^{ème} au 7^{ème} jour après la naissance. Les spermatogonies de type A, adjacentes à la membrane basale des tubes séminifères initient leur différenciation à la puberté. Ce processus biologique ou spermatogenèse, peut se diviser en trois grandes étapes : la première au cours de laquelle les spermatogonies prolifèrent, la deuxième caractérisée par deux divisions méiotiques pour donner des cellules haploïdes et la troisième (spermiogenèse) qui correspond à la maturation des cellules haploïdes en spermatozoïdes (Rathke et al. 2014). Ainsi au moment de la maturité sexuelle, les spermatogonies de type A subissent plusieurs divisions. Une des cellules filles assure l'auto-

renouvellement du stock de spermatogonies tandis que l'autre spermatogonie se transforme progressivement en spermatogonie de type B. Les spermatogonies de type B vont à leur tour se multiplier, grandir, puis migrer vers le lumen des tubes séminifères où elles se transforment en spermatocytes I (primaire). Le spermatocyte I subit successivement deux divisions méiotiques conduisant à l'obtention de spermatides. Les spermatides se différencient en spermatozoïdes via la spermiogenèse qui s'accompagne d'un ensemble de modifications morphologiques; permettant d'obtenir un spermatozoïde capable d'interagir avec l'ovocyte en attente dans l'ampulla et de le féconder.

La spermiogenèse est aussi la phase au cours de laquelle des remaniements s'opèrent au niveau nucléaire (Ward 2010). Les remodelages chromatiniens qui ont lieu au cours de la spermiogenèse sont nécessaires à la réduction du volume nucléaire au moment où la tête du spermatozoïde adopte sa forme allongée caractéristique (Balhorn 2007). Par ailleurs, les histones (unités fondamentales de la chromatine) seront remplacées par des protéines dites de transition puis par les protamines. Ces dernières rendant la chromatine du spermatozoïde très condensée (Rodman et al. 1984; Ward 2010; Miller et al. 2010; Rathke et al. 2014). On retrouve deux formes de protamines dans les spermatozoïdes matures : protamine 1 (PRM1) et protamine 2 (PRM2) (Kleene et al. 1985; Yelick et al. 1987; Braun 2001). Ces deux types de protamines sont cruciales aussi bien pour la fertilité que pour le succès du développement embryonnaire (Cho et al. 2001; Cho et al. 2003).

Les protamines sont riches en résidus arginine (entre 46.8 et 61.2%) essentielles pour les fortes liaisons avec l'ADN et en résidus cystéines assurant les ponts disulfures inter- et intra-protamines (Carrell et al. 2007). L'association protamines/ ADN forme un toroïde (Figure I-3), unité fonctionnelle de la chromatine du spermatozoïde à l'image du nucléosome mais induisant un niveau de compaction très élevé (Hud et al. 1993; Hud et al. 1995; Brewer et al. 2003). La protamination, quant à elle, est un mécanisme offrant protection, résistance et stabilité au génome paternel jusqu'à la fécondation (Kuretake et al. 1996; Brewer et al. 1999; Balhorn et al. 2000). Toutefois, sa mise en place nécessite l'arrêt préalable de la transcription dans le spermatozoïde (Ward 2010 ; Rathke et al. 2014). Par ailleurs, même si les protamines représentent les constituants majeurs du génome du spermatozoïde, des données suggèrent qu'une portion de la chromatine (1-2% chez la souris) reste associée aux histones. L'impact lors du développement embryonnaire de ces histones résiduelles au sein du spermatozoïde et des modifications épigénétiques associées est peu documenté.

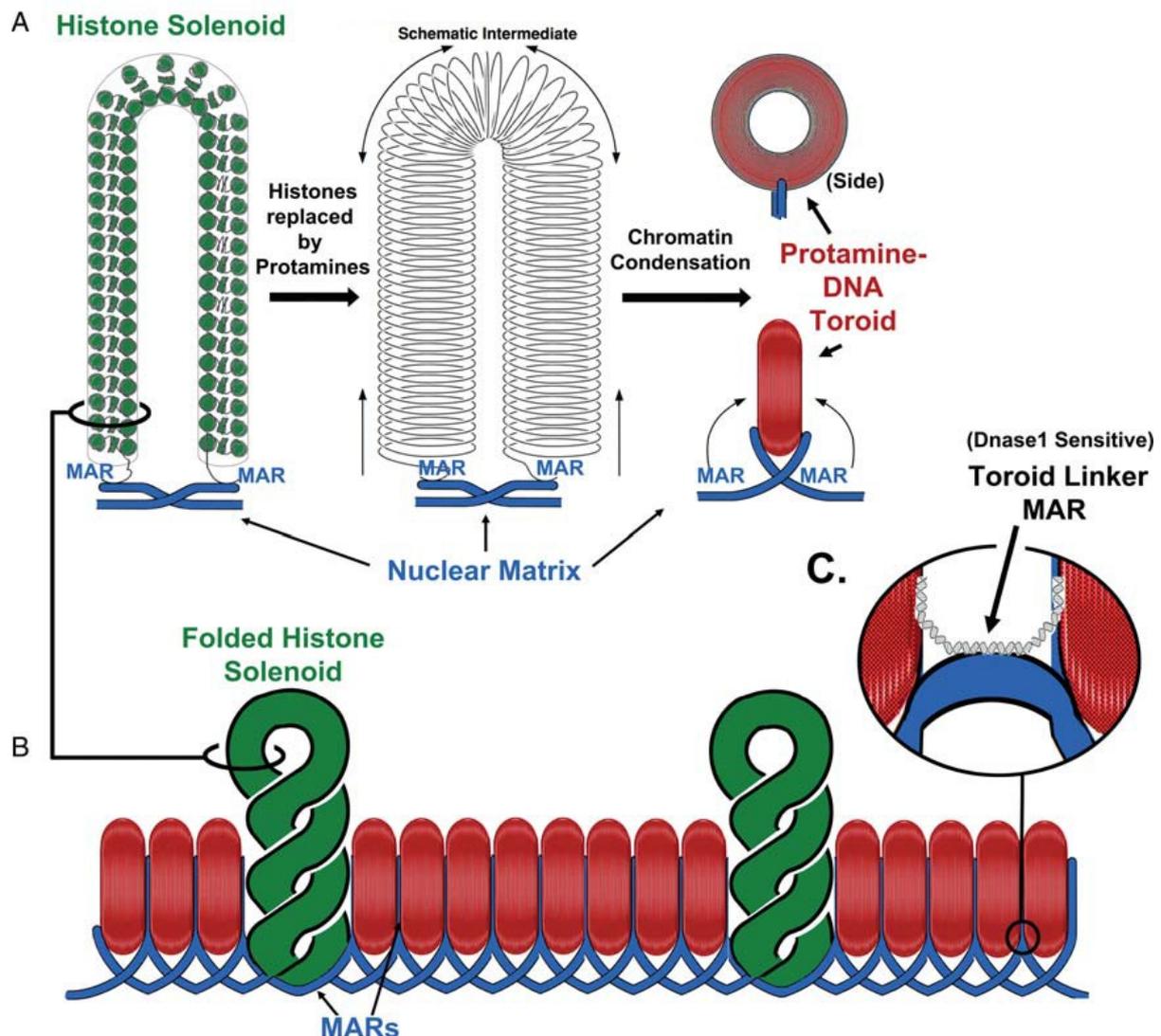


Figure I-3: Trois principaux éléments structuraux de la chromatine du spermatozoïde.

(A) Au cours de la spermiogenèse, les histones sont remplacées par les protamines, condensant l'ADN dans des toroïdes empaquetés. Chaque toroïde de protamines forme un domaine en boucle; (B) Les toroïdes de protamines peuvent être organisés par empilement les uns à côté des autres. Des données récentes suggèrent que certains domaines de l'ADN conservent les histones (solénoïde vert). Ceux-ci peuvent être des domaines entiers de boucles qui ne sont pas condensés par les protamines. (C) Les brins d'ADN qui lient les toroïdes de protamines sont sensibles à la nucléase, et peuvent être liés aussi bien à des histones, qu'à la MAR, région de fixation à la matrice. Source: Ward 2010.

Il a cependant été démontré que les histones (et variants d'histones) persistant après la spermatogenèse ne sont pas distribués au hasard et se retrouvent au contraire au niveau de certains promoteurs de gènes intervenant dans la fécondation et le développement embryonnaire (Hammoud et al. 2009; Brykczynska et al. 2010).

Hormis les protamines et les histones, l'ADN du spermatozoïde se lie également à la matrice nucléaire du spermatozoïde, ensemble ribonucléoprotéique formant un réseau fibreux à l'intérieur du noyau qui permet aux fibres de chromatine de s'organiser en trois dimensions, sous forme de larges boucles. Cette matrice représente un autre niveau d'organisation de la chromatine (Ward 2010) jouant un rôle important au cours du développement. En effet, la matrice nucléaire du spermatozoïde est héritable, donc transmise à l'embryon. Shaman et al. (2007) ont montré que cette matrice intervient notamment dans la formation du pronoyau paternel et est essentielle pour la réplication.

La contribution du spermatozoïde dans la formation d'un embryon ne se limite pas à l'apport de son génome haploïde (chromosomes homologues à ceux de l'oocyte) (Boerke et al. 2007; Jodar et al. 2013). Le spermatozoïde apporte aussi le centrosome qui est essentiel pour l'achèvement de la méiose ainsi que des ARN comme suggéré par les travaux d'Ostermeier et al. (2004). En effet ces auteurs ont montré pour la première fois que le spermatozoïde apporte des ARN encore détectables dans l'ovocyte 3h après la fécondation.

I-1-2) Fécondation et premier cycle embryonnaire

Au moment du coït, les spermatozoïdes sont libérés dans le tractus génital femelle où ils subissent la capacitation, les rendant aptes à féconder l'ovocyte.

La fécondation, union de l'ovocyte et du spermatozoïde et notamment de leurs génomes aboutit à la formation d'un embryon unicellulaire (stade 1-cellule ou zygote). L'embryon évolue au cours des jours suivants et se développe sur plusieurs cycles cellulaires pour donner un blastocyste, dernier stade avant l'implantation. La fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte déclenche une succession d'évènements déterminants pour la suite du développement. Il s'agit notamment de l'augmentation intra-cytoplasmique du calcium ovocytaire (Ajduk et al. 2008). Cela active l'ovocyte qui va réinitier et achever sa méiose par expulsion du deuxième globule polaire (Kubiak et al. 1993; Zernicka-Goetz et al. 1995). Il y a ensuite exocytose des granules corticaux dans l'espace périvitellin qui augmente la rigidité de la zone pellucide empêchant ainsi la polyspermie et enfin, la décondensation des génomes parentaux et la formation des pronoyaux.

Une fois les deux gamètes fusionnés, la décondensation asynchrone des deux génomes s'effectue dans le cytoplasme ovocytaire. Le génome maternel se décondense en premier suivi du génome paternel environ 4h après l'entrée du spermatozoïde (Debey et al. 1989; Adenot et

al. 1991) (figure I-4). La décondensation du génome paternel se manifeste par la rupture des ponts disulfures inter- et intra-protamines compactant l'ADN puis par le remplacement des protamines par les histones (Kopečný and Pavlok 1975; Rodman et al. 1981; Perreault et al. 1984; Perreault et al. 1987; Dieker et al. 2005; Ajduk 2006). La chromatine paternelle adopte ainsi une configuration moins compacte que celle conférée par les protamines. Le génome paternel va ensuite se recondenser suite au remplacement des protamines par les histones qui s'organisent en nucléosomes en association avec l'ADN. Les facteurs nécessaires à la décondensation, à savoir les enzymes et les histones remplaçant les protamines sont fournies par le cytoplasme ovocytaire (Yanagimachi 1978; Kunkle et al. 1978).

Suite à cette décondensation, des membranes se forment autour de chaque génome permettant la formation des pronoyaux maternel et paternel (Adenot et al. 1991). Les pronoyaux initialement de petite taille et localisés en périphérie du cytoplasme zygotique commencent à migrer vers le centre du zygote environ 12h post-fécondation (Howlett and Bolton 1985; Debey et al. 1989). Progressivement, les deux pronoyaux se rapprochent et augmentent en volume. C'est sur la base de ces deux critères de position et de taille qu'Adenot et al. (1997) ont proposé une nomenclature pour décrire différents stades de pronoyaux (PN) dans l'embryon 1-cellule, allant de PN0 à PN5. A partir du stade PN3 une différence de taille a été observée entre les deux pronoyaux, le paternel étant plus gros que le maternel (figure I-4). Il faut aussi noter que, dès leur formation, les pronoyaux contiennent des structures sphériques appelées NPB (nucleolar precursor bodies) (Austin 1961; Geuskens and Alexandre 1984; Debey et al. 1989). Ces structures compactes, entourées d'un anneau de chromatine condensée, ont été considérées pendant plusieurs années comme des précurseurs de nucléoles (Debey et al. 1989). L'origine, la structure et le rôle de ces structures seront abordés plus en détails dans le chapitre II du manuscrit.

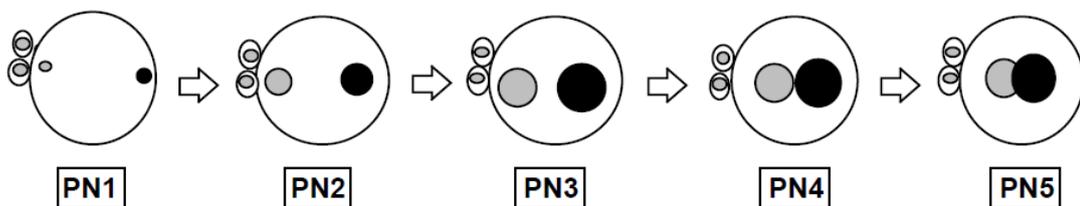


Figure I-4 : Nomenclature des différents stades de pronoyaux dans l'embryon au stade 1-cellule (PN0-PN5). Les chromatines mâle et femelle sont représentées par les cercles noir et gris respectivement. PN1, petits pronoyaux localisés à la périphérie de l'embryon. PN2, les pronoyaux augmentent en taille et commencent la migration vers le centre de l'embryon. PN3, les pronoyaux larges migrent vers le centre. PN4, les pronoyaux larges sont proches au centre de l'embryon. PN5, les pronoyaux larges sont apposés. Source: Adenot et al. 1997.

I-2) Organisation du génome dans l'embryon précoce de souris

Les pronoyaux maternel et paternel présentent aussi des différences au niveau de l'organisation de leur génome. J'aborderai rapidement quelques généralités sur la chromatine et sa composition/structure avant de détailler ces différences.

I-2-1) La chromatine : généralités

La chromatine est une structure dynamique et modulable dont l'organisation peut être influencée par l'environnement cellulaire, passant ainsi de l'état condensé à décondensé et réciproquement. La plasticité chromatinienne fait notamment intervenir des variants d'histones, des modifications de certains résidus d'histones et de l'ADN lui-même. Cela constitue un premier niveau de régulation de la conformation chromatinienne. Au cours de ces dernières années, les avancées technologiques ont permis une meilleure caractérisation de la structure de la chromatine et de son rôle dans les fonctions biologiques d'une cellule.

Dans le noyau, la chromatine se présente sous différents états basés sur les observations de Heitz en 1928 : l'euchromatine (décondensée) et l'hétérochromatine (condensée) (McNairn and Gilbert 2003). L'euchromatine est riche en gènes et correspond à la partie « active » du génome qui est répliquée en début de phase S. L'hétérochromatine peut se subdiviser en deux catégories :

- l'hétérochromatine facultative correspondant à une forme de chromatine dont la condensation est variable en fonction du type de cellule et qui se retrouve au niveau de régions chromosomiques variées contenant des gènes maintenus à l'état répressif. C'est le cas par exemple de l'hétérochromatine du chromosome X.
- l'hétérochromatine constitutive qui conserve son caractère condensé au cours du cycle cellulaire et qui est répliquée tardivement lors de la phase S. L'hétérochromatine constitutive est pauvre en gènes et correspond essentiellement à des séquences d'ADN hautement répétées (Terranova 2008; Sidhu et al. 2008; Gartenberg 2009). J'en reparlerai dans le chapitre III.

Les histones et les modifications post-traductionnelles

Chez les eucaryotes, l'ADN est associé à des protéines nucléaires basiques, les histones. Cette association forme la chromatine. L'unité fonctionnelle de la chromatine est le nucléosome. Selon le modèle proposé par Kornberg en 1974, le nucléosome est composé d'un octamère d'histones cœur autour duquel s'enroule 146 paires de bases d'ADN, plus une histone de liaison, l'histone H1. Quatre histones principales constituent l'octamère. Il s'agit de H2A, H2B, H3 et H4 qui s'organisent en un tétramère de H3/H4 associé à deux dimères H2A/H2B.

Les histones sont des protéines nucléaires de 11 à 16 kDa très conservées au cours de l'évolution. Sur le plan structural, les molécules d'histones présentent des domaines globulaires de type « histone fold » contenant trois hélice α (α_1, α_2 et α_3) grâce auxquels elles s'associent en hétérodimère H3/H4 et H2A/H2B et interagissent avec l'ADN. L'enroulement de l'ADN autour du nucléosome se fait au niveau du petit sillon de la double hélice d'ADN alors que le grand sillon reste lui accessible aux facteurs protéiques. Les extrémités N-terminales ou « queues d'histones », très conservées entre espèces s'extériorisent du nucléosome (Luger et al. 1997) (figure I-5) et permettent aussi les interactions inter-histones et avec d'autres protéines. Même si de manière générale toutes les histones sont considérablement enrichies en résidu lysine et arginine, la plus grande proportion de lysines se retrouve dans les histones H2A et H2B alors que les histones H3 et H4 présentent un enrichissement en résidus arginine. Leur position externe et leur fort enrichissement en résidus lysine et arginine exposent les extrémités N-terminale des histones à des modifications post-traductionnelles susceptibles d'influencer l'organisation de la chromatine. En effet, ces modifications post-traductionnelles des histones constituent essentiellement des sites de reconnaissance et points d'ancrage d'autres facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine. Parmi les modifications les plus connues, on retrouve la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitinylation. Cependant, au cours de ses dernières années, d'autres modifications d'histones ont été découverte telles que la sumoylation ou la citrullination (Tan et al. 2011).

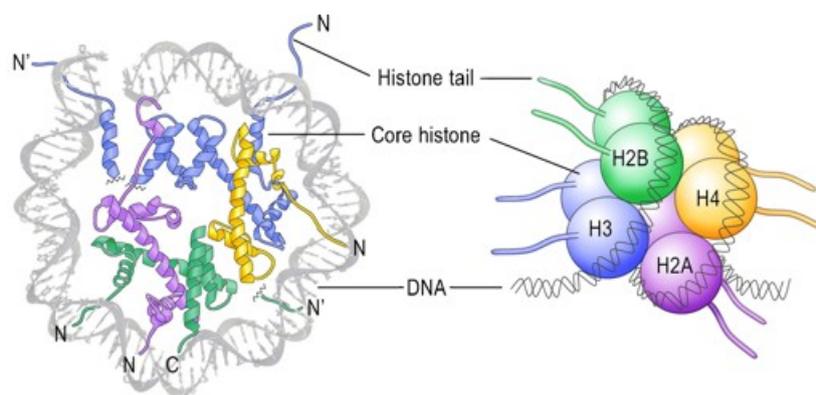


Figure I-5 : Les histones et leur association dans les nucléosomes.

Les histones H2A, H2B, H3 et H4 forment le coeur de la structure (core histone) octamérique impliquée dans les nucléosomes. Le nucléosome, autour duquel s'enroule l'ADN, contient 2 molécules de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4 assemblées en deux hétérodimères [H2A-H2B] et un hétérotétramère [H3-H4]. Les extrémités N-terminales de la chaîne polypeptidique des histones qui émergent des nucléosomes (histone tail) peuvent subir de nombreuses modifications post-traductionnelles. Source: Graff and Mansuy 2008.

Les variants d'histones

L'expression des différents allèles des gènes codant pour les histones génère des isoformes avec des variations minimales au niveau de la séquence primaire. Ces isoformes sont appelés « variants » (Franklin and Zweidler 1977). Ces variants d'histones peuvent être classés en 2 types: 1) les variants majeurs qui seront incorporés dans la chromatine néo-synthétisée de manière dépendante de la réplication (Osley 1991) afin de répondre au besoin massif en histones nécessaires à l'empaquetage de l'ADN et 2) les variants de remplacement qui peuvent être incorporés dans la chromatine indépendamment de la réplication.

Les variants les mieux caractérisés sont ceux des histones H2A et H3 (Harr et al. 2016; Zink and Hake 2016) ; les plus connues étant H3.1, H3.2, H3.3 et CENP-A (centromeric protein A aussi appelée cenH3). Structuralement, des différences s'observent essentiellement au niveau du domaine « histone fold ». Les variants d'histones sont incorporés non seulement à des moments différents mais aussi à des localisations différentes dans le génome. Je prendrai ici l'exemple de H3.3 qui présente une différence de 5 acides aminés avec H3.1 et de 4 acides aminés avec H3.2. Ce variant d'histone est plutôt enrichi dans les régions transcrites (« enhancers », site d'initiation de la transcription, exons) mais aussi au niveau des gènes réprimés, des télomères et de l'hétérochromatine péri-centromérique (Szenker et al. 2011). Je développerai dans le chapitre III le lien entre la présence de H3.3 dans les régions péri-centromériques et leur formation ainsi que leur transcription.

Concernant l'histone H2A, cinq variants (H2A.Z, H2A.X, etc...) ont été identifiés dont macroH2A (1 et 2) qui possède une structure différente de la forme canonique H2A liée à la présence d'un macro-domaine supplémentaire de 25 kDa permettant l'homo- et l'hétéro-dimérisation. La fonction de macroH2A dans la transcription est inhibitrice car il empêche la fixation du facteur NF- κ B et le remodelage de la chromatine par le complexe SWI/SNF (Angelov et al. 2003). J'en reparlerai dans le chapitre II.

Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une marque épigénétique connue pour son rôle dans la répression de l'expression des gènes (Razin and Riggs 1980). En général, la présence de cette marque notamment dans la région promotrice d'un gène peut avoir deux conséquences : soit la marque empêche directement l'accès du promoteur à la machinerie transcriptionnelle (Iguchi-Arigo and Schaffner 1989; Campanero et al. 2000), soit la marque recrute plusieurs protéines qui induisent une compaction de la chromatine rendant également le promoteur inaccessible (Bogdanović and Veenstra 2009). Ainsi un promoteur hyperméthylé est associé à

la répression de la transcription tandis qu'un promoteur hypométhylé est associé à l'activation de la transcription. De par sa fonction, la méthylation de l'ADN est impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que l'inactivation du chromosome X, la différenciation cellulaire, et à priori la régulation de la mise en route du génome embryonnaire (Gopalakrishnan et al. 2008).

La méthylation de l'ADN est une modification chimique covalente qui consiste en l'ajout d'un groupe méthyle sur un résidu cytosine sur le carbone C5 (5mC) au niveau d'un dinucléotide « CpG » (Cytosine-phosphate-Guanine) sur la molécule d'ADN (Bogdanović and Veenstra 2009; Corry et al. 2009; Franchini et al. 2012; Boland et al. 2014). Le groupement méthyle est fourni par le cofacteur S-adénosylméthionine (Christman 2002) et les enzymes catalysant cette réaction sont les DNMTs (DNA methyltransferase en anglais). Il existe plusieurs familles de DNMTs ayant des fonctions biologiques différentes (Goll and Bestor 2005):

- les DNA méthyltransférases qui agissent *de novo* au niveau des dinucléotides CpG initialement non méthylés. Il s'agit de DNMT3a et DNMT3b,

- les DNA méthyltransférases de maintien, DNMT1 qui assurent au cours de la réplication la conservation de la méthylation préexistante sur le brin néo-synthétisé; même si elles semblent aussi agir *de novo*,

- deux méthyltransférases, DNMT2 et DNMT3L ont également été caractérisées (Okano et al. 1998; Aapola et al. 2000). DNMT3L possède un domaine « PHD zinc-finger-like » (Deplus et al. 2002; Aapola et al. 2002) mais est dépourvue d'activité catalytique ; elle agirait comme cofacteur de DNMT3a et DNMT3b (Hata et al. 2002). Les données de la littérature suggèrent plusieurs fonctions associées à DNMT2. Elle semble posséder une activité de méthylation de l'ADN relativement faible et posséderait plutôt une activité de méthylation de l'ARN de transfert (Okano et al. 1998; Hermann et al. 2003; Goll et al. 2006; Jeltsch et al. 2006; Rai et al. 2007).

La présence de 5mC entraîne le recrutement de protéines possédant un domaine de fixation MBD (methyl-CpG binding domain), protéines qui a leur tour interagissent avec de multiples facteurs afin de condenser de la chromatine et réprimer la transcription (Bogdanović and Veenstra 2009).

En résumé, il est clairement établi que l'organisation de la chromatine est essentiellement influencée par des mécanismes impliquant notamment la méthylation de l'ADN, les

modifications post-traductionnelles des « queues d'histones », l'incorporation de variants d'histones dans la chromatine. Je vais maintenant détailler la nature de ces mécanismes modifiant l'organisation chromatinienne dans les pronoyaux maternel et paternel en mettant en évidence l'asymétrie parentale qui s'établit dès le stade 1-cellule.

I-2-2) Asymétrie parentale dans l'embryon dès le stade 1-cellule

Comme mentionné précédemment, il est bien établi qu'au stade 1-cellule, les deux pronoyaux présentent une différence de volume permettant de les distinguer (Debey et al. 1989; Adenot et al. 1991; Adenot et al. 1997). Ils présentent parallèlement une asymétrie au niveau de l'organisation de leur génome pour les raisons suivantes :

- Différences en termes de modifications post-traductionnelles des histones
- Différences en termes de présence et d'incorporation de variants d'histone
- Différence du niveau de méthylation de l'ADN sur les résidus cytosines

Les modifications post-traductionnelles des histones: la méthylation

La méthylation des « queues d'histones » fait intervenir des histones méthyltransférases (HMTs) qui rajoutent des groupes méthyle au niveau des résidus arginine et lysine sur les histones H3 et H4. La réaction antagoniste, la déméthylation, est elle assurée par des histones déméthylases (Dimitrova et al. 2015). Les groupes méthyles apposés peuvent être uniques (mono-méthylation), double (di-méthylation) ou triple (tri- méthylation). Ces marques de méthylation sont reconnues spécifiquement par des facteurs à chromo-domaine, à motif tudor, et à domaine WD40 et doigt PHD (plant homeo domain) qui entraîneront une réorganisation de la chromatine rendant plus ou moins accessible les promoteurs des gènes (effet répressif ou permissif sur la transcription des gènes) (Mozzetta et al. 2015). Parmi toutes les marques de méthylation d'histones décrites à ce jour, je présenterai ici les exemples les plus connus puis je décrirai leur distribution dans les pronoyaux parentaux.

➤ H3K9

La méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 est l'une des marques de méthylation de l'histone H3 la plus étudiée. De manière générale, suite à la triméthylation de H3K9, la chromatine adopte de façon temporaire et réversible une configuration condensée. Cette marque est classiquement associée avec une répression de l'expression des gènes. En effet, une accumulation de H3K9me3 via l'action des histones méthyltransférases SUV39H1 et SUV39H2 ainsi que SETDB1 (SET domain bifurcated 1) a été décrite au niveau de l'hétérochromatine constitutive localisée dans les régions centromériques et

péricentromériques du génome (Becker et al. 2016). La triméthylation de H3K9 entraîne le recrutement de la protéine HP1 (heterochromatin protein 1, ou CBX1 pour chromo box protein 1) via son chromo-domaine N-terminal (Bannister et al. 2001; Lachner et al. 2001). HP1 possède trois isoformes (α , β et γ) présentant des similarités de séquence et de structure (Singh et al. 1991). Les isoformes de HP1 sont des protéines d'environ 25 kDa : HP1 α est présente sur l'hétérochromatine péricentromérique, HP1 γ est présente sur l'euchromatine et HP1 β présente une distribution intermédiaire. HP1 possède également un domaine « hinge » qui permet la liaison à l'ADN et à l'ARN (Muchardt et al. 2002; Meehan et al. 2003) ainsi qu'un domaine « chromo-shadow » responsable de la dimérisation de HP1 (Smothers and Henikoff 2000). En effet, HP1 est connue pour son implication dans l'expansion et le maintien de l'hétérochromatine via un mécanisme d'auto-recrutement (Saksouk et al. 2015).

Grâce à son domaine « chromo-shadow », HP1 favorise également le recrutement de protéines intervenant dans l'hétérochromatinisation (Kosak and Groudine 2004; Gaszner and Felsenfeld 2006). Il s'agit notamment des ADN-méthyltransférases DNMT1 et DNMT3a (Fuks et al. 2003), de l'histone-méthyltransférase SUV39H (Meehan et al. 2003), de la protéine CAF-1 (chromatin-assembly-factor-1) intervenant dans l'assemblage des nucléosomes et de SUV4-20H (Murzina et al. 1999), une histone lysine méthyltransférase qui catalyse la méthylation H4 sur la lysine 20 (H4K20me_{2/3}) dont je parlerai plus tard (Li et al. 1992; Lachner et al. 2001; Peters et al. 2001; Schotta et al. 2004).

Plusieurs équipes se sont intéressées au profil de méthylation de l'histone H3 dans l'embryon préimplantatoire (Burton and Torres-Padilla 2010; Beaujean 2014). Les formes mono-et diméthylées (H3K9me₁ et H3K9me₂) sont observées dans le pronoyau maternel dès le stade PN0, juste après fécondation. Le niveau élevé d'H3K9me₃ dans l'ovocyte avant la fécondation est maintenu dans le pronoyau maternel au cours du 1er cycle embryonnaire avec une accumulation préférentielle autour des NPB (figure I-6). HP1 β est aussi présente dans l'ovocyte et recrutée progressivement en périphérie des NPB dans le pronoyau maternel. D'autre part, dans le pronoyau paternel, seule la forme mono-méthylée est détectable du stade PN1 jusqu'au stade PN4-5 avec une accumulation autour des NPB. Ainsi, le pronoyau paternel est après fécondation dépourvu aussi bien de H3K9me₃ que de HP1 β . Le recrutement de HP1 β dans le nucléoplasme du pronoyau paternel ne se fait que 6 à 8h après la fécondation tandis que H3K9me₃ n'est remarquée que très tardivement, en fin du stade 1-cellule (Martin et al. 2006; Mason et al. 2012). Selon les travaux de Liu et al. (2004), la détection différentielle de H3K9me₃ entre les pronoyaux serait due à l'inactivation de l'activité

méthyltransférase après fécondation ce qui empêcherait une méthylation *de novo* des histones qui vont remplacer les protamines sur le génome paternel au moment de la fécondation.

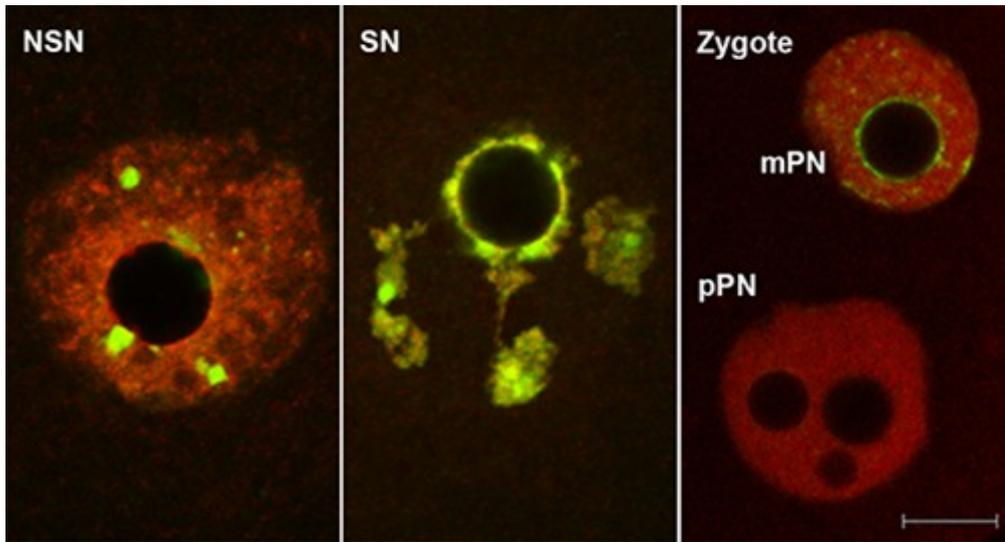


Figure I-6: Distribution de H3K9me3 dans des ovocytes et embryons de souris. Immunodétection de H3K9me3 (en vert) dans les vésicules germinales d'ovocytes de type NSN et SN et dans les pronoyaux maternel (mPN) et paternel (pPN) d'un embryon au stade 1-cellule, avec contre-coloration de l'ADN (en rouge). Barre d'échelle = 10 μ m. Source: Sepulveda et al. 2016.

➤ H3K27

La triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3) est aussi une marque répressive associée principalement à l'hétérochromatine facultative. La mise en place de cette marque fait intervenir un complexe protéique: PRC2 (polycomb group complex 2) (Peters et al. 2003; Cooper et al. 2014). La fonction biologique de PRC2 se manifeste à travers l'action de ses 3 sous-unités, à savoir SUZ12 (suppressor of zeste 12) responsable de la stabilité du complexe, EED (embryonic ectoderm development) impliquée dans la spécificité du complexe et l'une des deux protéines EZH (EZH1/2, enhancer of zeste homolog), enzymes catalysant la méthylation de H3K27 (Beisel and Paro 2011; Conway et al. 2015; Sun et al. 2016). La tri-méthylation de H3K27 induit le recrutement du complexe PRC1 (polycomb group complex 1) via les protéines à chromo-domaine CBX (2/4/6/7/8) (Cao et al. 2002). PRC1 est alors capable de catalyser la mono-ubiquitylation de H2A sur la lysine 119 (H2AK119ub) via les protéines RING1a et RNF2 possédant des domaines RING à activité E3 ubiquitine ligase (Wang et al. 2004; de Napoles et al. 2004). Cela aura pour conséquence d'inhiber non seulement l'initiation de la transcription mais aussi son élongation (Beisel and Paro 2011).

Dans l'embryon préimplantatoire au stade 1-cellule, la forme mono-méthylée est détectée à tous les stades, dans les 2 pronoyaux avec néanmoins un marquage plus intense dans le pronoyau maternel. H3K27me_{2/3} est également présente dans le pronoyau maternel sauf au niveau de l'hétérochromatine condensée, en périphérie des NPB. Par contre dans le pronoyau paternel, on retrouve H3K27me_{2/3} avec notamment une accumulation en périphérie des NPB à partir du stade PN4 (Burton and Torres-Padilla 2010; Beaujean 2014). En effet, il a été montré par Tardat et al. (2015) que dans le pronoyau maternel la présence de H3K9me₃ et Hp1β sur l'hétérochromatine localisée en périphérie des NPB empêche le recrutement de PRC2 et PRC1, ce qui est cohérent avec l'absence de H3K27me_{2/3} au niveau cette hétérochromatine. A l'inverse, le pronoyau paternel qui lui est dépourvu de H3K9me₃ et Hp1β dans cette région, présente une hétérochromatine permissive au recrutement de PRC2 et PRC1.

➤ H3K4

La méthylation de H3 n'est pas toujours associée à une répression transcriptionnelle, c'est notamment le cas de la méthylation de H3 sur la lysine 4 (H3K4). Les trois formes de méthylation de H3K4 (me/me₂/me₃) sont catalysées par les enzymes de la famille « SET » (su(var)₃₋₉, enhancer of zeste, trithorax) (Gu and Lee 2013). Il a été clairement établi que les protéines de la famille « trithorax » sont impliquées dans l'activation de la transcription (Ingham 1985) ce qui est cohérent avec la distribution de H3K4me₁/me₂/me₃ dans la région codante des gènes (Li et al. 2007).

Dans l'embryon, toutes les formes méthylées de H3K4 sont observables dès le stade PN0 dans le pronoyau maternel et ce jusqu'au stade PN5 même si le marquage reste très faible autour des NPB. Le pronoyau paternel présente un tout autre profil : H3K4me₁ n'est détectable qu'à partir du stade PN1 (environ 5h post-fécondation). En dépit de ce décalage, les deux pronoyaux présentent des intensités similaires aux stades PN3/4. C'est seulement au stade PN2 que H3K4me₂ commence à être observée alors que H3K4me₃ est indétectable jusqu'au stade PN4; à PN5 les deux pronoyaux parentaux présentent alors une intensité similaire pour H3K4me₃ (Sarmiento et al. 2004; Lepikhov and Walter 2004; van der Heijden et al. 2005).

➤ H4K20

Chez les mammifères, la méthylation de l'histone H4 concerne essentiellement la lysine 20. Trois états de méthylation (mono- di- et tri-méthylé) catalysés par des enzymes différentes ont été détectés et présentent des fonctions biologiques distinctes. En effet les formes mono- et di-méthylées (H4K20me et H4K20me₂) catalysées respectivement par PR-SET7/SET8/KMT5A

et SUV4-20H1 interviennent dans la réplication et les mécanismes de réparation de l'ADN (Mozzetta et al. 2015). La forme tri-méthylée (H4K20me3) est catalysée par SUV420H1/2 et est connue comme étant caractéristique de l'hétérochromatine constitutive (Rea et al. 2000; Kourmouli et al. 2004).

Dans les embryons, l'asymétrie parentale dans la distribution des formes méthylées de H4K20 n'est remarquée que pour H4K20me3, détectée uniquement dans le pronoyau maternel à tous les stades (PN0-PN5) avec une accumulation préférentielle autour des NPB. H4K20me1 est elle détectable après la fécondation (PN0) dans les deux pronoyaux, jusqu'à PN5 et présente une distribution homogène mais sans accumulation autour des NPB. Enfin, H4K20me2 n'est pas détectable au cours du cycle 1-cellule (Wongtawan et al. 2011; Beaujean 2014).

Les modifications post-traductionnelles des histones: l'acétylation

Comme la méthylation, l'acétylation est une modification post-traductionnelle touchant plusieurs résidus sur les histones H3 et H4. Les enzymes impliquées sont des histones acétyltransférases (HATs). L'action de ces enzymes est réversible suite à l'activité d'autres enzymes, les histones désacétylases (HDACs), qui retirent les marques d'acétylation. Les effets antagonistes de ces deux types d'enzymes interviennent dans la régulation de l'expression des gènes. En effet, l'hyperacétylation des histones est caractéristique de l'euchromatine et de l'activation de la transcription. A l'inverse, l'hypoacétylation des histones caractérise l'hétérochromatine et est associée à la répression de la transcription (Hebbes et al. 1988; Lee et al. 1993; Vettese-Dadey et al. 1996). Les effets de l'acétylation sur la chromatine sont en relation avec le rôle des histones H3 et H4 dans la structure et la dynamique chromatinienne mais également l'action de complexes de remodelage possédant un domaine « bromo », l'acétylation créant un site spécifique d'interaction pour ce type de motif (Moore and Ausió 1997; Peterson and Laniel 2004; Mellor 2005; Mellor 2006; Workman 2006).

Au cours du stade 1-cellule, les pronoyaux présentent des profils d'acétylation différents (figure I-7). En effet, le pronoyau paternel affiche des niveaux très élevés d'acétylation, en comparaison avec le pronoyau femelle au cours de la phase G1, notamment sur les lysines en position 8 et 12 de l'histone H4 et sur les lysines en position 9, 14, 18 et 27 de l'histone H3. Ces niveaux d'hyperacétylation s'équilibrent ensuite au cours des phases S et G2 du 1^{er} cycle cellulaire (Adenot et al. 1997; van der Heijden et al. 2006; Santenard et al. 2010).

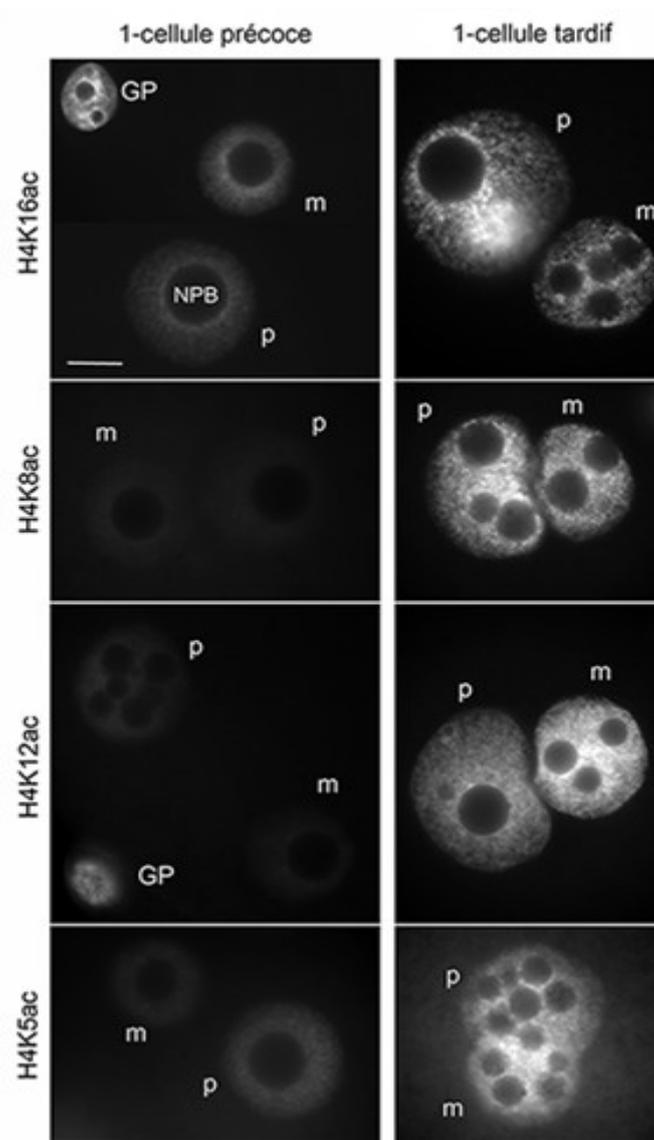


Figure I-7: Profil d'acétylation de l'histone H4 au stade 1-cellule. Immunodétection de l'histone H4 acétylée sur les lysines 16 (H4K16ac), 8 (H4K8ac), 12 (H4K12ac) et 5 (H4K5ac). On distingue les pronoyaux paternels (p) et maternels (m) par leur différence de taille et par la position du globule polaire (GP) subsistant après la fécondation. Deux stades ont été comparés, avant et après la première phase de réplication (embryons au stade 1-cellule "précoce" ou "tardif", soit à 7 et 15 heures après la fécondation respectivement). Barre d'échelle: 10 μ m. Source: Mason et al. 2012.

Les variants d'histones

Les variants d'histones sont également incorporés asymétriquement dans les pronoyaux parentaux. L'incorporation spécifique de ces variants et le moment d'incorporation vont jouer un rôle important dans la formation et l'organisation de la chromatine des pronoyaux. C'est en particulier le cas du variant H3.3 qui est rapidement incorporé préférentiellement dans le génome paternel après la fécondation indépendamment de la réplication. A l'inverse H3.1 et H3.2, absents jusqu'à la réplication, sont incorporés de manière prédominante dans le pronoyau femelle au niveau de l'hétérochromatine (van der Heijden et al. 2005; Torres-

Padilla et al. 2006; Santenard et al. 2010). Les travaux de Santenard et al. (2010) ont montré le rôle de H3.3 méthylée sur sa lysine 27 (H3.3K27), notamment son importance au cours du développement embryonnaire dans l'établissement de l'hétérochromatine dans l'embryon. En effet, la mutation de H3.3K27 entraîne une augmentation de la synthèse des transcrits péracentromériques associée à une délocalisation de HP1, une mauvaise ségrégation des chromosomes et un arrêt du développement.

Méthylation de l'ADN

Le développement embryonnaire est une période au cours de laquelle a lieu la deuxième phase de modification du profil de méthylation, notamment une déméthylation des génomes parentaux; la première ayant eu lieu pendant la gamétogenèse pour établir l'empreinte parentale (Mann and Bartolomei 2002; Morgan et al. 2005). Le rôle crucial des DNMTs et donc de la méthylation de l'ADN au cours du développement a été démontré par plusieurs équipes grâce aux expériences d'inactivation de gènes chez la souris entraînant un arrêt du développement (Li et al. 1992; Okano et al. 1999). Chez la souris, le génome paternel est rapidement et « activement » déméthylé après la fécondation alors que dans le génome maternel la déméthylation a lieu progressivement au cours des premiers cycles embryonnaires (cette déméthylation est dite « passive » en raison de ce caractère progressif) (Mayer et al. 2000a; Oswald et al. 2000).

La méthylation est en effet un processus réversible. Le mécanisme de déméthylation implique un intermédiaire, la 5-hydroxyméthylcytosine ou 5hmC issue de la conversion de la 5mC par les protéines de la famille TET (ten eleven translocation) (Tahiliani et al. 2009; Ito et al. 2010). Actuellement trois isoformes ont été identifiées chez la souris (TET 1, TET 2 et TET 3), intervenant à des moments différents au cours du développement embryonnaire (Koh et al. 2011; Dawlaty et al. 2011).

Grâce aux anticorps dirigés spécifiquement contre la 5mC et la 5hmC, il a été montré que la déméthylation « active » du pronoyau paternel conduit à une forte asymétrie entre les deux pronoyaux parentaux à la fin du stade 1-cellule. En effet, une forte accumulation de 5hmC dans le pronoyau paternel a été observée d'une part et un maintien de la 5mC dans le pronoyau maternel d'autre part (Yamazaki et al. 2007; Iqbal et al. 2011; Wossidlo et al. 2011; Ruzov et al. 2011; Inoue and Zhang 2011; Salvaing et al. 2012). L'enzyme TET3 serait responsable de cette conversion de 5mC en 5hmC dans le pronoyau paternel (Iqbal et al. 2011). Toutefois, plusieurs travaux suggèrent que la conversion de la 5mC ne serait pas totale dans le pronoyau paternel puisqu'un anneau de 5mC persiste au niveau de l'hétérochromatine

accumulée en périphérie des NPB (Wossidlo et al. 2011; Salvaing et al. 2012). A l'inverse, une accumulation de 5hmC est observée dans ces régions au niveau du pronoyau maternel, cette asymétrie s'établissant progressivement au cours du premier cycle embryonnaire (Salvaing et al. 2012).

En conclusion, il apparaît qu'après la fécondation, les deux génomes parentaux montrent des caractéristiques différentes aussi bien au niveau de la composition de la chromatine qu'au niveau épigénétique. Ainsi, le pronoyau paternel est globalement hypométhylé, il est notamment dépourvu de H3K9me2/3 et H4K20me2/3, deux marques caractérisant l'hétérochromatine constitutive, et subit une forte déméthylation de l'ADN (sauf autour des NPB). La modification H3K27me2/3 également associée à l'hétérochromatine n'apparaît elle qu'à la fin du stade 1-cellule, autour des NPB, au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique. En ce qui concerne son profil d'acétylation, il apparaît que le pronoyau paternel présente surtout une hyperacétylation de H4. Au vu de ses caractéristiques épigénétiques, le pronoyau paternel présente donc globalement une configuration chromatinienne plutôt décondensée, à l'exception des régions péricentromériques localisées majoritairement autour des NPB (figure I-8).

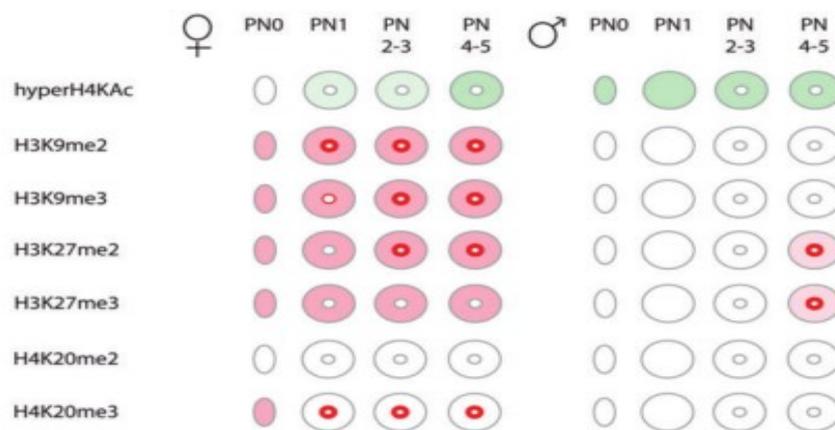


Figure I-8: Résumé de quelques modifications post-traductionnelles d'histones dans l'embryon de souris au stade 1-cellule, depuis la fécondation (PN0) jusqu'au stade PN5. Les deux pronoyaux (maternel et paternel) sont représentés séparément en colonnes. La densité de couleur reflète l'intensité relative de la modification (blanc = absence). L'acétylation de H4, marque permissive, est en vert et les marques répressives sont en rouge. Les NPB sont schématisés au centre par un seul cercle, entouré d'un anneau représentant l'hétérochromatine péricentromérique. Source: Burton et Torres-Padilla, 2010.

A l'inverse, dans le pronoyau maternel qui se forme à partir de la métaphase II, le profil épigénétique est déjà établi depuis l'ovogenèse. H3K9me_{2/3}, H3K27me_{2/3} et H4K20me₃ notamment apparaissent dans l'ovocyte en GV et sont maintenues - malgré une distribution plus hétérogène pour certaines d'entre elles - dans le pronoyau. Toutes ces marques, à l'exception de H3K27me₃, présente une accumulation autour des NPB. Le pronoyau maternel présente aussi une hyperméthylation globale de l'ADN.

Toutes ces caractéristiques suggèrent un état de condensation plus élevé de la chromatine dans le pronoyau maternel que dans le pronoyau paternel. L'asymétrie observée entre les deux pronoyaux parentaux peut donc être considérée comme la résultante d'une reprogrammation épigénétique dont la mise en place est essentielle dès le stade 1-cellule. Cette asymétrie va à posteriori influencer le niveau de compaction de la chromatine dans les deux pronoyaux mais aussi - et nous le verrons plus loin- le démarrage des activités transcriptionnelles.

Chez la souris, le premier clivage de l'embryon a lieu entre 18 et 21h post-fécondation. Dans les pronoyaux en apposition (stade PN5 selon Adenot et al. 1997), la chromatine se condense en chromosomes. Après la rupture des membranes entourant les pronoyaux, il y a dissolution des NPB et alignement des chromosomes en une seule plaque métaphasique. Le premier clivage se fait perpendiculairement au plan des deux groupes de chromosomes ce qui aboutit à l'obtention d'un embryon à 2 blastomères de taille équivalente ou « 2-cellules ». Dans l'embryon 2-cellules néo-formé, chaque blastomère contient les deux génomes parentaux qui restent néanmoins compartimentés dans les noyaux des deux blastomères (Mayer et al. 2000a; Mayer et al. 2000b; Haaf 2001). C'est notamment le cas pour certaines des marques évoquées dans le contexte de l'asymétrie parentale comme H3K9me₃, qui dans un des blastomères de l'embryon 2-cellules occupe la portion du génome d'origine maternel (Liu et al. 2004). Il est important de préciser que les 2 jeux de chromosomes parentaux conservent certaines des caractéristiques épigénétiques observées avant la mitose. Cependant, certaines marques épigénétiques sont modifiées/supprimées au stade 2-cellules et réapparaissent plus tard au cours du développement embryonnaire (Beaujean 2014).

I-3) Démarrage des activités transcriptionnelles dans l'embryon de souris

Jusqu'au stade 2-cellules, le développement de l'embryon est sous contrôle maternel (Minami et al. 2007). En effet, après la fécondation, les pronoyaux nouvellement formés sont d'abord transcriptionnellement inactifs. Ainsi, la progression de l'embryon du stade 1- vers le stade 2-cellules va dépendre des facteurs maternels (ARN et protéines) stockés dans l'ovocyte. En effet, au cours de l'ovogenèse, l'activité transcriptionnelle est intense dans l'ovocyte en GV (Moore et al. 1974; Kaplan et al. 1982). Toutes les machineries aussi bien transcriptionnelles que traductionnelles sont actives. L'ARN polymérase I (ARN pol I) synthétise les ARN ribosomiques (ARNr, que je détaillerai dans le chapitre III), l'ARN polymérase II (ARN pol II) synthétise principalement les ARN messagers (ARNm) mais aussi les ARN non-codants, et l'ARN polymérase III (ARN pol III) synthétise les ARN de transfert et l'ARN 5S. La quantification de cette activité transcriptionnelle intense révèle qu'un ovocyte préovulatoire contient 450 picogrammes environ d'ARN répartis de la façon suivante: 10 % d'ARN messagers, 65% d'ARN ribosomiques, 11% d'ARN de transfert et 14 % de petits ARN nucléaires.

Cependant, seule une faible proportion des ARNm est traduite, la majorité étant stockée dans le cytoplasme ovocytaire pour une utilisation ultérieure notamment au cours du premier cycle embryonnaire témoin d'une traduction sélective des ARN maternels stockés pendant l'ovogenèse (Flach et al. 1982; Cascio and Wassarman 1982). De plus, les protéines d'origine maternelle également stockées pendant l'ovogenèse subissent des modifications post-traductionnelles modifiant ainsi le contenu protéique (Braude et al. 1979; Van Blerkom 1981; Howlett and Bolton 1985; Howlett 1986). Le contrôle maternel du développement perdure jusqu'à l'activation de la transcription du génome embryonnaire (embryonic genome activation en anglais, ou EGA) (Schultz 1993; Minami et al. 2007; Li et al. 2013). A partir de ce moment, l'embryon s'affranchit progressivement de l'utilisation des facteurs maternels et prend le contrôle de son développement qui va alors dépendre exclusivement des transcrits d'origine zygotique (Schultz 1993). Cette transition d'un contrôle maternel à un contrôle embryonnaire est aussi appelée MZT (maternal to zygotic transition) (Telford et al. 1990).

Les expériences basées sur la culture d'embryons en présence d'inhibiteurs de l'ARN pol II (tels que l' α -amanitine) ont permis de mettre en évidence la MZT (Lindell et al. 1970; Braude et al. 1979). Il s'agit du stade au cours duquel le développement embryonnaire s'interrompt pendant l'exposition à l' α -amanitine. C'est le stade 2-cellules chez la souris. Les travaux de

Hamatani et al. (2004) ont montré par une approche sur puce à ADN que plus de 3000 gènes sont activés à ce moment là. Plus récemment, plusieurs auteurs se sont également intéressés aux profils de synthèse d'une autre catégorie d'ARN, les petits ARN non-codants au cours de l'activation du génome embryonnaire démontrant leur implication dans la régulation de l'activité transcriptionnelle (Tang et al. 2007; Tam et al. 2008; Watanabe et al. 2008; Ma et al. 2010; Suh et al. 2010; Svoboda and Flehr 2010). Cette catégorie d'ARN regroupe aussi bien les miRNA (micro RNA), les endo-siRNA (small interfering RNA) et les piRNA (Piwi-interacting RNA).

I-3-1) Activation « mineure » et « majeure »

Plusieurs auteurs se sont intéressés à la détection des premiers transcrits embryonnaires. Selon les travaux de Moore et al. (1975) les transcrits n'étaient pas détectables avant le stade 2-cellules. Ces données ont été ensuite contredites par Clegg et Piko (Clegg and Piko 1982; Clegg and Piko 1983) qui par incorporation d'adénosine tritiée ($[^3\text{H}]$ -adénosine) montraient une synthèse d'ARN messagers et d'ARN de transfert dès le stade 1-cellule. Vasseur et al. (1985) ont ensuite mis en évidence, par hybridation in situ, la synthèse de transcrits issus de séquences répétées de type B2 dès le stade 1-cellule. D'autres techniques telles que l'incorporation de BrUTP (5-bromouridine 5'-triphosphate; figure I-9) (Bouniol et al. 1995) et l'utilisation de gènes rapporteurs (Ram and Schultz 1993; Matsumoto et al. 1994; Christians et al. 1995; Aoki et al. 1997; Kigami et al. 2003) ont également permis de confirmer le démarrage de l'activité transcriptionnelle dans l'embryon dès la fin du stade 1-cellule. L'incorporation de BrUTP permettant de détecter la transcription *de novo* des gènes démontre par ailleurs que l'initiation de la transcription démarre d'abord dans le pronoyau paternel (Bouniol et al. 1995; Aoki et al. 1997).

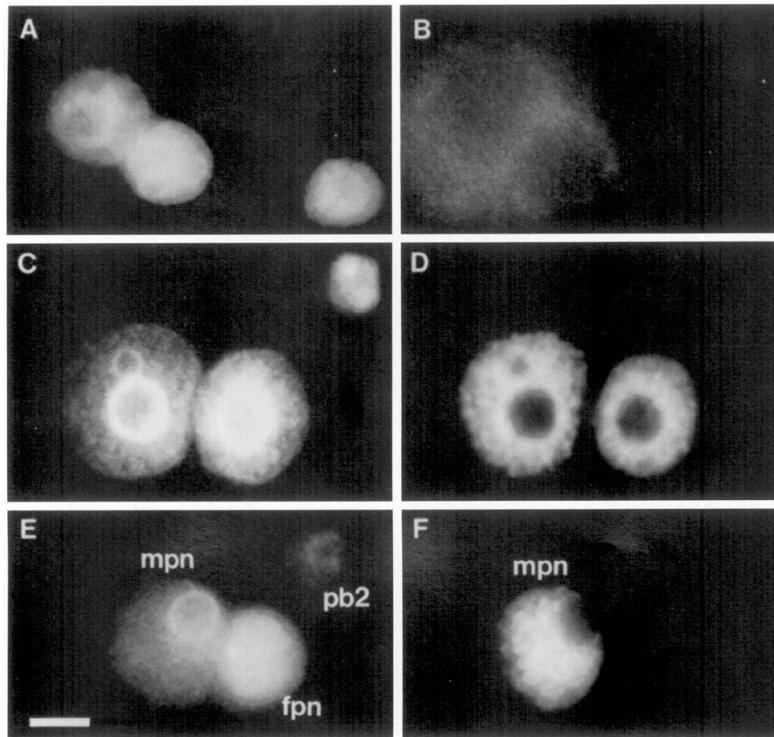


Figure I-9: Localisation des ARN marqués au BrUTP dans l'embryon de souris au stade 1-cellule. Les zygotes sont microinjectés avec le BrUTP à différents stades de développement, incubés pendant 1 h (A à D) ou 15 min (E et F), puis traités (détection par immunofluorescence). Les marquages correspondant au Hoechst (A, C, et E) et la détection immunofluorescente des transcrits (B, D, et F) sont présentés. (A et B) 22 hphCG, aucune activité transcriptionnelle n'est observée malgré le réglage de l'intensité d'excitation et du gain de la caméra au niveau maximum. (C et D) 28 hphCG, les deux pronoyaux sont marqués positivement au BrUTP. (E et F) 27 hphCG, cas d'un embryon où seul le pronoyau mâle (mpn) est marqué positivement au BrUTP. Le pronoyau femelle (fpn), est plus petit que le pronoyau mâle et est proche du second globule polaire (pb2). Notez l'augmentation en taille des deux pronoyaux entre 22 hphCG (A) et 28 hphCG (E). Dans cette étude l'heure d'injection d'hCG (hphCG) est prise comme temps de référence; l'ovulation et la fécondation ayant lieu environ 12 heures après. Barre d'échelle: 10 μ m. Source: Bouniol et al. 1995

Cette activation du génome embryonnaire se divise en deux phases à savoir la phase d'activation « mineure » et la phase d'activation « majeure » (figure I-10). Le caractère séquentiel de l'EGA est en relation avec l'activation asynchrone des ARN polymérases I, II et III. En effet, plusieurs études ont montré un décalage temporel de la mise en route des ARN polymérases au cours de l'activation du génome embryonnaire (Nothias et al. 1995; Minami et al. 2007; Jeanblanc et al. 2008). La phase d'activation mineure initiée en fin du stade 1-cellule est caractérisée par l'absence d'intervention de facteurs de transcription spécifiques et est initiée dans le pronoyau paternel sous l'action de l'ARN pol II, à la transition S/G2, environ 15h post-fécondation (Bouniol et al. 1995). Cependant, même si l'activité transcriptionnelle démarre, le caractère « mineur » de cette phase est lié à la faible quantité de

gènes alors exprimés. De nombreux transcrits ont été identifiés parmi lesquels Hsp70.1, MuERV-L, U2afbp-rs, EIF-1A et Xist (Bensaude et al. 1983; Christians et al. 1995; Kigami et al. 2003; Hamatani et al. 2004; Zeng and Schultz 2005). L'activation de la transcription au cours de la phase mineure de l'EGA concerne également les gènes dépendants de l'ARN pol III nécessaire notamment pour la synthèse de l'ARN 5S (Lee et al. 2014).

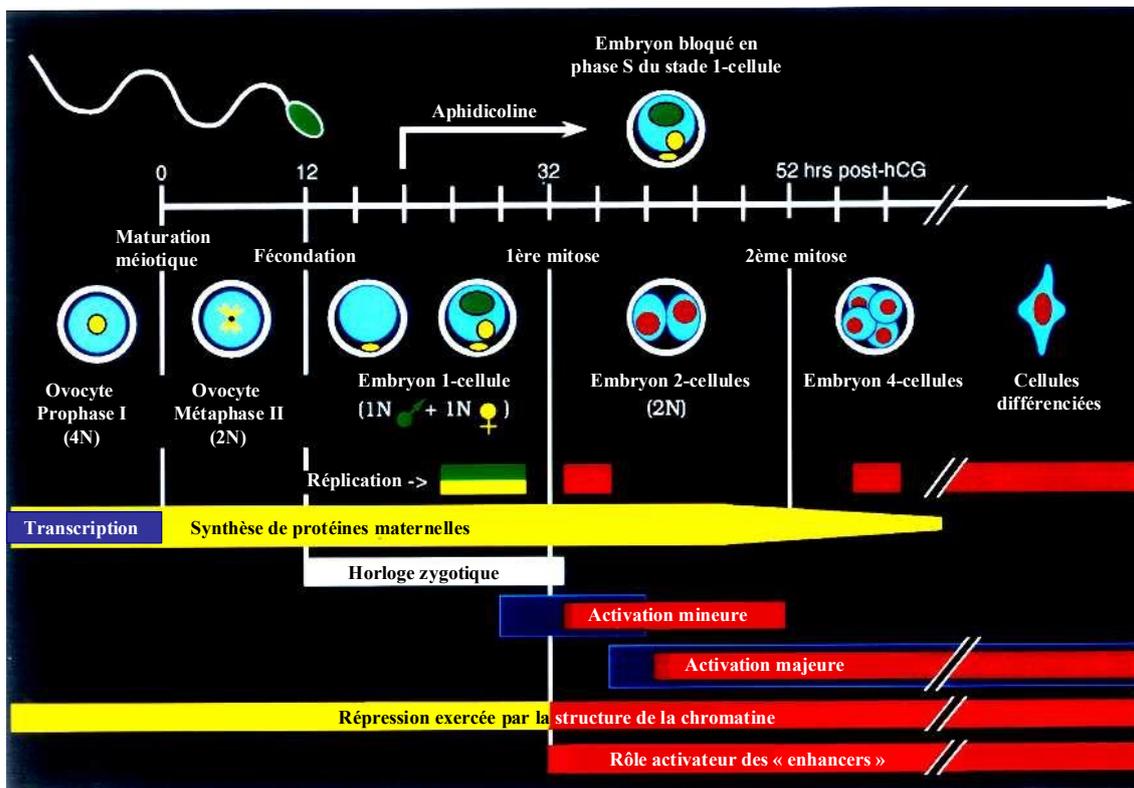


Figure I-10: Les diverses étapes du développement embryonnaire chez la souris selon l'équipe de M. DePamphilis (Nothias et al. 1995). Les ovocytes ovulés, bloqués en métaphase II, sont fécondés 12 heures après l'injection d'hCG. L'addition d'aphidicoline dans le milieu de culture des embryons au stade 1-cellule, avant la première réplication zygotique, bloque les embryons au stade 1-cellule mais n'empêche pas l'« horloge zygotique » d'activer la mise en route du génome (phase mineure) et l'expression des premières protéines zygotiques. La seconde phase (phase majeure) est caractérisée par un contrôle sélectif des gènes exprimés, dépendant du remodelage de la chromatine et de la présence de séquences « enhancers ».

La phase d'activation « majeure » qui a lieu au stade 2-cellules est caractérisée par l'intensification exponentielle de l'activité de l'ARN pol II (Schultz 2002). Contrairement à la phase mineure, cette seconde phase nécessite la présence de facteurs spécifiques d'origine maternelle présents dans l'embryon; ces facteurs jouant un rôle crucial dans l'activation du génome embryonnaire. Les travaux de Latham et al. (1991) et Rothstein et al. (1992) suggèrent notamment qu'au cours de cette période, une portion des transcrits maternels est

sélectivement traduite. Cependant, les transcrits maternels sont rapidement dégradés après la fécondation, conduisant à une réduction de 90% de ces transcrits au stade 2-cellules (Pikó and Clegg 1982; Paynton et al. 1988; Schultz 1993). Ces transcrits sont ensuite remplacés par les transcrits zygotiques néo-synthétisés; l'embryon s'affranchissant de sa dépendance exclusive des facteurs maternels et mettant en place son propre profil d'expression. L'utilisation de l' α -amanitine a permis de situer temporellement cette phase majeure entre 26 et 29 heures post-fécondation; la traduction ayant lieu par la suite entre 29 et 32 heures post-insémination (Flach et al. 1982; Bolton et al. 1984; Howlett and Bolton 1985; Howlett 1986). De manière similaire, Tang et al. (2007) ont mis en évidence que les miRNA d'origine maternelle, essentiels pour la poursuite du développement, sont dégradés à hauteur de 60% entre les stades 1- et 2-cellules avec synthèse *de novo* des miRNA propres au zygote à partir du stade 2-cellules. Ces résultats démontrent que la transition entre le contrôle maternel et le contrôle zygotique du développement (MZT) a lieu lors de l'activation majeure.

Enfin, le stade 2-cellules est également caractérisé par la transcription des gènes ribosomiques via l'activité de l'ARN pol I vers 33h post-fécondation (Pikó and Clegg 1982; Bouniol et al. 1995; Zatschina et al. 2003), dont je parlerai plus en détails dans le chapitre III.

I-3-2) Régulation de l'activité transcriptionnelle

L'EGA est une étape importante et déterminante dans la poursuite du développement embryonnaire. Cette activation est régulée à différents niveaux. L'initiation de la transcription au moment de l'EGA nécessite non seulement que les facteurs de la machinerie transcriptionnelle soit disponibles et fonctionnels mais aussi que la configuration chromatinienne soit permissive afin de donner accès aux promoteurs des gènes. Je détaillerai ici la disponibilité de la machinerie transcriptionnelle, les aspects épigénétiques ainsi que le rôle de certains facteurs maternels impliqués dans cette régulation transcriptionnelle.

Disponibilité des facteurs transcriptionnels

Comme mentionné plus haut, l'activité transcriptionnelle dans l'embryon s'observe dès la fin du stade 1-cellule avec la transcription de gènes dépendant de l'ARN pol II. L'ARN pol II s'associe avec des facteurs transcriptionnels classiques tels que TBP (TATA box binding protein) qui se lie à la séquence TATA dans la région promotrice des gènes, SP1 (specificity protein 1) se liant aux promoteurs comportant des « boîtes GC », ainsi que des cofacteurs transcriptionnels comme les TAF (TBP associated factors) (Pugh 1996; Greenblatt 1997; Buratowski 2000). Cette association forme un complexe multi-protéique assurant la synthèse

des ARNm. Un autre cofacteur transcriptionnel, TIF1 α (transcription intermediary factor 1 alpha) est aussi indispensable à la mise en route de l'expression de gènes durant la phase d'activation mineure; son absence entraînant un arrêt du développement (Torres-Padilla and Zernicka-Goetz 2006).

Ces facteurs initialement présents dans le cytoplasme de l'embryon sont transloqués au cours du stade 1-cellule vers les pronoyaux pour y exercer leur fonction. La phosphorylation a été décrite comme étant la modification post-traductionnelle assurant cette translocation et régulant l'affinité de liaison à l'ADN de ces protéines (Karin 1991; Hunter and Karin 1992; Calkhoven and Ab 1996; Torres-Padilla and Zernicka-Goetz 2006). En effet, l'ARN pol II -et notamment sa plus grosse sous-unité RPB1- possède un domaine carboxy-terminal (CTD) dont la richesse en résidu Sérine et Tyrosine lui confère la capacité d'être hautement phosphorylable aussi bien *in vivo* que *in vitro* (Corden 1990; Dahmus 1996). En cellules somatiques, il a été montré que la forme hypophosphorylée de RPB1 est impliquée dans la formation du complexe de pré-initiation de la transcription alors que la forme hyperphosphorylée est caractéristique du complexe d'élongation de la transcription (Payne et al. 1989; Laybourn and Dahmus 1990; Dahmus 1996). Dans l'embryon précoce de souris, c'est la forme déphosphorylée de l'ARN pol II - issue du stock maternel- qui intervient au moment de l'activation mineure du génome (Bellier et al. 1997). Par la suite, au moment de la phase majeure à la fin du stade 2-cellules, on assiste à la translocation nucléaire massive de de la forme hyperphosphorylée de type somatique (Dubois et al. 1994; Yankulov et al. 1995; Bellier et al. 1997).

Modifications épigénétiques et régulation de la transcription

Le lien entre organisation de la chromatine et expression des gènes est connu depuis plusieurs années en cellules somatiques. De manière similaire, il s'avère que les mécanismes de méthylation de l'ADN et de modifications post-traductionnelles des histones mais aussi l'incorporation de certains variants d'histones peuvent considérablement influencer l'état de condensation de la chromatine et par conséquent l'activité transcriptionnelle au moment de l'EGA (figure I-11).

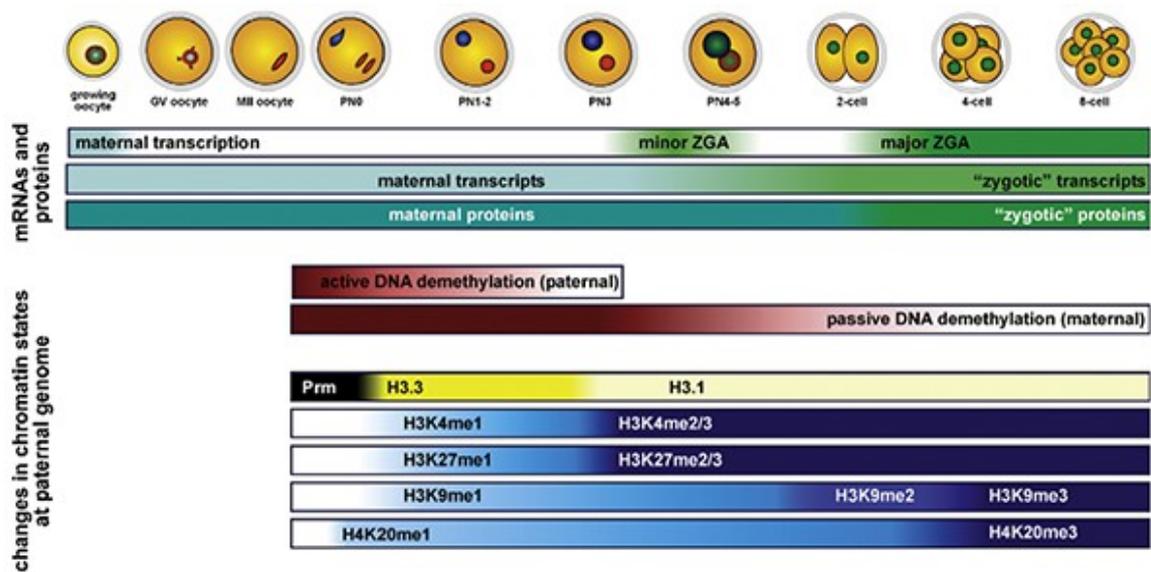


Figure I-11: Schéma récapitulatif des principaux processus biologiques et changements temporels dans les états de la chromatine au début du développement, depuis l'ovocyte jusqu'au stade 8-cellules. Sont représentés la progression de l'activité traductionnelle et transcriptionnelle, notamment avec l'EGA (ou ZGA pour zygotic genome activation), la dynamique de la méthylation de l'ADN et des principales modifications post-traductionnelles d'histones sur le génome d'origine paternelle, ainsi que le remplacement des protamines (PRM) par les variants d'histones H3.3 puis H3.1. La densité de couleur reflète l'intensité relative de ces processus (blanc = absence). Ce schéma illustre la décondensation de la chromatine qui accompagne la mise en route du génome embryonnaire au cours de ces stades précoces de développement. Source: Albert et Peters, 2009.

Comme mentionné précédemment, le pronoyau paternel est hyperacétylé et hypométhyélé alors que le pronoyau maternel présente de nombreuses marques répressives. Or cette asymétrie au niveau épigénétique observée entre les pronoyaux parentaux au stade 1-cellule semble corrélée à l'ordre d'initiation de la transcription embryonnaire. En effet, l'état d'hypométhylation et d'hyperacétylation des histones et la déméthylation de l'ADN induirait une décondensation de son génome donc la chromatine du pronoyau paternel serait plus permissive à l'initiation de la transcription, ce qui est cohérent avec le démarrage de la phase mineure de l'activation du génome dans ce pronoyau. A l'inverse, l'état transcriptionnel dans le pronoyau maternel serait corrélé au maintien de marques épigénétiques répressives induisant la compaction de la chromatine et la répression de la transcription (Wiekowski et al. 1991; Wiekowski et al. 1993; Henery et al. 1995; Schultz 2002). Cet état transcriptionnel plutôt répressif après la fécondation serait maintenu dans l'embryon jusqu'à la première mitose (clivage du stade 1-cellule au stade 2-cellules). Selon certains auteurs, cet état transcriptionnel répressif serait lié à « l'horloge zygotique » et la première mitose permettrait la régulation spatio-temporelle de l'expression des gènes (Wiekowski et al. 1991).

Cette régulation pourrait notamment être liée à l'évolution des modifications post-traductionnelles des histones après la première mitose (Beaujean 2014). En effet, la relation entre l'organisation de la chromatine et la régulation de la transcription a notamment été mise en évidence par l'utilisation de drogues inhibant l'action des enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles des histones. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs d'histones désacétylases comme le butyrate ou la trapoxine - entraînant une hyperacétylation des histones et donc une décompaction de la chromatine - augmente considérablement le taux de transcription endogène ainsi que l'expression de gènes rapporteurs (Wiekowski et al. 1991; Wiekowski et al. 1993; Aoki et al. 1997). Shao et al. (2008) ont aussi montré que le blocage de la déméthylation de H3K4 par la bisguanidine1c altère l'expression de *Pou5f1* (POU class 5 homeobox 1, aussi appelé *Oct4* pour Octamer-Binding Protein 4) au stade 2-cellules et empêche le clivage de l'embryon à 4-cellules. De la même manière, l'absence de certains composants du complexe PRC1 liant H3K27me3 pendant l'ovogenèse entraîne des défauts de structuration de la chromatine maternelle, ce qui altère la mise en route du génome embryonnaire et provoque un arrêt de développement au stade 2-cellules (Posfai et al. 2012).

En conclusion, le rôle de la chromatine via les marques épigénétiques dans la régulation de la transcription au moment de l'activation du génome semble clairement établi. De plus, la perte de certaines marques épigénétiques pourrait être considérée comme un mécanisme favorisant la transcription des gènes à des stades plus tardifs.

Les facteurs à « effet maternel »

Les facteurs maternels sont des protéines issues de la transcription et traduction de gènes d'origine maternelle appelés gènes à « effet maternel ». L'action de ces gènes est limitée à une fenêtre de temps spécifique au cours du développement. Plusieurs études basées sur l'utilisation des techniques d'inactivation génique ont montré l'implication de ces gènes entre le stade 1-cellule et le stade 2-cellules notamment au cours de l'activation du génome embryonnaire. Leur absence est délétère, entraînant des arrêts de développement au stade 2-cellules. Ainsi, ils tiendraient une place essentielle dans la régulation de l'initiation de l'activité transcriptionnelle au cours de l'embryogenèse précoce (Minami et al. 2007; Li et al. 2013). Je détaillerai ici l'exemple de la nucléophosmine ou nucléoplasmine 2 (NPM2) en raison de son implication dans le développement embryonnaire précoce. En effet, NPM2 est présente dans l'ovocyte et l'embryon préimplantatoire notamment comme composant du NLB/NPB (Burns et al. 2003; Frehlick et al. 2007; Zhang et al. 2009; Inoue and Aoki 2010). Chez la souris, l'inactivation de *Npm2* dans les ovocytes perturbe la formation du NLB et

l'accumulation de l'hétérochromatine entourant normalement le NLB/NPB (Burns et al. 2003; Inoue and Aoki 2010). En 2011, les travaux de Inoue et al. ont aussi souligné le rôle de NPM2 dans la décondensation de l'ADN du spermatozoïde (Inoue et al. 2011). Ainsi, le retrait du NLB de l'ovocyte entraîne un retard dans la décondensation du génome paternel qui peut être restaurée par microinjection de l'ARNm de *Npm2*. Enfin, la mise en évidence de la fonction de NPM2 dans la régulation de l'activation du génome embryonnaire a été démontrée dans des embryons dépourvus de NPM2: sans NPM2, la synthèse de TRC (transcription-requiring complex) - marqueur du démarrage de l'activité transcriptionnel embryonnaire - est réduite à 30% au stade 2-cellules (Burns et al. 2003).

I-4) Evolution du développement jusqu'au stade blastocyste

Au cours de son développement, l'embryon subit plusieurs divisions cellulaires aboutissant à l'obtention d'un blastocyste. Contrairement à la première division donnant un embryon 2-cellules, la seconde division est caractérisée par l'asynchronisme des blastomères ce qui conduit à une transition au cours de laquelle l'embryon a 3-cellules avant d'atteindre le stade 4-cellules. Jusqu'à ce stade, l'asymétrie observée par exemple pour H3K9me3 entre les génomes parentaux est encore visible (Hayashi-Takanaka et al. 2009; Ribeiro-Mason et al. 2012).

L'embryon poursuit ces cycles cellulaires et, après la troisième division, atteint le stade 8-cellules au cours duquel se met en place le processus de compaction via l'établissement de jonction inter-blastomères. Malgré la mise en place de la compaction, les blastomères continuent de se diviser toujours de façon asynchrone, passant progressivement aux stades 16-cellules puis morula. Quand la morula atteint 64 cellules, une cavité pleine de liquide (le blastocœle) se forme donnant naissance à un blastocyste (figure I-12). Ce dernier est composé de deux régions distinctes constituées de cellules caractérisées par la présence de protéines ou de marques épigénétiques différentes (Beaujean 2014).

Le trophoctoderme (TE), qui a une position externe, est constitué de cellules de type épithéliales. Les cellules du TE se distinguent par la synthèse exclusive de CDX2 (Caudal type homeobox 2) et TEAD4 (TEA domain family member 4) qui assurent leur maintien. La deuxième région correspond à la masse cellulaire interne (ICM), localisée à l'intérieur du blastocyste, exprimant des gènes de la pluripotence tels que *Oct4* et *Nanog*. Au cours des divisions suivantes, les cellules de l'ICM vont se différencier en épiblaste embryonnaire et en endoderme primitif extra-embryonnaire. L'ICM est de ce fait à l'origine de la formation des différents organes du futur individu.

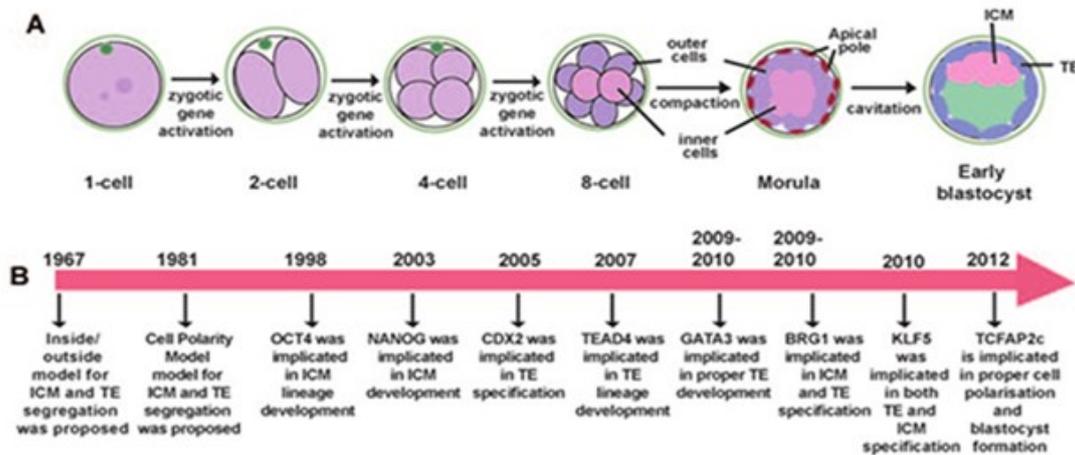


Figure I-12: Les différentes étapes de développement préimplantatoire de souris, du stade 1-cellule à blastocyste. A: L'expression du génome zygotique (ZGA) est mise en route aux stades précoces du développement. Au stade 8-cellules, les blastomères de l'embryon se compacte pour ensuite se séparer en deux populations distinctes : cellules internes vs. cellules externes (cellules polarisées avec un pôle apicale et un pôle basal). La transition morula-blastocyste est associée à la formation d'une cavité, le blastocœle, et la ségrégation des lignées de l'ICM et du TE.
B: Chronologie soulignant les principales découvertes scientifiques associées à la ségrégation des lignages, entre ICM et TE. Source: Paul et Knott, 2014.

Il est important de préciser que la position des blastomères au cours des différentes divisions semble déterminer leur destin dans la formation du blastocyste; les blastomères externes suivent une différenciation en cellules du TE alors que les blastomères internes tendent à former l'ICM. Les marqueurs, bien qu'ils soient exclusifs aux deux régions distinctes du blastocyste, ne déterminent cependant pas le lignage entre cellules internes/externes. En effet, dans le cas de *Oct4* et *Nanog*, l'expression restreinte aux cellules de l'ICM ne s'observe qu'après l'établissement du lignage (Wu and Schöler 2014; Xenopoulos et al. 2015). De la même manière, il a été observé que des embryons dépourvus de *Cdx2* forment des blastocystes présentant des TE dont le maintien est compromis (Strumpf et al. 2005; Jedrusik et al. 2008). Par ailleurs il est possible de modifier le destin cellulaire en modifiant les profils d'expression de ces gènes ou même d'enzymes modifiant certaines marques épigénétiques (Torres-Padilla et al. 2007; Burton et al. 2013; Goolam et al. 2016).

Chapitre II/ Les compartiments nucléaires impliqués dans la ribogenèse

La ribogenèse est le processus biologique par lequel les ribosomes sont produits. Cette biogenèse a lieu dans un compartiment nucléaire spécifique, le nucléole. La biosynthèse des ribosomes implique d'autres structures nucléaires, les corps de Cajal qui coopèrent étroitement avec le nucléole. Le nucléole est une structure qui a été amplement étudiée en cellules somatiques mais les connaissances sur son apparition et sa formation au cours du développement embryonnaire sont moins étendues.

II-1) Le nucléole en cellules somatiques

II-1-1) Généralités

Le nucléole est un compartiment nucléaire dont la première description a été faite en 1781, mais ce n'est qu'en 1836 que le terme « nucléole » a été introduit (Mosgöller W 2004). Le nucléole présent dans les noyaux de cellules eucaryotes, est le siège de la biogenèse des ribosomes (Bourgeois and Hubert 1988). Le nombre estimé de nucléoles par noyau est de 1 à 6 car ce sont des structures dynamiques capables de fusionner (Savino et al. 2001). Les nucléoles sont facilement observables en microscopie électronique à transmission de par leur structure dense aux électrons (figure II-1). Ces observations révèlent la présence de trois compartiments nucléolaires (Hernandez-Verdun and Louvet 2004; Lo et al. 2006; Derenzini et al. 2006; Sirri et al. 2008). Il s'agit :

- du centre fibrillaire (fibrillar center ou FC), de forme sphérique. Ce compartiment, dont la taille varie de 0,1 à 1 μm , contient une structure fibrillaire fine relativement claire en microscopie électronique (Recher et al. 1969). Les séquences d'ADN ribosomique (ADNr) sont localisées dans ce compartiment bien que leur transcription n'y ait pas lieu.
- du composant fibrillaire dense (dense fibrillar component ou DFC), plus contrasté en microscopie électronique. Il correspond à des fibrilles empaquées de façon très dense et entourant le FC ; il contient des ARNr (ARN ribosomiques) néo-synthétisés associés à des protéines ribosomiques.
- du composant granulaire (granular component ou GC) constitué de granules de ribonucléoprotéines (RNP) de 15 à 20 nm. Ces granules correspondent à l'assemblage précoce des sous-unités ribosomiques (Leger-Silvestre and Gas 2004).

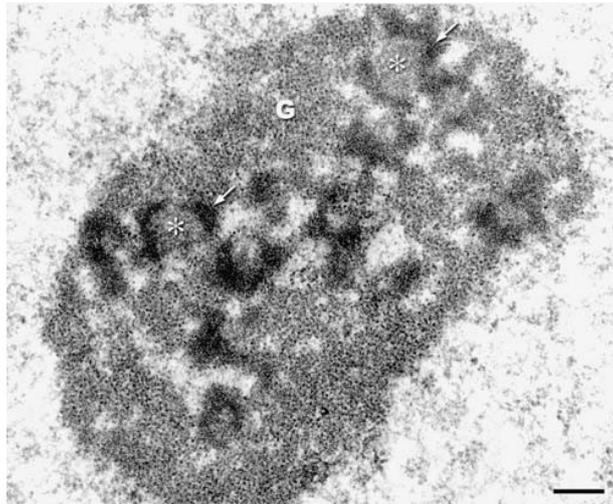


Figure II-1 : Organisation ultrastructurale du nucléole vue par microscopie électronique. Les trois composantes nucléolaires sont observées dans une cellule HeLa: les centres fibrillaires (astérisques), le composant fibrillaire dense (flèche) et le composant granulaire (G). Barre d'échelle: 0,3 μ m. Source: Hernandez-Verdun 2006.

Les FC et DFC s'entremêlent et forment le nucléolonème (compartiment fibrillaire) (Sato et al. 2005), tandis que le GC entoure ce compartiment et occupe 70% du volume du nucléole. L'organisation de ces trois compartiments confère une structure réticulée au nucléole (figure II-1).

A ce jour, la fonction la mieux connue du nucléole est la biogenèse des ribosomes. Ce processus est divisé en trois étapes se déroulant dans les différents compartiments nucléolaires (figure II-2) (Hernandez-verdun 2006a; Hernandez-verdun 2006b; Boisvert et al. 2007). La transcription des gènes ribosomiques (dont je parlerai plus en détails dans le chapitre III) se déroule à la jonction entre le FC et le DFC. Les transcrits primaires (pré-ARNr) subissent ensuite une maturation précoce dans le DFC suivie de leur migration dans le GC où aura lieu la maturation tardive. La maturation des transcrits ribosomiques implique deux types de modifications à savoir la 2'-O-méthylation et la pseudo-uridylation contrôlées par de petits ARN nucléolaires (small nucleolar RNA en anglais ou snoRNA) formant en association avec de petites protéines, les snoRNP (small nucleolar ribonucleoprotein).

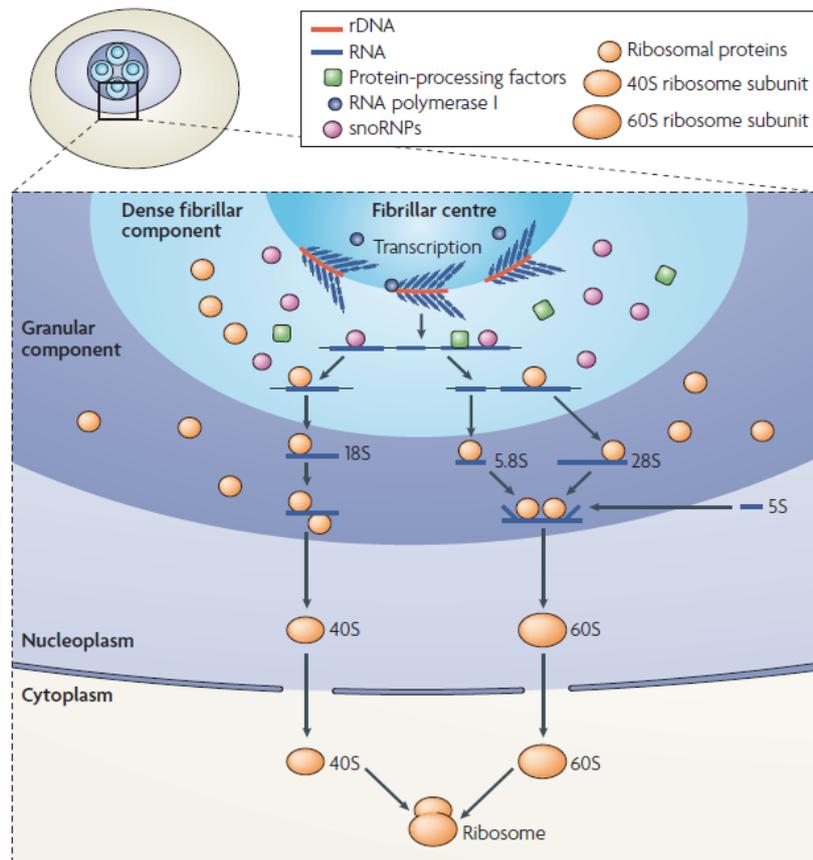


Figure II-2: Modèle de la biogenèse des ribosomes. La transcription de l'ADN ribosomique (ADNr) par l'ARN-polymérase I se produit soit dans les centres fibrillaires (FC) ou à la limite entre le FC et la région du composant fibrillaire dense (DFC). Les ARN pré-ribosomiques sont clivés, et modifiés par de petites ribonucléoprotéines nucléolaires (snoRNP), dans le DFC. La maturation finale des ribonucléoprotéines pré-ribosomiques et l'association avec les protéines ribosomiques se produisent principalement dans la région du composant granulaire (CG). Dans le GC, les ARNs ribosomiques (ARNr) 5.8S et 28S s'associent avec l'ARN 5S pour former la sous-unité 60S, tandis que les ARNr 18S s'assemblent seuls dans la sous-unité 40S du ribosome. Les sous-unités ribosomiques 40S et 60S sont toutes deux exportées vers le cytoplasme, où elles se lient à l'ARNm pour former des ribosomes fonctionnels. Source: Boisvert et al. 2007.

Ce déroulement de la biogenèse des ribosomes reflète la relation étroite qui existe entre ces différentes étapes et l'ultrastructure du nucléole. Selon (Mélèse and Xue 1995), le fait de produire les ribosomes permet la formation des nucléoles. Cette hypothèse est cohérente avec les deux observations suivantes:

- 1) au moment de la biogenèse des ribosomes, il y a recrutement des machineries de transcription, de maturation et d'assemblage des sous-unités ribosomiques, les protéines et facteurs ainsi rassemblés constituant les éléments structuraux des différents compartiments nucléolaires.
- 2) l'inhibition de la transcription des gènes ribosomiques entraîne une ségrégation des compartiments nucléolaires (Douset et al. 2000; Shav-tal et al. 2005; Thiry et al.

2009). On passe ainsi d'une structure où les trois compartiments sont imbriqués les uns dans les autres à une structure où ils sont séparés (figure II-3).

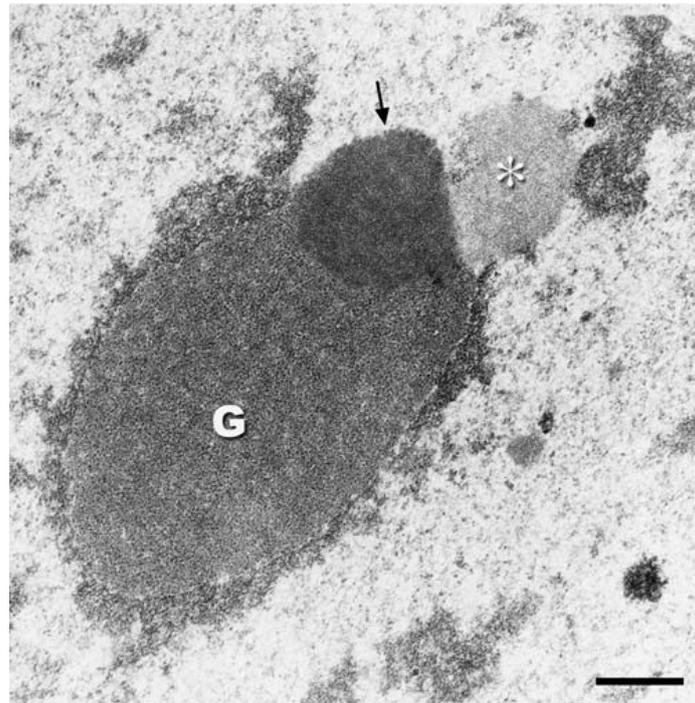


Figure II-3 : Désorganisation du nucléole des cellules HeLa observée en microscopie électronique. Les trois principaux composants nucléolaires sont séparés suite à l'inhibition de la transcription pol I-dépendante par l'actinomycine D (actD). On distingue clairement les centres fibrillaires (astérisques), le composant fibrillaire dense (flèche) et le composant granulaire (G). Barre d'échelle: 0,5 μm . Source Hernandez-Verdun 2006.

De par sa fonction dans la biogenèse des ribosomes, le nucléole est impliqué dans la prolifération cellulaire, notamment dans le cas de cancer (Boisvert et al. 2007; Sirri et al. 2008; Drygin et al. 2014). Dans le cas particulier de la prolifération cellulaire, il existe une corrélation entre la taille des nucléoles et l'intensité de la ribogenèse. En effet, dans les cellules en prolifération présentant une activité ribogénique intense, les nucléoles ont une taille allant de 3 à 9 μm . Ces valeurs sont largement supérieures à la taille de nucléoles observée dans des cellules non prolifératives comme par exemple dans les lymphocytes matures dans lesquels les nucléoles ont une taille est de 0,5 μm . De plus, en fonction du type cellulaire, les nucléoles ont également des FC dont le nombre et la taille vont varier : dans les cellules à forte activité de production ribosomique, les FC sont nombreux et petits alors qu'en cas d'activité faible, on retrouve un FC très large (Pébusque and Seite 1981; Hozák et al. 1989).

II-1-2) Les protéines nucléolaires

Plusieurs auteurs se sont intéressés au protéome du nucléole en utilisant la spectrométrie de masse (Andersen et al. 2002; Andersen et al. 2005). En 2006, Leung et al. ont ainsi mis en évidence la présence de plus de 700 protéines dans le nucléole humain. Depuis plus de 4500 protéines nucléolaires ont été répertoriées chez l'homme (Ahmad et al. 2009). Parmi les protéines nucléolaires, on retrouve celles impliquées dans les différentes étapes de la ribogénèse (Hernandez-Verdun and Louvet 2004; Hernandez-verdun 2006a):

- les protéines de la machinerie transcriptionnelle spécifique de la transcription des ARNr notamment l'ARN Pol I, UBF (upstream binding factor), et SL1/TIF-IB (selectivity factor 1/transcription initiation factor-IB), ainsi que leurs cofacteurs transcriptionnels, que l'on retrouve dans le FC et au niveau de la jonction FC/DFC ;

- les protéines impliquées dans la maturation précoce des ARNr comme la fibrillarine, NOPP140 (nucleolar phosphoprotein 140), la nucléoline (Ncl/C23) sont détectées dans le DFC;

- les protéines impliquées dans la maturation tardive, localisées dans le GC, telles que la nucléophosmine 1 (NPM1/B23) ou NOP52.

Plusieurs techniques ont permis d'étudier le trafic de ces protéines dans les noyaux de cellules vivantes (Lippincott-Schwartz et al. 2001; Lippincott-Schwartz 2002; Dundr et al. 2004). Ainsi, Dundr et al. (2002) ont montré par redistribution de fluorescence après photoblanchiment (fluorescent recovery after photobleaching en anglais, ou FRAP) que les sous-unités de l'ARN pol I ne s'assemblent qu'une fois présentes dans le nucléole. Plusieurs équipes ont également mis en évidence que les constituants de la machinerie transcriptionnelle liée à l'ARN pol I ainsi que de nombreuses protéines nucléolaires transitent rapidement entre le nucléole et le nucléoplasme (Phair and Misteli 2000; Snaar et al. 2000; Chen and Huang 2001; Dundr et al. 2004; Louvet et al. 2005). Dans le cadre de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée aux protéines UBF et NOPP140.

Le facteur de transcription UBF

UBF est une protéine nucléolaire agissant dans l'activation de la transcription des gènes ribosomiques. Les travaux de Roussel et al. (1993) ont montré qu'en interphase, UBF est localisée à la périphérie des FCs et dans le DFC sous forme de petits paquets (figure II-4). En mitose, UBF reste associée aux chromosomes, au niveau des NOR (nucleolus organizer regions), bien que certains NOR en soient dépourvus. Ces régions NOR, organisatrices du

nucléole, sont des régions chromosomiques comportant plusieurs copies en tandem d'ADNr (j'en reparlerai plus en détails dans le chapitre III).

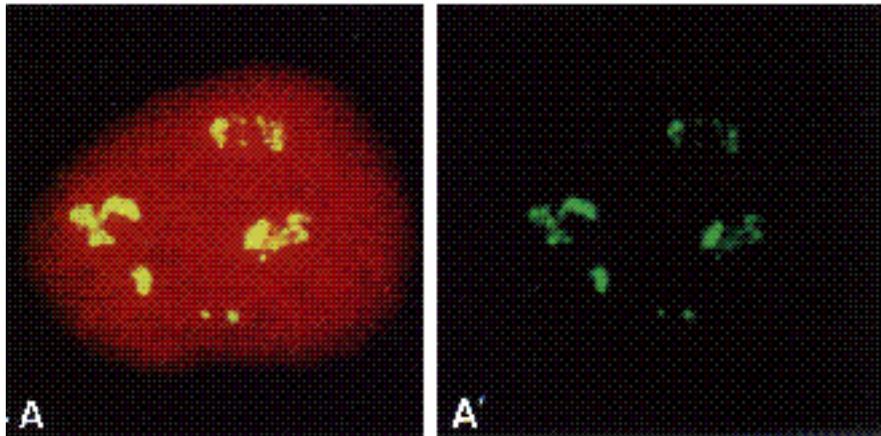


Figure II-4: Localisation d'UBF (vert) en microscopie confocale. (A, A') Cellules HEp-2 en interphase marquées avec le sérum S14 dirigé contre UBF (contre-coloration de l'ADN en rouge). A': Focus sur le marquage UBF observé dans quatre nucléoles. Trois d'entre eux forment une structure en « chaîne ». Modifiée à partir de Roussel et al. 1993.

UBF est un facteur de transcription qui agit à deux niveaux dans l'activation de la transcription des gènes ribosomiques. En effet, UBF intervient dans la formation du complexe de pré-initiation de la transcription avec SL1/TIF-1B et l'ARN polymérase I ; mais aussi dans l'organisation de la chromatine en maintenant une configuration « ouverte » favorisant la transcription (Russell and Zomerdijk 2005; Sanij et al. 2008).

UBF appartient à la famille des protéines possédant des domaines HMG (high mobility group). Les homologues d'UBF chez l'homme et la souris sont conservés avec 91% d'homologie au niveau de la séquence d'ADN et 98% d'homologie dans la composition en acides aminés. Plusieurs domaines HMG identifiés dans la portion centrale de la protéine UBF chez la souris, et homologues aux domaines de liaison de l'ADN des protéines HMG 1 et HMG 2, confèrent à UBF la capacité de se fixer à l'ADN (Jantzen et al. 1992; Leblanc et al. 1993; Hu et al. 1994; Bazett-Jones et al. 1994; Copenhaver et al. 1994; Putnam et al. 1994; Stefanovsky et al. 2001). Toutefois, l'interaction avec le promoteur des gènes ribosomiques n'implique pas toutes les HMGs (McStay et al. 1991; Jantzen et al. 1992; Leblanc et al. 1993; Stefanovsky et al. 2001). Il a été montré que la fixation d'UBF nécessite sa dimérisation via son extrémité N-terminale et que par le biais des domaines HMG cette fixation entraîne une courbure de l'ADN de 360°. Il se forme ainsi un important complexe protéique ou « enhanceosome » au niveau du promoteur des séquences d'ADNr (Bazett-Jones et al. 1994; Stefanovsky et al. 2001; Chen et al. 2004). UBF n'est cependant pas uniquement enrichie

dans la région promotrice mais également au niveau de la région codante des ADN_r (O'Sullivan et al. 2002; Sanij and Hannan 2009a). Le domaine C-terminal acide de la protéine UBF est également important pour l'activation de la transcription. Ce domaine est caractérisé par la présence de nombreux résidus sérines qui seront phosphorylés par la caséine kinase 2 (McStay et al. 1991; O'Mahony et al. 1992b; O'Mahony et al. 1992a; Voit et al. 1992; Jantzen et al. 1992; Voit et al. 1995).

Il existe deux isoformes pour la protéine UBF (UBF1 et UBF2) issus d'un épissage alternatif qui diffèrent par la présence d'une délétion de 37 acides aminés au niveau du second domaine HMG. Les deux isoformes sont exprimées différemment dans les tissus et UBF2 représente la forme majoritaire. Les anticorps disponibles pour étudier UBF en immunologie ne permettent cependant pas de distinguer UBF 1 et 2 (Bell et al. 1988; Jantzen et al. 1990).

La protéine NOPP140

Identifiée initialement chez le rat (Meier and Blobel 1990), NOPP140 est une protéine chaperonne de 140 kDa qui fait la navette entre le nucléole et le cytoplasme (Thomas Meier and Blobel 1992). NOPP140 a également été identifiée dans d'autres espèces, les homologues de NOPP140 ne différant qu'au niveau de la taille en acide aminés (Cairns and McStay 1995; Pai et al. 1995; Waggener and DiMario 2002). Au niveau structural, toutes les extrémités N- et C-terminales de la protéine NOPP140 sont conservées tandis que le domaine central est spécifique à chaque espèce. En particulier, on retrouve dans ce domaine central aussi bien des résidus acides (acide aspartique, acide glutamique) que basiques (histidine, lysine, arginine) et une majorité de sérines (Meier and Blobel 1990; Thomas Meier and Blobel 1992; Cairns and McStay 1995; Pai et al. 1995). Il apparaît que cette caractéristique favoriserait les interactions entre facteurs activateurs de la transcription et serait commune aux co-activateurs transcriptionnels interagissant avec l'ARN polymérase II (Ge et al. 1994; Kretschmar et al. 1994; Kaiser et al. 1995).

Plusieurs travaux ont mis en évidence la localisation de NOPP140 dans le compartiment DFC mais aussi dans les corps de Cajal (figure II-5 et partie II-3) (Thomas Meier and Blobel 1992; Meier and Blobel 1994; Isaac et al. 1998; Ogg and Lamond 2002; Thiry et al. 2009). NOPP140 intervient à différents niveaux dans la ribogenèse, notamment, elle est impliquée dans la maturation des transcrits ribosomiques. En effet, NOPP140 a été décrite comme une protéine chaperonne des snoRNP, faisant la navette entre les corps de Cajal et le nucléole (Isaac et al. 1998). Ainsi, l'expression d'un dominant négatif de *Nopp140* entraîne une délocalisation des snoRNP du nucléole. NOPP140 interagit avec deux familles de snoRNP et

avec les protéines qui les constituent : fibrillarine et NAP57 ou dyskérine (Meier and Blobel 1994; Yang et al. 2000; Wang et al. 2002). L'ensemble de ces données suggèrent une coopération étroite entre le nucléole et les corps de Cajal, coopération qui serait assurée par NOPP140 (Raska et al. 1991; Meier and Blobel 1994).

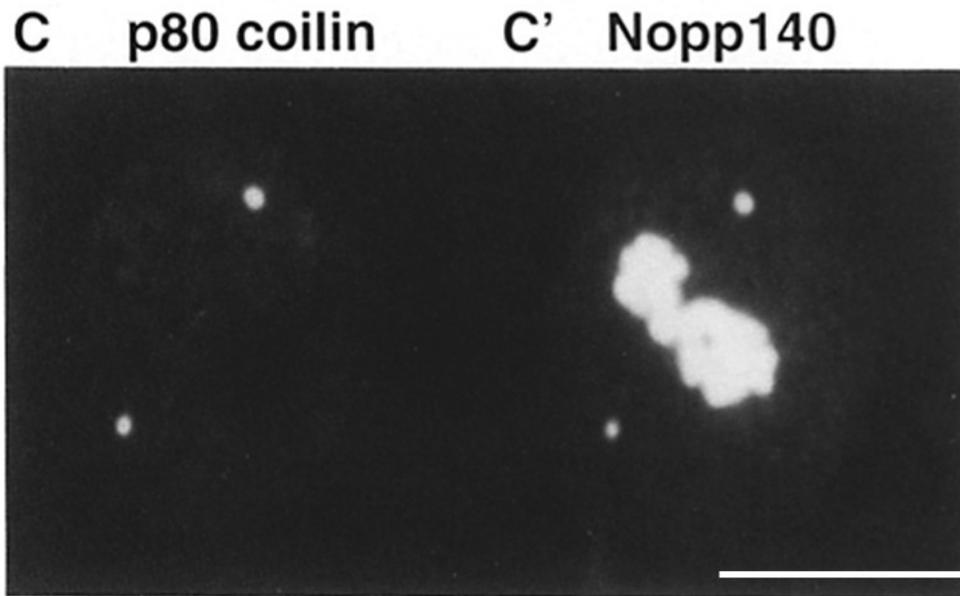


Figure II-5: Double immunofluorescence indirecte sur cellules BRL, observée en microscopie confocale. Marquage des cellules avec des anticorps anti-p80 coiline humaine (marqueur des corps de Cajal) (C) et des anticorps anti-NOPP140 de lapin (C'). Barre d'échelle: 10 μ m. Modifiée à partir de Meier et Blobel 1994.

Par ailleurs, il a été montré par immunofluorescence que NOPP140 colocalise avec l'ARN polymérase I et des ADNr (Baran et al. 2001; Tsai et al. 2008). NOPP140 interagit notamment avec la sous-unité RPA194 de l'ARN polymérase I (Chen et al. 1999) mais aussi avec la caséine kinase 2, un autre constituant majeur de l'ARN polymérase I (figure II-6). De plus, chez l'homme, l'inactivation de *Nopp140* entraîne une délocalisation des ADN ribosomiques et un arrêt de la transcription (Tsai et al. 2008). Ces données suggèrent un rôle important de NOPP140 dans la transcription des gènes ribosomiques mais à l'heure actuelle aucune donnée directe n'a pu le confirmer. Il faut noter que la fonction de NOPP140 en tant que facteur de transcription a déjà été mise en évidence dans le cadre de gènes dépendant de l'ARN polymérase II (Miau et al. 1997). NOPP140 joue également un rôle dans la structure du nucléole. Ainsi, l'expression d'un mutant de *Nopp140* présentant une délétion pour l'extrémité N-terminale affecte la morphologie du nucléole qui adopte une structure en forme de croissant (Chen et al. 1999). Les extrémités N- et C-terminales de NOPP140 pourraient aussi servir à l'ancrage des séquences d'ADNr en interphase, favorisant la formation du nucléole (Tsai et al. 2008).

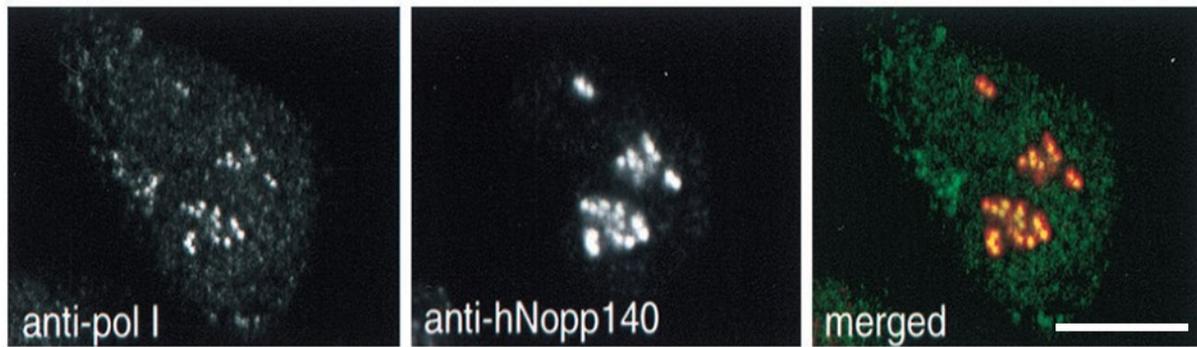


Figure II-6: Distribution subcellulaire de l'ARN polymérase I par rapport à NOPP140, observées en microscopie confocale. Double immunofluorescence sur des cellules HeLa montrant la co-localisation de l'ARN polymérase I et de NOPP140 (h: humaine). Barre d'échelle : 10 μ m. Modifiée à partir de Chen et al. 1999.

Enfin, selon les travaux de Ueshima et al. (2014), UBF favoriserait le recrutement de NOPP140 ainsi que d'autres facteurs impliqués dans la maturation des ARNr, suggérant des interactions éventuelles entre ces protéines.

II-1-3) Dynamique du nucléole pendant le cycle cellulaire

Le nucléole est une structure dynamique passant par des phases de désassemblage/réassemblage au cours du cycle cellulaire (figure II-7). Pendant la mitose, il y a disparition du nucléole suite au désassemblage de ses compartiments. Cet événement se déroule après la rupture de la membrane nucléaire en pro-métaphase et accompagne la condensation des chromosomes, formant un compartiment périchromosomal. Les protéines contenues dans le DFC (fibrillarine, nucléoline, NOPP140) et le GC (nucléophosmine 1/B23, NOP52) - normalement impliquées dans la maturation des transcrits - sont les premières à être délocalisées du nucléole vers le compartiment périchromosomal (Gautier et al. 1992a; Gautier et al. 1992b; Gautier et al. 1994; Dimario 2004). La délocalisation des complexes de maturation est suivie de l'inhibition de la transcription des gènes ribosomiques avec notamment une baisse du taux de transcription de 30% au début de la prophase et son arrêt total en fin de prophase (Prescott and Bender 1962; Gébrane-Younès et al. 1997; Heix et al. 1998). Contrairement aux complexes de maturation, la machinerie transcriptionnelle - composée notamment de l'ARN polymérase I, UBF et SL1/ TIF-IB - reste associée aux séquences ribosomiques; bien que inactive du fait de la phosphorylation par le complexe CDK1-cycline B (Roussel et al. 1996; Gébrane-Younès et al. 1997; Sirri et al. 2000). La mitose représente donc un état au cours duquel l'activité principale des nucléoles, à savoir la production des ribosomes, est mise en « pause ».

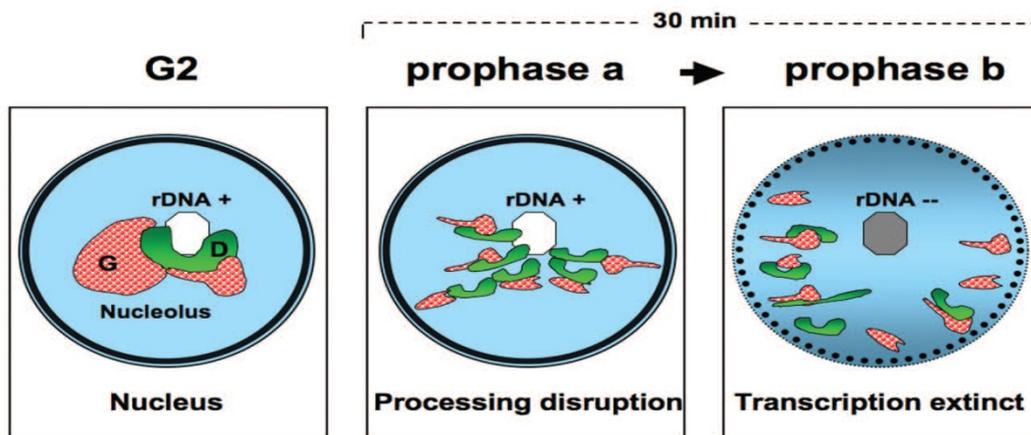


Figure II-7 : Illustration schématique de la dissociation du nucléole au début de la mitose. Pendant la phase G2 du cycle cellulaire, le nucléole est composé de 3 structures correspondant à différentes étapes de la biogenèse des ribosomes: (1) le centre fibrillaire ou FC (octogone de blanc) où sont localisés les gènes ribosomiques (ADNr), (2) le composant fibrillaire dense ou DFC (D en vert) et (3) le composant granulaire ou GC (G en rouge) . L'enveloppe nucléaire (doubles anneaux noirs) est à la périphérie du noyau entourant la chromatine (bleu). Au début de la prophase (prophase a), la transcription de l'ADNr est toujours active (octogone blanc) et les protéines nucléolaires impliquées dans la maturation (des compartiments D et G) quittent le nucléole (arrêt de la maturation). A la fin de la prophase (prophase b), la transcription des ADNr est arrêtée (octogone gris), les protéines de maturation sont dispersées et il y a rupture de l'enveloppe nucléaire. Dans les cellules Hela, la durée totale de la prophase est d'environ 30 min. Source: Hernandez-Verdun 2011.

A la fin de la mitose, le nucléole se réassemble notamment pendant la télophase. Au cours de cette période, des corps pré-nucléolaires se forment (prenucleolar bodies en anglais, ou PNB) à la surface des chromosomes (Savino et al. 2001; Carron et al. 2012).. Le réassemblage du nucléole implique alors la coordination de deux évènements (Hernandez-Verdun et al. 2002):

- la réactivation de la transcription des gènes ribosomiques, impliquant l'inactivation de la CDK1-cycline B. Cette réactivation semble simultanée sur chaque NOR associé à la machinerie transcriptionnelle ;
- le recrutement et l'association des PNB avec les NOR qui étaient actifs au cours de l'interphase précédente et où l'on retrouve les protéines de la machinerie transcriptionnelle.

Les PNB ont été initialement décrits comme des plates-formes d'assemblages du nucléole. Il semblerait cependant que les PNB pourraient constituer des sites extra - nucléolaires de maturation des pré - ribosomes. Les PNB contiennent en effet les facteurs impliqués dans le processus de ribogenèse tels que les pré-ARNr non maturés ou partiellement maturés (Carron et al. 2012; Sirri et al. 2016), des snoRNA et des protéines ribosomiques (Ochs et al. 1985;

Jiménez-García et al. 1994; Dundr and Olson 1998; Dousset et al. 2000; Angelier et al. 2005; Muro et al. 2010).

II-2) Le nucléole et le NPB dans l'embryon de souris

Le nucléole est donc un compartiment largement étudié et décrit dans les cellules somatiques mais beaucoup moins dans le contexte de l'embryon préimplantatoire. On sait néanmoins que l'embryon ne présente pas au début du développement de nucléole similaire à ce que l'on peut observer en cellules somatiques mais plutôt des précurseurs de nucléole (nucleolar precursor body/bodies en anglais, ou NPB). Dans la suite de ce chapitre, je décrirai les données existantes concernant la formation, la structure et le fonctionnement de ces NPB.

II-2-1) Définition en fonction du stade de développement

Comme présenté précédemment, le nucléole est un organite réticulé à composition tripartite dont les compartiments sont entremêlés les uns dans les autres. Cette définition n'est cependant valide que dans le cas des cellules somatiques eucaryotes. En effet, dans l'embryon préimplantatoire aucun organite réticulé n'est présent au début du développement. Chez la souris on observe à la place des structures sphériques appelées NPB, dès la fécondation et la formation des pronoyaux au stade 1-cellule (figure II-8) (Fléchon and Kopečný 1998).

Les observations réalisées en microscopie de fluorescence sur embryons vivants à ce stade ont confirmé une relation entre le nombre de NPB et le déroulement du premier cycle embryonnaire (Debey et al. 1989). Ainsi, le nombre de NPB est moins élevé dans des embryons collectés à la fin du premier cycle embryonnaire que dans les embryons collectés plus précocement dans lesquels on observe des distributions différentes entre pronoyau paternel et maternel: le pronoyau paternel présente souvent un NPB de grande taille ainsi que 4 à 5 NPB de taille plus petite, alors que le pronoyau maternel présente fréquemment 2 à 4 NPB de taille équivalente. Selon ces études, il y aurait fusion de plusieurs petits NPB formant ainsi un NPB plus large au cours du premier cycle embryonnaire (Austin 1961; Szollosi 1971; Debey et al. 1989).

Les observations réalisées en microscopie électronique viennent compléter ces données. Selon ces études, les NPB qui apparaissent dès le stade 1-cellule correspondent à des masses fibrillaires compactes et denses (Fléchon and Kopečný 1998). Ces NPB persistent tout au long du développement (figure II-8), jusqu'au stade morula/blastocyste où l'on retrouve alors des nucléoles semblables à ceux observés en cellules somatiques (Geuskens and Alexandre 1984; Takeuchi and Takeuchi 1986; Rozinek et al. 1991).

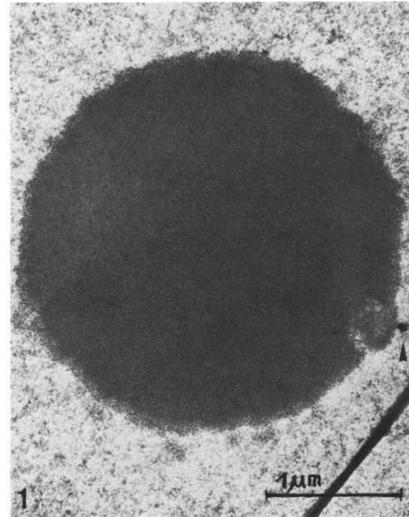


Figure II-8: Exemple d'un NPB dans l'embryon de souris au stade 4-cellules observé en microscopie électronique. Nucléole (NPB) fibrillaire sphérique. Un grain d'argent (pointe de flèche), correspondant à l'incorporation d'uridine tritiée dans les ARN ribosomiques nouvellement synthétisés, est visible près du centre fibrillaire qui se différencie à la périphérie du NPB. Modifiée à partir de Geuskens et Alexandre, 1984.

L'existence de ces deux types de structures nucléolaires à des moments distincts du développement soulève de nombreuses questions notamment sur les NPB: 1) quelle est leur origine ? 2) que contiennent-ils ? 3) Comment fonctionnent-ils? 4) comment se fait la transition NPB/ nucléole réticulé au cours du développement et comment évoluent-ils ?

Ces questions ont constitué le point de départ de mon travail de thèse.

II-2-2) Origine et structure des NPB dans l'embryon de souris

Les origines du NPB présent dans l'embryon remontent à l'ovogenèse. Au cours de cette période, les ovogonies présentent un nucléole de type réticulé fibrillo-granulaire similaire à celui des cellules somatiques. Ce nucléole est fonctionnel, il y a transcription des gènes ribosomiques. Cependant, pendant la croissance ovocytaire, le nucléole va subir plusieurs modifications morphologiques (figure II-9) (Kyogoku et al. 2014). Ces modifications morphologiques se font en parallèle de la formation de l'antrum dans le follicule chez la souris (Chouinard 1971) et s'accompagnent de la réduction de l'activité transcriptionnelle (Oakberg 1968; Moore et al. 1974).

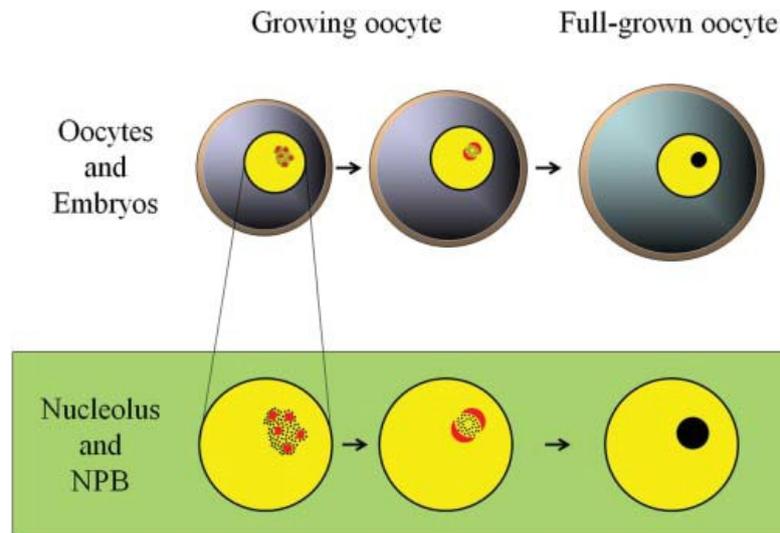


Figure II-9 : Modifications morphologiques du nucléole accompagnant la croissance ovocytaire. Les nucléoles dans les ovocytes de mammifères en croissance se composent de centres fibrillaires (rouge), de composants fibrillaires denses et de composants granulaires (points noirs). A la fin de la phase de croissance, les nucléoles sont inactivés et subissent des modifications morphologiques donnant un NPB. Modifiée à partir de Kyogoku et al. 2014.

En effet, un agrégat dense composé de fibrilles empaquées se développe progressivement au cours de la croissance de l'ovocyte, formant le NLB (nucleolus-like body). Le compartiment fibrillo-granulaire du nucléole entourant cet agrégat compact de fibrilles persiste au cours de cette croissance ovocytaire. Cependant, au stade GV, il finit par disparaître, aussi bien dans les ovocytes de type NSN que les SN. A la périphérie du NLB, mesurant environ 5 μ m de diamètre, se retrouvent quelques FC provenant du nucléole avant condensation. Il a été suggéré que ces FC correspondent aux NOR (Chouinard et al. 1971) et représentent les derniers sites actifs de transcription des gènes ribosomiques (Mirre and Stahl 1978). En effet, ces FC contiennent un réseau de fibrilles d'ADN qui selon des études basées sur l'hybridation in situ (Knibiehler et al. 1977; Bonnet-Garnier et al. 2012) et la coloration à l'argent (Hernandez-Verdun et al. 1978) correspondent aux gènes ribosomiques.

Ce processus de compaction des nucléoles et sa relation avec la baisse de la transcription est commun à d'autres espèces. Il existe de nombreux travaux sur ce sujet chez le porc (Crozet et al. 1981). Une relation directe entre l'activité transcriptionnelle des gènes ribosomiques et la compaction du nucléole en masse fibrillaire dense a notamment été démontrée par Crozet et al. (1983). Alors que l'incorporation d'uridine tritiée dans les brins d'ARN néo-synthétisés diminue avec la condensation nucléolaire dans les ovocytes pré-antraux, l'utilisation d'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription des gènes ribosomiques, entraîne une dé-

granulation du nucléole suivie de sa compaction formant des NLB similaires à ceux observés dans le cas d'ovocytes au stade GV.

En fin de méiose, il y a alors rupture de la GV et le NLB disparaît. Son contenu est alors libéré dans le cytoplasme, attendant la fécondation. Après fécondation et formation des pronoyaux parentaux, ce matériel nucléolaire présent dans le nucléoplasme sert à la formation des NPB dans le zygote. L'importance du NLB d'origine maternelle dans la formation des NPB du zygote a été mise en évidence grâce à la technique d'énucléation d'ovocyte au stade GV (Fulka and Langerova 2014) (figure II-10). Cette technique consiste en une microchirurgie au cours de laquelle le NLB est retiré de la GV de l'ovocyte. Il a ainsi été montré que : i) l'énucléation n'empêche pas la progression de l'ovocyte vers la métaphase II ; ii) les embryons issus d'ovocytes ayant subi une énucléation et fécondés artificiellement ne possèdent pas de NPB ; iii) ces embryons restent bloqués au stade 2-cellules. Ces données suggèrent que les NPB présents dans l'embryon sont d'origine maternelle et que ces NPB sont cruciaux pour le succès du développement embryonnaire.

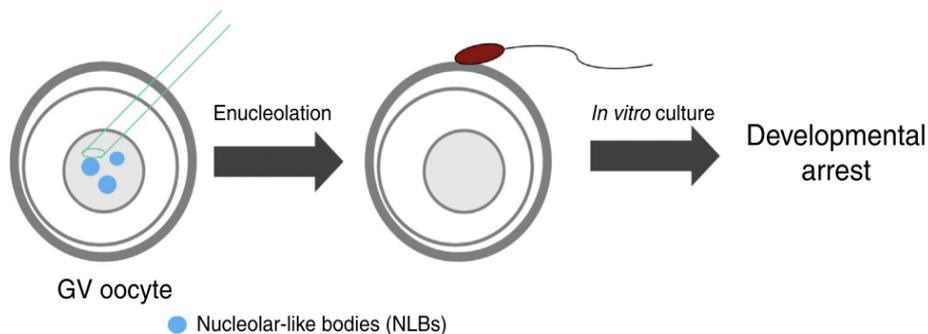


Figure II-10: Effet de la manipulation artificielle des NLB et des facteurs associés aux NLBs sur le développement embryonnaire. Les embryons obtenus avec des ovocytes ayant subi préalablement une énucléation au stade GV ne se développent pas au stade blastocyste. Modifiée à partir de Dang-Nguyen et Torres- Padilla. 2015

En termes de structure, les observations réalisées en microscopie électronique montrent que le NPB est composé d'un réseau dense de fibrilles formant une masse fibrillaire compacte avec en périphérie des FC de forme convexe, constitués de fibrilles partiellement agrégées. Ces FC forment des protubérances de diamètre variant entre 0,5 et 1,5 μm (Takeuchi and Takeuchi 1986). L'une des caractéristiques du NPB est qu'il ne contient pas d'ADN (Fakan and Odartchenko 1980; Takeuchi and Takeuchi 1986; Baran et al. 1993; Biggiogera et al. 1994; Kopečný et al. 1995). Par contre, les NPB sont entourés de chromatine. Ainsi, après marquage nucléaire avec des colorants ADN, les observations en microscopie à fluorescence révèlent

des structures apparaissant comme des « trous noirs » (les NPB) délimités par des anneaux fluorescents intenses (ADN agrégé à la périphérie des NPB). L'utilisation des techniques d'hybridation in situ en fluorescence a permis de montrer qu'il s'agit des séquences d'hétérochromatine péricentromérique ainsi que des séquences d'ADN ribosomique (figure II-11) (Romanova et al. 2006; Maalouf et al. 2010; Probst et al. 2010; Salvaing et al. 2012; Aguirre-Lavin et al. 2012).

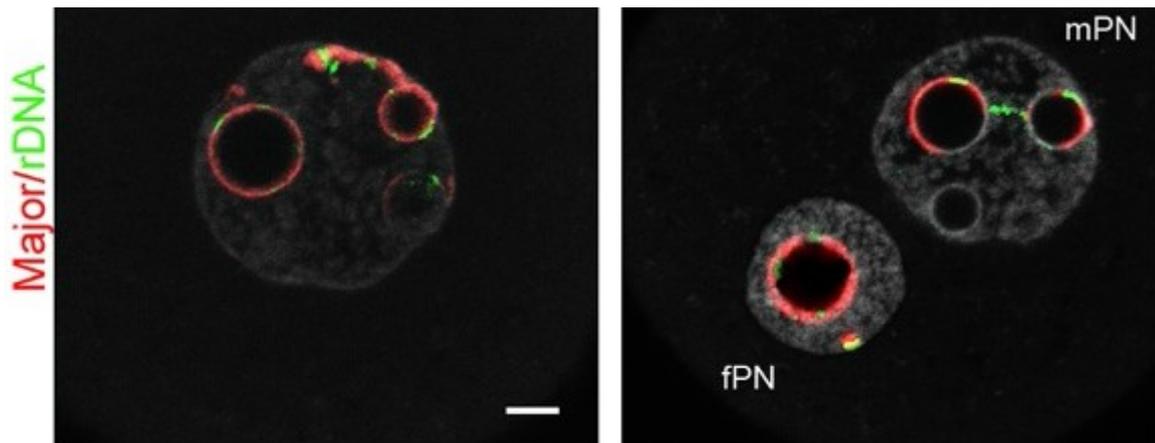


Figure II-11: Distribution de l'hétérochromatine péricentromérique (rouge) et des ADNr (vert) par FISH au stade 1-cellule, observée en microscopie confocale. La plupart des signaux d'ADNr sont autour des NPB. Toutefois, il existe parfois des signaux associés à des filaments d'hétérochromatine péricentromérique (partant des NPB vers la périphérie nucléaire) ainsi que des signaux de ADNr reliant deux NPB. Barre d'échelle:5 μ m. Modifiée à partir d'Aguirre-Lavin et al. 2012.

La formation des NPB dans l'embryon est aussi observée dans d'autres espèces de mammifères (Szollosi and Hunter 1973; Uehara and Yanagimachi 1977; Takeuchi and Takeuchi 1982; Naish et al. 1987; Tománek et al. 1989; Laurincik et al. 1995; Kanka et al. 1996). Toutefois la présence du NPB est transitoire au cours du développement, quelle que soit l'espèce. Ce NPB est systématiquement le siège de modifications morphologiques et structurelles qui ont lieu essentiellement au niveau de sa périphérie, aboutissant à la formation d'un nucléole de type somatique.

II-2-3) Transition entre NPB et nucléole réticulé de type «somatique»

La nucléogénèse embryonnaire a été relativement bien étudiée en microscopie électronique (Fakan and Odartchenko 1980; Geuskens and Alexandre 1984; Takeuchi and Takeuchi 1986). Ces études montrent que les compartiments typiques d'un nucléole somatique apparaissent progressivement en périphérie des NPB au cours du développement.

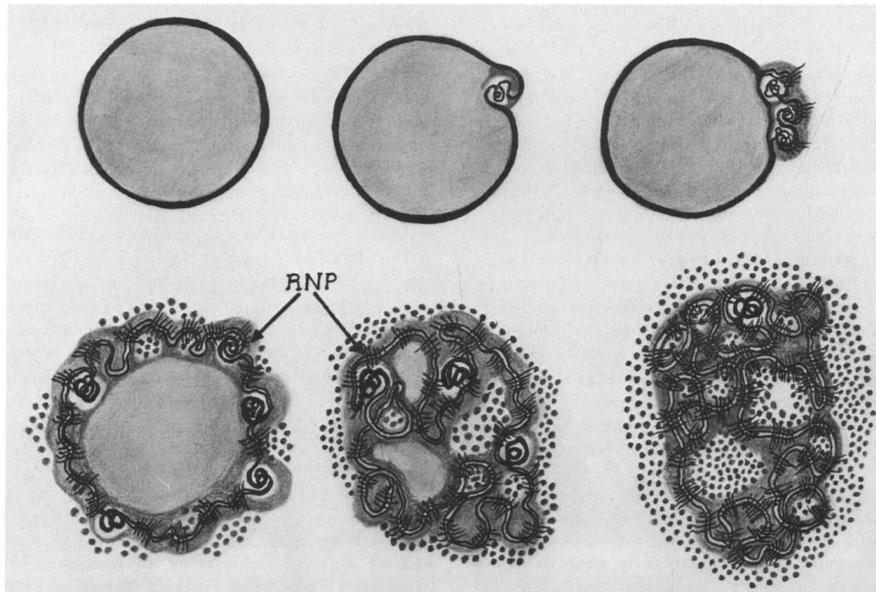


Figure II-12: Représentation schématique de la différenciation nucléolaire dans les embryons de souris au début du développement (voir le texte ci-dessous pour une description détaillée). Noir: cistrons ribosomiques; gris foncé: nucléolonème (brins fibrillaires où des sites d'ADNr sont transcrits); gris clair: noyau fibrillaire et masses inactives d'ADNr -(la chromatine ribosomique est enroulée et non transcrite dans les centres fibrillaires). RNP: fibrilles de ribonucléoprotéines naissantes. Source: Geuskens and Alexandre. 1984.

Le schéma résumant ces données sur la nucléogénèse embryonnaire chez la souris est présenté dans la figure II-12 et peut être ainsi décrit:

- ✓ Au stade 1-cellule, le FC est le premier compartiment visible en périphérie des NPB. Les compartiments DFC et GC sont absents.
- ✓ Après clivage, au stade 2-cellules, du matériel granulaire de 40-55 nm de diamètre apparaît en petite quantité parallèlement à l'augmentation en taille des FC.
- ✓ A partir du stade 4-cellules, les composants fibrillaires denses et granulaires apparaissent en plus grande quantité à la périphérie des NPB. A ce moment, les 3 compartiments FC, DFC et GC présentent une organisation particulière en raison du processus de réticulation qui se met en place: ces compartiments vont s'imbriquer les uns dans les autres à l'image de « brins torsadés » observés dans les réseaux anastomosés. Dans cette configuration, les FC présents en grand nombre se retrouvent

entourés par le DFC. La réticulation observée est soit asymétrique - la structure fibrillo-granulaire est présente sur un côté du NPB - soit symétrique - entourant complètement le NPB. Ces deux composants forment le compartiment fibrillaire. Ceci donne naissance au nucléolonème qui à son tour est entouré par le compartiment granulaire.

- ✓ Le nucléolonème ainsi formé s'étend, occupant une grande surface en périphérie des NPB à partir du stade 8-cellules. Les FC se retrouvent entourés par une couche de filaments denses en continuité avec le NPB.
- ✓ Au cours des stades suivants, notamment quand l'embryon atteint le stade morula précoce, deux types de structures sont visibles : certaines possèdent plusieurs masses fibrillaires sphériques issues de la fragmentation du NPB, entourées d'un réseau fibrillo-granulaire, et d'autres présentent des nucléoles réticulés avec un nucléolonème (compartiment fibrillaire composé de FC et DFC) et un compartiment granulaire. Ce dernier type de structure est également observé au stade morula tardif et au stade blastocyste. Les masses fibrillaires sphériques ne sont alors plus observées au sein du réseau fibrillo-granulaire. On peut alors conclure que les nucléoles à ce stade présentent une structure réticulée similaire à celle observée en cellules somatiques.

En résumé, la mise en place d'un nucléole similaire à celui d'une cellule somatique s'accompagne de modifications morpho-structurelles ayant lieu en périphérie des NPB; NPB qui finissent par disparaître à des stades plus tardifs du développement. Il y a donc une certaine coexistence entre NPB et nucléole au cours du développement. Ces deux structures semblent cependant indépendantes. Ainsi, les travaux de Kyogohu et al. (2014) ayant réalisé une énucléation de zygote au stade 1-cellule tardif (après la formation des NPB) montrent que: i) des nucléoles de type somatique se forment dans ces embryons énucléolés et ii) les embryons se développent normalement et donnent des descendants viables à terme.

II-2-4) Fonctionnement et dynamique nucléolaire dans l'embryon

Le lien entre la biogenèse des ribosomes et le nucléole découle des observations de Brown et Gurdon (1964). Ces auteurs ont montré que des embryons mutants de *Xénope* dépourvus de nucléoles sont incapables de produire des ribosomes et que le développement s'arrête. Dans l'embryon, l'activité transcriptionnelle des gènes ribosomiques a été détectée en périphérie des NPB, notamment en microscopie électronique par coloration à l'argent marquant les NOR actifs (Engel et al. 1977) ou par analyses biochimiques (Dvorák et al. 1978; Clegg and Pikó 1982; Takeuchi and Takeuchi 1986). Ces travaux démontrent l'initiation de la transcription des gènes ribosomiques en périphérie des NPB et dans les FC dès le stade 2-cellules chez la souris, au moment de l'activation majeure du génome. Une fois initiée, la transcription des gènes ribosomiques s'intensifie au cours du développement, jusqu'au stade blastocyste (Pikó and Clegg 1982; Geuskens and Alexandre 1984). L'incorporation dans les transcrits néo-synthétisés d'un précurseur, le BrUTP, a permis de préciser le déroulement de cette initiation de la transcription des gènes ribosomiques: la transcription démarre vers 32-33h post-fécondation (figure II-13) avec recrutement de la machinerie transcriptionnelle 4 à 5h avant (Zatsepina et al. 2003). Les analyses en immunofluorescence ont révélé que ces transcrits ribosomiques colocalisent avec les protéines UBF et RPA116 (sous unité de l'ARN polymérase I). Cependant, certains signaux d'UBF ne colocalisent pas avec les transcrits, suggérant ainsi que certaines séquences d'ADNr seraient inactives bien qu'associées à UBF. Par ailleurs, tous les NPB ne présentent pas un signal suggérant que les compartiments nucléolaires n'apparaissent pas à la périphérie de chaque NPB. Il existerait une hétérogénéité des NPB dans la capacité à recruter les machineries de transcription et de maturation des gènes ribosomomiques (Baran et al. 2001; Zatsepina et al. 2003; Romanova et al. 2006).

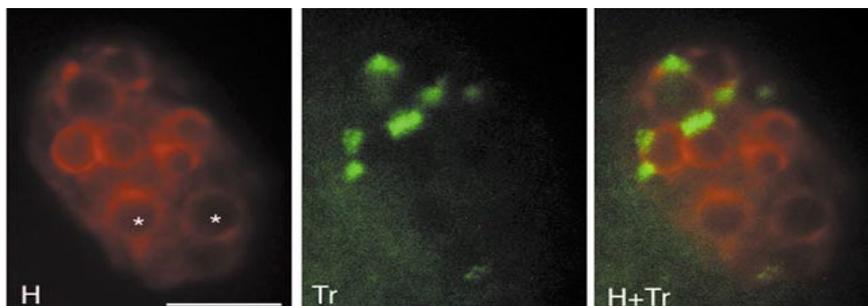


Figure II-13: Localisation des transcrits ribosomiques naissants dans des embryons de souris au stade 2-cellules tardif par incorporation de BrUTP. Double marquage au Hoechst 33342 pour l'ADN (H, en fausse couleur rouge) et BrUTP pour l'ARNr (Tr, vert). La superposition des 2 images est présentée dans la colonne de droite (H+Tr). Deux NPBs qui ne présentent pas de transcrits ribosomiques, sont indiqués par une astérisque (*). Images acquises en microscopie conventionnelle avec l'objectif $\times 100$. Barre d'échelle: 10 μm . Modifiée à partir de Zatsepina et al. 2003.

Cependant, des études récentes réalisées par Fulka et Langerova (2014) ont montré que la transcription des gènes ribosomiques est indépendante de la présence des NPB. En effet, il s'avère que dans les embryons issus d'ovocytes énucléolés, l'activité transcriptionnelle des gènes ribosomiques au stade 2-cellules est normale (en comparaison aux embryons contrôles).

L'ensemble de ces données montre bien que le NPB et le nucléole sont des structures indépendantes, qui apparaissent à des périodes différentes mais qui coexistent au cours du développement embryonnaire. Ces deux structures semblent par ailleurs présenter des fonctions différentes. Bien que la fonction des nucléoles soit bien décrite, celle des NPB reste encore peu connue. Selon une des hypothèses émises, notamment par notre équipe, les NPB pourraient servir à la réorganisation structurelle et à la formation des séquences d'hétérochromatine péricentromérique après la fécondation (Martin et al. 2006; Aguirre-Lavin et al. 2012; Fulka and Langerova 2014). Je reviendrai sur cette hypothèse dans le chapitre III.

II-3) Le corps de Cajal

Comme nous venons de le voir, le nucléole est le site de la biogenèse des sous-unités pré-ribosomiques. A ce titre, il contient plusieurs types de protéines impliquées dans les différentes étapes de cette biogenèse. Cependant, le nucléole n'est pas le seul compartiment impliqué. En effet, dans sa fonction, le nucléole est assisté par d'autres compartiments nucléaires, notamment le corps de Cajal.

La découverte du corps de Cajal (Cajal body en anglais, ou CB) dans les cellules neuronales par Ramon y Cajal remonte à 1903. Il l'avait alors qualifié de « nucleolar accessory body » en raison de son association avec le nucléole. Suite à des observations en microscopie électronique, l'apparence en « balles enchevêtrées de fils » leur a valu un autre nom, celui de « coiled bodies » (Monneron and Bernhard 1969; Hardin et al. 1969). En dépit des nombreux qualificatifs qui leur ont été attribués, Joseph Gall a proposé en 1999 une appellation unique à savoir « Cajal bodies » (Brouwer 2010). Il apparaît que ces structures sont observées dans plusieurs types cellulaires. Dans les cellules de mammifères les CB sont localisés dans le nucléoplasme, très proches, associés mais aussi parfois très éloignés des nucléoles (figure II-14). Les CB mesurent entre 0,1 et 2 μm de diamètre et leur nombre varie entre 0 et 10 par noyau. Les CB sont en effet des structures mobiles capables de s'assembler et de se dissocier modifiant ainsi leur nombre dans la cellule (Carmo-Fonseca et al. 1993; Platani et al. 2000). La dynamique des CB peut être influencée par plusieurs facteurs : le type cellulaire, le cycle cellulaire, la température, l'activité transcriptionnelle ou encore l'activité métabolique.

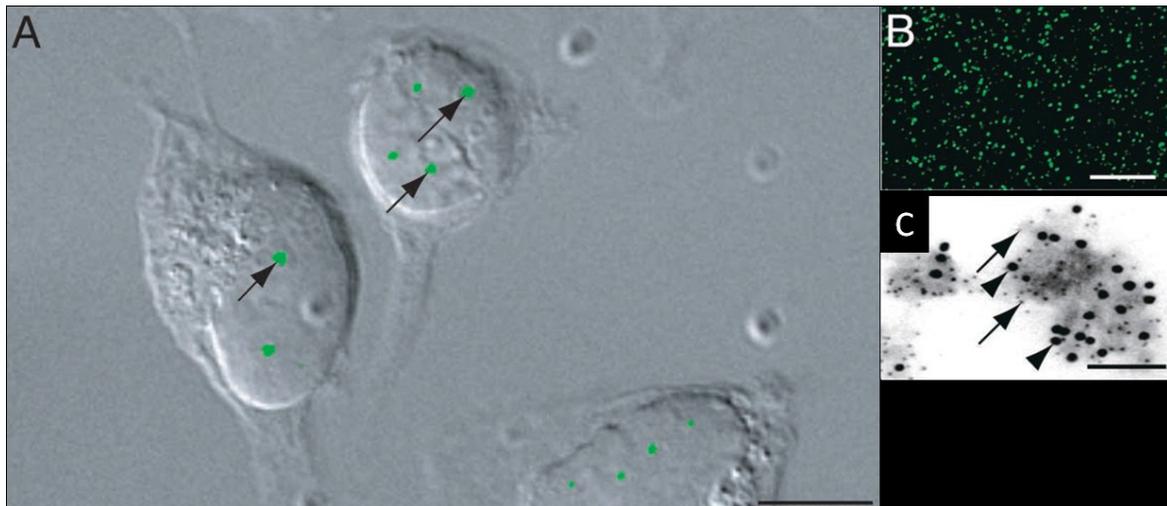


Figure II-14: Corps de Cajal. (A), cellules HeLa exprimant une protéine coiline fluorescente (les flèches indiquent les corps de Cajal). (B) immunofluorescence avec des anticorps anti-coiline détectant les corps de Cajal, (C) Corps de Cajal purifié et observé en microscopie électronique à transmission avec des anticorps couplés à l'or. La coiline est immunomarquée avec des particules de 5 nm d'or (flèches) et la protéine SMN est immunomarquée avec des particules de 10 nm d'or (têtes de flèches). Barres d'échelle: (A et B) 10 μ m, (C) 200 nm. Modifiée à partir de Ogg and Lamond. 2002.

II-3-1) Composition

Les CB contiennent des facteurs impliqués dans la transcription ainsi que la maturation de plusieurs types d'ARN. En effet, on y retrouve les ARN polymérases I, II et III ainsi que leurs cofacteurs transcriptionnels. Il a été également montré que les CB contiennent des snRNP (small nuclear ribonucleoproteins), les protéines associées mais aussi des snoRNP (small nucleolar ribonucleoproteins) et des protéines nucléolaires à savoir la fibrillarine, NOPP140 et B23 (Lamond and Carmo-Fonseca 1993; Matera and Ward 1993; Spector et al. 1993; Matera 1999; Dundr and Misteli 2001; Gall 2001; Gall 2003).

D'autres protéines considérées comme des « vrais » marqueurs des CB ont été identifiées ; il s'agit notamment de la protéine SMN (survival of motor neurons) et de la coiline (P80-coiline) (Andrade et al. 1991; Gall 2000; Terns and Terns 2001; Paushkin et al. 2002; Sleeman 2003). Ces composants représentent des éléments importants dans la formation des CB. La présence de la coiline, son interaction avec la protéine SMN et la synthèse des snRNP, représentent notamment des facteurs critiques dans la formation des CB (Machyna et al. 2013; Machyna et al. 2015). La coiline est un composant structurel critique; son absence entraînant la désintégration des CB (Tucker et al. 2001).

II-3-2) Fonction

Le CB joue plusieurs rôles dans la cellule en relation avec la transcription et la maturation des ARN (ribosomiques, messagers) via les facteurs qu'il contient. Le CB intervient ainsi dans la biogenèse des ribosomes à différents niveaux.

Les CB sont en effet des sites de pré-assemblage de nombreux complexes qui vont ensuite transiter vers leur site d'action comme par exemple le nucléole (Gall et al. 1999). Il apparaît notamment chez le *Xénope* que les CB pourraient être le lieu d'assemblage de la machinerie transcriptionnelle ARN polymérase II- et III-dépendante, et par analogie ARN polymérase I-dépendante (Gall et al. 1999; Murphy et al. 2002). En cellules humaines, il a été montré par Dundr et al. (2004) que le facteur de transcription UBF pouvait transiter rapidement par les CB.

C'est aussi le cas des snoRNP (en association avec les snoRNA) impliquées dans la maturation des pré-ARNr. Ces snoRNP présentes en faible quantité dans les CB (par rapport à leur quantité totale) correspondent à un assemblage *de novo* de molécules qui vont ensuite s'accumuler dans le nucléole (Gall et al. 1999; Sleeman and Lamond 1999; Narayanan et al. 1999; Carvalho et al. 1999; Sleeman et al. 2001). Il existe deux catégories de snoRNA à savoir les snoRNA à boîtes C/D, associées à la fibrillarine qui sont responsables de la 2'-O-méthylation des pré-ARNr (Tollervey et al. 1993; Kiss-László et al. 1996; Nicoloso et al. 1996) et les snoRNA à boîtes H/ACA interagissant avec NAP57 (dyskérine), impliquées dans la pseudo-uridylation des ARN ribosomiques (Ganot et al. 1997; Lafontaine et al. 1998). Il a été montré que la coiline, lie directement les snoRNA qui transitent par le CB, avant de cibler le nucléole (Boulon et al. 2004; Machyna et al. 2014). Par ailleurs, la coiline interagit également avec NOPP140 (chaperonne interagissant avec les deux classes de snoRNP) et donc participe au transport des snoRNA (Isaac et al. 1998; Yang et al. 2000).

En résumé, les CB correspondent à des « structures nucléolaires accessoires » car ils entretiennent un lien physique et moléculaire avec le nucléole.

L'interaction entre les CB et le nucléole a également été observée au cours du développement embryonnaire. Dans l'embryon préimplantatoire de souris, la présence des CB a été mise en évidence par immunofluorescence de protéines nucléolaires telles que NOPP140, la fibrillarine et la coiline (Ferreira and Carmo-Fonseca 1995; Baran et al. 2001; Zatssepina et al. 2003) (figure II-15). La biogenèse des CB dans l'embryon préimplantatoire de souris a été bien décrite par Ferreira et Carmo-Fonseca (1995). Ces auteurs ont observé que des pré-CB morphologiquement distincts (structure fibrillaire compact) mais contenant néanmoins de la

coiline et de la fibrillarine sont visibles dès la formation des pronoyaux au stade 1-cellule, en périphérie des NPB. Cependant, l'assemblage des CB a lieu plus tard (entre 8 et 17 h post-fécondation), avant la ré-initiation de la transcription dans laquelle ils sont impliqués (Zatsepina et al. 2003). Cette observation est en accord avec l'hypothèse selon laquelle la machinerie transcriptionnelle ARN polymérase I pourrait être d'abord recrutée et assemblée dans les CB avant de cibler les séquences ribosomiques (Gall et al. 1999).

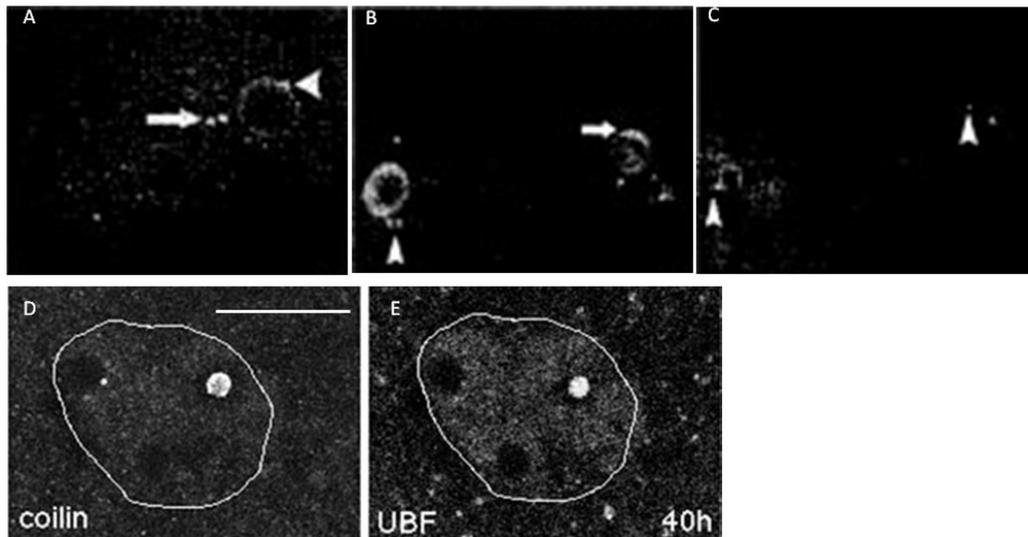


Figure II-15: Immunodétection des protéines NOPP140, coiline et UBF dans les corps de Cajal dans l'embryon de souris. Localisation dans le nucléoplasme de NOPP140 (flèche en A et tête de flèche en B) dans les corps de Cajal au stade 1-cellule tardif (A) et 2-cellules (B). (C) Les spots nucléoplasmiques représentent les corps de Cajal marqués positivement à la p80-coiline (tête de flèche). Zoom: (A) $\times 250$; (B) $\times 220$ et (C) $\times 170$. Modifiée à partir de Baran et al. 2001. Localisation de la coiline (D) et d'UBF (E) dans l'embryon au stade 2-cellules. UBF est associée à l'amas marqué positivement à la coiline. Modifiée à partir de Zatsepina et al. 2003.

Comme nous venons de le voir, au cours du développement, la mise en place d'un nucléole de type somatique et fonctionnel est reliée à la reprise de la transcription des gènes ribosomiques dès le stade 2-cellules, ce qui va fournir à l'embryon son autonomie et permettre la poursuite de son développement. Dans sa fonction, le nucléole en devenir est assisté par les corps de Cajal qui apparaissent dès le stade 1-cellule avant la reprise des activités transcriptionnelles. Cependant, le NPB semble aussi avoir un rôle dans l'organisation du génome notamment par la présence des séquences ribosomiques juxtaposées aux séquences centromériques au niveau de sa périphérie, hypothèse que j'ai aussi testée au cours de mon travail de thèse. Afin de bien poser cette hypothèse, la proximité topographique des séquences ribosomiques et des séquences péri/centromériques sera abordée dans le chapitre III.

Chapitre III/ Les séquences centromériques, péricentromériques et ribosomiques

III-1) L'hétérochromatine péricentromérique

L'hétérochromatine constitutive, condensée et pauvre en gènes, correspond essentiellement à des séquences d'ADN hautement répétées (Terranova 2008; Sidhu et al. 2008; Gartenberg 2009). Ce type d'hétérochromatine est notamment localisée au niveau des régions périphériques aux centromères (hétérochromatine péricentromérique) (Pardue and Gall 1970; Hsu and Arrighi 1971; Matsuda and Chapman 1995; Anton et al. 2014). Dans la suite de ce chapitre, je détaillerai le cas de l'hétérochromatine péricentromérique, d'abord en cellules somatiques puis dans le cas particulier de l'embryon préimplantatoire de souris.

III-1-1) Organisation, formation et fonction de l'hétérochromatine péri-centromérique

Nature et organisation de l'hétérochromatine péri-centromérique

Chez la souris, les centromères sont formés de répétitions en tandem de séquences « satellites mineurs » (régions centromériques), flanquées de séquences « satellites majeurs » (régions péricentromériques). Les séquences satellites mineurs sont présentes sous forme de monomères de 120 paires de bases, répétés sur 600 kilobases (Mitchell 1996; Kipling and Warburton 1997; Plohl et al. 2008). Les séquences satellites majeurs, plus abondantes, sont des répétitions de 234 paires de bases riches en résidus A-T et étalées sur 2 mégabases (Vissel and Choo 1989; Mitchell 1996; Lehnertz et al. 2003; Kalitsis et al. 2006). Leur richesse en résidus A-T facilite leur détection en interphase grâce à coloration de l'ADN avec le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Ces séquences sont présentes en proportions différentes dans le génome: les satellites majeurs constituent ~76% des séquences répétées alors que les satellites mineurs ne représentent que ~2% (Komissarov et al. 2011).

Sur les chromosomes métaphasiques, les séquences satellites majeurs ont une localisation périphérique par rapport au centromère alors que les satellites mineurs sont détectés au niveau de la constriction centrique (figure III-1) (Wong and Rattner 1988; Joseph et al. 1989). Chez *Mus Musculus*, espèce de souris communément utilisée en laboratoire, tous les chromosomes portent des satellites majeurs et mineurs à l'exception du chromosome Y (Pardue and Gall 1970; Hsu and Arrighi 1971; Pertile et al. 2009).

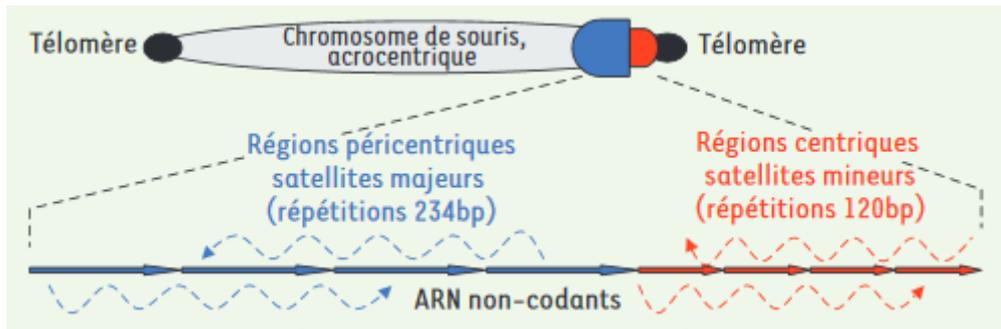


Figure III-1 : Représentation schématique d'un chromosome acrocentrique de souris et de l'organisation en tandem des régions centromériques (satellites mineurs) et péricentromériques (satellites majeurs). Les flèches en pointillés indiquent la production de longs ARN non-codants. Source : Terranova 2008.

En interphase, les régions centromériques et péricentromériques apparaissent sous forme de chromocentres (regroupement de chromatine hautement condensée) facilement observables par coloration de l'ADN au DAPI (figure III-2). Certains de ces chromocentres sont notamment associés aux nucléoles.

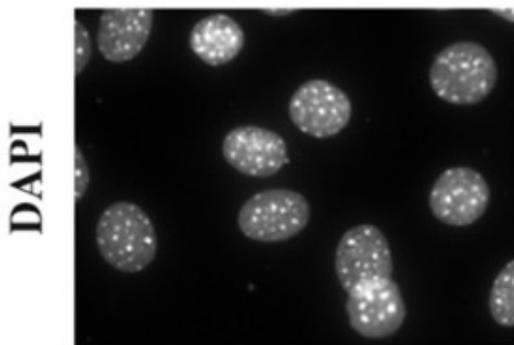


Figure III-2: Chromocentres marqués au DAPI dans des fibroblastes d'embryons de souris. Les chromocentres de ce type cellulaire (cellules différenciées) sont petits, nombreux et condensés. Modifiée à partir de Saksouk et al. 2015.

Les chromocentres correspondent au regroupement des régions péricentromériques de chromosomes différents par coalescence des séquences satellites majeurs en périphérie desquels se positionnent les séquences satellites mineurs caractérisées par la protéine CENP-A (centromeric protein A ; variant de l'histone H3) (Cerda et al. 1999; Guenatri et al. 2004). Bien qu'étant observé dans tous les types cellulaires, la taille et le nombre de chromocentres dépend de plusieurs facteurs tels que le type cellulaire, l'état de la cellule (différenciation) ou encore le cycle cellulaire (Manuelidis 1985; Ceccarelli et al. 1998; Alcobia et al. 2000; Baxter et al. 2004; Grigoryev et al. 2004; Terranova et al. 2005).

Formation et maintien de l'hétérochromatine péricentromérique

L'hétérochromatine péricentromérique est caractérisée par la présence de marques épigénétiques répressives telles que l'hyperméthylation de l'ADN, la méthylation des histones H3K9me2/3, H4K20me3, H3K27me3, une hypoacétylation des histones, et le recrutement de

la protéine HP1, constituant majeur de ce type d'hétérochromatine (Jeppesen et al. 1992; Bannister et al. 2001; Lachner et al. 2001; Peters et al. 2001; Taddei et al. 2001; Bird 2002; Lehnertz et al. 2003; Schotta et al. 2004). Comme mentionné dans le chapitre I, HP1 possède dans sa structure différents domaines qui permettent la reconnaissance de H3K9me2/3, la liaison aux ARN et à l'ADN, la dimérisation de HP1 ainsi que les interactions avec DNMT1 et DNMT3, l'histone-méthyltransférase SUV39H et la protéine CAF-1. Par un mécanisme d'auto-recrutement, et par son interaction avec tous ces facteurs capables de modifier et de remodeler la chromatine, HP1 participe à la formation et la propagation de l'hétérochromatine et joue un rôle dans l'établissement de ses caractéristiques épigénétiques (figure III-3) (Maison and Almouzni 2004; Saksouk et al. 2015).

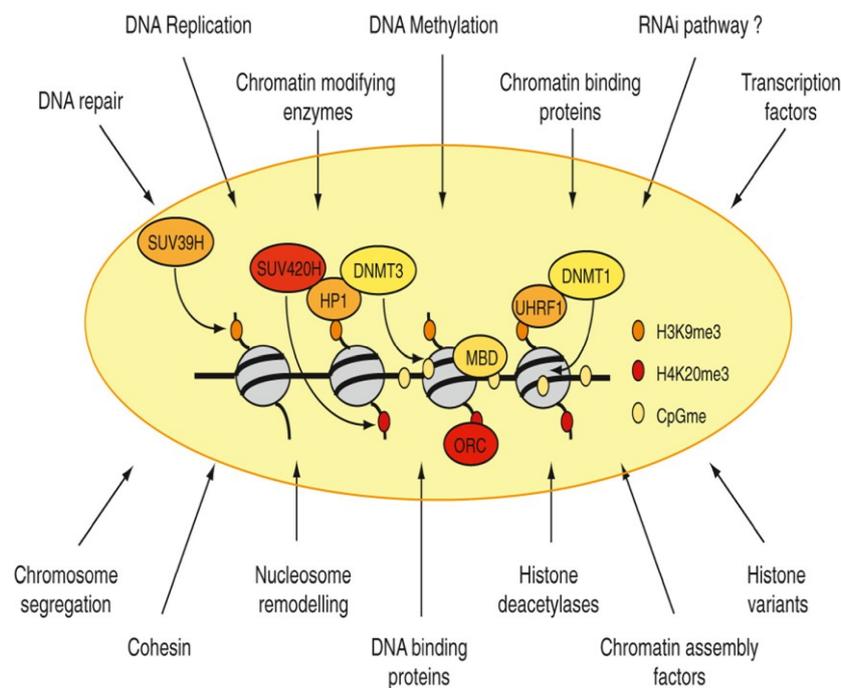


Figure III-3 : Représentation schématique de la formation de l'hétérochromatine constitutive chez les mammifères. SUV39H est l'enzyme responsable de la méthylation de H3K9 sur les péricentromeres, une marque d'histone reconnue par les protéines HP1. Les protéines HP1 interagissent et recrutent SUV420H et les DNMTs, conduisant à la tri-méthylation de H4K20 et à la méthylation de l'ADN, respectivement. Ces marques épigénétiques fonctionnent également comme sites de fixation, H4K20me3 pour le complexe ORC (origin of replication) et les CpG pour les protéines MBDs (facteurs ayant un domaine de reconnaissance des groupes méthyle sur l'ADN). Une alternative pour le recrutement des DNMTs pourrait être par le biais d'UHRF1 qui reconnaît la marque H3K9me3 et interagit directement avec DNMT1. En général, la formation de l'hétérochromatine et la maintenance requièrent la participation de plusieurs protéines impliquées dans des voies différentes. Source: Saksouk et al. 2015.

HP1 joue aussi un rôle de maintien de l'hétérochromatine lors de la réplication. Au cours de la phase S du cycle cellulaire, la protéine CAF-1 (chromatin assembly factor 1) interagit spécifiquement avec HP1 et forme un complexe qui recrute SetDB1 (méthyltransférase de

H3K9). Ce complexe monométhyle H3K9 ce qui produit ainsi un substrat pour SUV39H1/H2 et entraîne la triméthylation de cette histone, constituant de nouveaux sites de liaison pour HP1 qui s'accumule et assure la stabilité de l'hétérochromatine au cours de l'interphase suivante. Dans ce modèle, CAF-1 aurait un rôle de chaperon des histones néo-synthétisées et de HP1, en association avec le PCNA (composant de la machinerie de réplication) et HP1, il constituerait une plateforme contribuant à la fois au maintien et à la duplication des domaines d'hétérochromatine (Verreault et al. 1996; Taddei et al. 1999; Loyola et al. 2009). Le PCNA interagirait aussi avec le facteur SMARCAD1 ce qui provoquerait la désacétylation globale des histones H3/4 via le recrutement des désacétylases HDAC1/2 d'une part et la diméthylation de H3K9 par G9a d'autre part, favorisant la formation de l'hétérochromatine (Rowbotham et al. 2011).

M. Musculus

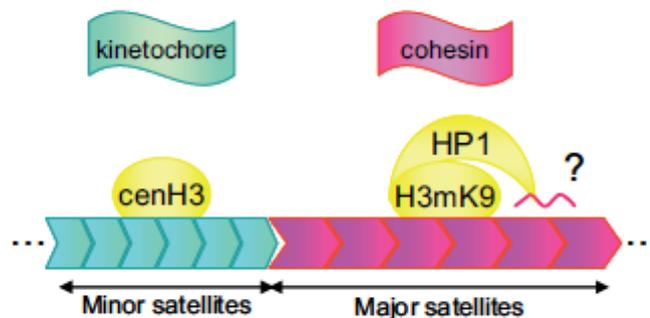


Figure III-4: Représentation schématique des séquences satellites mineurs (vert) et majeurs (rouge). Les régions centromériques (satellites mineurs) sont enrichies en CENH3 et jouent un rôle direct dans la fixation du kinetochore. Les régions péri-centromériques recrutent le complexe cohesine et sont enrichies en H3K9me3 sur laquelle se fixe la protéine HP1. Les molécules d'ARN (rose) semblent également participer à la structure de ces régions. Modifiée à partir de Eymery et al. 2009.

Enfin, plusieurs études ont mis en évidence la participation d'ARN non codants dans la formation de l'hétérochromatine (Almouzni and Probst 2011; Saksouk et al. 2015). C'est le cas notamment pour la formation et le maintien de l'hétérochromatine péri-centromérique qui fait intervenir chez la levure la machinerie d'ARN interférence « siRNA » (small interfering RNA) (Reinhart and Bartel 2002). Chez la souris, les ARN issus des régions péri-centromériques contribueraient de manière similaire à l'accumulation et l'association d'HP1 au niveau de ces régions (Muchardt et al. 2002; Maison et al. 2002). On ignore si les mécanismes impliquant les ARN non codants décrits chez la levure sont similaires chez les mammifères, en dépit de l'existence de protéines orthologues (figure III-4) (Eymery et al. 2009). L'embryon préimplantatoire représente un cas où la présence d'ARN non codants à

des stades bien précis serait indispensable à la formation de l'hétérochromatine et à la poursuite du développement (Santenard et al. 2010; Probst et al. 2010; Casanova et al. 2013). Le cas de l'embryon sera abordé dans la partie III-1-3.

Fonction de l'hétérochromatine péri-centromérique

Les régions centromérique et péri-centromérique jouent plusieurs rôles. La fonction essentielle du centromère est de servir de plate-forme d'assemblage pour le kinétochore et d'assurer la ségrégation des chromatides sœurs lors de la mitose. Au moment de cette ségrégation chromosomique, c'est le kinétochore qui assure la liaison des chromatides sœurs au fuseau mitotique. L'hétérochromatine péri-centromérique, et en particulier le recrutement de la cohésine au niveau de cette région, assurerait la cohésion des chromatides sœurs (Guenatri et al. 2004; Whelan et al. 2012). L'hétérochromatine péri-centromérique est en effet très importante pour la stabilité du génome. Peters et al. (2001) ont par exemple montré que des souris déficientes pour les enzymes SUV39H1 et SUV39H2, qui catalysent la méthylation de H3K9 spécifiquement au niveau des régions péri-centromériques, présentent une mauvaise ségrégation des chromosomes. Les embryons possédant cette double déficience se développent normalement pendant 12.5 jours mais par la suite d'importants retards de croissance associés à des taux élevés de résorption et de létalité prénatale sont observés.

Le rôle répressif de l'hétérochromatine péri-centromérique a été mis en évidence dans le phénomène de variégation (position effect variegation en anglais, ou PEV). Ce phénomène, initialement décrit chez la Drosophile, est observé lors de l'extinction mosaïque d'un gène suite à un changement de sa position (Singh 1994; Grewal and Klar 1996). La répression des gènes soumis à variégation est associée à une "hétérochromatinisation" de ces gènes, compaction induite en cis par la protéine HP1 (Eissenberg et al. 1990; Eissenberg et al. 1992; Wallrath and Elgin 1995; Cryderman et al. 1998; Festenstein et al. 1999; Sun et al. 2001). De manière similaire, l'hétérochromatine péri-centromérique joue également un rôle important dans la régulation de la transcription en formant un compartiment sub-nucléaire répressif (Francastel et al. 2000). La transcription des séquences répétées perturbant la stabilité et l'intégrité du génome, l'établissement de l'hétérochromatine de manière permanente est un mécanisme permettant l'inhibition de leur transcription (Misteli 2010; Almouzni and Probst 2011; Verdaasdonk and Bloom 2011; Martínez-A and van Wely 2011). De plus, la présence de HP1 ainsi que de ces facteurs associés (ADN méthyltransférase, histone méthyltransférase, histone désacétylase, facteur de remodelage) au niveau des chromocentres en interphase

constitue un environnement répressif défavorable à la transcription des gènes situés à proximité. La répression pourrait alors être due à une propagation de l'état chromatinien en trans (Figure III-5).

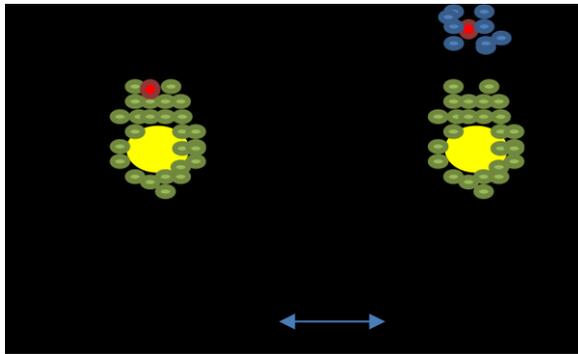


Figure III-5: Représentation schématique du rôle répresseur d'un chromocentre dans un noyau en interphase. La présence de HP1 ainsi que de ces facteurs associés (vert) au niveau des séquences satellites majeurs (jaune) constitue un environnement répressif défavorable à la transcription des gènes situés à proximité (rouge). L'activation de ces gènes s'accompagne de modifications de l'état chromatinien (comme l'hyperacétylation, en bleu) et de la délocalisation de ces gènes loin des chromocentres.

Ce mécanisme d'extinction a notamment été observé chez la souris par analyse de la localisation de gènes par hybridation in situ en fluorescence (fluorescent in situ hybridization en anglais, ou FISH) sur des cellules lymphoïdes (Brown et al. 1997; Brown et al. 1999). Lors de la différenciation en Lymphocyte T ou B, les gènes réprimés sont relocalisés à proximité de l'hétérochromatine péricentromérique. De la même manière chez l'homme, l'activation de la transcription du gène de la bêta-globine dans les cellules érythroïdes s'accompagne de sa délocalisation loin des chromocentres (Francastel et al. 1999; Schübeler et al. 2000). La dissociation des chromocentres est dans ce cas associée à un état pré-activé ou actif du locus qui présente une chromatine hyperacétylée; alors que l'association avec les chromocentres est associée à l'hypoacétylation du locus. Le fait que l'éloignement ou la dissociation des chromocentres favorise l'activation de gènes a ainsi été mise en évidence dans plusieurs types cellulaires (Bannister et al. 2001; Hiragami and Festenstein 2005). Il est aussi possible de positionner par transgénèse un locus à proximité des chromocentres et d'induire ainsi sa répression (Lundgren et al. 2000; Wijchers et al. 2015).

Cependant, il semblerait que l'extinction des gènes par rapprochement avec les chromocentres soit régulée de manière cellule-spécifique. En effet, dans plusieurs types cellulaires, comme par exemples les cellules hématopoïétiques, les gènes transcriptionnellement inactivés ne se localisent pas systématiquement à proximité de chromocentres (Brown et al. 2001; Hewitt et al. 2004; Takizawa et al. 2008; Jost et al. 2011). Des exemples d'activité transcriptionnelle ont également été décrits pour des gènes localisés à proximité de chromocentres (Lundgren et al. 2000; Sabbattini et al. 2001). Ce mécanisme d'extinction de l'activité transcriptionnelle par "hétérochromatinisation" n'est donc pas généralisable; il servirait plutôt de stratégie

d'extinction rapide de gènes dans des conditions physiologiques spécifiques. Par la suite, l'hétérochromatine péricentromérique jouerait un rôle dans le maintien de l'état transcriptionnellement inactif de certains gènes au cours de la différenciation (Guillemin et al. 2009). De tels mouvements de gènes par rapport aux chromocentres en interphase n'ont jusqu'à présent pas été identifiés dans les embryons à des stades précoces de développement.

III-1-2) Transcription et régulation de l'hétérochromatine péricentromérique

Les travaux de Harel et al. (1968) ont suggéré qu'il pourrait y avoir transcription des séquences péricentromériques dans des cellules tumorales de souris alors que ces régions étaient considérées comme transcriptionnellement inactives. L'idée selon laquelle l'hétérochromatine constitutive serait transcriptionnellement inactive a depuis été remise en cause avec la découverte des ARN issus de ces séquences. La transcription de ces régions péricentromériques est notamment assurée par l'ARN polymérase II et produit des transcrits non codants, généralement en faible quantité, dans certaines cellules (Eymery et al. 2009; Saksouk et al. 2015). Chez l'homme par exemple ces séquences sont réprimées dans tous les tissus analysés sauf dans les testicules. Leur transcription, considérée comme occasionnelle, a été observée dans des conditions physiologiques diverses. Une synthèse aberrante de ces transcrits a notamment été observée dans le cas de stress ou de différenciation (Terranova et al. 2005). Les brins sens et anti-sens des séquences péricentromériques sont tous les deux transcrits. Cette transcription se fait de façon cycle-dépendante. En effet, chez la souris la transcription des séquences péricentromériques a lieu principalement en G1/S, probablement suite à la décompaction de l'hétérochromatine (Lu and Gilbert. 2007). En effet, de nombreuses études mettent en parallèle une décompaction des péricentromères et une surexpression des satellites majeurs, comme par exemple dans les cellules *SUV39H* $\frac{1}{2}$ $-/-$ (Peters et al. 2001). Une régulation fine de ces séquences peut cependant conduire à une synthèse inégale des transcrits sens et anti-sens dans une cellule donnée en fonction des conditions physiologiques. Ainsi, au cours du cycle cellulaire, une forte transcription du brin sens est observée au cours de la phase S (Chen et al. 2008). De même, seule transcription antisens est détectée dans les testicules et dans le foie (Eymery et al. 2009; Saksouk et al. 2015). L'incorporation de variants d'histones, notamment H3.3, au niveau des régions péricentromériques représente un autre niveau de régulation de leur transcription (Drané et al. 2010). Dans une manière similaire, la perte de marques épigénétiques répressives, comme H3K9me3 et H4K20me3, favorise la transcription des séquences péricentromériques dans les

cellules souches embryonnaires de souris ainsi qu'au cours de la différenciation musculaire (Terranova et al. 2005; Martens et al. 2005). Enfin, il a été montré que le remodelage de la chromatine par la protéine WDHD1 (WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1) pouvait aussi réguler la transcription des séquences satellites mineurs. L'absence de WDHD1 entraîne non seulement une délocalisation de la protéine HP1 mais également une augmentation de la transcription des séquences majeurs et mineurs (Hsieh et al. 2011).

III-1-3) L'hétérochromatine péri/centromérique dans l'embryon de souris

Organisation des régions centromériques et péricentromériques dans l'embryon précoce de souris.

Après la fécondation, les génomes parentaux sont le siège de nombreux remaniements, notamment au niveau de l'hétérochromatine constitutive des régions centromériques et péricentromériques. L'organisation des séquences centromériques et péricentromériques au cours du développement a été décrite par plusieurs équipes grâce à la technique de FISH aussi bien dans les gamètes qu'après fécondation, jusqu'au stade blastocyste (Haaf and Ward 1995; Govin et al. 2007; Probst et al. 2007; Santenard et al. 2010; Bonnet-Garnier et al. 2012; Aguirre-Lavin et al. 2012).

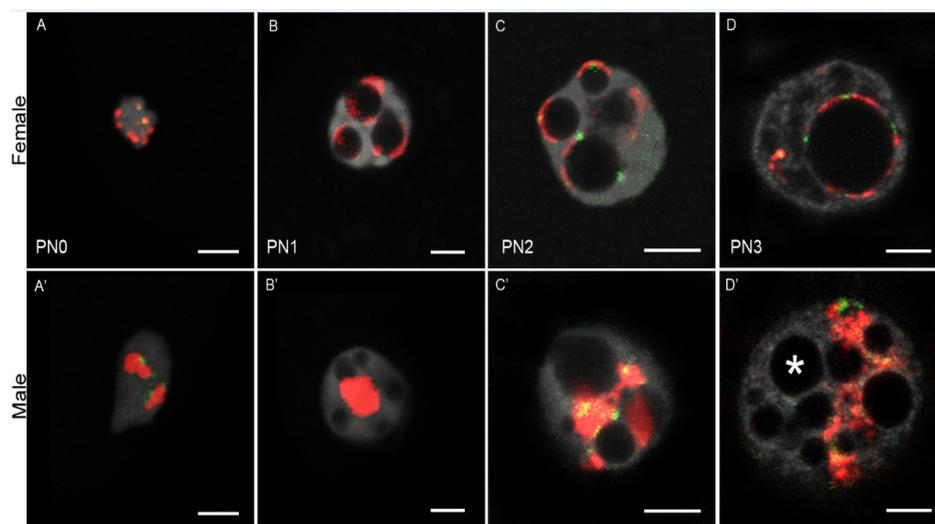


Figure III-6: Distribution des régions centromériques (vert) et péricentromériques (rouge) dans l'embryon de souris à des stades précoces du stade 1-cellule (PN0 à PN3) par FISH-3D avec des sondes spécifiques. A PN0, les séquences sont condensées dans les gamètes femelle et mâle (A et A'). PN1, les régions péricentromériques sont recrutés en périphérie des NPB dans le pronoyau femelle alors qu'elles restent condensées en position centrale dans le pronoyau mâle (B et B'). Ce n'est qu'à partir de PN2 que les régions péricentromériques commencent à être recrutées en périphéries des NPB dans le pronoyau mâle (C et C'). A PN3, le recrutement des régions péricentromériques autour des NPB se poursuit dans le pronoyau mâle à l'exception de certains NPBs (*). Dans le pronoyau femelle, les régions péricentromériques entourent la quasi-totalité de la surface du NPB. Par ailleurs, certaines séquences restent en périphérie du noyau sans interaction avec le NPB. Barres d'échelle: 5 μ m. Source: Aguirre-Lavin et al. 2012.

➤ Dans les gamètes et au stade 1-cellule

Avant fécondation, les gamètes présentent une organisation distincte. Les séquences satellites majeurs/mineurs se regroupent au centre de la tête du spermatozoïde, alors que l'ovocyte après ovulation est bloqué en fin de méiose avec alignement des séquences satellites majeurs/mineurs sur la plaque métaphasique. Après fécondation, il y a décondensation des génomes parentaux, formation des pronoyaux, et réorganisation des séquences satellites (figure III-6 ci-dessus). En effet, on observe un "recrutement" des séquences satellites qui

s'accumulent en périphérie des NPB, recouvrant de manière plus ou moins continue la surface du NPB. Il est important de préciser que l'apparition de ces anneaux à la périphérie des NPB n'est pas synchrone entre les deux pronoyaux parentaux. Ces structures apparaissent rapidement, dès le stade PN1, dans le pronoyau maternel, alors que les séquences satellites restent associées, formant une masse relativement condensée et centrale dans le pronoyau paternel. Ainsi, au stade PN3, seulement 3% des NPB ne sont pas associés aux séquences satellites dans le pronoyau maternel contre 30% dans le pronoyau paternel (Aguirre-Lavin et al. 2012). A des stades plus tardifs (PN4/PN5) du premier cycle, les deux pronoyaux présentent toutefois une organisation plus similaire des séquences satellites, à la périphérie des NPB. Alors que le pronoyau maternel possède en général ~4 NPB, tous entourés de ces séquences, le pronoyau paternel présente régulièrement 1 NPB sur 6 sans séquence satellite associée (Aguirre-Lavin et al. 2012). Dans tous les cas, certaines séquences satellites ne semblent cependant pas se relocaliser autour des NPB et restent en périphérie des pronoyaux (figure III-7). Au cours de la mitose, cette organisation en anneaux est remplacée par celle habituellement observée sur les chromosomes.

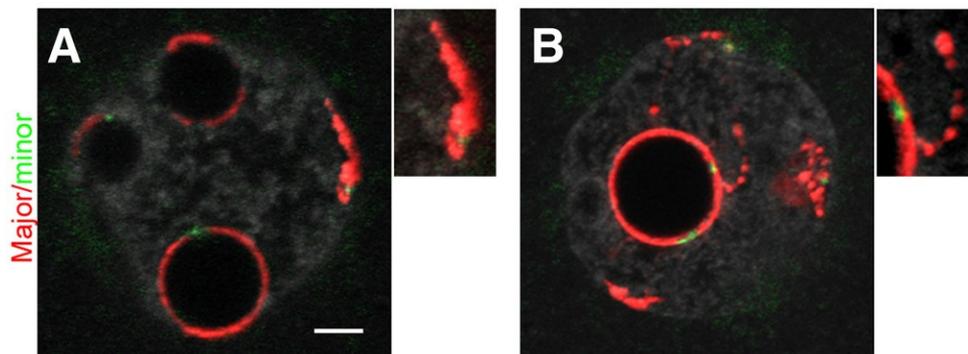


Figure III-7 : Distribution des régions centromériques (vert) et péri-centromériques (rouge) dans l'embryon de souris au stade 1-cellule tardif. Des embryons au stade PN4 du stade 1-cellule ont été traités avec des sondes péri-centromériques (rouge) et centromériques (vert). L'ADN est marqué au Yopro (gris). Dans les deux pronoyaux (A et B), les régions péri-centromériques forment des anneaux plus ou moins entiers, autour des NPB, dans lesquels les centromères sont intégrés. Les régions péri-centromériques sont également présentes à la périphérie nucléaire, associées à des signaux centromériques (voir l'agrandissement de A), et peuvent former des filaments (voir l'agrandissement de B). Barre d'échelle : 5 μ m. Modifiée à partir de Aguirre-Lavin et al. 2012.

➤ Organisation des séquences satellites à partir du stade 2-cellules

Après la mitose, au stade 2-cellules précoce, les séquences satellites mineurs/majeurs forment à nouveau des anneaux sur ~ 58% des NPB. Une faible proportion de NPB présente à la place des « paquets » de séquences satellites, proportion dont le nombre augmente au cours du stade 2-cellules suggérant qu'il y a réorganisation de ces séquences à ce stade. Cette réorganisation

est concomitante avec à la formation des chromocentres et la diminution du nombre de NPB. Deux types de chromocentres ont été décrits dans les embryons précoces, description basée sur leur forme et leur degré de compaction (Aguirre-Lavin et al. 2012): allongé ou compact (figure III-8). Alors que les séquences satellites fortement associées aux NPB au stade 2-cellules précoce forment des chromocentres de type allongé, il y aurait au cours du stade 2-cellules dissociation progressive de ces séquences des NPB et compaction. Ce deuxième type de chromocentres, compact, est caractéristique du stade 2-cellules tardif et leur proportion devient majoritaire au stade 4-cellules (Aguirre-Lavin et al. 2012). Ces chromocentres sont localisés aussi bien en périphérie des NPB que dans le nucléoplasme. Cette configuration est maintenue jusqu'au stade blastocyste et est assimilable à l'organisation des séquences satellites observée dans les cellules somatiques.

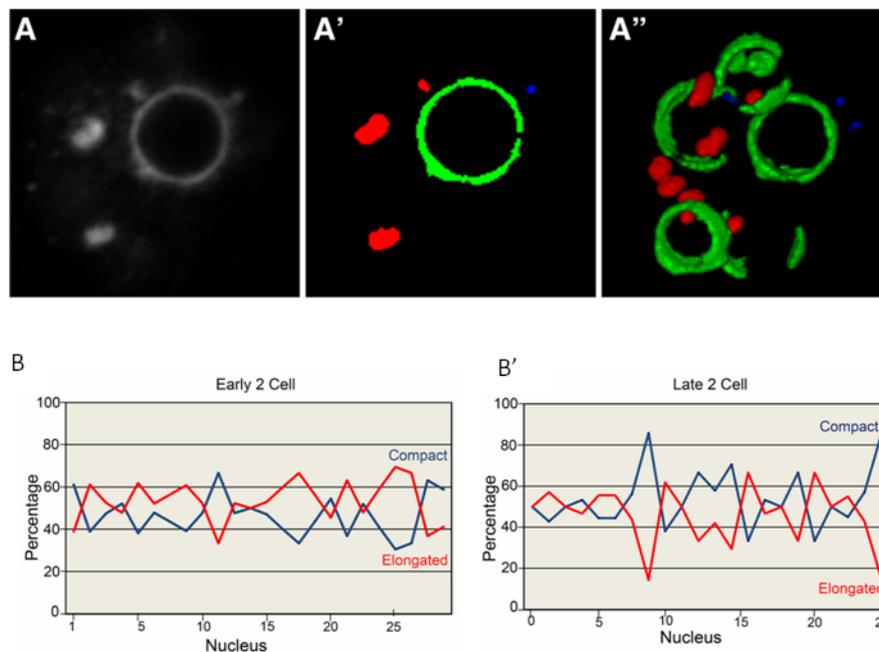


Figure III-8 : Analyse informatisée de l'organisation et de la structures des régions péri-centromériques. (A) section confocale acquise après FISH-3D avec les sondes péri-centromériques. (A') Section confocale après segmentation et classification du signal "compact" (rouge), "allongé" (vert), ou "non analysé" (bleu); (A'') Reconstruction 3D des signaux péri-centromériques après segmentation. B et B': Pourcentage de péri-centromères "compacts" (bleu) et "allongés" (rouge) dans plusieurs noyaux du stade 2-cellules précoce à tardif. Modifiée à partir d'Aguirre-Lavin et al. 2012.

Transcription des régions péri-centromériques dans l'embryon précoce de souris

Chez la souris, la transcription des régions péri-centromériques au cours du développement précoce a été précisément décrite par Probst et al. (2010). Après la fécondation, le brin anti-sens est transcrit en premier et les ARN produits sont présents majoritairement dans le pronoyau paternel à la fin du cycle 1-cellule (stades PN4-PN5). Au stade 2-cellules précoce dès la phase S (27h post-fécondation), il y a majoritairement transcription des ARN sens mais

le taux de transcription diminue considérablement au stade 2-cellules tardif (36h post-fécondation). Ces transcrits sens sont localisés aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. A la fin du stade 2-cellules, les ARN anti-sens sont abondamment produits et sont détectés uniquement dans les noyaux. Aucun transcrit n'est détecté à partir du stade 4-cellules, et ce jusqu'au stade blastocyste. La très forte transcription des séquences satellites observée au cours du stade 2-cellules est donc concomitante à la formation des chromocentres. Le rôle des ARN issus de ces régions péri-centromériques dans la formation des chromocentres a été confirmé par l'utilisation de LNA-DNA gapmers (oligonucléotide anti-sens contenant des nucléotides de type "locked nucleic acid" stabilisant l'hybridation). En effet, des LNA-DNA gapmers ciblent les ARN issus des séquences satellites majeurs et entraînent une dégradation des ARN via l'activation de la voie RNase H (Mayer et al. 2006; Rapozzi et al. 2006). Leur injection dans des embryons précoces de souris empêche la formation des chromocentres et bloque le développement embryonnaire au stade 2-cellules (Probst et al. 2010).

Il est important de noter que les ARN anti-sens issus des régions péri-centromériques présents dans l'embryon au stade 1-cellule sont d'abord d'origine paternelle (figure III-9).

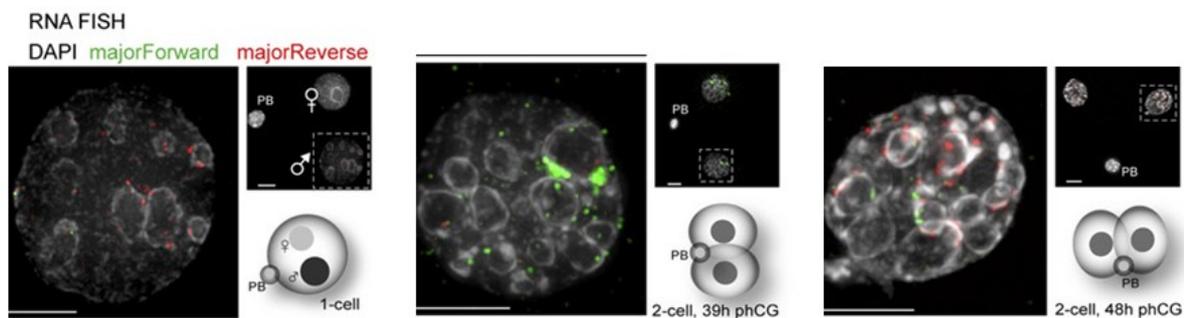


Figure III-9 : Expression brin-spécifique des séquences satellites majeurs dans l'embryon de souris aux stades 1-cellule et 2-cellules (39 hphCG et 48 hphCG). Les transcrits des séquences satellites majeurs sont détectés avec des sondes LNA brin-spécifique : Sens (vert) et anti-sens (rouge). Les agrandissements montrent le pronoyau paternel du zygote et représentent le noyau d'une cellule pour les autres stades de développement. L'ADN est marqué au DAPI (gris). L'injection d'hCG est utilisée comme temps de référence, l'ovulation et la fécondation ayant lieu ~12h après. Barre d'échelle: 10 μ m. PB, globule polaire. Modifiée à partir de Probst et al. 2010.

Puis, au stade 2-cellules, les ARN issus du brin anti-sens sont produits par les deux génomes parentaux. Par contre, seuls les ARN sens sont d'origine paternelle (figure III-10). La fonction précise de chaque transcrit (sens ou anti-sens) a été testée récemment par Casanova et al. (2013). Ces auteurs ont confirmé que l'inhibition de la transcription des

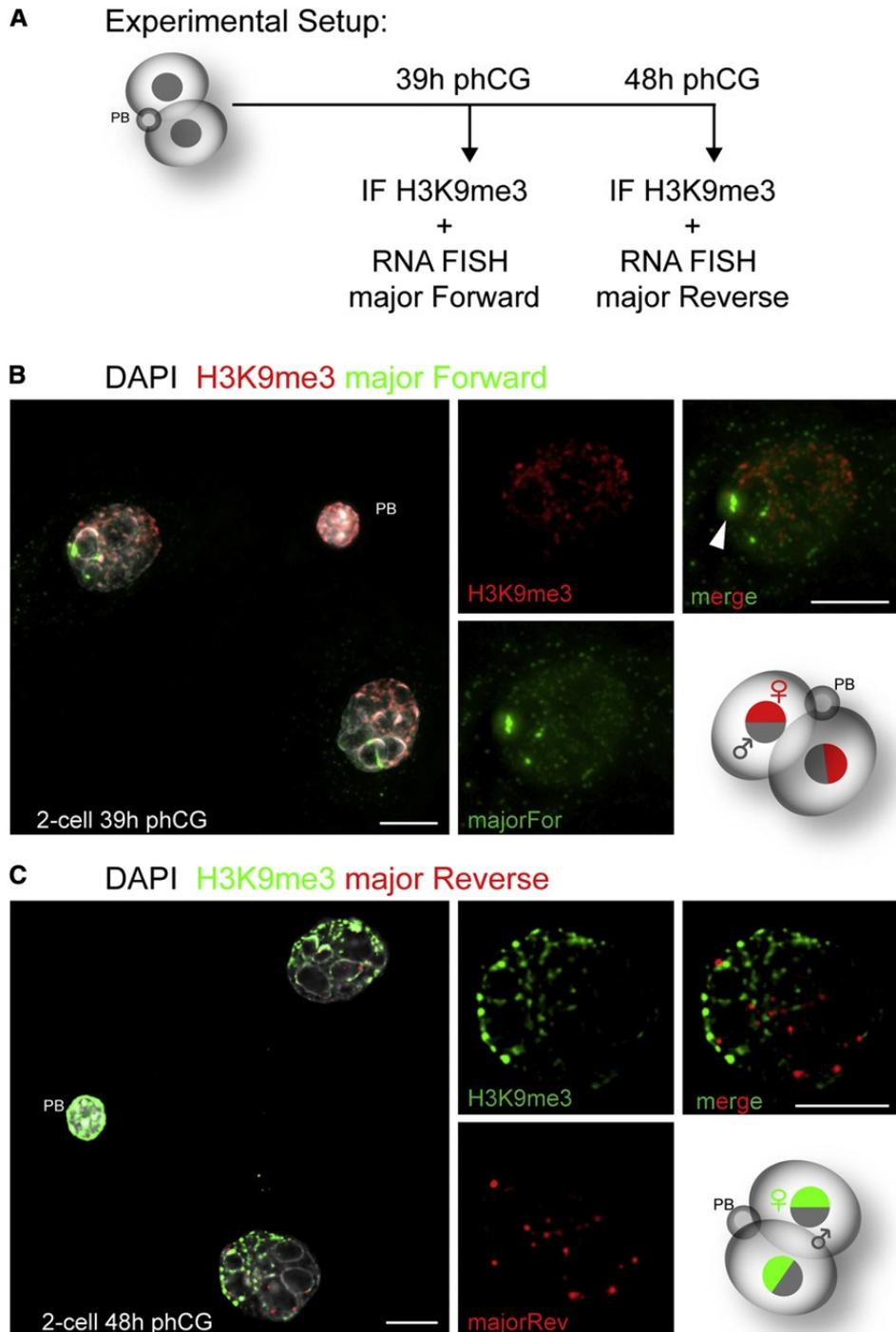


Figure III-10: Asymétrie parentale dans la transcription des séquences satellites majeurs. (A) Des embryons au stade deux cellules ont été fixés à 39 hphCG(B) et 48 hphCG (C) et traités par immunofluorescence puis par ARN FISH. (B et C) Immunofluorescence d'embryons 2-cellules présentant du marquage H3K9me3 (rouge dans B et vert dans C), suivie par l'ARN FISH pour les ARNs sens (vert, B) ou anti-sens (rouge, C). L'ADN est marqué au DAPI (gris). Barre d'échelle:10 μ m. PB, globule polaire. Source: Probst et al. 2010.

régions péricentromériques compromet la formation des chromocentres. Cependant, seule l'inhibition des transcrits issus du brin anti-sens empêche la formation des chromocentres et entraîne un arrêt du développement au stade 2-cellules.

Les mécanismes spatio-temporels régulant cette activité transcriptionnelle restent pour l'instant inconnus. La synthèse des ARN issus des régions péricentromériques semble cependant dépendre de la présence du variant d'histone H3.3 incorporé en premier lieu dans la chromatine du pronoyau paternel lors de sa formation (Santenard et al. 2010). Il a en effet été mis en évidence que la mutation de H3.3 sur la lysine en position 27 (H3.3K27) entraîne une transcription aberrante de ces ARN, la délocalisation de la protéine HP1 β et perturbe la formation des chromocentres (Santenard et al. 2010). Ces données suggèrent un lien entre la transcription des régions péricentromériques et l'organisation de l'hétérochromatine péricentromérique via HP1 β dans les embryons précoces de souris. Par ailleurs, il semblerait que la contribution du "nucléole" maternel soit aussi très importante (Fulka et Langerova, 2014). En effet, l'énucléolation du NLB de l'ovocyte entraîne : i) une baisse considérable de la transcription des régions péricentromériques, notamment d'origine paternelle, au stade 2-cellules, et ii) un arrêt de développement. Il y aurait donc potentiellement des facteurs provenant du NLB maternel nécessaires à la transcription des régions péricentromériques.

L'ensemble de ces données montre l'importance de la transcription des régions péricentromériques dans l'organisation et la formation des chromocentres au début du développement et souligne le rôle majeur des transcrits issus des brins sens et anti-sens avec une contribution parentale inégale. La transcription des régions péricentromériques n'a lieu que dans une fenêtre de temps spécifique, entre la fécondation et la mise en route du génome embryonnaire, période critique pour le développement de l'embryon.

III-2) Les gènes ribosomiques

La biogénèse des ribosomes permet la constitution de la machinerie traductionnelle cellulaire. C'est un processus séquentiel initié par la transcription des gènes ribosomiques ou « ADN_r ». Ces gènes sont présents dans le nucléole sous forme de séquences répétées en tandem, en plusieurs copies (Hadjiolov 1985). La multitude de copies et la répétition en tandem des séquences ribosomiques a été observée pour la première fois chez le *Xénope* (Wallace and Birnstiel 1966; Brown et al. 1972). Ces séquences forment des boucles de chromatine à priori fixées à la matrice nucléaire (Marilley and Gassend-Bonnet 1989; Marilley et al. 1992; Razin et al. 1993). Le nombre de répétitions de séquence varie entre espèces, allant de 100 à 1000 copies. Chez la souris, les gènes ribosomiques sont au nombre de 200 copies et leur dispersion dans le génome - entre chromosomes - dépend de la souche (Kurihara et al. 1994). Ainsi, chez *Mus musculus domesticus* les gènes ribosomiques sont présents sur 3 à 7 paires de chromosomes (Cazaux et al. 2011). Par contre, l'homme présente 400 copies réparties sur 5 paires de chromosomes acrocentriques. Dans cette partie de chapitre, je détaillerai un peu plus les données existantes concernant les gènes ribosomiques et j'aborderai le cas particulier de l'embryon préimplantatoire de souris.

III-2-1) Structure et localisation des gènes ribosomiques

Structure d'un gène ribosomique

Chez la souris, chaque unité de répétition d'ADN ribosomique mesure environ 45kb et est composée de différentes régions organisées de la manière suivante (figure III-11):

- l'espaceur intergénique (intergenic spacer en anglais, ou IGS) est une séquence nucléotidique non transcrite d'environ 30 kb qui sépare deux gènes ribosomiques. Au niveau de l'IGS, on retrouve le promoteur proximal constitué du domaine CPE (core promoter element) et du domaine UCE (upstream control element), impliqué dans la stimulation de la transcription *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Henderson and Sollner-Webb 1990). Un deuxième promoteur, appelé promoteur distal est situé en amont du promoteur proximal. L'activité de ce promoteur distal serait réduite par rapport à celle du promoteur proximal (Kuehn and Arnheim 1983; Kuhn and Grummt 1987). Le site de terminaison de la transcription (T₀) est aussi situé dans cette région, en amont de l'UCE. Enfin, des séquences activatrices de la transcription (ou « enhancers »), situées entre le promoteur distal et le T₀, agissent sur le promoteur proximal (Pikaard et al. 1990; Kuhn et al. 1990).

- la région codante pour l'ARN pré-ribosomique 47S est d'environ 13 kb. Cette région contient les séquences codant pour les ARN 18S, 5.8S et 28S, séparées par des espaces intragéniques. Ces espaces correspondent à des séquences qui sont aussi transcrites et qui sont de deux types: i) les espaceurs transcrits internes (internal transcribed spacer en anglais, ou ITS), et ii) les espaceurs transcrits externes (external transcribed spacer ou ETS). On retrouve deux ITS: ITS1 séparant les séquences codant pour les ARN 18S et 5.8S tandis que ITS2 s'intercale entre les séquences codant pour les ARN 5.8S et 28S. Il y a aussi deux ETS localisés aux extrémités 5' et 3' de la région codante. Dix sites de terminaison, de T1 à T10, sont présents en aval de cette région codante, à proximité de la séquence du 28S.

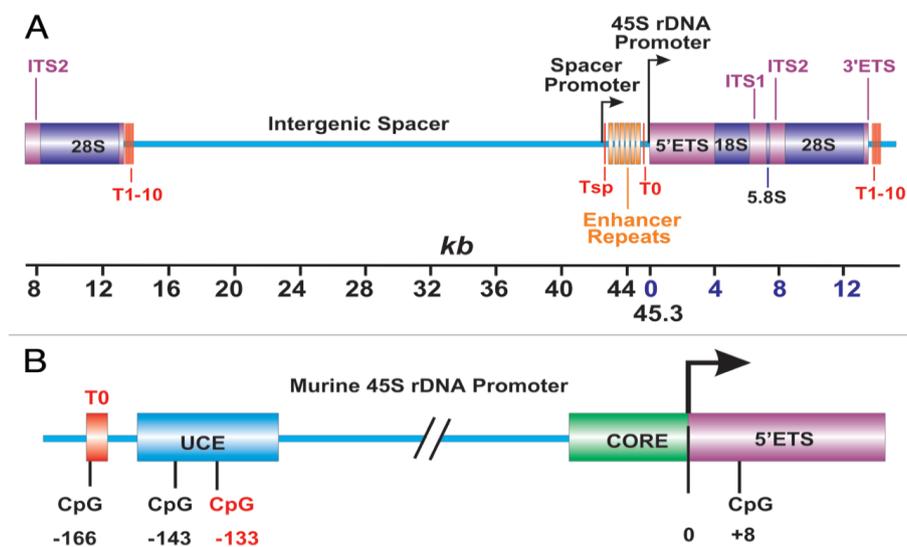


Figure III-11: (A) Schéma d'une répétition unique d'ADNr de souris. Le gène 45S se compose de séquences (13-14 kb) codant pour la région transcrite suivie par un espace intergénique (IGS) de ~ 30 kb de longueur. Les barres d'échelle en kb sont présentées dessous; le site d'initiation de transcription du 45S est indiqué à 0 kb. L'IGS héberge les éléments régulateurs de l'ADNr comprenant l'espaceur (spacer promotor) et le promoteur du gène 45S (marqués par des flèches) et des éléments amplificateurs en 5' du site d'initiation de la transcription. Les éléments "terminateurs" situés en aval de la région codante (T1-T10), en aval du promoteur espaceur (Tsp) et en amont du promoteur 45S (T0) sont indiqués par les barres rouges. ETS, espaceur externe transcrit; ITS, espaceur transcrit interne. (B) Schéma du promoteur de l'ADNr 45S de souris. Le promoteur de l'ADNr se compose de deux éléments, un élément de contrôle (UCE) de 100 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription et le promoteur de base immédiatement adjacent au site d'initiation. Les éléments de terminaison de transcription T0 sont situés immédiatement avant l'UCE. La position de résidus CpG au niveau des nucléotides -166, -143, -133 et +8 est indiquée. Le dinucléotide CpG à -133 de couleur rouge est la cible de facteurs de remodelage de la chromatine. Source : Sanij and Hannan. 2009.

Localisation des gènes ribosomiques

Les approches cytochimiques, immunocytochimiques et d'hybridation in situ ont permis d'étudier la localisation et l'organisation des gènes ribosomiques (Robert-Fortel et al. 1993; Derenzini et al. 2006). L'utilisation de la technique de coloration à l'argent (Goodpasture and Bloom 1975) permet aussi de visualiser les NOR (nucleolar organizer regions) grâce à la

présence de certaines protéines argyrophiles - les AgNOR comme l'ARN Pol I, UBF ou la nucléoline - qui sont sensibles à la coloration à l'argent et rendent possible leur observation en interphase et en mitose (Trerè et al. 1989; Derenzini et al. 1990).

➤ En interphase

En interphase, les gènes ribosomiques se présentent, en FISH, sous forme de foci et de fibres étendues interconnectées (figure III-12). Cette organisation est par ailleurs influencée par le cycle cellulaire avec notamment une distribution différente au cours des phases G1, S et G2 (Junéra et al. 1995). La présence des gènes ribosomiques dans les compartiments FC et DFC a été démontrée en microscopie de fluorescence et microscopie électronique (Schwarzacher and Wachtler 1991; Thiry 1991; Puvion-Dutilleul et al. 1991; Motte et al. 1991; Hozák et al. 1993; Jiménez-García et al. 1993).

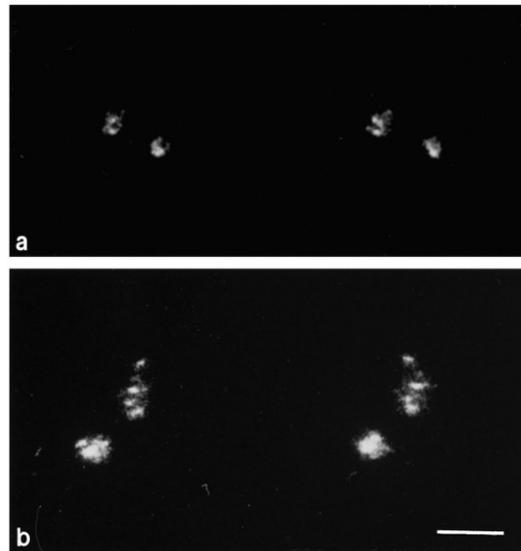


Figure III-12: Reconstruction 3D du marquage d'ADNr dans les nucléoles en phase G1 (a) et S tardive (b) dans une cellule PtK1. Projection stéréoscopique de 13 à 15 sections optiques consécutives (0,4 μm) après marquage des ADNr par FISH. En phase G1, l'organisation 3D des ADNr est sous forme de points agrégés avec, en plus, quelques signaux ponctués de plus faible intensité. À la fin de la phase S, les signaux d'ADNr forment des amas fluorescents intenses et adoptent une organisation plus étendue dans laquelle les signaux ponctués connectant les amas sont plus dispersés. Ces projections peuvent être observées avec une visionneuse stéréoscopique. Barre d'échelle: 5 μm . Source: Junera et al. 1995.

Le site de transcription des gènes ribosomiques en interphase a cependant longtemps été sujet à débat. Trois localisations possibles ont été suggérées, à savoir au sein du FC, à la jonction entre le FC et le DFC, ou au sein du DFC. Ces observations contradictoires sont probablement dues aux différentes approches utilisées mais aussi aux types cellulaires étudiés. Plusieurs travaux ont mis en évidence la localisation des transcrits naissants au niveau de la jonction

entre le FC et le DFC, avant qu'ils ne s'accumulent dans le DFC (Hozák et al. 1994; Shaw et al. 1995; Puvion-Dutilleul et al. 1997; Cmarko et al. 2000; Cheutin et al. 2002; Guillot et al. 2005). De plus, le facteur de transcription UBF et l'ARN polymérase I sont localisés à la périphérie des FC et dans le DFC suggérant également que la région corticale du FC (jonction FC/DFC) constitue le site de transcription des gènes ribosomiques (Cheutin et al. 2002).

➤ En mitose

Au cours de la mitose, les gènes ribosomiques ne sont plus détectables au niveau du nucléole en raison de son désassemblage (Hernandez-Verdun 2011). Les gènes ribosomiques apparaissent alors regroupés sur les chromosomes métaphasiques, au niveau des NOR. L'identification des chromosomes porteurs de ces gènes peut être réalisée par FISH sur étalements chromosomiques. Dans notre laboratoire, nous avons détecté 8 chromosomes porteurs de gènes ribosomiques pour les souris de souche C57BL6/CBA (Bonnet- Garnier A., données non publiées). Il s'agit à priori des chromosomes 12, 15, 18 (la paire), 19, 22, 25 et 16 (Dev et al. 1977). Chez la souris, les NOR sont détectés à proximité de l'hétérochromatine péricentromérique (McStay and Grummt 2008). Il a été suggéré que les NOR seraient les équivalents mitotiques des FCs (Goessens 1984). La présence de facteurs tels que l'ARN polymérase I et UBF aussi bien au niveau des FCs que des NOR et la détection d'ADNr dans les FCs en interphase sont en accord avec cette hypothèse (Gebrane-Younes et al., 1997; Roussel et al., 1996). Ceci expliquerait également la structure décondensée des certains NOR dits "actifs" durant la mitose. De plus, l'étude du recrutement d'UBF sur des séquences ectopiques de NOR (ou pseudo-NOR) de *Xenope* dans des chromosomes de cellules humaines montre que la fixation d'UBF sur ces pseudo-NOR permet la formation de pseudo-nucléoles fonctionnels (Grob et al. 2016).

III-2-2) Transcription des gènes ribosomiques

Comme mentionné plus haut, la transcription des gènes ribosomiques est l'étape initiale de la biogenèse des ribosomes. Cette transcription est modulée en fonction du cycle cellulaire, ainsi les gènes ribosomiques s'expriment au cours de l'interphase, avec une modulation du niveau de transcription entre la phase G1 / G2, et un arrêt de la transcription au cours de la mitose (Hadjiolov 1985; Hernandez-verdun 2006a; Hernandez-verdun 2006b; Hernandez-Verdun 2011). Au niveau moléculaire, les séquences ribosomiques transcriptionnellement actives se présentent sous forme d'un « arbre de Noël » (figure III-13), initialement décrit dans les ovocytes d'amphibiens puis dans les autres espèces (Raška et al. 2004).

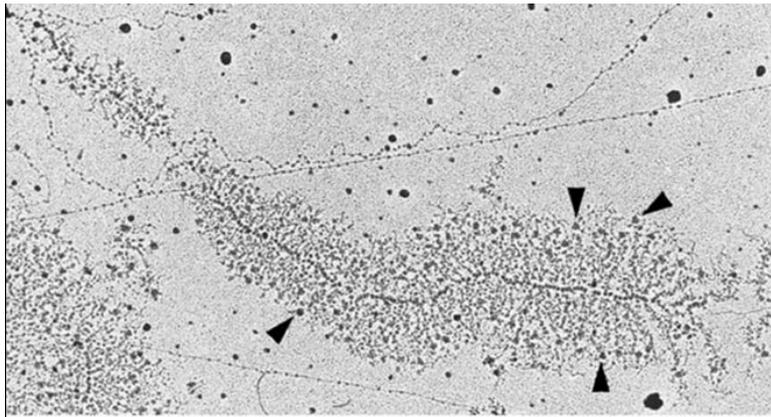


Figure III-13: Chromatine nucléolaire fixée in situ et observée en microscopie électronique. Etalement de Miller montrant une structure en "arbre de Noël" d'une cellule de souris. Les flèches désignent les boutons terminaux aux extrémités 5' des transcrits naissants. Modifiée à partir de Raška et al. 2004.

Dans cette structure en arbre de Noël, le "tronc" correspond à une séquence ribosomique et les "branches" correspondent aux pré-ARN ribosomiques naissants de tailles différentes. Ce gradient de taille résulte de la progression de l'élongation de la transcription générant des transcrits de longueurs variables. A l'extrémité de ces branches (extrémités 5' des transcrits naissants) s'observent des RNP aussi appelées « boutons terminaux » impliqués dans la maturation des transcrits.

La transcription des gènes ribosomiques implique l'ARN polymérase I qui agit de manière coordonnée avec plusieurs cofacteurs transcriptionnels. La transcription de ces gènes peut se résumer en trois étapes: l'initiation, l'élongation et la terminaison.

Initiation de la transcription

L'initiation de la transcription nécessite le recrutement de trois facteurs principaux de la machinerie transcriptionnelle dans la région promotrice des loci d'ADNr. Il s'agit de l'ARN polymérase I, le facteur SL1/TIF-IB ("selectivity factor 1" chez l'homme; ou "transcription initiation factor IB" chez la souris) et le facteur de transcription UBF qui forment ainsi le complexe de pré-initiation de la transcription (pre-initiation complex en anglais, ou PIC) (Hannan et al. 1998; Reeder 1999; Moss and Stefanovsky 2002; Grummt 2003; Comai 2004; Russell and Zomerdijk 2005; Russell and Zomerdijk 2006; Grummt 2010).

L'assemblage de ce complexe s'effectue de manière stochastique à partir de facteurs libres et diffusibles (Dundr et al. 2002). C'est la fixation d'UBF et du complexe SL1/TIF-IB sur le domaine UCE du promoteur des gènes ribosomiques qui permet le recrutement de l'ARN polymérase I et de cofacteurs transcriptionnels (figure III-14) (Learned et al. 1986; Clos et al. 1986). En effet, SL1/TIF-IB présente dans sa composition une protéine TBP (TATA-binding protein) et trois TAFs (TBP-associated factors) qui vont favoriser les interactions entre l'ARN polymérase I et la région promotrice des gènes ribosomiques (Zomerdijk et al. 1994; Heix et al. 1997). Ces TAFs sont à l'origine de la sélectivité de la polymérase I pour le promoteur des

gènes ribosomiques. En parallèle, UBF entraîne une courbure de l'ADN par le biais de ses domaines HMG (Bazett-Jones et al. 1994; Copenhaver et al. 1994). Cette courbure favoriserait le recrutement de SL1/TIF-IB au niveau du promoteur (Stefanovski et al. 2001). UBF interagit aussi avec SL1/TIF-IB via son domaine C-terminal (Tuan et al. 1999) ce qui assurerait non seulement la stabilité d'UBF (Friedrich et al. 2005) mais favoriserait aussi sa dimérisation. Les domaines HMG d'UBF seraient eux à l'origine de son interaction avec l'ARN polymérase I (Russell and Zomerdijk 2005; Russell and Zomerdijk 2006). L'ARN polymérase I s'associe par ailleurs à d'autres co-facteurs transcriptionnels, notamment des enzymes responsables de modifications épigénétiques (notamment G9a), entraînant une modification de la chromatine au niveau des gènes ribosomiques actifs (Russell et Zomerdijk, 2005 ; Grummt, 2010). Lors du recrutement de la polymérase I, UBF interagit également avec certains de ces co-facteurs, notamment PAF53 et PAF49 (Pol-I associated factors) ce qui participe à la stabilisation de ce complexe PIC (Hanada et al. 1996; Panov et al. 2006).

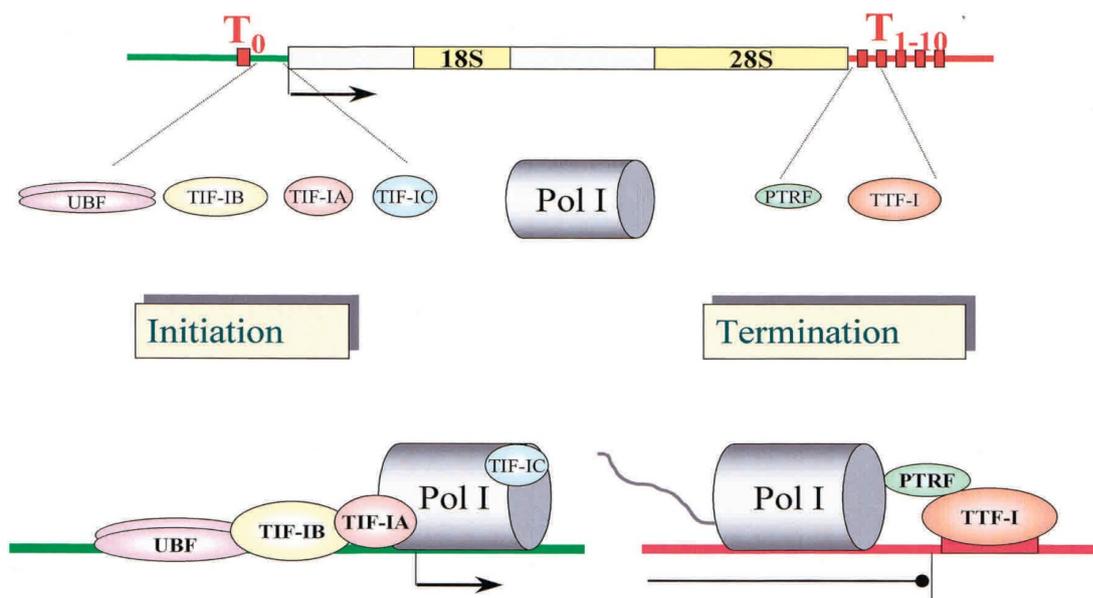


Figure III-14: Schéma montrant l'organisation structurale d'un gène ribosomique chez la souris et résumant les facteurs de base nécessaires à l'initiation et la terminaison de la transcription. La ligne verte correspond aux séquences en amont du site d'initiation de la transcription, incluant le promoteur de la séquence d'ADNr, et le terminateur T0 en amont. La ligne rouge correspond aux séquences en aval de la région codante contenant les éléments terminateurs T1-10. L'image suivante montre les facteurs de transcription de base, un schéma du complexe d'initiation de la transcription (UBF, TIF-IB et l'ARN polymérase I), et 2 protéines, TTF-1 (transcription termination factor) and PTRF (polymerase and transcript release factor) qui sont requises pour l'arrêt de la transcription. Source: Grummt 2003.

L'initiation de la transcription des gènes ribosomiques impliquerait également le site T0 situé en amont du promoteur proximal qui recruterait le facteur de transcription TTF-1 (transcription termination factor 1) interagissant avec l'histone acétyltransférase PCAF

(p300/CBP associated factor) afin d'acétyler SL1. Ceci aurait pour conséquence de fortifier la liaison de SL1 avec la région promotrice au niveau du CPE (Muth et al. 2001). Denissov et al. (2011) ont d'ailleurs proposé un modèle de transcription des gènes ribosomiques selon lequel SL1 aurait le rôle de liaison entre le promoteur, la région en amont du promoteur et le terminateur, et serait entouré par une forme cylindrique rotative d'ADNr transcrit. L'inhibition de la fixation de SL1 par l'addition d'une molécule, CX-5461, diminue d'ailleurs fortement la transcription des ADNr dans les lignées de cellules cancéreuses humaines (Drygin et al. 2011).

Terminaison de la transcription

La production des pré-ARNr se termine au niveau des sites de terminaison situés en aval de la région codante. Le mécanisme de terminaison de la transcription se déroule en deux étapes et implique principalement deux facteurs : TTF-1 et PTRF (pol I and transcript release factor) (figure III-14). Il y a d'abord arrêt de l'élongation de transcription via la fixation de TTF-1 (Evers et al. 1995; Evers and Grummt 1995); ensuite le facteur PTRF entraîne la terminaison de la transcription par dissociation de l'ARN Polymérase I et du transcrit de la matrice (Mason et al. 1997; Jansa et al. 1998; Jansa and Grummt 1999).

Une fois transcrit, les pré-ARN néosynthétisés (ARN ribosomiques 47S) vont progresser du centre du nucléole vers le cytoplasme. Des études combinant l'incorporation de BrUTP dans ces ARN et la microscopie électronique ont montré que l'accumulation de ces transcrits dans le GC mais aussi dans le DFC après 15 à 30 minutes d'incorporation (Cheutin et al. 2004; Thiry et al. 2009). Après 30 et 45 minutes d'incorporation, ils sont uniquement détectables dans le GC. La localisation des transcrits devient cytoplasmique au bout d'une heure; les transcrits sont alors intégrés dans des structures correspondant aux particules pré-ribosomiques; ce ne sont cependant pas les ARN ribosomiques 47S nouvellement transcrits qui entrent dans la composition des ribosomes. Ils vont d'abord subir une maturation. Cette maturation débute dans le DFC et s'achève dans le GC, accompagnant la migration des transcrits.

III-2-3) Maturation de l'ARN pré-ribosomique et assemblage des ribosomes

La maturation des ARNr néo-synthétisé repose sur leur modification chimique, leur clivage et leur assemblage pour former, après association avec l'ARNr 5S, les sous-unités ribosomiques 40S et 60S (Mullineux and Lafontaine 2012).

La modification et le clivage de ces pré-ARN impliquent l'intervention de complexes snoRNP issus de l'association entre un snoRNA (U3, U8, U17, U22) et des protéines nucléolaires

(NOPP40, fibrillarine, dyskérine) (Fromont-Racine et al. 2003; Cisterna and Biggiogera 2010). Les snoRNA - de 60 à 300 nucléotides - forment deux grandes familles (Watkins and Bohnsack 2012) : la famille à boîtes C/D et à boîtes H/ACA. Ces snoRNA servent de guides pour des modifications post-transcriptionnelles des ARN ribosomiques (ARNr), c'est-à-dire la méthylation en 2'-OH de riboses (C/D) et la pseudouridylation (H/ACA). Le snoRNA va d'abord s'apparier à l'ARNr et les protéines associées au snoRNA vont effectuer les modifications. Ces modifications apparaissent avant le clivage du pré-ARNr en ARNr 18S, 5.8S, 28S et sont importantes dans la fonctionnalité des ribosomes (Maden 1990; Belin et al. 2009; Basu et al. 2011; Jack et al. 2011; Mullineux and Lafontaine 2012). A titre d'exemple, le snoRNA U3 est impliqué dans la formation de l'ARN 18S par excision des ETS et ITS périphériques. Le snoRNA U8 est lui impliqué dans les clivages générant les ARNr 5.8S et 28S (Peculis and Steitz 1993).

Les sous-unités ribosomiques 40S et 60S se forment dans le nucléole puis sont exportées dans le cytoplasme où elles seront assemblées en ribosomes. La formation de ces sous-unités ribosomiques nécessite - en plus des ARNr 18S, 5.8S et 28S - des protéines ribosomiques synthétisées à partir de gènes ARN pol II-dépendants et l'ARNr 5S transcrit par l'ARN polymérase III (Kim et al. 2014; Pelava et al. 2016). La petite sous-unité ribosomique 40S est ainsi formée par l'association entre l'ARN 18S et 33 protéines ribosomiques tandis que 49 protéines ribosomiques vont s'associer aux ARNr 5.8S, 28S et 5S pour former la grande sous-unité 60S. De très nombreux facteurs, protéines ribosomiques mais aussi ARN non codants, s'associeraient ainsi avec les ARNr à différentes étapes de leur maturation (Henras et al. 2014; Lafontaine 2015).

III-2-4) Etat transcriptionnel et régulation

Les ARNr représentent environ 80% de la quantité totale d'ARN dans une cellule mais les besoins cellulaires diffèrent en fonction de l'état et du type cellulaire (cellule indifférenciée / différenciée). Ceci implique une régulation importante de la synthèse des ARN ribosomiques. Deux niveaux de régulation ont été décrits (Grummt 2003; Grummt 2007; Grummt 2010). A court terme, il y a modulation du taux transcriptionnel de chaque locus d'ADNr impliquant des modifications réversibles des facteurs de la machinerie transcriptionnelle. Le deuxième niveau correspond à la régulation à plus long terme et passe par la modulation du nombre de séquences ribosomiques actives (Lawrence et al. 2004; Grummt 2007; McStay and Grummt 2008; McKeown and Shaw 2009; Bártoová et al. 2010; Grummt and Längst 2013). Il a en effet été démontré par la technique de photo-pontage au psoralen que les séquences actives présentent une structure de type euchromatique et qu'à l'inverse, les séquences inactives sont plutôt de type hétérochromatique. Il a été suggéré que la moitié des séquences ribosomiques seraient ainsi constitutivement inactives alors que l'activité transcriptionnelle de l'autre moitié serait régulée par des facteurs externes et pourrait passer par 3 états transcriptionnels différents: l'état inactif, actif ou en pause (Conconi et al. 1989; Toussaint et al. 2005; Sanij et al. 2008; Sanij and Hannan 2009b). Il a aussi été suggéré que certaines séquences ribosomiques pourraient être transcriptionnellement "compétentes" en raison de la persistance de la structure euchromatique des gènes ribosomiques au cours de la mitose et ce malgré l'arrêt de la transcription. Je détaillerai ci-dessous uniquement les 3 états: inactif, actif ou en pause.

ADNr inactif

Les séquences ribosomiques inactives présentent une structure chromatinienne condensée caractérisée par la présence de marques épigénétiques répressives (hypoacétylation de H4, méthylation de H3K9 et H4K20 ou encore méthylation des îlots CpG notamment celui en position -133 par rapport au site d'initiation de la transcription) (Zhou et al. 2002; Santoro and Grummt 2005). La répression épigénétique des ADNr est mise en place par le complexe NoRC (nucleolar remodeling complex) (Strohner et al. 2001; Santoro et al. 2002; Strohner et al. 2004; Zhou and Grummt 2005; Anosova et al. 2015). Ce complexe appartient à la famille des complexes de remodelage ATP-dépendant. Il est composé d'une sous-unité ATPase (SNF2H, sucrose non fermenting 2 homolog) et d'une large sous-unité TIP5 (TTF-I interacting protein 5). Ces sous-unités sont impliquées dans différents mécanismes épigénétiques (figure III-15) (Schultz et al. 2001; McStay and Grummt 2008).

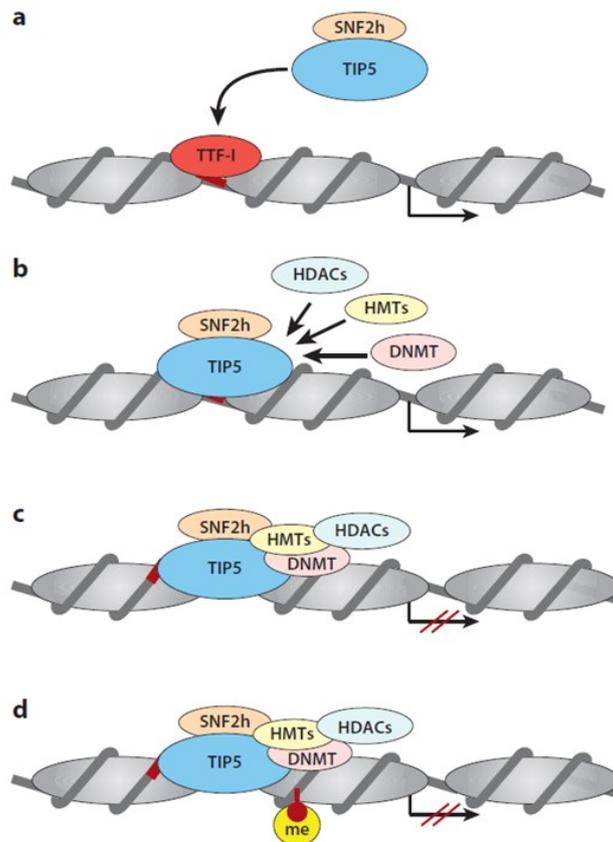


Figure III-15: Modèle du mécanisme d'inhibition des gènes ribosomiques. (a) NoRC est recruté sur le promoteur des ADNr par TTF-I, fixé au promoteur proximal T0. (b) Ensuite NoRC interagit avec le complexe de corépression Sin 3 (entraînant la désacétylation des histones H3 et H4) et avec les histones méthyltransférases (HMTs) qui méthylent H3K9, H3K20, et H3K27. (c) Ces modifications d'histones caractéristiques de l'hétérochromatine seraient reconnues comme signal pour l'ATPase SNF2H qui décale le nucléosome associé au promoteur de 25 nucléotides (nt) plus en aval. Cette position est défavorable à la formation du complexe de préinitiation de la transcription. (d) Sous l'action de SNF2H, le dinucléotide CpG en position -133 se retrouve accessible à la méthylation par les ADN méthyltransférases (DNMTs). La méthylation du CpG en position -133 empêche la fixation d'UBF et l'assemblage du complexe de préinitiation de la transcription. Source: McStay and Grummt 2008.

NoRC est recruté par TTF-I dans la région promotrice des ADNr au niveau du site de terminaison T0, avec le complexe corépresseur SIN3 (contenant des enzymes histones désacétylases) ainsi que des DNMTs (Zhou et al. 2002; Santoro et al. 2002). D'autres protéines sont également impliquées dans la régulation épigénétique des gènes ribosomiques. C'est le cas du variant d'histone macroH2A (Cong et al. 2014) dont la présence au niveau du promoteur des gènes ribosomiques empêche le recrutement de l'ARN pol I et du facteur de transcription UBF. En résumé, le remodelage de la chromatine et la répression épigénétique mise en place bloque la fixation d'UBF et l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription (Santoro and Grummt 2001; Santoro et al. 2002; Santoro and Grummt 2005; Li et al. 2006).

ADNr actif

Contrairement aux séquences inactives, les séquences ribosomiques actives présentent une chromatine décondensée, « ouverte », facilitant ainsi l'accès à la machinerie transcriptionnelle. Le promoteur de ces séquences est caractérisé par la présence d'acétylation sur les histones H3 et H4, de la présence d'H3K4me3 et de l'absence de méthylation au niveau des îlots CpG (Santoro et al. 2002; Zhou et al. 2002; Lawrence et al. 2004; Santoro and Grummt 2005; Earley et al. 2006).

Le complexe CSB (Cockayne syndrome protein B) est impliqué dans la formation de cette structure décondensée de la chromatine. CSB est membre de la famille des complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants « SWI/SNF2 » qui altèrent les interactions entre l'ADN et les histones modifiant ainsi l'organisation de la chromatine (Lake and Fan 2013). CSB serait recruté au niveau du promoteur des ADNr actifs par TTF-I. CSB, en tant que complexe de remodelage associé à la machinerie transcriptionnelle ARN pol I, favoriserait l'établissement de la structure euchromatique au niveau des promoteurs des gènes ribosomiques actifs (Bradsher et al. 2002; Yuan et al. 2007; Xie et al. 2012) (Figure III-16).

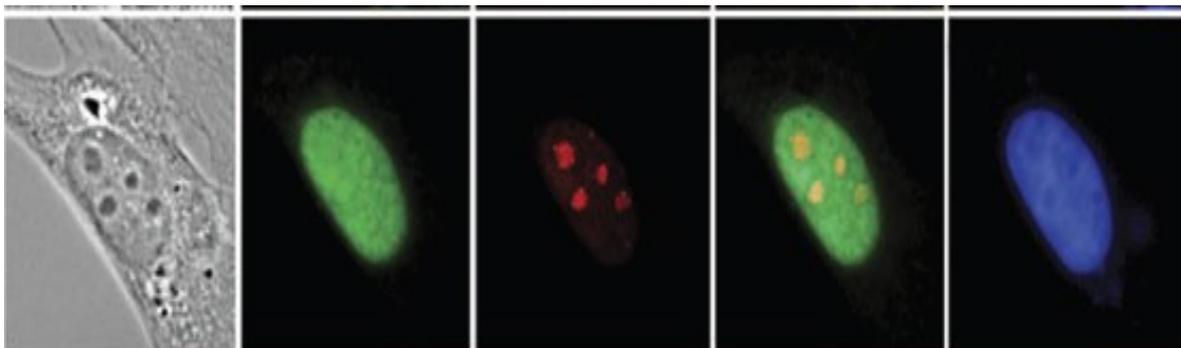


Figure III-16: Colocalisation de CSB et de l'ARN pol I dans le nucléole. Images d'immunofluorescence montrant la co-localisation de l'ARN pol I avec CSB dans les nucléoles des cellules NIH 3T3. Image en contraste de phase à gauche. Modifiée à partir de Yuan et al. 2007.

Un autre mécanisme impliquant une histone déméthylase PHF8 (PHD finger protein 8) a aussi été décrit (Zhu et al. 2010; Feng et al. 2010). PHF8, appartenant à la famille de déméthylases JmjC, pourrait favoriser la déméthylation de H3K9me1 et H3K9me2 ce qui favoriserait "l'ouverture" de la chromatine et l'activation de la transcription.

Enfin, la présence du facteur de transcription UBF et de la nucléoline sur les séquences ribosomiques actives contribuerait aussi au maintien d'une structure euchromatique permissive à la transcription (figure III-17) (Sanij and Hannan 2009a; Cong et al. 2012). Des

données récentes ont notamment montré que la nucléoline associée aux séquences actives empêche le recrutement de TIP5 par TTF-1 bloquant ainsi l'action répressive de TIP5 (Cong et al. 2012).

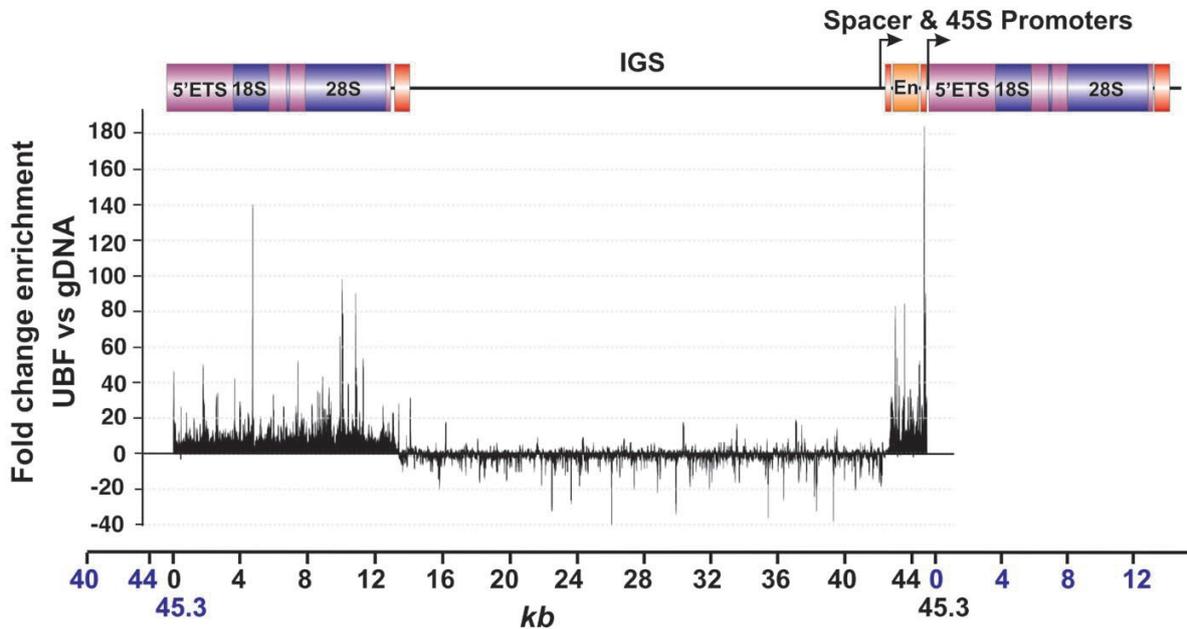


Figure III-17: Analyse de la distribution d'UBF sur une unité d'ADNr chez la souris par "ChIP-seq". Les fragments d'ADN liés à UBF puis isolés par immunoprécipitation (ChIP), ainsi que le fragment total d'ADNr génomique, sont séquencés (système d'analyse du génome GeneWorks, Australia). Toutes les séquences sont comparés à la séquence d'ADNr de souris complète, publiée (N° Gene bank: BK000964). Le graphe représente la fréquence de séquences ribosomiques enrichies en UBF et immunoprécipitées par rapport à la l'ADN génomique initialement utilisé. Barre d'échelle en kb ; le site d'initiation de la transcription est indiqué à 0 kb. En, éléments amplificateur; ETS, espaceur transcrit externe ; IGS,espaceur intergénique. Source : Sanij and Hannan 2008).

ADNr en « pause »

L'état « en pause » des ADNr (poised rDNA en anglais) correspond à un arrêt de la transcription malgré une configuration chromatinienne décondensée. Cette configuration est essentiellement observée dans le cas de cellules en différenciation. Il a été montré que le complexe NuRD (nucleosome remodeling and deacetylation complex) est impliqué dans ce mécanisme de mise en pause (Xie et al. 2012; Ling et al. 2013). La composition du complexe NuRD lui confère des activités de remodelage de la chromatine et de modification d'histones, notamment par le biais d'histones désacétylases (Zhang et al. 1999; Hirose et al. 2002; Le Guezennec et al. 2006). Selon Xie et al. (2012), NuRD serait notamment impliqué dans la mise en place de marques épigénétiques distinctes de celles présentes au niveau des ADNr actifs et inactifs. Le promoteur des ADNr en « pause » est caractérisé par l'absence de la méthylation de l'ADN au niveau des CpG du promoteur et l'hypoacétylation de H4 mais

surtout par la présence de marques bivalentes H3K4me3/H3K27me3 (Xie et al. 2012). Les régions d'ADN bivalentes sont caractérisées par la présence des deux marques épigénétiques opposées, active (H3K4me3) et répressive (H3K27me3), et l'absence d'activité transcriptionnelle. Il est actuellement admis que la bivalence autorise une transition rapide, de la répression à l'activation des gènes, lors d'un stimulus de différenciation (Bernstein et al. 2006; Azuara et al. 2006). Ces deux marques sont catalysées par les enzymes MLL-1 (mixed lineage leukemia 1) et PRC2, respectivement, dont l'interaction avec NuRD a déjà été montrée par Reynolds et al. (2011).

La transition entre configuration en « pause » et « actif » des ADNr nécessite une coopération entre NuRD et CSB ainsi que le recrutement de l'histone acétyltransférase PCAF induisant l'acétylation des histones H3 et H4 afin de favoriser la formation du complexe de pré-initiation de la transcription PIC (Xie et al. 2012; Shen et al. 2013) (figure III-18).

En conclusion, la régulation de la transcription des ADNr est déterminée par TTF-I qui interagit avec trois complexes majeurs de remodelage de la chromatine à savoir NoRC, CSB et NuRD. La présence de l'un ou l'autre de ces facteurs induit notamment des modifications épigénétiques (modifications post-traductionnelles des histones et de l'ADN) connues pour leurs effets sur l'organisation de la structure chromatine. Il en résulte alors un effet permissif ou réfractaire à l'activation de la transcription.

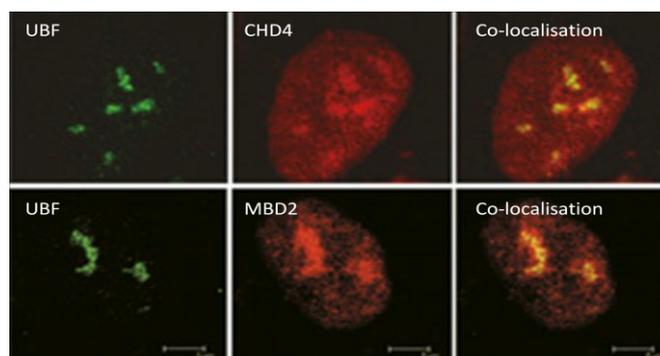


Figure III-18: Localisation des protéines UBF (vert), CHD4 (chromodomain, hélicase and DNA-binding 4 ; rouge; haut) et MBD2 (rouge; bas) dans des cellules NIH 3T3. CHD4 et MBD2 sont des sous-unités appartenant au complexe NurD. Images d'immunofluorescence montrant la co-localisation de CHD4 et MBD2 avec UBF dans le nucléole. Source: Xie et al. 2012.

III-2-5) Proximité des ADNr avec l'hétérochromatine péricentromérique

Sur les chromosomes, les gènes ribosomiques sont localisés à proximité de l'hétérochromatine péricentromérique. Cette proximité entre les ADNr et l'hétérochromatine

péricentromérique pourrait s'avérer importante dans la répression des gènes ribosomiques (Akhmanova et al. 2000; Carmo-fonseca et al. 2000) (figure III-19). Ainsi, dans les neurones de souris, une fraction importante des séquences d'ADNr inactives est juxtaposée au centromère et à l'hétérochromatine péricentromérique. L'hétérochromatine péricentromérique correspond à un compartiment subnucléaire répressif qui favoriserait l'état réprimé des ADNr situés à proximité. Par ailleurs, il a été montré que l'action répressive de TIP5, via les mécanismes épigénétiques, ne se limite pas aux gènes ribosomiques mais intervient également dans la formation de l'hétérochromatine périnucléolaire des séquences centromériques et péricentromériques (Guettg et al. 2010). Il existe donc une relation forte entre l'état répressif de la transcription et la proximité des séquences ribosomiques avec l'hétérochromatine péricentromérique.

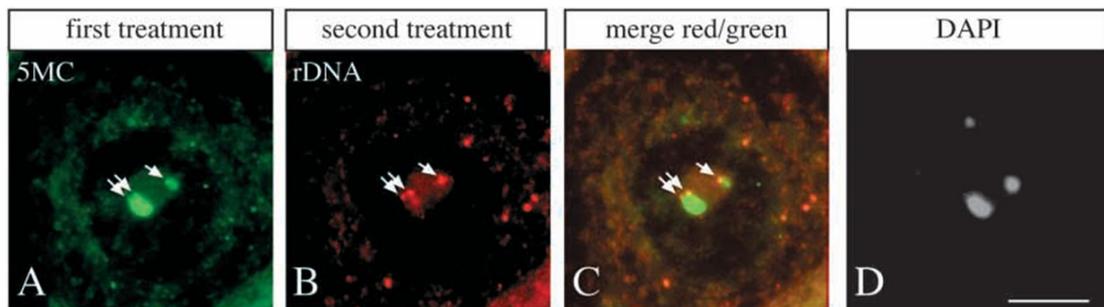


Figure III-19: Caractérisation de la portion de gènes ribosomiques inactifs dans les nucléoles de neurones larges. Des sections transverses de 5 μ m, coupées à travers le cerveau de souris de souche FVB, sont utilisées pour détecter la 5-méthylcytosine (5MC) (A), les ADNr (B) ou l'ADN péri/centromérique (DAPI, gris) par immuno-FISH. (A-D) Co-localisation de la 5MC (vert, A) et des ADNr (rouge, B). la 5MC se localise principalement au niveau de l'ADN péri/centromérique (D). Cela est cohérent avec le fait que l'ADN péri/centromérique est méthylé. A proximité de ces régions, on observe de petits domaines, indiqués par des flèches, qui ne sont pas associés au marquage DAPI mais qui colocalisent avec les ADNr. Barre d'échelle: 3 μ m. Modifiée à partir de Ahkmanova et al., 2000.

III-2-6) Régulation des gènes ribosomiques dans l'embryon de souris

L'ensemble des données décrites précédemment se base essentiellement sur des études réalisées en cellules chez l'homme ou la souris mais il existe très peu de données sur l'embryon préimplantatoire concernant les mécanismes de régulation de la transcription des gènes ribosomiques au cours du développement.

Avant la fécondation, l'ovocyte en GV se présente sous deux types de configuration chromatinienne (NSN et SN), comme abordé dans le chapitre I. Ces deux types de configuration sont associés à des profils transcriptionnels distincts. Notamment dans le cas des gènes ribosomiques, les ovocytes NSN sont transcriptionnellement actifs alors que les SN sont inactifs (Bouniol-baly et al. 1999; Zatssepina et al. 2000). Dans ces ovocytes, les ADNr sont organisés de manière similaire à ce qui a été observé en cellules somatiques: dans les ovocytes NSN, transcriptionnellement actifs, les ADNr se présentent sous une forme décondensée et éloignés de l'hétérochromatine péricentromérique; alors que dans les ovocytes SN inactifs en transcription, les ADNr apparaissent condensés et à proximité de l'hétérochromatine péricentromérique (Bonnet-Garnier et al. 2012).

Dans l'embryon préimplantatoire de souris, aucune activité transcriptionnelle n'est détectée après la fécondation et au cours des premières heures du développement. La transcription des gènes ribosomiques ne démarre pas avant la fin du stade 2-cellules. Une seule étude, par Romanova et al. (2006), a abordé la problématique de l'organisation des gènes ribosomiques dans l'embryon de souris. Dans cette étude, des embryons au stade 1-cellule et 2-cellules précoce (ADNr inactifs) et 2-cellules tardif (ADNr actifs) ont été comparés par FISH. Alors qu'aux stades 1-cellule (figure III-20) et 2-cellules précoce (figure III-20), les ADNr sont condensés, sous forme d'amas, les séquences d'ADNr apparaissent plutôt décondensées au stade 2-cellules tardif (figure III-21). Ces données suggèrent qu'il existerait aussi une relation étroite entre l'organisation des ADNr et leur statut transcriptionnel dans les embryons de souris.

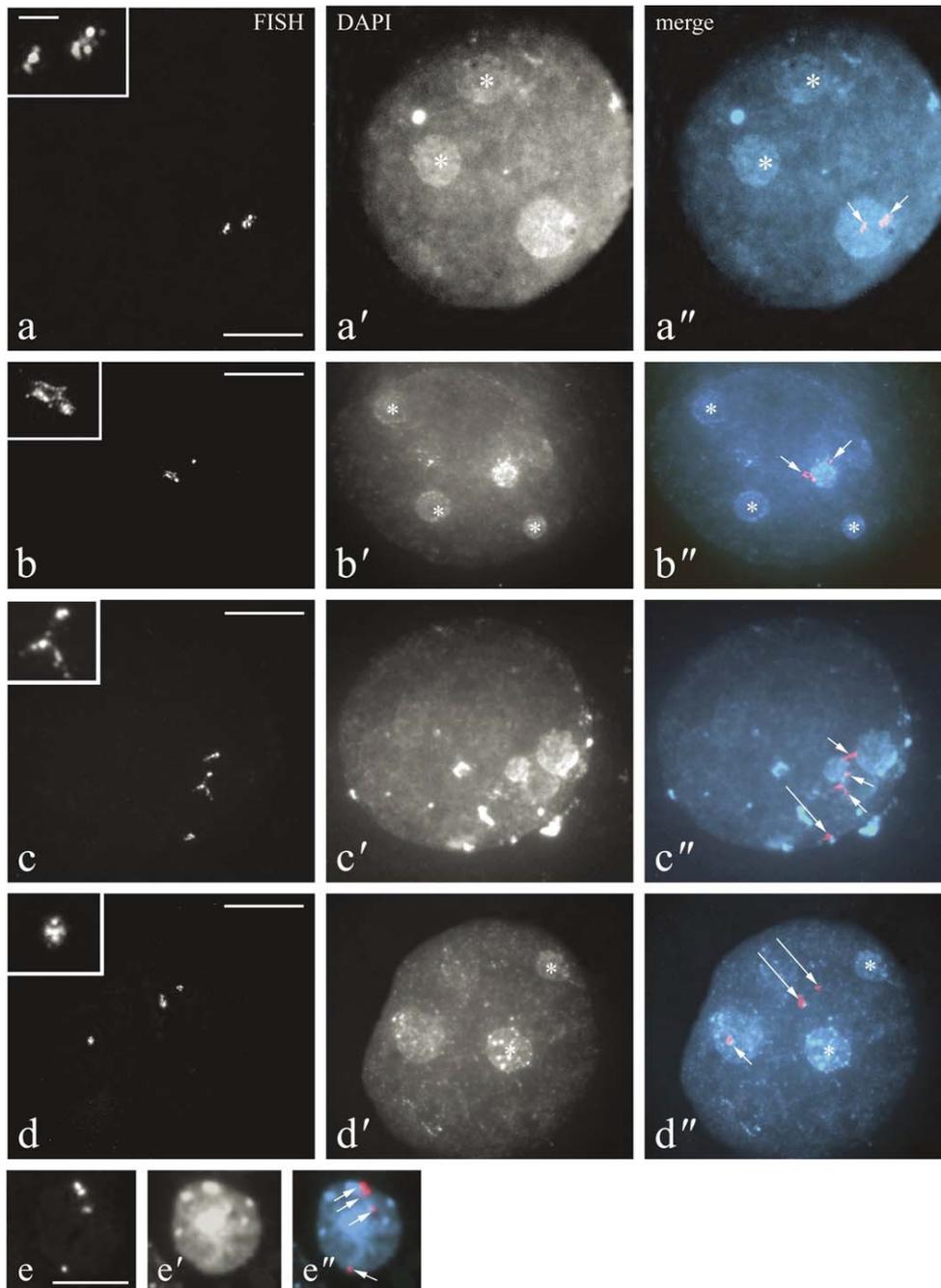


Figure III-20: Hybridation in situ en fluorescence détectant les ADNrs dans les pronoyaux paternel (a et b), et maternel (c et d) et le globule polaire (e) à 21 h (a), 24 h (b, e), 26 h (c) et 29 h (d) post-hCG. L'injection d'hCG est utilisée comme temps de référence, l'ovulation et la fécondation ayant lieu ~12h après. a-e) images de FISH. a'-e') marquage des pronoyaux au DAPI ; inserts = agrandissement sur le signal FISH ADNr. a''-e'') images fusionnées avec en rouge le signal de FISH et en bleu le marquage DAPI. Les petites flèches indiquent le signal de FISH associé aux NPB ; les longues flèches indiquent les signaux d'ADNr libres. Les NPB non associés avec du signal d'ADNr sont marqués par des astérisques (dans a', a'', b', b'', d' et d''). Les unités d'ADNr forment des ponctuations compactes dans les 2 pronoyaux et le globule polaire. Barre d'échelle: 10 μm (a-e) et 2,5 μm (inserts dans a-d). Source: Romanova et al. 2006.

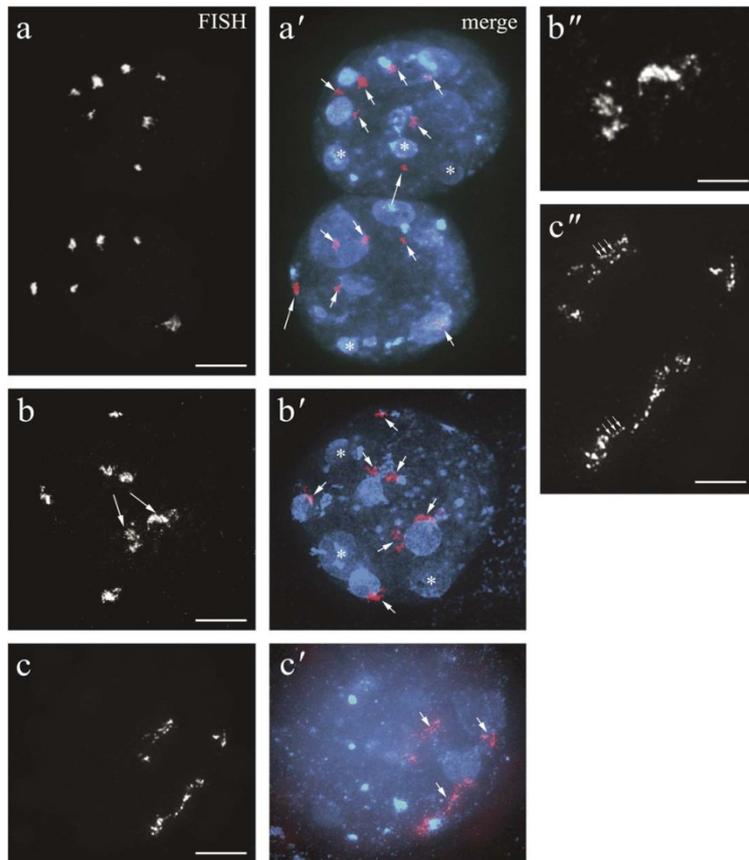


Figure III-21: Hybridation in situ en fluorescence sur embryons au stade 2-cellules à 32h post-hCG (a, ADNr inactif) et 46hphCG (b, lorsque les ADNrs sont transcrits). a–c) Images de FISH. a'–c') Images fusionnées; avec en rouge le signal de FISH et en bleu le marquage DAPI. Les signaux de FISH sont indiqués par des flèches. a') les agrégats d'ADNr qui ne sont pas associés aux NPB sont indiqués par de longues flèches. b'' et c'') les signaux de FISH de b et c sont observés à plus fort grossissement. Les NPB non associés aux ADNr sont marqués par des astérisques (dans a' et b'). Barres d'échelle : 10 μm (a, a', b, b', c, et c') et 5 μm (b'' et c''). On observe une décondensation des gènes ribosomiques à partir du stade 2-cellules tardif, quand la transcription se met en route. Source: Romanova et al. 2006.

Malheureusement, il n'existe aucune donnée sur la distribution de marques épigénétiques particulières qui pourraient être associées aux ADNr en fonction de leur état transcriptionnel ni sur les différents complexes de remodelage de la chromatine qui pourraient être impliqués dans la régulation des ADNr dans les embryons préimplantatoires.

PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE

Le nucléole, siège de la biogenèse des ribosomes, représente un organite essentiel dans la fonction cellulaire. La dynamique du nucléole est très bien documentée en cellules somatiques. Néanmoins, les données sur l'embryon préimplantatoire sont beaucoup moins abondantes. Il est clair qu'il n'y a pas véritablement de nucléole au début du développement mais des NPB qui ne sont pas fonctionnels. Cependant, au moment de l'activation du génome embryonnaire, lors de la mise en place des machineries transcriptionnelles et traductionnelles, la présence d'un nucléole fonctionnel de type « somatique » est indispensable afin d'assurer la production des ribosomes. Savoir comment se déroule la transition de NPB à nucléole fonctionnel reste une question d'actualité. En effet, bien qu'il existe quelques études dans la littérature, la question de la mise en place des nucléoles fonctionnels ainsi que de la dynamique des protéines nucléolaires au cours du développement reste ouverte.

Une régulation adéquate de la transcription des gènes ribosomiques est également cruciale au cours du développement. De plus, il apparaît que la nucléologenèse embryonnaire a lieu de manière concomitante à l'activation du génome embryonnaire et notamment à la reprise de la transcription des gènes ribosomiques au stade 2-cellules tardif. Dans l'embryon préimplantatoire de souris, bien que le stade d'initiation ainsi que l'évolution du taux de la transcription soient connus, seule l'équipe de Romanova et al. (2006) s'est intéressée à l'organisation de la chromatine des gènes ribosomiques en fonction de leur statut transcriptionnel aux stades très précoces du développement. Ce travail suggère que les gènes ribosomiques présentent d'abord une organisation condensée avant l'activation du génome (stade 1-cellule) puis décondensée une fois la transcription embryonnaire activée (stade 2-cellules). Cependant l'approche utilisée (FISH-2D) ne permet pas d'observer la structure tridimensionnelle des noyaux.

Par ailleurs, la juxtaposition des séquences ribosomiques avec l'hétérochromatine péricentromérique observée au niveau des chromosomes soulève d'autres interrogations quant à la régulation de la transcription des gènes ribosomiques sachant que l'hétérochromatine péricentromérique peut constituer un environnement réfractaire à la transcription. En cellules somatiques, un lien entre la proximité de ces séquences d'ADNr avec les régions péricentromériques et la transcription des gènes ribosomiques a été mis en évidence (Akhmanova et al. 2000). Dans l'embryon de souris, la localisation des gènes ribosomiques

par rapport aux régions péricentromériques a été décrite au laboratoire uniquement au cours du 1er cycle embryonnaire (Aguirre-Lavin et al. 2012). Pour les stades plus tardifs, on ignore si l'embryon présente des mécanismes de régulation similaires à ceux décrits en cellules somatiques, à savoir i) l'organisation en 3D des gènes ribosomiques par rapport à l'hétérochromatine péricentromérique et ii) l'impact potentiel de cette proximité sur la transcription de ces gènes dans l'embryon préimplantatoire.

Enfin, sachant l'importance de la réorganisation de l'hétérochromatine péricentromérique -et la formation des chromocentres- pour la mise en route du génome embryonnaire et la poursuite du développement, comprendre les mécanismes contrôlant cette réorganisation est primordial. Le NPB semble jouer un rôle important dans cette réorganisation du génome après fécondation, notamment dans le cas particulier de l'hétérochromatine péricentromérique qui se réorganise en périphérie des NPB dès la formation des pronoyaux. Nous avons remarqué que ce « recrutement » est asynchrone entre les deux pronoyaux parentaux. C'est également le cas de la transcription des séquences péricentromériques qui démarre de manière asynchrone : elle semble avoir lieu en priorité dans le pronoyau paternel qui synthétiserait majoritairement les ARN sens (Probst et al. 2010; Casanova et al. 2013). Il semble donc y avoir une asymétrie importante en termes d'organisation et de transcription des régions péricentromériques entre les génomes parentaux.

Dans ce contexte, ma thèse s'est articulée autour de trois questions biologiques principales, avec pour modèle l'embryon de souris:

- I) Comment se déroule la nucléogénèse au cours du développement préimplantatoire?
- II) Quel rôle pourrait avoir l'hétérochromatine péricentromérique sur la régulation de la transcription des ADNr ?
- III) Quelle est la contribution de chaque génome parental après la fécondation dans la réorganisation et la transcription de l'hétérochromatine péricentromérique qui se réorganise en périphérie des NPB après la fécondation?

MATERIEL & METHODES

MATERIEL ET METHODES

Superovulation et autorisation d'expérimentation

Les expérimentations ont été réalisées avec des souris de souche C57Bl6/CBA (F1). Les femelles de cette souche fournissent, après stimulation hormonale (superovulation), des ovocytes et des embryons en grande quantité. Toutes les superovulations sont réalisées sur des femelles de 6 à 10 semaines par injection intrapéritonéale de 5 UI de PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) puis 5 UI d'hCG (human chorionic gonadotropin) 48 heures plus tard. L'heure d'injection d'hCG (hphCG) peut alors être prise comme temps de référence; l'ovulation ayant lieu environ 12 heures après le pic hormonal. La fécondation et l'ovulation se font simultanément s'il y a eu accouplement auparavant.

Comme statué par la convention européenne sur l'expérimentation animale et la société pour l'étude de la reproduction, toutes les expériences ont été réalisées suivant le guide international des principes pour la recherche biomédicale impliquant les animaux et avec l'accord du comité local d'éthique animale du centre de Jouy-en-Josas (autorisation N° 12/123; Comethea Jouy-en-Josas/AgroParisTech).

Sauf précision, tous les produits utilisés pour les expériences proviennent majoritairement de chez Sigma Aldrich et Thermo Fisher Scientific.

Collecte d'ovocytes en métaphase II et d'embryons au stade 1-cellule

Pour l'obtention d'ovocytes, les femelles sont sacrifiées par dislocation cervicale puis disséquées afin de récolter directement dans les ampulla les ovocytes ovulés, bloqués en métaphase II. Cette étape se déroule dans un milieu M2 contenant de la hyaluronidase (200µg/ml) afin d'éliminer les cellules du cumulus. Les ovocytes sont ensuite rincés en microgouttes de M2.

Pour l'obtention d'embryons, les femelles superovulées et accouplées sont sacrifiées par dislocation cervicale (~22/26hphCG) puis disséquées afin de prélever les ampulla. Ces ampulla sont placées dans des gouttes de M2 contenant de la hyaluronidase (200 µg/ml) puis percées à l'aide d'une aiguille fine afin de collecter les embryons. Les embryons sont ensuite rincés dans des microgouttes de M2 et triés. Après tri, les embryons sont mis en culture en microgouttes de milieu M16, sous huile minérale, dans un incubateur à 37°C et sous 5% de

CO₂. Les embryons seront ensuite prélevés et traités en fonction des expériences à différents stades de développement (tableau ci -dessous).

Stade	Heure de prélèvement
1-cellule tardif	26hphCG
2-cellules précoce	34 hphCG
2-cellules tardif	48 hphCG
4-cellules précoce	52 hphCG
4-cellules tardif	58 hphCG
8-cellules précoce	62-65 hphCG
8-cellules tardif	70-72 hphCG
16-cellules précoce	74-75 hphCG
16-cellules tardif	81 hphCG
Morula précoce	85-86hphCG
Morula (sans distinction)	93 hphCG
Morula tardive	99 hphCG
Blastocyste précoce	102-110 hphCG

Production d'embryons parthénotes diploïdes

Après collecte des ovocytes en métaphase II, l'activation se fait dans un milieu M16 contenant du strontium (SrCl 10 μ M), additionné de cytochalasine B (CB ; 5 μ M), afin de provoquer la reprise de la méiose tout en bloquant l'expulsion du globule polaire pour conserver la diploïdie de l'embryon ainsi formé. Le début de l'incubation est considéré comme le « T0 » pour déterminer le stade des embryons qui sera exprimé en heures post-activation (hpa). Après 6 heures d'incubation (dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂), les embryons parthénotes obtenus sont triés (présence de deux pronoyaux, d'origine maternelle, bien visibles), rincés et mis en culture en M16 (37°C, 5% CO₂).

Production d'embryons androgénotes par injection de spermatozoïde

Un mâle est euthanasié et disséqué afin de récupérer les épидидymes. Sous loupe binoculaire, en M2, les épидидymes sont dilacérés au niveau de la partie caudale pour libérer les spermatozoïdes matures dans le milieu. Les spermatozoïdes sont resuspendus dans 1ml de M2

et conservés à 37°C. Pour la sonication, les spermatozoïdes sont dilués dans du M2 à une concentration de 150×10^4 spermatozoïdes/ml. Par lots successifs, les spermatozoïdes sont traités par ultrason pour séparer la tête du flagelle sur au moins 50% de la population (Branson digital Sonifier 250 ; Paramètres: 2 secondes ; 10% amplitude ; 37°C). Les têtes obtenues sont utilisées en ICSI (intra cytoplasmic sperm injection) dans les 30 minutes qui suivent la sonification pour conserver leur pouvoir fécondant.

Pour l'ICSI, les ovocytes en métaphase II et les spermatozoïdes sont transférés sous microscope inversé (Olympus IX70 DIC) en milieu M2 additionné de cytochalasine B. A l'aide d'un système Piezo-électrique, les ovocytes sont énucléés avec une micropipette puis deux têtes de spermatozoïdes sont microinjectés dans le cytoplasme (pour conserver la diploïdie de l'embryon). Après injection, les embryons sont mis en culture en M16 dans l'incubateur (37°C ; 5% CO₂). Pour ces embryons, l'heure de mise en culture correspond au « T0 » à partir duquel le stade des embryons sera déterminé (en heure post-injection ou hpinj). La décondensation des têtes de spermatozoïdes a lieu environ 4 heures après leur injection. On obtient ainsi un embryon au stade 1-cellule dans lequel 2 pronoyaux paternels sont observables.

Production d'embryons androgénotes et gynogénotes par échange de pronoyaux

A 23 hphCG, les embryons naturellement fécondés sont collectés et transférés en milieu M2 maintenu à 37°C. Après tri au microscope, seuls les embryons au stade PN4 sont conservés pour l'expérimentation. La micromanipulation des embryons s'effectue avec un système Piezo-électrique de la manière suivante : le pronoyau paternel est retiré d'un embryon dit « donneur 1 ». Ce pronoyau paternel est transféré sous la zone pellucide, dans l'espace périvitellin, d'un autre embryon dit « donneur 2 » dont le pronoyau maternel aura été préalablement retiré. Le pronoyau maternel qui a été extrait de l'embryon « donneur 2 » est lui-même retransféré dans l'espace périvitellin de l'embryon « donneur 1 ». Un choc électrique est alors appliqué pour fusionner le pronoyau placé dans l'espace périvitellin et le cytoplasme de chaque embryon reconstitué; à l'aide d'un appareil « Stimulator GRASS S44 » avec 2 pulses de 0,04 ms à 80 volts. Pour réaliser cette électrofusion, les embryons sont posés entre les deux électrodes d'une chambre de fusion dans du mannitol supplémenté avec du calcium et du magnésium . Après la fusion, les embryons sont transférés en M16 à 37°C/5 % CO₂. On obtient ainsi soit des androgénotes avec 2 pronoyaux paternels, soit des gynogénotes avec 2 pronoyaux maternels (voir le schéma récapitulatif dans la partie Résultats). L'heure

d'injection de l'hCG est considérée comme le « T0 » afin de déterminer le stade des embryons (estimé en hphCG) comme pour les embryons fécondés naturellement et non manipulés.

Immunofluorescence UBF et NOPP140

Sauf précision, les étapes décrites se déroulent à température ambiante et à l'abri de la lumière après addition des anticorps secondaires.

Après fixation au paraformaldéhyde 4% (PFA ; EMS) pendant 10 minutes, les embryons sont rincés en tampon phosphate salin (phosphate buffered saline en anglais, PBS) puis dépellucidés en quelques secondes par incubation dans de l'acide chlorhydrique 0,1N (HCl ; Prolabo). Les embryons sont ensuite rincés en PBS supplément avec 0,2% de sérum albumine bovine (PBS-BSA), puis perméabilisés pendant 30 minutes dans du Triton X100 0,5% dilué en PBS-BSA 0,2 %. La saturation des sites aspécifiques se fait en PBS-BSA 2% pendant 1h. Les anticorps sont également dilués en PBS-BSA 2%. L'incubation des embryons en présence des anticorps primaires est réalisée sur la nuit, à 4°C. Les anticorps utilisés sont les suivants: l'anti-UBF de souris (dilution 1:100; H00007343-M01; Novus Biologicals), l'anti-NOPP140 de lapin (dilution 1:150; sérum offert par U. Thomas Meier, New York, USA) et l'anti-TIP5 de lapin (dilution 1:100, offert par I. Grummt, Heidelberg, Allemagne). Le lendemain, après 3 rinçages en PBS-BSA 0,2%, les embryons sont incubés 30 minutes en PBS - BSA 2%. La révélation des anticorps primaires se fait par incubation pendant 1 heure des embryons avec des anticorps secondaires correspondants (anti-souris ou anti-lapin) couplés aux fluorochromes cyanine 3 (Cy3) ou cyanine 5 (Cy5) (Jackson immuno-research laboratories) dilués au 1:200 en BSA-PBS 2%. Les embryons sont à nouveau rincés (3 x 5 minutes) en PBS-BSA 0,2% puis une contre-coloration de l'ADN au YO-PRO (5µM en PBS, Invitrogen) ou à l'iodure de propidium (1 µg/mL, en PBS, Invitrogen) est réalisée pendant 15 minutes à 37°C. Cette étape est suivie d'un rinçage en PBS-BSA 0,2% puis du montage des embryons entre lame et lamelle. Lorsque l'objectif était de préserver la structure tridimensionnelle des embryons, les embryons étaient d'abord transférés dans une goutte de milieu de montage (Citifluor ; AF1 BioValley) puis récupérés individuellement et posés sur une lamelle avec une petite quantité de milieu de montage. L'excès de milieu de montage est aspiré jusqu'à ce que l'embryon devienne réfringent à la lumière de la loupe binoculaire. L'observation au microscope est réalisée extemporanément.

Sondes pour l'ADN-FISH

Les sondes utilisées pour la détection des séquences satellites majeurs et mineurs ont été obtenues par amplification de l'ADN génomique de souris avec les amorces listées dans le tableau suivant :

Sondes	Amorces
Séquences satellites majeurs (SatMaj)	5'-CATATTCCAGGTCCTTCAGTGTGC-3' et 5'-CACTTTAGGACGTGAAATATGGCG-3'
Séquences satellites mineurs (SatMin)	5'-ACTCATCTAATGTTCTACAGTG-3' et 5'-AAAACACATTCGTTGGAAACGCG-3'

Après amplification, les sondes ont été marquées au Cy3 (pour les séquences satellites majeurs) ou au Cy5 (Amersham) (pour les séquences satellites mineurs) par amorçage aléatoire (« random priming », Bioprime Array CGH Genomic Labeling kit, Invitrogen) puis purifiées (Bioprime purification Module with Purelink kit, Invitrogen).

Pour détecter les séquences ribosomiques, nous avons utilisé une sonde issue d'un cosmide dans lequel a été clonée la séquence codante de l'ARN 47S (environ 14kb) (Akhmanova et al. 2000). Ce cosmide nous a été donné par N. Galjart (Pays-Bas). Après amplification puis extraction de bactéries transfectées (protocole de Mini-Prep, Qiagen), les sondes sont marquées à la digoxygénine (DIG) par déplacement de brèche (« nick-translation », DIG-Nick Translation kit, Roche).

Sondes pour l'ARN-FISH des séquences satellites majeurs

La détection des ARN transcrits à partir des séquences satellites majeurs a été réalisée avec des sondes LNA de 18 mers, synthétisées *in vitro* et couplées à deux fluorochromes différents: Alexa fluor 488 et Cy5 (don de C. Escudé, MNHN, Paris). Ces sondes sont présentées dans le tableau ci-dessous (dans les séquences un nucléotide sur deux environ est un LNA, indiqué en lettre minuscule).

Sondes	Séquences
SatMaj LNA sens	cAcAcTtTaGgAcGtGaA-Alx 488 [5']
SatMaj LNA anti-sens	gGaTgTtTcTcAtTtTcC-Cy5 [5']

Les positions des sondes et le brin détecté (sens ou anti-sens) au sein de la séquence consensus des satellites majeurs sont indiqués ci-dessous (Figure M1).



Figure M1: Séquence consensus des satellites majeurs chez la souris. Une seule répétition est présentée, divisée en 4 sous-parties relativement homologues. Les nucléotides soulignés en gris sont conservés d'une sous-partie à l'autre. Les deux sondes utilisées en ARN-FISH sont indiquées. D'après Hörz and Altenburger 1981.

ADN-FISH des séquences satellites majeurs et mineurs

Sauf précision, les étapes décrites se déroulent à température ambiante et à l'abri de la lumière à partir de l'incorporation des sondes.

Les embryons sont traités selon le protocole établi au laboratoire (Aguirre-Lavin et al. 2012). Les embryons sont dépellucidés au Tyrode pH 2.5 puis fixés en PFA 4% pendant 30 minutes. Après rinçage en PBS, les embryons sont montés sur lames puis perméabilisés au Triton X100 0,5% pendant 30 minutes. Les embryons sont ensuite rincés en PBS pendant 5 minutes puis mis à incuber dans un tampon de citrate de sodium 2X (saline sodium citrate, SSC) pendant 5 minutes. Cette étape est suivie d'une digestion à la RNase 200 µg/ml, pendant 30 minutes à 37°C. Après plusieurs rinçages de 5 minutes en SSC 2X pH 6,3 puis en PBS, les embryons sont mis à pré-hybrider pendant 2 heures dans du tampon d'hybridation (50% formamide, SSC 2X, Denhardt 1X, 40mM NaH₂PO₄, 10% sulfate de dextran). Les embryons sont alors déposés sur une lame dans un minimum de tampon d'hybridation et la dénaturation de l'ADN est réalisée sur plaque chauffante à 85°C pendant 10 minutes. Parallèlement, les sondes ciblant les séquences majeurs (SatMaj couplée Cy3) et mineurs (SatMin couplée Cy5) sont diluées dans le tampon d'hybridation à la concentration finale de 200 ng/ml et mises à dénaturer dans un bloc chauffant à 85°C pendant 10 minutes. Après la dénaturation, les sondes sont immédiatement placées dans de la glace. Le tampon d'hybridation recouvrant les

embryons est retiré par aspiration et remplacé par 15µl de sondes préparées comme décrit ci-dessus. La lame est ensuite placée sur un support dans une boîte fermée contenant des disques de papiers Whatman imbibés de formamide pur (chambre humide) et placé à 37°C pendant 24 heures pour permettre l'hybridation des sondes sur leurs cibles. Le lendemain, les embryons sont rincés 3 fois en SSC 2X pH 6,3 à 42°C puis perméabilisés au Triton X100 0,5% pendant 10 minutes. Après un rinçage en PBS, les embryons sont incubés dans le colorant ADN (YO-PRO, 10 µM) pendant 15 minutes à 37°C. Les embryons déjà fixés sur la lame sont rincés en PBS rapidement puis montés avec une lamelle et du milieu de montage protégeant la fluorescence (Citifluor).

ARN-FISH des séquences satellites majeurs (brin sens et anti-sens)

Sauf précision, les étapes décrites se déroulent à température ambiante et à l'abri de la lumière à partir de l'utilisation des sondes.

Les embryons sont dépellucidés au Tyrode pH 2,5 puis fixés au PFA 4% pendant 15 minutes. Après rinçage en PBS pendant 5 minutes, les embryons sont fixés sur une lame puis perméabilisés au Triton X100 0,5% pendant 30 minutes. Pendant ce temps, les sondes ciblant les ARN issus des séquences satellites majeurs (sondes SatMaj LNA sens couplées à l'Alexa fluor 488 et anti-sens couplées au Cy5) sont diluées dans le tampon d'hybridation (50% formamide ; SSC 2X pH 6.3 ; sulfate de dextran 10%), à la concentration finale de 0,3 µM. Après perméabilisation, les embryons sont rincés en PBS (2 x 5 minutes) puis en SSC 2X pH 6,3. L'hybridation des embryons se fait dans 50 µl de sondes déposées sur la lame. La lame est posée dans une chambre humide et placée dans une étuve à 37°C toute la nuit. Le lendemain, les embryons sont rincés 3 fois en SSC 2X pH 6,3 à 42°C puis perméabilisés au Triton X100 0,5% pendant 10 minutes. Après un rinçage en PBS, l'ADN est contre-coloré au Hoechst 33245 (2 µg/ml) (Invitrogen). Les embryons sont ensuite montés entre lame et lamelle avec du Citifluor.

ADN-FISH des gènes ribosomiques et des séquences satellites majeurs

Sauf précisions, toutes les étapes se déroulent à température ambiante et à l'abri de la lumière à partir de l'incorporation des sonde. Le protocole se déroule en trois étapes :

- ✓ 1^{ère} étape : traitement préalable des embryons

Les embryons sont d'abord fixés au PFA 4% pendant 10 minutes puis rincés en PBS pendant 5 minutes. La zone pellucide est enlevée par incubation de très courte durée (quelques

secondes) monitorée sous loupe binoculaire, dans de l'acide chlorhydrique 0,1N; suivie d'un rinçage en PBS-BSA 2%. Les embryons sont traités à la pepsine (20mg/ml) à 37°C pendant 4 minutes puis rincés dans du chlorure de magnésium (MgCl₂, pour bloquer l'action de la pepsine). Les embryons sont ensuite incubés dans une solution de TritonX100 0,05%-PBS (2x5 minutes) avant d'être perméabilisés dans du TritonX100 0,5% durant 30 minutes. Après deux autres rinçages en TritonX100 0,05% pendant 10 minutes, les embryons sont incubés 10 minutes dans du SSC 2X (pH 6,3). L'élimination des ARN endogènes se fait par incubation en RNase (0,2 mg/ml) durant 30 minutes à 37°C. Les embryons sont ensuite incubés dans de la formamide désionisée (50%) pendant 48 heures à 37°C afin de faciliter la dénaturation.

✓ 2^{ème} étape : hybridation

Les embryons sont ensuite transférés dans une microgoutte de 13 µL (sous huile) de la solution d'hybridation (50% formamide, 2X SSC pH 5.7, sulfate de dextran 10x%) préparée extemporanément et contenant les sondes spécifiques des ADNr (50ng/µl) et des séquences satellites majeures (SatMaj, 200ng/µl). Après transfert, les embryons sont mis à pré-hybrider durant 3 heures à 37°C. Les sondes et les séquences cibles sont ensuite dénaturées simultanément en plaçant les embryons sur une plaque à 85°C pendant 10 minutes. Après dénaturation, les embryons sont placés dans une chambre humide (contenant du papier imbibé de formamide désionisée pur), elle-même placée dans un incubateur à 37°C pendant 72 heures.

✓ 3^{ème} étape : révélation des sondes d'ADNr

Les sondes SatMaj sont déjà couplées à un fluorochrome (CYy3). Les sondes ciblant les gènes ribosomiques sont couplées à la DIG et sont révélées par immunofluorescence. Pour cela, après deux rinçages dans du SSC 2X (pH 6,3), les sites aspécifiques sont saturés par incubation en PBS-BSA 4%. Les embryons sont ensuite incubés une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire anti-DIG de mouton (Roche) dilué au 1:100 en PBS-BSA 4%. Après 2 rinçages en 4X SSC – Tween 20 0,02% (10 minutes), les embryons sont incubés pendant 10 minutes en PBS-BSA 4%. Cette étape est suivie d'une incubation dans l'anticorps secondaire anti-mouton couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (fluorescein isothiocyanate en anglais, FITC), dilué au 1:200 en PBS-BSA 4% (Jackson immuno-research laboratories) pendant 1 heure. Les embryons sont ensuite perméabilisés dans du TritonX100 0,5% pendant 15 minutes afin de faciliter la contre-coloration de l'ADN au iodure de propidium (1µg/ml) en

PBS-BSA 2% . Après un rinçage en PBS pendant 5 minutes, les embryons sont montés sur lamelle avec du Citifluor contenant également de l'iodure de propidium (2 μ g/ml).

Observation et acquisition des images

Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM700 (plateforme MIMA2, INRA) muni de trois lasers (longueurs d'onde 488-, 535-, et 633-nm) et d'un objectif à immersion 63X (Plan-Apochromat, ouverture numérique à 1,4). Les acquisitions des images sont effectuées sur toute l'épaisseur des embryons, en plusieurs coupes successives espacées de 0,4 μ m afin de récupérer un maximum de la fluorescence. Les analyses (description et comptage des signaux) sont ensuite réalisées à l'aide des logiciels Image J et Zen (Zeiss).

Tests statistiques

L'analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée grâce au logiciel de statistique R (version 3.3.1) avec l'interface de commandes Rcommander (Rcmdr) et le plugin coin (conditional inference procedures in a permutation test framework) qui permet d'appliquer des tests adaptés aux petits échantillons. J'ai ainsi systématiquement testé la normalité des données sur chaque groupe de données par un test de Shapiro et vérifié l'homogénéité des variances par un test de Levène. Les distributions n'étant pas normales et les variances non homogènes, les tests utilisés par la suite étaient donc de type non paramétrique, pour tous les résultats obtenus. J'ai notamment vérifié l'effet du « stade embryonnaire » pour chaque paramètre quantifié par un test de Kruskal & Wallis (test non paramétrique sur échantillons indépendants) puis effectué un test de n parcomp lors d'une comparaison entre deux stades précis afin d'étudier la significativité des différences observées. Dans le cas où plusieurs paramètres ont été mesurés (au moins 2) au sein d'un même stade, j'ai effectué un test de Wilcoxon (test non paramétrique apparié). Pour ces tests, j'ai fixé un seuil $\alpha = 5\%$ et considéré les différences observées comme significatives si la valeur $p < 0,05$.

RESULTATS

RESULTATS

Partie I- Nucléogenèse embryonnaire

I-1) Distribution des protéines nucléolaires UBF et NOPP140 au cours du développement embryonnaire précoce

I-1-1) Introduction

Dans cette partie de ma thèse, je me suis intéressée à la nucléogenèse au cours du développement embryonnaire préimplantatoire chez la souris. Pour cela, j'ai analysé par immunofluorescence les protéines UBF et NOPP140, caractéristiques des compartiments FC et DFC, en conservant la structure tri-dimensionnelle des embryons. D'autres équipes s'étaient déjà intéressées à ces protéines dans les embryons de souris, mais à des stades très précoces du développement (Baran et al. 2001 ; Zatssepina et al. 2003). Dans le cadre de ma thèse, j'ai étudié la distribution d'UBF et de NOPP140 du stade 2-cellules (moment de la reprise de la transcription des gènes ribosomiques) jusqu'au stade blastocyste (avant l'implantation), dans des embryons de souris fécondés naturellement.

L'objectif était de i) faire le lien entre la distribution de ces protéines et la formation ainsi que l'organisation des compartiments nucléolaires, ii) analyser l'éventuelle interaction entre ces deux protéines impliquées dans la ribogenèse et iii) faire le lien avec la mise en route de l'activité transcriptionnelle dépendante de l'ARN polymérase I.

L'ensemble des résultats obtenus a été valorisé dans un premier article publié en avril 2016 dans la revue "Biology of Reproduction".

I-1-2) Article " 3D distribution of UBF & Nopp140 in relationship to rDNA transcription during mouse preimplantation development"

21 BIOLOGY OF REPRODUCTION (2016) 94(4):0, 1–12
 Published online before print 16 March 2016.
 DOI 10.1095/biolreprod.115.136366

Three-Dimensional Distribution of UBF and Nopp140 in Relationship to Ribosomal DNA Transcription During Mouse Preimplantation Development¹

Maimouna Coura Koné,⁴ Renaud Fleurot,⁴ Martine Chebrou,⁴ Pascale Debey,⁵ Nathalie Beaujean,^{2,3} and Amélie Bonnet-Garnier^{3,4}

⁴UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, Jouy en Josas, France

⁵Sorbonne-Universités, MNHN, CNRS, INSERM, Structure et instabilité des génomes, Paris, France

ABSTRACT

The nucleolus is a dynamic nuclear compartment that is mostly involved in ribosome subunit biogenesis; however, it may also play a role in many other biological processes, such as stress response and the cell cycle. Mainly using electron microscopy, several studies have tried to decipher how active nucleoli are set up during early development in mice. In this study, we analyzed nucleologenesis during mouse early embryonic development using 3D-immunofluorescent detection of UBF and Nopp140, two proteins associated with different nucleolar compartments. UBF is a transcription factor that helps maintain the euchromatic state of ribosomal genes; Nopp140 is a phosphoprotein that has been implicated in pre-rRNA processing. First, using detailed image analyses and the *in situ* proximity ligation assay technique, we demonstrate that UBF and Nopp140 dynamic redistribution between the two-cell and blastocyst stages (time of implantation) is correlated with morphological and structural modifications that occur in embryonic nucleolar compartments. Our results also support the hypothesis that nucleoli develop at the periphery of nucleolar precursor bodies. Finally, we show that the RNA polymerase I inhibitor CX-5461: 1) disrupts transcriptional activity, 2) alters preimplantation development, and 3) leads to a complete reorganization of UBF and Nopp140 distribution. Altogether, our results underscore that highly dynamic changes are occurring in the nucleoli of embryos and confirm a close link between ribosomal gene transcription and nucleologenesis during the early stages of development.

CX-5461, embryo, fluorescence microscopy, NPB, nucleolar proteins, nucleolus, oocyte, proximity ligation assay, RNA FISH, RNA polymerase I

INTRODUCTION

The embryonic preimplantation period is when the biological processes that shape long-term development occur. During this period (from fertilization to implantation), mRNA,

ribosomes, and proteins of maternal origin ensure the development of the embryo until its own genome is activated, a process known as embryonic genome activation [1–3]. From this time point, embryonic development will rely on the translation of newly synthesized embryonic mRNA and on the *de novo* production of ribosomes, which requires the presence of a functional nucleolus.

The nucleolus is a dynamic nuclear compartment that is involved in many biological functions, among which ribosome biogenesis is the most important and best known (for reviews of the relevant literature, see Lo et al. [4] and Boisvert et al. [5]). In somatic cells, the nucleolus consists of three functional compartments that can be clearly distinguished using electron microscopy: the fibrillar centers (FCs), the dense fibrillar component (DFC) that surrounds the FCs, and the granular center (GC) that contains fibrillar structures (for selected reviews, see Raška et al. [6], Derenzini et al. [7], and Hernandez-Verdun et al. [8]). The structure of the nucleolus is closely linked to its function. Each subcompartment is associated with a specific step in ribosome synthesis (for reviews, see Raška et al. [6], Hernandez-Verdun et al. [8], and Hernandez-Verdun [9]). Ribosomal genes (rDNA) are located in the FC and are transcribed into single, large rRNA precursors (pre-rRNA) at the junction between the FC and the DFC. Correspondingly, transcriptional machinery components, such as RNA polymerase I (RNA pol I), the upstream binding factor (UBF), and TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit B (TIF-1B), are found both at the FC/DFC border and in the DFC. Large pre-rRNA is then processed to generate three ribosomal RNAs: 28S, 18S, and 5.8S. Early processing is mainly performed in the DFC, which contains several proteins, such as fibrillarin and Nopp140. These proteins, together with small nucleolar RNA (snoRNA), form RNA-protein complexes called ribonucleoproteins (RNPs) [10]. Later processing and the assembly of the pre-40S and pre-60S ribosomal subunits start in the GC, where nucleolar proteins, such as B23/nucleophosmin 1, are present.

This typical nucleolar organization is absent at the beginning of mouse embryonic development. After fertilization, specific structures called nucleolar precursor bodies (NPBs) appear in the male and female pronuclei as compact fibrillar masses that can be visualized using electron microscopy. At the late two-cell stage NPBs get involved in the onset of rDNA transcription [11–14]. Indeed, the transcriptional machinery, including RNA pol I and the processing components, is recruited to the cortical region of the NPBs [15–17]. Ribosomal transcription starts at around 45 h after human chorionic gonadotrophin injection (hphCG) [17] and gradually increases until the blastocyst stage [18]. However, during these early stages of embryonic development, NPBs are not equivalent to the nucleoli of somatic cells, and several research

¹Supported by the REVIVE LabEX program from the Agence nationale de la recherche. M.C.K.'s PhD thesis is funded by the government of Côte d'Ivoire.

²Correspondence: Nathalie Beaujean INSERM U1208, INRA USC1361, Stem Cell and Brain Research Institute, Department of Pluripotent Stem Cells in Mammals, 18 avenue Doyen Lépine, 69675 Bron, France. E-mail: nathalie.beaujean@inserm.fr

Received: 27 October 2015.

First decision: 1 December 2015.

Accepted: 8 March 2016.

© 2016 by the Society for the Study of Reproduction, Inc. This article is available under a Creative Commons License 4.0 (Attribution-Non-Commercial), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>

eISSN: 1529-7268 <http://www.biolreprod.org>

ISSN: 0006-3363

teams have tried to disentangle the relationship between the establishment of somaticlike nucleoli (referred to as nucleologenesis) and the recovery of rDNA transcriptional activity.

Indeed, electron microscopy studies have shown that reticulated zones arise at the periphery of NPBs; the nucleolar compartments (FC, DFC, and GC) appear gradually and form a reticulated structure, whereas the compact mass disappears progressively during the course of development [13, 15, 19, 20]. In addition, the distributions of some nucleolar proteins have been studied using immunofluorescence microscopy, either from the one-cell to the eight-cell stage (UBF and Nopp140) or from the one-cell to the blastocyst stage (fibrillarin, B23/nucleophosmin 1, and C23/nucleolin). These studies suggest that the presence of nucleolar proteins in the cortical region of the NPBs is linked to the appearance of fibrillar and granular structures [15, 17, 21–24]. However, data fully describing the events that occur between the eight-cell and the blastocyst stage are scarce [25].

In this study, we focused on UBF and Nopp140, two nucleolar proteins that are associated with the FC and DFC compartments of the nucleolus [26, 27]. UBF is a transcription factor belonging to the high-mobility group box (HMG box) class of proteins that activate the transcription of ribosomal genes [28, 29]. UBF acts at both the structural and molecular levels to promote rDNA transcription. It binds with the upstream control element and with core components of the rDNA promoter. A specific interaction between UBF and TIF-IB is required to recruit RNA pol I and form the preinitiation complex at the transcription start site (for reviews, see Grummt [30, 31] and Russell and Zomerdijk [32]). UBF has also been found across rDNA repeats and probably maintains ribosomal genes in an open-chromatin state (for a review, see Sanij and Hannan [33]).

Nopp140 is a highly phosphorylated protein that was first identified in rats [34, 35]; it shuttles between the nucleolus and the Cajal (coiled) bodies [23, 27, 36], where it interacts with coilin [36, 37]. It has been suggested that Nopp140 is a chaperone that interacts with both classes of snoRNPs, transporting them to the nucleolus [38, 39]. Nopp140 is phosphorylated by casein kinase II [40] and interacts with RNA pol I [41].

We therefore decided to analyze the distributions and interactions of these two proteins in mouse preimplantation embryos using immunofluorescent staining. Our analyses spanned the onset of rDNA synthesis during the late two-cell stage through the blastocyst stage. The aim of these experiments was to reveal the morphological and structural changes that occur during nucleologenesis. To further explore the relationship between nucleologenesis and rDNA transcription, we also disrupted ribosome biogenesis in the embryos by using a novel RNA pol I inhibitor, CX-5461, which was developed for use in cancer therapy [42–44].

MATERIALS AND METHODS

Ethics

As stated by the European Convention on Animal Experimentation and the Society for the Study of Reproduction, all experiments were performed according to the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. N.B. and A.B.-G. have the authorization to work with laboratory animals from the departmental veterinary regulatory service (license no. 78–95 and A78–184) and from the local ethics committee (no. 12/123; Cometha Jouy-en-Josas/AgroParisTech).

Harvesting of Oocytes and Embryos

To obtain oocytes, ovaries were collected from adult (6- to 8-wk-old) C57Bl6/CBA F(1) female mice and placed in M2 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with dibutyl cyclic AMP (dbcAMP; 100 mg/ml; Sigma-Aldrich) to prevent the spontaneous resumption of meiosis. Oocyte-cumulus complexes were collected by randomly puncturing the ovary with a fine needle. Any follicular cells surrounding the oocytes were mechanically removed by gentle pipetting using a mouth-controlled glass pipette. The oocytes were then transferred into droplets of M2 supplemented with dbcAMP under mineral oil (Sigma-Aldrich) and fixed as described below.

To obtain embryos, adult C57Bl6/CBA F(1) female mice were superovulated by intraperitoneally injection of 5 IU of pregnant mare serum gonadotropin; a second injection, of 5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG), followed 48 h later. The mice were killed, and the one-cell-stage embryos (23–24 hphCG) were taken directly from the ampullae and placed in M2 medium with 200 µg/ml hyaluronidase (Sigma-Aldrich). The harvested embryos were then cultured *in vitro* in microdroplets of M16 medium (Sigma-Aldrich) under mineral oil at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere until the following stages: late 2-cell (48 hphCG), early 4-cell (52 hphCG), late 4-cell (58 hphCG), early 8-cell (65 hphCG), late 8-cell (72 hphCG), early 16-cell (75 hphCG), late 16-cell (81 hphCG), morula (93 hphCG), late morula (99 hphCG), and blastocyst (102 hphCG).

CX-5461 Treatment

Embryos collected at the one-cell stage (24 hphCG) as described above were cultured at 37°C and in a 5% CO₂ atmosphere in M16 medium containing 80 nM–1 µM CX-5461 (Adooq), which specifically inhibits RNA pol I. CX-5461 was prepared as described by Drygin et al. [42]. The embryos were transferred to new droplets of M16 + CX-5461 every 24 h to ensure optimal action of the drug.

Immunofluorescent Staining of UBF and Nopp140

Oocytes and embryos were fixed by being placed in 4% paraformaldehyde (PFA; EMS) in PBS for 10 min at room temperature. The zona pellucida was removed under a stereomicroscope using 0.1 N HCl (Prolabo); the process usually took only a few seconds and occurred at room temperature. The oocytes and embryos were then permeabilized for 30 min at room temperature using 0.5% Triton X-100 in 0.2% bovine serum albumin (BSA)-PBS (Sigma-Aldrich). Then, the oocytes and embryos were incubated in 2% BSA-PBS for 1 h (to block unspecific binding sites) and processed for *in toto* single or double immunolabeling. The following primary antibodies diluted in 2% BSA-PBS were used: an anti-UBF mouse polyclonal antibody (1:100; H00007343-M01; Novus Biologicals), and an anti-Nopp140 rabbit polyclonal antibody (1:150; RF12 serum; a gift from U. Thomas Meier, Department of Anatomy and Structural Biology, Albert Einstein College of Medicine, New York, New York). The embryos were then incubated with either anti-UBF or anti-Nopp140 antibodies overnight at 4°C. After being washed three times with 0.2% BSA-PBS, the embryos were blocked with 2% BSA-PBS for 30 min and incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse or anti-rabbit Cy3- or Cy5-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.), which were diluted (1:200) in 2% BSA-PBS. DNA counterstaining was performed for 15 min at 37°C using 5 µM YO-PRO (Invitrogen) in PBS. The embryos were washed using PBS and gently mounted on slides using a large amount of Citifluor antifading agent (AFI BioValley) to preserve the 3D structure of the nuclei.

Immuno-RNA Fluorescent *In Situ* Hybridization

Oocytes and embryos were briefly transferred in four successive solutions at 37°C: first, M2 medium; second, Tyrode acidic solution (Sigma-Aldrich); then, M2 medium with 10 mM PMSF; and finally, 0.5% polyvinylpyrrolidone (PVP)-PBS with 10 mM PMSF (Fluka). Thereafter, we performed a fixation/permeabilization in a solution containing 4% PFA, 0.5% Triton X-100, 10 mM PMSF, 0.5% PVP, and 1 µl/ml RNase inhibitor (RNasin; Promega) in PBS 15 min at 37°C. From this step onward, all solutions contained RNasin at 1 µl/ml. After a rinse in 0.5% PVP-PBS, oocytes and embryos were permeabilized 30 min with 0.5% Triton X-100 in 0.5% PVP-PBS and were further blocked with 2% BSA-PBS for 1 h (all of these steps were performed at room temperature). *In toto* double immunolabeling was then performed with anti-UBF and anti-Nopp140 antibodies overnight as described above. After incubation with the secondary antibodies, oocytes and embryos were rinsed in 0.5% PVP-PBS and postfixed in 2% PFA/0.5% PVP-PBS for 10 min at room temperature. Oocytes and embryos were then permeabilized 45 min with 0.5% Triton X-100 in 0.5%

UBF AND Nopp140 IN MOUSE EARLY EMBRYOS

PVP-PBS at 37°C, washed briefly, and transferred for 30 min at 50°C in the prehybridization mix containing 50% formamide (Sigma-Aldrich), 0.5 µg/µl tRNA (Sigma-Aldrich), and 1× hybridization buffer (2× hybridization buffer was prepared beforehand with 20% dextran sulfate, 4× saline-sodium citrate [SSC], 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid, 40 mg/ml BSA, 2 mg/ml PVP, and 0.1% Triton X-100, diluted in pure-grade water). Meanwhile, the mix containing the specific oligonucleotide probe was denatured for 10 min at 85°C and immediately transferred on ice. Oocytes and embryos were then transferred in this hybridization mix and incubated overnight at 42°C. Oocytes and embryos were washed 2× 10 min in 2× SSC, 0.5% PVP, and 0.1% Triton X-100 (diluted with pure grade water), and were gently mounted on slides with Vectashield antifading agent (Eurobio/Abcys) containing 10 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen). The Alexa 488-conjugated probe used for RNA fluorescent in situ hybridization (FISH) was purchased at Eurogentec (5'-ETS-AGAGAA AAGAGCGGA GGTTCGGGACTCAA, described in Kent et al. [45]).

Duolink Assay

The Duolink II in situ proximity ligation assay (PLA; Olink Bioscience) was performed largely in accordance with the manufacturer's instructions; some modifications were necessary to adapt the assay to our biological material (1- to 16-cell mouse embryos). All steps were performed in a preheated, humidified chamber. Embryos were fixed for 10 min at room temperature using 4% PFA and 1 mM PMSF in PBS. After the removal of the zona pellucida using 0.1 N HCl (as described above), the embryos were transferred to a 0.5% PVP-PBS solution (Sigma-Aldrich). The embryos were then permeabilized for 30 min at room temperature using 0.5% Triton X-100 in 0.5% PVP-PBS and were incubated in Olink blocking solution for 30 min at 37°C. In toto double immunolabeling occurred overnight at 4°C using anti-UBF mouse polyclonal antibodies and anti-Nopp140 rabbit polyclonal antibodies (as described above) in Olink antibody diluent. After being washed twice in 0.5% PVP-PBS for 20 min at room temperature, the embryos were incubated with Olink Plus and Minus PLA probes (0.5×) for 2 h at 37°C. After two washes (10 min each) in 0.5% PVP-PBS, the embryos were incubated for 1 h 30 min at 37°C in the ligation solution with the ligase (see also the manufacturer's instructions). After two washes (10 min each) in 0.5% PVP-PBS, amplification was performed by incubating the embryos for 2 h at 37°C in the amplification solution with the polymerase (cf. manufacturer's instructions). After the embryos were washed in 0.5% PVP-PBS, the DNA counterstaining and embryo mounting was performed as described above, except that 10 µg/ml DAPI was used.

BrUTP Microinjection and Immunodetection

To test the efficiency of the CX-5461 treatment, transcription was assessed as previously described [17], at 49 or 52 hphCG. In short, before the microinjection, the embryos were incubated for 30 min at 37°C and in a 5% CO₂ atmosphere in M16 droplets containing 10 µg/ml alpha-amanitin ± 1 µM CX-5461. Then, the embryos were microinjected with 40 µM BrUTP (Sigma-Aldrich) and 50 µg/ml alpha-amanitin ± 1 µM CX-5461. During and after microinjection, the embryos were placed in M2 medium containing 10 µg/ml alpha-amanitin ± 1 µM CX-5461. Thirty minutes after the microinjection, the embryos were fixed overnight at 4°C in 4%. Embryos were then washed for 30 min with PBS and permeabilized for 30 min at room temperature using 0.5% Triton X-100. After blocking in 2% BSA-PBS, embryos were incubated for 1 h at 37°C with an anti-BrdU mouse polyclonal coupled with DyLight 488 (1:50; NB500; Novus Biologicals) that recognizes BrUTP [46]. DNA counterstaining was performed with 5 µg/ml DAPI in PBS for 15 min at 37°C. Finally, the embryos were washed using PBS and mounted on slides as described above.

Fluorescence Microscopy and Image Analysis

The embryos were viewed using either an inverted Zeiss AxioObserver Z1 microscope (equipped with an ApoTome slider, a Colibri light source, and an Axiocam MRm camera) or a Zeiss LSM 700 confocal laser scanning microscope (MIMA2 Platform, INRA). Observations were carried out using a 63× oil-immersion objective (N.A.: 1.3). Entire embryos were scanned using a z-distance of 0.37 µm between optical sections. Fluorescent wavelengths of 405, 488, 555, and 639 nm were used to excite DAPI, DyLight or Alexa 488, Cy3, and Cy5, respectively. Image treatment was performed using ZEN software as follows: for each embryo, the distribution of UBF and Nopp140 was analyzed, section by section, through the entire confocal z-stack. As many nuclei as possible were analyzed for each embryo. For each z-section, several criteria were evaluated, such as the number of NPBs, the size and shape of each signal, their occurrence, and their distribution. These data were then reported on an Excel (Microsoft) sheet for statistical analysis.

Statistical Analyses

Statistical analyses were conducted using R (v. 3.1.2). We used the Rcmdr interface to perform descriptive statistics and the coin and nparcomp packages to perform nonparametric statistics.

RESULTS

Occurrence of UBF and Nopp140 from the Late Two-cell Stage to the Blastocyst Stage

First, we evaluated the occurrence of UBF and Nopp140 proteins in naturally fertilized preimplantation embryos, from the late two-cell stage through the blastocyst stage. After the embryos had been stained using classical immunofluorescence procedures, we carefully mounted them on slides to preserve the 3D structure of the nuclei and to facilitate image analysis, section by section, through the entire confocal z-stack. More than 118 embryos were scanned (approximately 12 for each stage). For the sake of clarity, we use the term "NPB" when the structures presented a central core that showed no sign of DNA staining.

As can be seen in Figure 1, UBF and Nopp140 proteins were observed in the nuclei of embryos of all stages. However, in early-stage embryos, the two proteins were not always associated with NPBs. The NPBs either 1) displayed both Nopp140 and UBF signals (Nopp140/UBF-NPB); 2) displayed the Nopp140 signal only (Nopp140-NPB); or 3) were unlabeled (i.e., had neither the UBF nor the Nopp140 signal; NS-NPB). The frequency of these three NPB classes changed over the course of development (Fig. 2A). In the late two-cell-stage embryos, we observed two major classes of NPBs: those that displayed Nopp140 and UBF signals (~40%; n = 44 nuclei) and those that were unlabeled (~60% per nuclei; n = 44 nuclei). The percentage of unlabeled NPBs then significantly decreased from the two-cell stage to the early four-cell stage (~50%; n = 48 nuclei; P < 0.001, Kruskal-Wallis test) and the late four-cell stage (~20%; n = 49 nuclei; P < 0.001, Kruskal-Wallis test). The third class of NPBs, with the Nopp140 signal only, was observed mainly during the early eight-cell stage (~25%; n = 59 nuclei; Fig. 2, A and B). By the late 8-cell stage (n = 103 nuclei) and the early 16-cell stage (n = 98 nuclei), there were no longer any unlabeled NPBs. The remaining NPBs (on average two per nucleus, for both stages) displayed both Nopp140 and UBF signals. Finally, from the late 16-cell stage to the blastocyst stage, no NPBs (i.e., structures with a central core that showed no sign of DNA staining) were present (Fig. 1).

UBF and Nopp140 Distribution in Early Preimplantation Embryos

Next, we focused on the distribution of UBF and Nopp140 proteins in Nopp140- and UBF-positive NPBs. In late two-cell stage embryos (2cL, Fig. 1, upper panel), high-intensity UBF and Nopp140 signals were observed, colocalizing at the periphery of the NPBs. During the four-cell stage, the Nopp140 signals became more diffuse and formed partial rings in the cortical region of the NPBs, whereas the UBF signals became more abundant and more heterogeneous in size (4cE and 4cL, Fig. 1, upper panel). The pattern observed during the early eight-cell stage was very similar to that observed during the late four-cell stage, except that the Nopp140 rings were complete in the former (8cE, Fig. 1, upper panel). During the late eight-cell stage, the central core of the NPBs was clearly smaller in size and surrounded by a large, irregular zone that was slightly stained for DNA. Nopp140 signals were of greater

KONÉ ET AL.

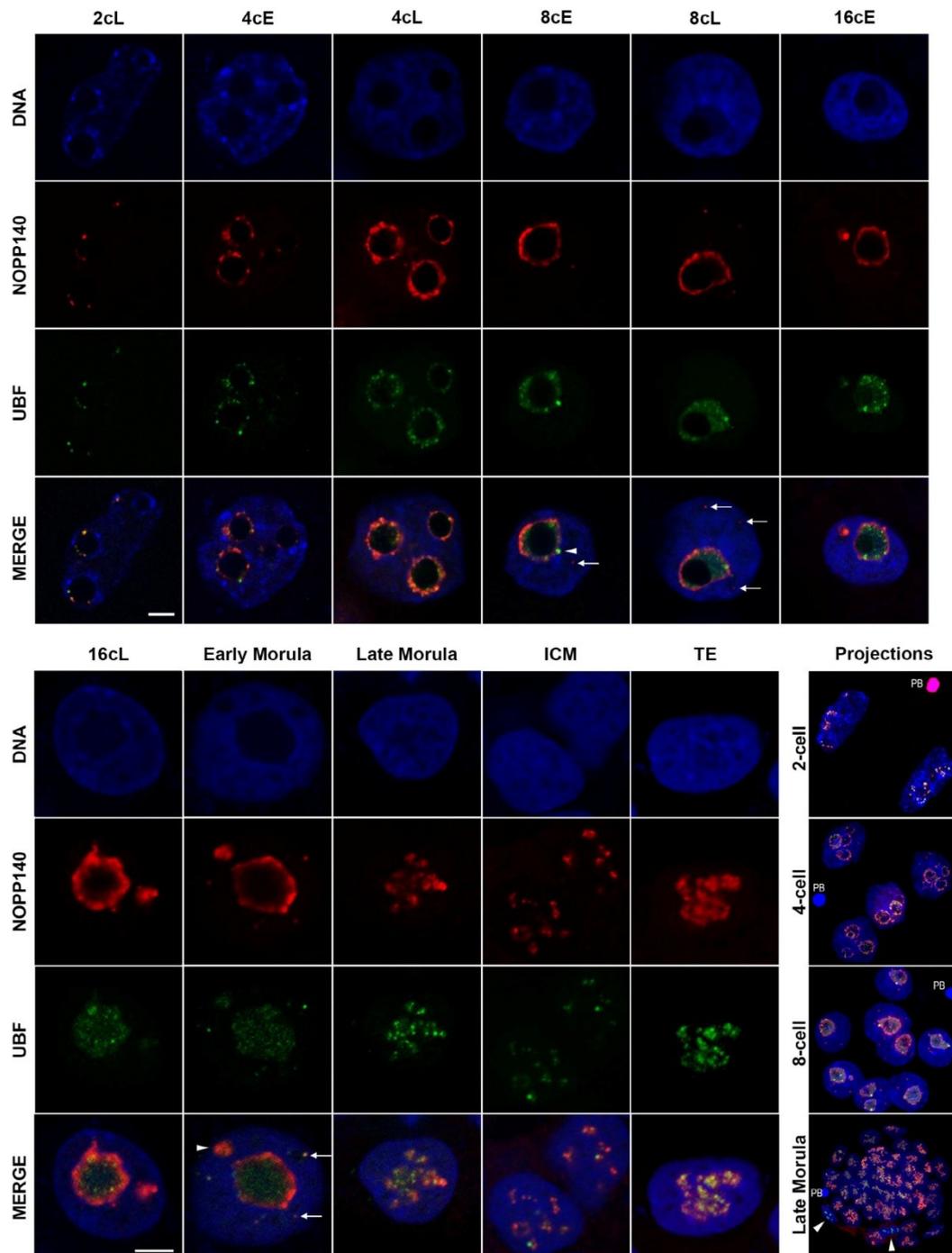


FIG. 1. Distributions of Nopp140 and UBF in mouse embryos during preimplantation development (late two-cell to blastocyst stage). Single representative confocal z-sections of embryos produced by natural fertilization and stained for DNA (blue), Nopp140 (red), and UBF (green); the merged colors are in the last row of each panel. Embryos were fixed either early (E) or late (L) in each stage from the two-cell (2c) to the morula stage. At the blastocyst stage, examples of cells from the inner cell mass (ICM) or the trophoblast (TE) are shown. At the eight-cell stage (8c), an example of a high-intensity nucleolar UBF spot that demonstrated only light Nopp140 staining is indicated by a single arrowhead, and Nopp140 spots in the UBF-devoid

UBF AND Nopp140 IN MOUSE EARLY EMBRYOS

intensity at the periphery of this zone, whereas UBF signals accumulated inside this zone and showed both a diffuse and punctuated distribution (8cL, Fig. 1, upper panel). From the late 2-cell stage to the 16-cell stage we could observe some UBF spots with greater intensity (for example, arrowhead in 8cE, Fig. 1, upper panel). The distributions of UBF and Nopp140 were similar in late 8-cell embryos and 16-cell embryos (16cE, Fig. 1, upper panel). Notably, the dark NPB cores shrank progressively as development progressed, and they disappeared entirely by the end of the 16-cell stage (16cL, Fig. 1, lower panel).

Nucleolar precursor bodies displaying Nopp140 signals occurred more frequently during the late four-cell (12%; $P = 0.1$, Kruskal-Wallis test) and early eight-cell (26%; $P < 0.001$, Kruskal-Wallis test) stages (Fig. 2, A and B). During the late four-cell stage, such NPBs were mostly very small and associated with large Nopp140 spots. During the early eight-cell stage, they were associated with large Nopp140 spots or rings.

In early morulae, the Nopp140 signals predominantly formed thick rings (approximately two per nucleus) that encircled diffuse and punctuated UBF signals, a pattern similar to that seen in late 16-cell-stage embryos (Fig. 1, lower panel). Importantly, another pattern emerged at those stages: Nopp140 signals formed clusters that contained UBF signals (arrowhead in Fig. 1, lower panel). These clusters were seen in the late morula and blastocyst stages, both in inner cell mass and trophoctoderm cells (Fig. 1, lower panel). It is similar to the one that has been observed in the nucleoli of mouse somatic cells [27, 47].

During all of these developmental stages, we detected Nopp140 spots within the nucleoplasm, which were, for the most part, devoid of UBF signals (arrows in 8cE/8cL, Fig. 1, upper panel); a maximum of spots were seen at the 16-cell stage (Fig. 2C). However, sometimes these Nopp140 spots colocalized with UBF, especially at the 2-cell stage and from the 16-cell stage onward (arrows in Early Morula, Figs. 1, lower panel, and 2C). These nucleoplasmic spots were close or even apposed to NPBs and most probably corresponded to Cajal bodies [23, 36].

Interactions Between UBF and NOPP140

The immunofluorescent staining results suggest that UBF and Nopp140 proteins colocalize in the cortical region of the NPBs between the 2-cell and 16-cell stages and in the nucleoplasm at certain other stages. To test whether this reflects a true spatial proximity, we used a new *in situ* PLA technique. This sensitive approach can be used to confirm the presence of interactions between two spatially close proteins (i.e., when they are separated by less than 30–40 nm). Protein-protein interactions are revealed by the presence of fluorescent spots [48–50]. In the PLA experiments, we observed high-intensity spots during all stages (Fig. 3). These spots were mostly localized at the periphery of the NPBs but were sometimes observed in the nucleoplasm (Fig. 3, z-sections). Importantly, the number of PLA spots gradually increased during the course of development, from approximately 2 spots

in the late 2-cell stage to around 18 spots in the 16-cell stage (Fig. 3).

Impact of CX-5461-Mediated RNA Pol I Inhibition on Embryonic Development

Our results show that UBF and NOPP140 proteins are reorganized in the cortical region of NPBs during the course of development, from the late two-cell stage, by which time rDNA transcription has started [17], up until the morula stage. To evaluate the relationship between these morphological and functional changes, we investigated whether UBF and Nopp140 reorganization was dependent on rDNA transcription. We used a novel synthetic inhibitor, CX-5461, which specifically inhibits RNA pol I [51]. First, we determined the effect of this inhibitor on embryonic development. One-cell-stage embryos were collected and cultured at various concentrations of CX-5461 (80 nM, 300 nM, 500 nM, and 1 μ M; as previously tested on cells [42–44]). At CX-5461 concentrations of 80, 300, and 500 nM, embryos reached the blastocyst stage, but their morphological quality was quite poor (data not shown). Embryos cultured with 1 μ M CX-5461 never reached the blastocyst stage (Table 1). Treated embryos cleaved normally going from the one-cell to the two-cell stage (comparable to controls), but the cleavage needed to reach the four-cell stage was delayed. Compared with 63% of the control embryos, only 42% of the treated embryos were at the four-cell stage 28 h after having been transferred into the culture drops containing CX-5461 (D2 +28H; statistically different with $P < 0.001$, Fisher test). The percentage of four-cell embryos in the treatment group climbed to 66% 20 h later (D2 +48H), but none of them gave rise to eight-cell embryos (Table 1).

To check whether CX-5461's strong detrimental effects on development were indeed due to its inhibition of RNA pol I, we analyzed rDNA transcriptional activity in embryos treated with 1 μ M CX-5461. Such concentrations are supposed to reduce the rate of rDNA transcription in somatic cells by up to 90% [42]. We used BrUTP signaling to reveal patterns of rDNA transcription in control and CX-5461-treated late two-cell-stage embryos [17]. As expected, 92% of control embryos contained large clusters of BrUTP signals in their NPBs (Fig. 4 and Table 2). In contrast, in the treatment group, only 33% of embryos displayed BrUTP signals. Furthermore, BrUTP signaling was of lower intensity in the treated embryos than in the control embryos. Because the treated embryos developed more slowly (Table 1), we analyzed their rDNA transcription levels 4 h later than for the control group (28 h after transfer to the culture drops containing CX-5461). Although the percentage of BrUTP-positive embryos was higher in the treatment group (58%), the signals were of lower intensity (Fig. 4 and Table 2). Taken together, these results confirm that CX-5461 inhibits embryonic rDNA transcription and development.

Impact of CX-5461-Mediated RNA Pol I Inhibition on UBF and Nopp140 Distribution

Next, we examined the impact of CX-5461 on the localization patterns of UBF and Nopp140 using the

nucleoplasm are indicated by arrows (upper). In the early morulae, Nopp140/UBF spots present in the nucleoplasm are indicated by arrows, and clusters of Nopp140 proteins that colocalized with UBF proteins are indicated by a single arrowhead (lower). Bar = 10 μ m. Full 3D projections of some of the analyzed embryos are shown in the bottom right column to illustrate the homogeneity observed between cells within each embryo (PB indicates polar body). In morula, two cells that are in mitosis (arrowheads) do not present any Nopp140 signal but only some UBF spots that remain bound to chromosomes, as expected [17].

KONÉ ET AL.

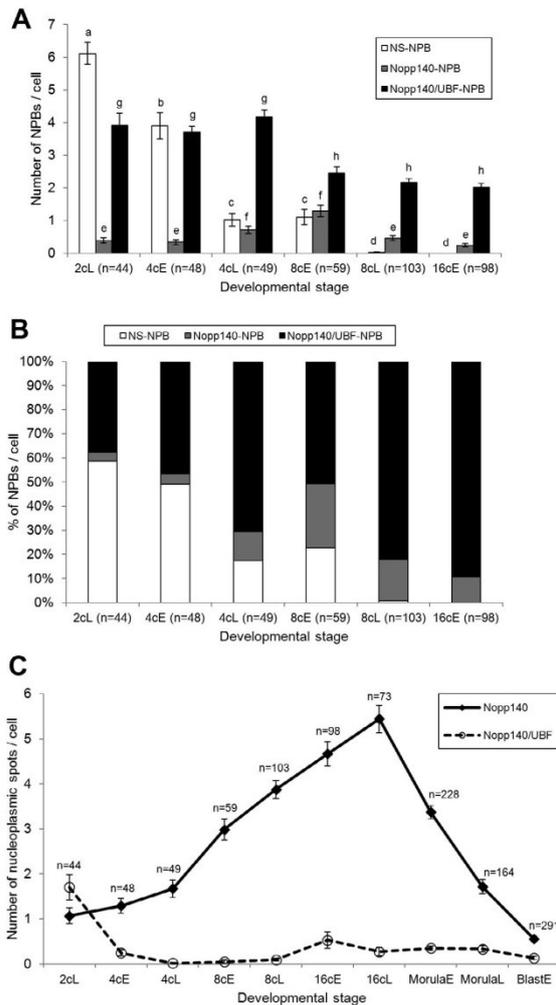


FIG. 2. Statistical analysis of Nopp140 and UBF signals. Images were analyzed, section by section, through the entire confocal z-stack, and several criteria were evaluated in as many nuclei as possible for each embryo. The two upper panels show the frequency (A) and proportion (B) of NPBs per cell according to their Nopp140 and UBF signals during early development (from late 2-cell stage [2cL] to early 16-cell stage [16cE]). Black bars: NPBs displaying both Nopp140 and UBF signals (Nopp140/UBF-NPB); gray bars: NPBs displaying a Nopp140 signal only (Nopp140-NPB); white bars: NPBs with no signals (NS-NPB). Mean values \pm standard errors are given. Bars with different superscripts (a,b,c,d/e,f/g,h) indicate significantly different values between developmental stages within each type of NPB ($P < 0.001$; Kruskal-Wallis test). C) Images were analyzed, section by section, through the entire confocal z-stack, and the number of Nopp140 nucleoplasmic spots with or without tandem UBF signals (continuous line vs. dotted line, respectively) were evaluated in as many nuclei as possible for each embryo from late two-cell stage (2cL) to early blastocyst stage (BlastE). Mean values \pm standard errors are given. For all panels, the total number of nuclei analyzed is indicated. As many nuclei as possible were analyzed per embryo for each developmental stage: 2cL, n = 23 embryos; 4cE, n = 13 embryos; 4cL, n = 17 embryos; 8cE, n = 8 embryos; 8cL, n = 15 embryos; 16cE, n = 7 embryos; 16L, n = 8 embryos; MorulaE, n = 11 embryos; MorulaL, n = 12 embryos; BlastE, n = 15 embryos.

immunofluorescent staining technique described above. We observed very distinct patterns in CX-5461-treated versus control embryos. In two-cell embryos in the treatment group, Nopp140 was distributed all around the NPBs, forming rings containing few UBF signals (n = 14 nuclei; D2 + 24h, Fig. 5). In four-cell embryos in the treatment group (+28 h and +48 h after transfer to culture drops containing CX-5461; n = 37 and 118, respectively), large UBF spots surrounded by Nopp140 signals were regularly observed forming concave structures or “caps” (arrowheads in Fig. 5). In addition, we also often observed nuclear protrusions (arrows in Fig. 5) in CX-5461-treated embryos, which underscores their poor morphological quality.

In transcriptionally inactive oocytes, Zatspeina et al. [52] have observed RNA pol I/UBF foci localized at the periphery of the nucleoluslike bodies. We thus coimmunostained transcriptionally inactive oocytes using anti-Nopp140 and anti-UBF antibodies. We observed in these oocytes similar Nopp140/UBF “caps” at the periphery of the nucleoluslike bodies (Fig. 5; n = 11) as in the four-cell treated embryos. This suggests that “caps” are a consequence of transcriptional inhibition resulting from the segregation of nucleolar components, as has been observed in somatic cells inhibited with actinomycin-D [41, 53].

We therefore analyzed rDNA transcription in relation to the distribution of UBF and Nopp140 proteins by double immunofluorescence with a probe that specifically binds to the 5' external transcribed spacer (5'-ETS) of the 47S pre-rRNA transcript. In four-cell embryos Nopp140, UBF, and 5'-ETS showed a peculiar distribution: the 5'-ETS signal was less diffuse and juxtaposed to Nopp140-UBF “caps” in the treatment group, whereas in the control embryos it formed thick rings in which Nopp140 and UBF signals were embedded (Fig. 6). Moreover, the 5'-ETS signal was of much lower intensity in the treated embryos than in the control embryos (Fig. 6). Because immunostainings for UBF and Nopp140 look alike in transcriptionally inactive oocytes (Fig. 5), we also performed immuno-RNA FISH on oocytes. Notably, the immuno-RNA FISH signal observed in the transcriptionally inactive oocytes was quite similar to the one observed in treated embryos (Fig. 6).

Taken together, these results confirm that inhibition of rDNA transcription in early embryos by CX-5461 is accompanied by a profound reorganization of UBF and Nopp140.

DISCUSSION

The aim of our study was to analyze in detail nucleolusgenesis in mouse preimplantation embryos. This study is the first to describe the distribution of both UBF and Nopp140 from the two-cell through the blastocyst stage.

NPB Heterogeneity Between the Two-Cell Stage and the Early Eight-Cell Stage

The first striking characteristic of early embryonic development is that NPBs were heterogeneously associated with UBF and Nopp140. Zatspeina et al. [17] have proposed that unlabeled NPBs (NS-NPB) could either lack associations with chromosomes bearing rDNA sequences or form associations with inactive ribosomal genes. Fluorescent in situ hybridization experiments on one- and two-cell embryos have shown that not all NPBs are associated with rDNA (Aguirre-Lavin et al. [54] and Romanova et al. [55]; our unpublished data). We could thus assume that the NS-NPB population observed in our study at late two-cell stage is not associated with ribosomal genes.

UBF AND Nopp140 IN MOUSE EARLY EMBRYOS

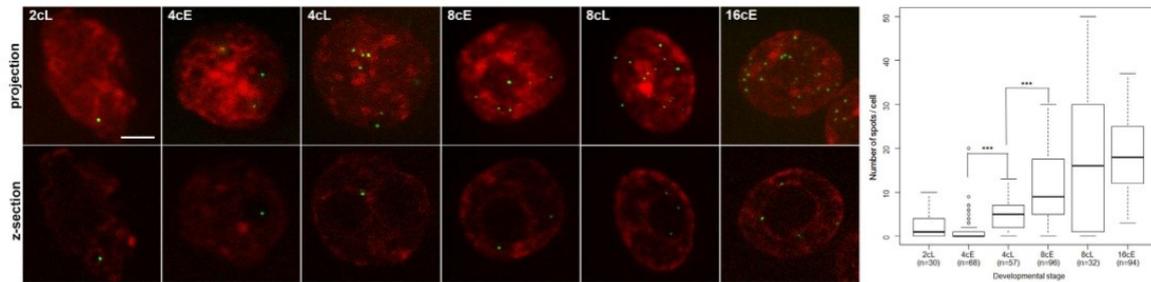


FIG. 3. Interactions between UBF and Nopp140 at different developmental stages as detected using a proximity ligation assay technique. The green fluorescent dots indicate that the distance between UBF and Nopp140 was less than 30–40 nm. The proteins demonstrated this degree of proximity during all of the stages studied, from the late 2-cell (2cL) stage to the early 16-cell (16cE) stage. DNA is stained in red. The upper row images are projections of all of the z-sections, and the lower row corresponds to single representative z-sections (apoptome) showing that colocalization mostly occurred near the NPBs. Bar = 10 μm. The box plots on the right side show the number of fluorescent dots obtained. The asterisks indicate when a significant difference was found ($P < 0.001$; Kruskal-Wallis test) between two consecutive stages. The number of nuclei analyzed per stage is indicated. As many nuclei as possible were analyzed per embryo for each developmental stage: 2cL, n = 25 embryos; 4cE, n = 24 embryos; 4cL, n = 22 embryos; 8cE, n = 22 embryos; 8cL, n = 14 embryos; 16cE, n = 23 embryos.

This heterogeneity in the Nopp140 and UBF signals also raises questions about the different possible contents and functions of the different NPBs. Biggiogera et al. [21] showed that NPBs contain RNA, fibrillarin, and other components, such as ribosomal proteins, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, and nucleoplasmic small nuclear ribonucleic proteins; however, they did not analyze whether these components were present in all NPBs. Thus, even if two different groups [25, 56] have recently observed B23/nucleoplamin, C23/nucleolin, and fibrillarin in all of the NPBs from the one-cell to the blastocyst stages, we can suggest that the NPBs displaying no UBF signal may serve to store other nucleolar components.

In addition, the percentage of NPBs not displaying a UBF signal significantly decreased within stages and during the course of development (Fig. 2B). These NPBs may be equivalent to the heterogeneous prenucleolar bodies of various compositions that have been observed at the beginning of interphase in somatic cells [9, 57, 58] and that rapidly fuse to form nucleoli. Nucleolar precursor body fusion has indeed already been amply documented in embryos [17, 59].

Starting at the late eight-cell stage, NPBs with both Nopp140 and UBF signals were fairly pervasive, suggesting that all of the NPBs present from this point on are involved in

rRNA production and early processing. This supports the recent publication by Lavrentyeva et al. [56] showing accumulation of processed pre-rRNA in NPBs in embryos with more than four cells.

UBF and Nopp140 Distributions Diverge Rapidly after the Onset of Transcription

During the late two-cell and four-cell stages, the localization of UBF and Nopp140 around the periphery of the NPBs is consistent with that previously observed by Baran et al. [23] and Zatssepina et al. [17]. The latter further showed that UBF spots are associated with new rRNA transcripts. These spots were quite large in these earlier stages, suggesting that several transcription units were concentrated at the same point and that the chromatin was still quite structurally compact. Because Nopp140 has been shown to interact with snoRNPs [38, 39], each UBF/Nopp140 spot could correspond to one ribosomal transcription and early processing site. If so, the rings of UBF signals that formed around the NPBs may represent active tandemly repeated rDNA sequences.

Thereafter, patterns of protein distribution changed drastically. Starting at the 8-cell stage, the area occupied by the two

TABLE 1. Development of embryos upon transfer into culture drops (Day 1 [D1], T0) with 1 μM CX-5461 or without (control).^a

Embryo	D (T0)	D2 (+24 h)	D2 (+28 h)	D3 (+48 h)	D3 (+52 h)	D4 (+72 h)	D5 (+96 h)
Control							
1-Cell	104 (100%)	6 (6%)	5 (5%)	4 (4%)	3 (3%)	3 (3%)	3 (3%)
2-Cell		98 (94%)	31 (32%)	2 (2%)	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)
4-Cell			68 (63%)	7 (6%)	3 (3%)	3 (3%)	3 (3%)
8-Cell				91 (88%)	17 (16%)	3 (3%)	3 (3%)
16-Cell					80 (77%)	12 (11%)	2 (2%)
Morula						60 (56%)	—
Blastocyst						22 (23%)	92 (88%)
CX-5461							
1-Cell	78 (100%)	28 (32%)	28 (32%)	18 (20%)	18 (20%)	18 (20%)	18 (20%)
2-Cell		50 (68%)	21 (26%)	12 (13%)	12 (13%)	12 (13%)	12 (13%)
4-Cell			29 (42%)	48 (66%)	48 (66%)	48 (66%)	48 (66%)
8-Cell				—	—	—	—
16-Cell				—	—	—	—
Morula				—	—	—	—
Blastocyst				—	—	—	—

^a Development was evaluated every day (D1 up to D5), and the number of embryos at each stage (as well as the corresponding percentage) is indicated. Three different experiments were pooled.

KONÉ ET AL.

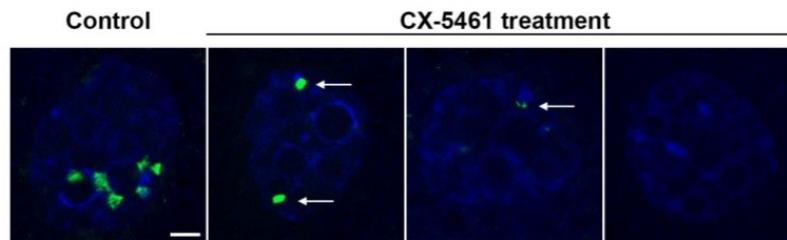


FIG. 4. Pol I-dependent transcription in control and CX-5461-treated late two-cell-stage embryos. Representative images (apoptome single z-sections) of transcription after BrUTP microinjections in control and CX-5461-treated embryos. DNA was counterstained with DAPI (blue). The BrUTP signal (green) was much less diffuse and of lower intensity in the CX-5461-treated embryos (arrows) than in the control embryos; sometimes it was even absent. Bar = 10 μ m.

proteins at the periphery of the NPBs expanded and the dark NPB core gradually diminished in size, disappearing by the late 16-cell stage, thus allowing UBF to occupy the center of the former NPB, whereas Nopp140 formed a thick ring of great intensity at its periphery. This redistribution parallels the ultrastructural modifications that have been described in mouse embryos using electron microscopy: a reticulation process starts at the NPB periphery and includes the emergence of intermingled fibrillar and granular compartments [13, 15, 19, 20]. This process gives rise to a nucleolonema, which corresponds to the fibrillar part of the reticulated structure that emerges from the NPB cortex. Geuskens and Alexandre [20] further showed that rDNA is transcribed in the fibrillar part of this reticulated peripheral structure and that the nascent rRNA is then transported to the granular part. Our results are consistent with these findings.

We never observed any Nopp140 or UBF signals in the core of the NPBs, which is consistent with results from other studies of mouse embryos that examined the localization of other nucleolar proteins using immunostaining [17, 22, 24, 60–62]. However, several authors [15, 24] using immunoelectron microscopy have shown that some nucleolar proteins are present in the inner core of NPBs from the one-cell to the eight-cell stage. It should be pointed out, however, that Fulka and Langerova [25] recently detected nucleolar proteins, including UBF, in the NPB core using an antigen-retrieval technique. Thus, the lack of signaling in the central core of NPBs does not mean that Nopp140 and UBF were indeed absent from the region.

Finally, during the late morula stage, the NPBs disappeared and the Nopp140 and UBF signals intermingled in three to six large clusters that were clumped together (Fig. 1, lower panel). This pattern is very similar to the one observed in the nucleoli of somatic cells [26, 27].

Nopp140 Nucleoplasmic Foci

We also detected Nopp140 signals in the nucleoplasm, generally in close proximity to the NPBs, which fits with the findings of Baran et al. [23]. Because there is ample evidence

that Nopp140 interacts with coilin [35–37, 63], our results strongly suggest that these nucleoplasmic foci are Cajal (coiled) bodies [64]. Moreover, Nopp140 has been described as a chaperone of the snoRNPs involved in rRNA processing and, as such, it should shuttle between the nucleolus and the coiled bodies [37–39]. Our findings support this idea.

Surprisingly, the number of Nopp140 nucleoplasmic spots increased dramatically up until the late 16-cell stage and then decreased (Fig. 2C). Previous studies have shown that Cajal body number increases when cells are stimulated to grow rapidly or when high levels of gene expression are induced [63, 65]. It may also be due to the fact that these highly dynamic structures undergo regulated cycles of assembly and disassembly [66–68]. Consequently, it could be informative to analyze their size distribution.

Interactions Between UBF and Nopp140

Using the highly sensitive PLA (Duolink) technique, we were able to detect molecular interactions between UBF and Nopp140 (i.e., a distance of less than 40 nm). Interestingly, the number of spots per nucleus became significant at the late 4-cell stage and increased up to the 16-cell stage. It should be noted that we quantified the total number of spots regardless of their localization because DNA staining in PLA assay was not good enough to allow a precise discrimination of NPBs. However, PLA spots seem to be more abundant around NPBs (z-section images in Fig. 4) and could be linked to several processes. First, Nopp140 and UBF have been found to be localized in both the FC and the DFC [26, 27], which are intermingled [7, 9, 57, 69, 70]. The 3D intermingling of these two NPB compartments could result in the close spatial proximity of these two proteins. Second, UBF is a component of the RNA pol I holoenzyme [6, 30], and it has been shown that Nopp140 colocalizes with RNA pol I [23, 71]. Indeed, it interacts with RPA subunit 194 [41] and casein kinase II, which also belongs to the RNA pol I transcriptional machinery [40, 41, 72]. Thus, the spatial organization of the holoenzyme components could result in the close spatial proximity of UBF and Nopp140. Third, Nopp140 and other factors that form part

TABLE 2. BrUTP signal in control and CX-5461 treated two-cell embryos at different time points on Day 2.*

Treatment	No. of embryos	Large BrUTP patches, n (%)	Small BrUTP patches, n (%)	No BrUTP signal, n (%)
Control (D2 +24 h)	39	29 (74) ^a	7 (18) ^a	3 (7) ^a
CX-5461 (D2 +24 h)	21	5 (24) ^b	2 (9) ^a	14 (66) ^b
CX-5461 (D2 +28 h)	39	8 (20) ^b	15 (38) ^b	16 (41) ^b

* This experiment was performed in triplicate.

^{a,b} Within the same column, values with different superscripts indicate significantly different values ($P < 0.05$; Kruskal-Wallis test).

UBF AND Nopp140 IN MOUSE EARLY EMBRYOS

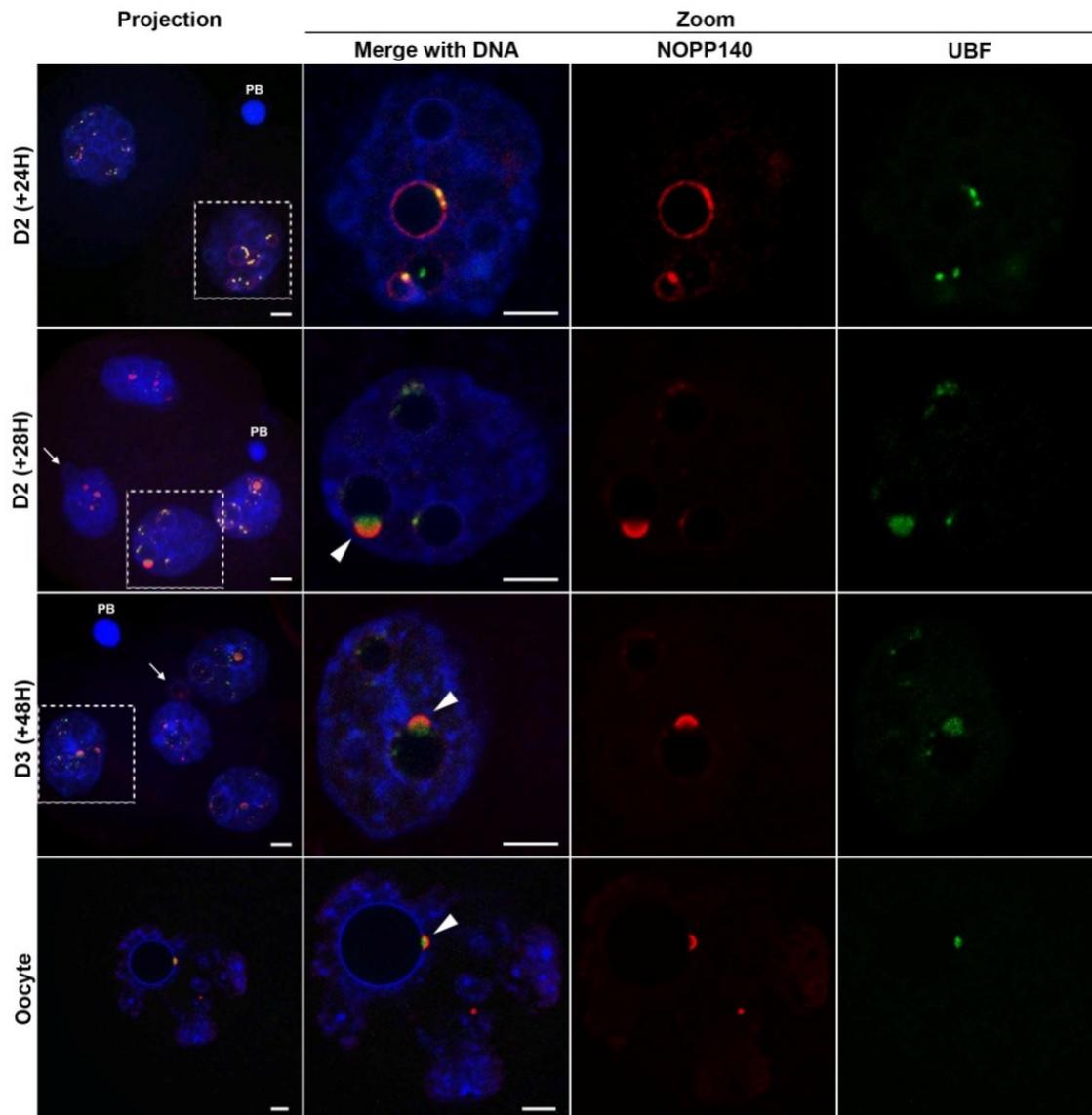


FIG. 5. Impact of the CX-5461 treatment on UBF and Nopp140 distributions. Representative images of CX-5461-treated embryos at various time points after their transfer to drops containing the inhibitor (three upper rows) and of transcriptionally inactive oocytes (last row). DNA is stained blue, Nopp140 is stained red, and UBF is stained green. Whole-embryo projections are shown in the first column, and enlarged single z-sections are shown in the other three columns (the corresponding nuclei are indicated on the projection). The Nopp140 and UBF “caps” are indicated by arrowheads, and the nuclear protrusions are indicated by arrows. PB indicates polar body. Bar = 10 μ m.

of the pre-rRNA processing machinery are known to associate with rDNA outside of rRNA synthesis, and UBF is necessary for the recruitment process [10]. Maden [73] and Yang et al. [38] have also suggested that transcription and processing could occur simultaneously. In this case, complexes and proteins involved in these two steps of ribosomal biogenesis could be grouped at rDNA transcription sites and thus be close enough to interact with each other.

On the other hand, some PLA spots were also observed in the nucleoplasm. We believe these could correspond to the few putative coiled bodies displaying both Nopp140 and UBF signals as observed by immunodetection (Fig. 4C). Indeed, it has been shown that factors forming part of the RNA pol I machinery are present in the Cajal bodies [74]; however, UBF’s presence is very transient because it is rapidly recruited to the nucleoli [75]. Whereas this colocalization was not often visible by immunodetection, we most probably caught this

KONÉ ET AL.

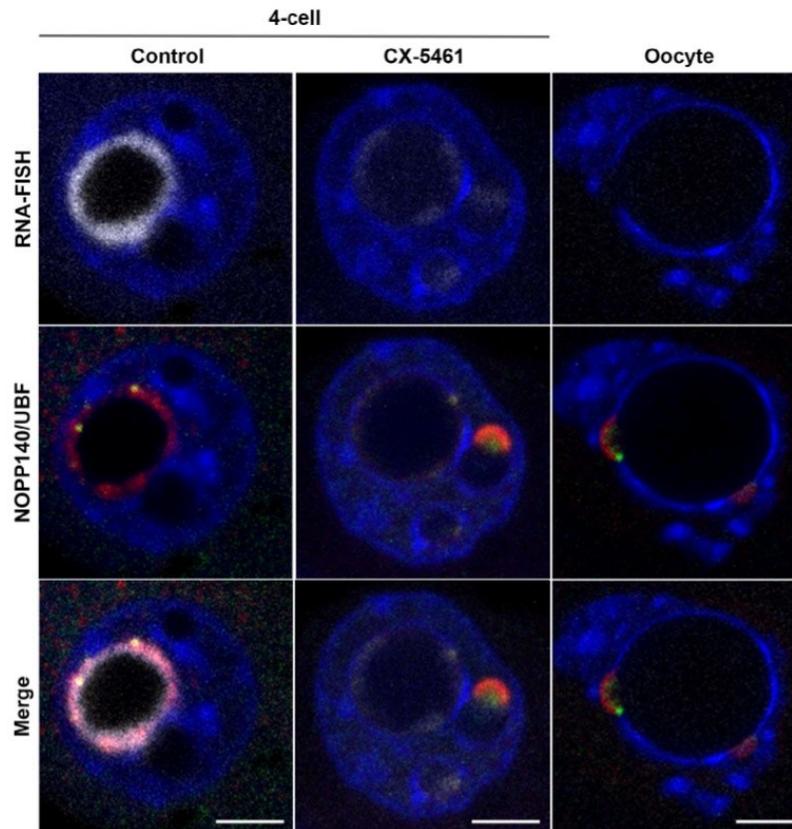


FIG. 6. Impact of the CX-5461 treatment on rDNA transcription and UBF-Nopp140 distributions. Representative images of four-cell control embryos (56 hphCG) and CX-5461-treated embryos (D2 +48 h after their transfer to drops containing the inhibitor) and of transcriptionally inactive oocytes are shown. Ribosomal RNA transcription was detected by RNA-FISH, with a 5&prime-ETS probe in white, Nopp140 stained red, and UBF stained green. Single z-sections with the 5&prime-ETS signal alone are shown in the upper row, and Nopp140/UBF signals are shown in the second row (with blue DNA counterstaining). The last row corresponds to the merged immuno-RNA FISH. Bar = 5 μ m.

transient event with the PLA procedure because of the 2-h amplification step.

RNA Pol I Inhibition by CX-5461

To analyze the link between nucleologenesis and rDNA transcription, we used CX-5461 to specifically inhibit RNA pol I activity. Embryos treated with 0.5 μ M CX-5461 reached the blastocyst stage (27%; n = 15), which contrasts with previous findings that 0.5 μ M CX-5461 can block the embryos in the one-cell stage [76]. This discrepancy could be explained by methodological differences: 1) the fertilization procedure used (natural mating vs. in vitro fertilization), 2) the time of exposure to the drug (24 hphCG vs. fertilization), and 3) the solution used to resuspend the drug (NaH₂PO₄ vs. DMSO). Anyway, we observed blastocysts of poor quality.

Treatment with 1 μ M CX-5461 led to a decrease in the number of two-cell embryos engaged in rDNA transcription, as well as lower-intensity signaling and a more diffuse distribution of transcription sites as revealed by BrUTP incorporation and RNA FISH. Our data concur with those of Drygin et al. [42], who showed that 1 μ M CX-5461 can considerably reduce the ribosomal gene transcription rate (90%). The small amount

of residual transcription observed in the embryos suggests that a few sites are still active but are functioning at lower levels. In addition, the increase in the number of two-cell embryos transcribing between 24 and 28 h after transfer to the culture drops containing CX-5461 could reflect a delay in the initiation of ribosomal gene transcription. In any case, the low transcription levels in CX-5461-treated embryos could be related to the developmental delay and arrest observed at the four-cell stage.

Recently, Lavrentyeva et al. [56] have shown by RNA FISH that one-cell embryos are significantly impoverished for RNA and that in late two-cell embryos nascent rRNAs appear on NPB surface, supporting our results. Moreover, we confirmed here by immuno-RNA FISH that UBF and Nopp140 are indeed localized at the initiation sites of rRNA synthesis on the NPB surface in four-cell embryos.

More interestingly, we observed that the CX-5461 treatment led to a reorganization of nucleolar components at both the two- and four-cell stages. In particular, in four-cell treated embryos, Nopp140 and UBF formed “nucleolar caps.” Those caps correspond to those observed in transcriptionally inactive oocytes (Figs. 5 and 6) [52]. Similar distributions of Nopp140 and UBF have also been observed during interphase in the

UBF AND Nopp140 IN MOUSE EARLY EMBRYOS

nucleoli of actinomycin-D-treated somatic cells [41, 53, 77]. These findings strongly suggest that the inhibition of ribosomal transcription leads to the reorganization of nucleolar proteins and probably that of the nucleolar compartment.

Taken together, these data suggest that 1) the structural organization of nucleoli in the mouse embryo is tightly linked to RNA pol I transcription, and 2) ribosomal transcription is essential for long-term development.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Prof. U. Thomas Meier and Dr. Marie Françoise O'Donohue for their scientific support. We are grateful to Claire Boulesteix and Tiphaine Aguirre-Lavin for their help in running the lab. We also acknowledge Pierre Adenot and the platform MIMA2 (Microscopie et Imagerie des Microorganismes, Animaux et Elements) for microscopy equipment, as well as UE IERP for animal care (Unité Expérimentale d'Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons).

REFERENCES

1. Bultman SJ, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda P, Schultz RM, Magnuson T. Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes Dev* 2006; 20:1744–1754.
2. Schultz RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 323–331.
3. Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J Reprod Dev* 2007; 53:707–715.
4. Lo SJ, Lee CC, Lai HJ. The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings. *Cell Res* 2006; 16:530–538.
5. Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nature* 2007; 8:574–585.
6. Raška I, Kobema K, Malínský J, Fidlerová H, Mašata M. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* 2004; 96:579–594.
7. Derenzini M, Pasquinelli G, O'Donohue MF, Ploton D, Thiry M. Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem* 2006; 54:131–145.
8. Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DLJ. The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2010; 1:415–431.
9. Hernandez-Verdun D. The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol* 2006; 126:135–148.
10. Ueshima S, Nagata K, Okuwaki M. Upstream binding factor-dependent and pre-rRNA transcription-independent association of pre-rRNA processing factors with rRNA gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 443:22–27.
11. Engel W, Zenzes MT, Schmid M. Activation of mouse ribosomal RNA genes at the 2-cell stage. *Hum Genet* 1977; 38:57–63.
12. Kobema K, Landa V, Kaňka J, Pliss A, Eltsov M, Staněk D, Raška I. Non-isotopic detection of nucleolar transcription in pre-implantation mouse embryos *Reprod Nutr Dev* 1998; 38:117–126.
13. Takeushi IK, Takeushi YK. Ultrastructural localization of Ag-NOR proteins in full-grown oocytes and preimplantation embryos of mice. *J Electron Microscop* (Tokyo) 1986; 35:280–287.
14. Fléchon JE, Kopečný V. The nature of the 'nucleolus precursor body' in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. *Zygote* 1998; 6:183–191.
15. Biggiogera M, Bürki K, Kaufmann SH, Shaper JH, Gas N, Amalric F. Nucleolar distribution of proteins B23 and nucleolin in mouse preimplantation embryos as visualized by immunoelectron microscopy. *Development* 1990; 1270:1263–1270.
16. Prather R, Simerly C, Schatten G, Pilch DR, Lobo SM, Marzluff WF, Dean WL, Schultz GA. U3 snRNPs and nucleolar development during oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis in the mouse: U3 snRNA and snRNPs are not regulated coordinate with other snRNAs and snRNPs. *Dev Biol* 1990; 138:247–255.
17. Zatssepina O, Baly C, Chebrou M, Debey P. The step-wise assembly of a functional nucleolus in preimplantation mouse embryos involves the Cajal (coiled) body. *Dev Biol* 2003; 83:66–83.
18. Piko L, Clegg KB. Quantitative changes in total RNA, total poly (A), and ribosomes in early mouse embryos. *Dev Biol* 1982; 89:362–378.
19. Fakan S, Odartchenko N. Ultrastructural organization of the cell nucleus in early mouse embryos. *Biol Cell* 1980; 37:211–217.

20. Geuskens M, Alexandre H. Ultrastructural and autoradiographic studies of nucleolar development and rDNA transcription in preimplantation mouse embryos. *Cell Differ* 1984; 14:125–134.
21. Biggiogera M, Martin T, Gordon J, Amalric F, Fakan S. Physiologically inactive nucleoli contain nucleoplasmic ribonucleoproteins: immunoelectron microscopy of mouse spermatids and embryos. *Exp Cell Res* 1994; 213:55–63.
22. Baran V, Veselá J, Reháč P, Koppel J, Fléchon J. Localization of fibrillarin and nucleolin in nucleoli of mouse preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 1995; 40:305–310.
23. Baran V, Brochard V, Renard JP, Flechon JE. Nopp 140 involvement in nucleolegenesis of mouse preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 2001; 59:277–284.
24. Cuadros-Fernández JM, Esponda P. Immunocytochemical localisation of the nucleolar protein fibrillarin and RNA polymerase I during mouse early embryogenesis. *Zygote* 1996; 4:49–58.
25. Fulka H, Langerova A. The maternal nucleolus plays a key role in centromere satellite maintenance during the oocyte to embryo transition. *Development* 2014; 141:1694–1704.
26. Roussel P, André C, Masson C, Géraud G, Hernandez-Verdun D. Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J Cell Sci* 1993; 337:327–337.
27. Thiry M, Cheutin T, Lamaye F, Thelen N, Meier UT, Donohue MO, Ploton D. Localization of Nopp140 within mammalian cells during interphase and mitosis. *Histochem Cell Biol* 2009; 132:129–140.
28. Jantzen HM, Admon A, Bell SP, Tjian R. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 1990; 344:830–836.
29. Panov KI, Friedrich JK, Russell J, Zomerdijk JC. UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *EMBO J* 2006; 25:3310–3322.
30. Grummt I. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* 2003; 17:1691–1702.
31. Grummt I. Wisely chosen paths – regulation of rRNA synthesis. *FEBS J* 2010; 277:4626–4639.
32. Russell J, Zomerdijk JCBM. The RNA polymerase I transcription machinery. *Biochem Soc* 2006; 73:203–216.
33. Sanij E, Hannan RD. The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin. *Epigenetics* 2009; 4:374–382.
34. Meier UT. A nuclear localization signal binding protein in the nucleolus. *J Cell Biol* 1990; 111:2235–2245.
35. Meier UT, Blobel G. Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. *Cell* 1992; 70:127–138.
36. Meier U, Blobel G. NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria. *J Cell Biol* 1994; 127:1505–1514.
37. Isaac C, Yang Y, Meier UT. Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. *J Cell Biol* 1998; 142: 319–329.
38. Yang Y, Isaac C, Wang C, Meier UT. Conserved composition of mammalian box H/ACA and box C/D small nucleolar ribonucleoprotein particles and their interaction with the common factor Nopp140. *Mol Biol Cell* 2000; 11:567–577.
39. Wang C, Query CC, Meier UT. Immunopurified small nucleolar ribonucleoprotein particles pseudouridylate rRNA independently of their association with phosphorylated Nopp140. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 8457–8466.
40. Li D, Meier UT, Dobrowolska G, Krebs EG. specific interaction between casein kinase 2 and the nucleolar protein Nopp140. *J Biol Chem* 1997; 272:3773–3779.
41. Chen H, Pai C, Huang J, Chen H, Pai C, Huang J. Human Nopp140, which interacts with RNA polymerase I: implications for rRNA gene transcription and nucleolar structural organization. *Mol Cell Biol* 1999; 19:8536–8546.
42. Drygin D, Lin A, Bliesath J, Ho CB, O'Brien SE, Proffitt C, Omori M, Haddach M, Schwaebe MK, Siddiqui-Jain A, Streiner N, Quin JE, et al. Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res* 2011; 71:1418–1430.
43. Bywater MJ, Poortinga G, Sanij E, Hein N, Peck A, Cullinane C, Wall M, Cluse L, Drygin D, Anderes K, Huser N, Proffitt C, et al. Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell* 2012; 22:51–65.
44. Haddach M, Schwaebe MK, Michaux J, Nagasawa J, O'Brien SE, Whitten JP, Pierre F, Kerdoncuff P, Darjania L, Stansfield R, Drygin D, Anderes K, et al. Discovery of CX-5461, the first direct and selective inhibitor of

KONÉ ET AL.

- RNA polymerase I, for cancer therapeutics. *ACS Med Chem Lett* 2012; 3: 602–606.
45. Kent T, Lapik YR, Pestov DG. The 5' external transcribed spacer in mouse ribosomal RNA contains two cleavage sites. *RNA* 2009; 15:14–20.
 46. Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Guibert J, Beaujean N, Szöllösi MS, Debey P. Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biol Reprod* 1999; 60:580–587.
 47. Sharma P, Murillas R, Zhang H, Kuehn MR. N4BP1 is a newly identified nucleolar protein that undergoes SUMO-regulated polyubiquitylation and proteasomal turnover at promyelocytic leukemia nuclear bodies. *J Cell Sci* 2010; 123:1227–1234.
 48. Hervouet E, Vallette F, Cartron P. Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics* 2009; 4: 487–499.
 49. Naegel K, White F, Lauffenburger D, Yaffe M. Robust co-regulation of tyrosine phosphorylation sites on proteins reveals novel protein interactions. *Mol Biosyst* 2012; 8:2771–2782.
 50. Choo YY, Hagen T. Mechanism of cullin3 E3 ubiquitin ligase dimerization. *PLoS One* 2012; 7:1–8.
 51. Drygin D, Rice WG, Grummt I. The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50:131–156.
 52. Zatssepina OV, Bouniol-baly C, Amirand C, Debey P. Functional and molecular reorganization of the nucleolar apparatus in maturing mouse oocytes. *Dev Biol* 2000; 370:354–370.
 53. Shav-tal Y, Blechman J, Darzacq X, Montagna C, Dye BT, Patton JG, Singer RH, Zipori D. Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 2395–2413.
 54. Aguirre-Lavin T, Adenot P, Bonnet-Garnier A, Lehmann G, Fleuret R, Boulesteix C, Debey P, Beaujean N. 3D-FISH analysis of embryonic nuclei in mouse highlights several abrupt changes of nuclear organization during preimplantation development. *BMC Dev Biol* 2012; 12:30.
 55. Romanova L, Korobova F, Noniashvili E, Dyban A, Zatssepina O. High resolution mapping of ribosomal DNA in early mouse embryos by fluorescence collection of embryos. *Biol Reprod* 2006; 815:807–815.
 56. Lavrentyeva E, Shishova AK, Kagarlitsky A, Zatssepina O. Localisation of RNAs and proteins in nucleolar precursor bodies of early mouse embryos. *Reprod Fertil Dev* (in press). Published online ahead of print 17 September 2015. DOI 10.1071/RD15200.
 57. Hernandez-Verdun D. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol* 2006; 125:127–137.
 58. Hernandez-Verdun D. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus* 2011; 2:189–194.
 59. Kyogoku H, Fulka J, Wakayama T, Miyano T. De novo formation of nucleoli in developing mouse embryos originating from enucleolated zygotes. *Development* 2014; 141:2255–2259.
 60. Ferreira J, Carmo-Fonseca M. The biogenesis of the coiled body during early mouse development. *Development* 1995; 612:601–612.
 61. Romanova LG, Anger M, Zatssepina OV, Schultz RM. Implication of nucleolar protein SURF6 in ribosome biogenesis and preimplantation mouse development. *Biol Reprod* 2006; 75:690–696.
 62. Vogt EJ, Meglicki M, Hartung KI, Borsuk E, Behr R. Importance of the pluripotency factor LIN28 in the mammalian nucleolus during early embryonic development. *Development* 2012; 139:4514–4523.
 63. Ogg SC, Lamond A. Cajal bodies and coilin—moving towards function. *J Cell Biol* 2002; 159:17–21.
 64. Raska I, Andrade LE, Ochs RL, Chan EK, Chang CM, Roos G, Tan EM. Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp Cell Res* 1991; 195:27–37.
 65. Morris GE. The Cajal body. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 2108–2115.
 66. Carmo-Fonseca M, Ferreira J, Lamond AI. Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis—evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. *J Cell Biol* 1993; 120: 841–852.
 67. Lamond AI, Carmo-Fonseca M. The coiled body. *Trends Cell Biol* 1993; 3:198–204.
 68. Platani M, Goldberg I, Swedlow JR, Lamond AI. In vivo analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells. *J Cell Biol* 2000; 151:1561–1574.
 69. Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Hernandez-Verdun D, Roussel P. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 2008; 129:13–31.
 70. Bártová E, Harni A, Uhlí R, Ra I, Galiová G, Orlova D, Kozubek S. Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments. *J Histochem Cytochem* 2010; 58:391–403.
 71. Tsai YT, Lin CI, Chen HK, Lee KM, Hsu CY, Yang SJ, Yeh NH. Chromatin tethering effects of hNopp140 are involved in the spatial organization of nucleolus and the rRNA gene transcription. *J Biomed Sci* 2008; 15:471–486.
 72. Meier UT. Comparison of the rat nucleolar protein nopp140 with its yeast homolog SRP40: differential phosphorylation in vertebrates and yeast. *J Biol Chem* 1996; 271:19376–19384.
 73. Maden B. The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1990; 39:241–303.
 74. Gall JG, Bellini M, Wu Z, Murphy C. Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. *Mol Biol Cell* 1999; 10:4385–4402.
 75. Dundr M, Hebert MD, Karpova TS, Stanek D, Xu H, Shpargel KB, Meier UT, Neugebauer KM, Matera AG, Misteli T. In vivo kinetics of Cajal body components. *J Cell Biol* 2004; 164:831–842.
 76. Lin CJ, Koh F, Wong P, Conti M, Ramalho-Santos M. Hira-mediated H3.3 incorporation is required for DNA replication and ribosomal RNA transcription in the mouse zygote. *Dev Cell* 2015; 30:268–279.
 77. Dousset T, Wang C, Chen D. Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. *Mol Cell Biol* 2000; 11:2705–2717.

I-2) Distribution et organisation des gènes ribosomiques au cours du développement

I-2-1) Introduction

Dans cette deuxième partie, je me suis intéressée à la distribution et à l'organisation des gènes ribosomiques au cours du développement embryonnaire chez la souris. Très peu d'études abordent cette question dans l'embryon précoce de souris. Romanova et al. (2006) ont analysés les gènes ribosomiques en FISH-2D aux stades 1- et 2-cellules suggérant un lien entre l'état de condensation de ces séquences et leur activité transcriptionnelle mais aucune donnée n'était disponible à des stades plus tardifs. Ici, nous avons utilisé l'approche de FISH-3D pour localiser et analyser la dynamique des séquences d'ADNr dans des noyaux d'embryons dont la structure 3-D a été conservée. Nous avons également détecté de manière simultanée les séquences satellites majeurs afin d'évaluer l'influence de la proximité de l'hétérochromatine péricentromérique sur la transcription des gènes ribosomiques. Nous avons analysé des embryons (165 au total) avant l'activation du génome (1-cellule tardif et 2-cellules précoce), puis une fois la transcription des gènes ribosomiques initiée (du stade 2-cellules tardif au stade blastocyste).

I-2-2) Evolution des NPB au cours du développement

La détection des séquences ribosomiques (ADNr) et des séquences satellites majeures (SatMaj) par FISH-3D à l'aide de sondes spécifiques de ces séquences (voir la partie matériel et méthodes) a permis d'identifier deux catégories de NPB (figure R-1). La première catégorie concerne les NPB qui ne présentent aucun signal (NPB-null) et la deuxième catégorie correspond aux NPB associés à du signal FISH d'ADNr et/ou d'hétérochromatine péricentromérique.

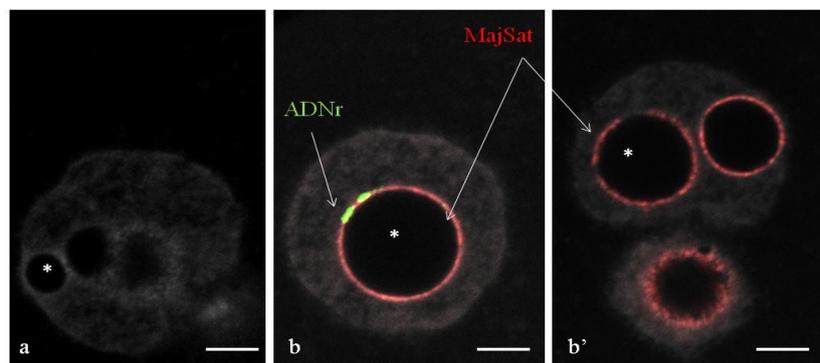


Figure R-1: Exemples de NPB observés au cours du développement préimplantatoire chez la souris. Deux catégories de NPB (astérisques) ont été identifiées : a) NPB sans signal (NPB-null) et b /b') NPB avec signaux FISH d'ADNr (vert) et /ou d'hétérochromatine péricentromérique (rouge) (NPB-ADNr/MajSat). Sections optiques acquises au confocal, avec contre-coloration de l'ADN en gris. Barre d'échelle = 5 μ m.

Le nombre de NPB de chaque catégorie a été quantifié de manière systématique du stade 1-cellule au stade 16-cellules, stade à partir duquel les NPB en tant que tels ne sont plus détectables comme nous l'avons décrit précédemment (Kone et al. 2016). Cette quantification montre que le nombre total de NPB, toutes catégories confondues (figure R-2), est légèrement inférieur dans le pronoyau maternel (~ 2 NPB $\pm 0,4$; $n=24$) par rapport au pronoyau paternel (~ 3 NPB $\pm 0,6$; $n=24$) (différence non significative, $p=0,08$). Le nombre de NPB augmente ensuite de manière significative au stade 2-cellules précoce (~ 18 NPB $\pm 2,27$; $n=6$; $p<0,001$). Par la suite, ce nombre diminue significativement entre le stade 2-cellules tardif (~ 17 NPB $\pm 0,8$; $n=27$) et le stade 16-cellules (~ 2 NPB $\pm 0,1$; $n=44$; $p<0,001$).

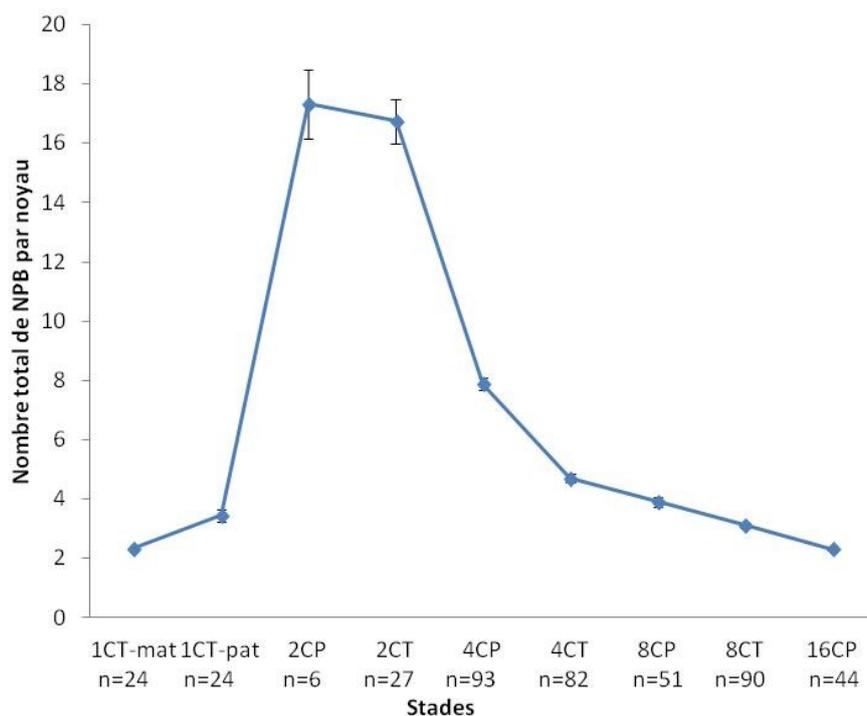


Figure R-2 : Evolution du nombre (moyenne) de NPB du stade 1-cellule tardif (1CT) au stade 16-cellules précoce (16CP). Au stade 1-cellule chaque pronoyau, maternel (mat) et paternel (pat), a été analysé séparément. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le nombre total de noyaux analysés est indiqué sous l'axe des abscisses.

L'analyse des NPB en fonction de la catégorie à laquelle ils appartiennent (avec ou sans signal) montre que les NPB associés à des signaux FISH d'ADNr et/ou d'hétérochromatine péricentromérique sont majoritaires à tous les stades étudiés, sauf au stade 4-cellules, stade au cours duquel la quantité de NPB sans signal n'est pas significativement différente de celle avec signaux (figure R-3). C'est au stade 2-cellules précoce que la quantité de NPB sans signal est la plus élevée (~ 7 NPB $\pm 1,1$; $n=6$; $p<0,001$). Leur nombre diminue ensuite

significativement jusqu'au stade 8-cellules tardif ($p < 0,001$) et ces NPB sans signal ne sont plus observables au stade 16-cellules précoce.

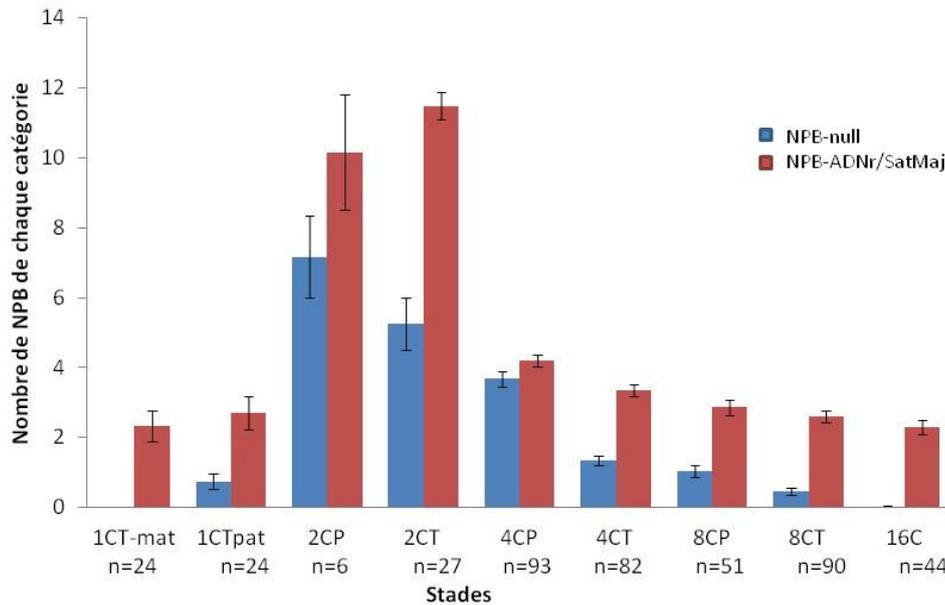


Figure R-3 : Evolution des deux catégories de NPB. Le nombre (moyenne) de NPB sans signal (NPB-null, en rouge) et de NPB avec signaux FISH d'ADNr et / ou de satellites majeurs (NPB-ADNr/SatMaj, en bleu) est représenté. Au stade 1-cellule tardif (1CT) chaque pronoyau, maternel (mat) et paternel (pat), a été analysé séparément. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le nombre total de noyaux analysés est indiqué sous l'axe des abscisses.

Les NPB associés aux ADNr et/ou à l'hétérochromatine péricentromérique suivent une dynamique relativement similaire (figure R-3). Ces NPB sont en nombre relativement faible au stade 1-cellule (~ 2 NPB $\pm 0,4$; $n=24$), sans différence entre les deux pronoyaux ($p=0,99$) et leur nombre augmente rapidement au stade 2-cellules (~ 11 NPB $\pm 0,3$ au stade 2-cellules tardif; $n=27$; $p < 0,001$). Leur nombre diminue par la suite progressivement du stade 4-cellules précoce (~ 4 NPB $\pm 0,1$; $n=93$) jusqu'au stade 16-cellules précoce ($\sim 2 \pm 0,1$; $n=44$; $p < 0,001$). Il existe une hétérogénéité entre les différents NPB des embryons préimplantatoires en termes d'association aux ADNr et à l'hétérochromatine péricentromérique.

I-2-3) Organisation des séquences d'ADNr du stade 1-cellule au stade blastocyste

Avant le redémarrage de la transcription des gènes ribosomiques

La détection des séquences d'ADNr avec préservation de la structure des noyaux nous a également permis d'analyser l'organisation tridimensionnelle de ces séquences. Au stade 1-cellule tardif, lorsque la transcription des gènes ribosomiques est inactive, nous observons que les ADNr sont condensés et se présentent sous forme de petits amas (figure R-4 ; flèche). Ces amas, peu nombreux sont localisés en périphérie des NPB et à proximité de

l'hétérochromatine péricentromérique qui elle forme des anneaux plus ou moins discontinus autour des NPB. Les ADNr sont parfois également présents dans le nucléoplasme, toujours en association avec l'hétérochromatine péricentromérique (figure R-4 ; tête de flèche). A ce stade, aucune différence majeure n'a été observée entre les pronoyaux maternels et paternels.

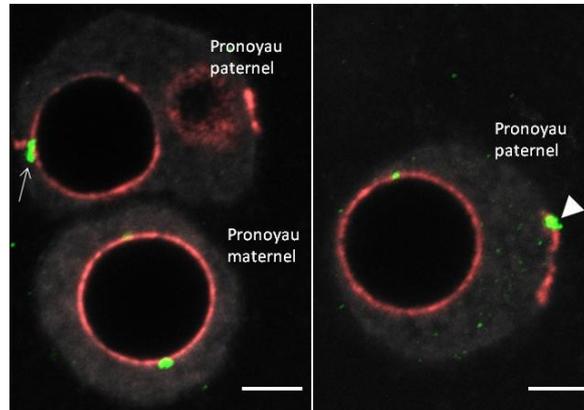


Figure R-4 : Exemples de distribution des signaux FISH d'ADNr (vert) et de satellites majeurs (rouge) au stade 1-cellule tardif. Des signaux d'ADNr sont observés dans les deux pronoyaux (maternel et paternel) sous forme d'amas associés soit aux NPBs (flèche) soit à des agrégats d'hétérochromatine péricentromérique situés dans le nucléoplasme (tête de flèche). Sections optiques acquises au confocal, avec contre-coloration de l'ADN en gris. Barre d'échelle = 5 μ m.

Après activation de la transcription des gènes ribosomiques

Après la première division mitotique, au stade 2-cellules précoce, alors que les gènes ribosomiques sont toujours inactifs, ceux-ci présentent une organisation identique à celle observée au stade 1-cellule (figure R-5). Par contre, dès le stade 2-cellules tardif, lorsque la transcription des gènes ribosomiques est réinitiée, les séquences d'ADNr commencent à se décondenser et apparaissent sous forme de grappes plus ou moins décompactées et composées de signaux de tailles variables (figure R5, encadré). Ces signaux d'ADNr sont soit seuls soit associés à l'hétérochromatine péricentromérique.

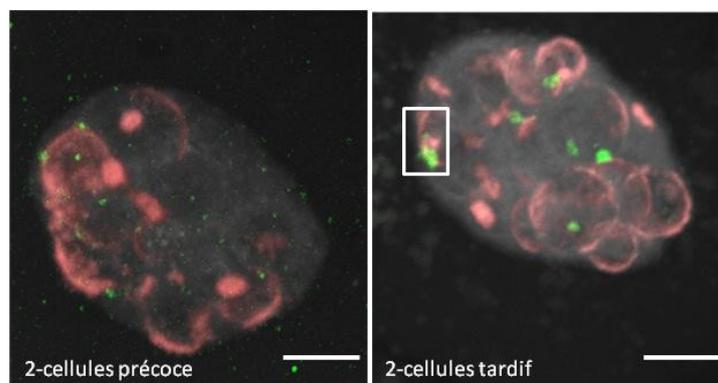


Figure R-5 : Exemples de distribution des signaux FISH d'ADNr (vert) et de satellites majeurs (rouge) au stade 2-cellules précoce et 2-cellules tardif. C'est à partir de ce stade que la décondensation des séquences ribosomiques semble avoir lieu : les signaux FISH d'ADNr sont moins compacts et forment des grappes (encadré). Projection en z de sections optiques acquises au confocal avec contre-coloration de l'ADN en gris. Barre d'échelle = 5 μ m.

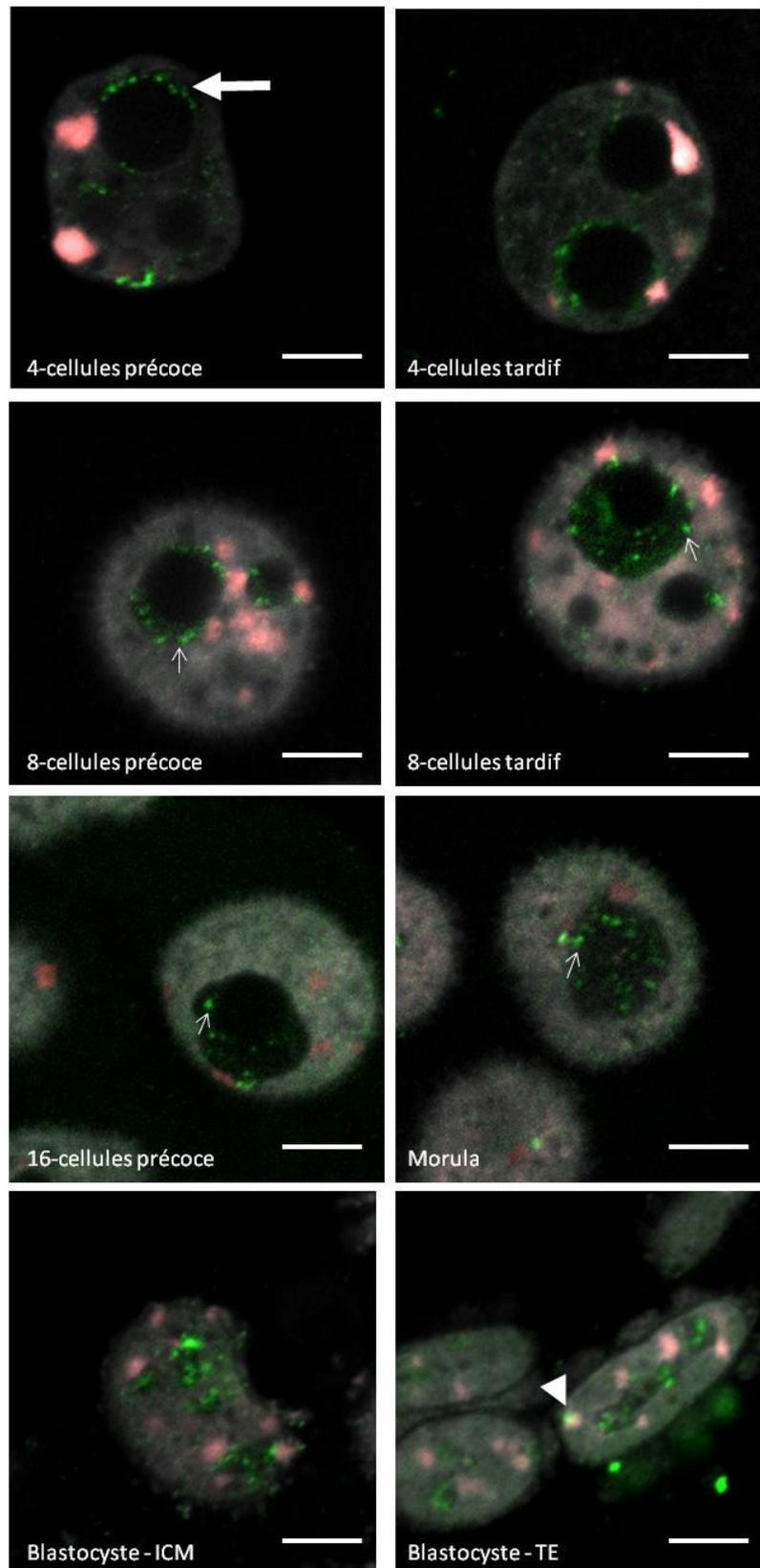


Figure R-6 : Exemples de distribution des signaux FISH d'ADNr (vert) et de satellites majeurs (rouge) du stade 4-cellules précoce au stade blastocyste. Les signaux FISH d'ADNr qui forment au départ des structures en collier de perles (grande flèche), sont de plus en plus diffus et étendus. Quelques punctuations subsistent, isolés dans le nucléolonème (flèches) ou associés à de l'hétérochromatine péricentromérique (tête de flèche). Sections optiques acquises au confocal, avec contre-coloration de l'ADN en gris. Barre d'échelle : 5 μ m

Dès le stade 4-cellules précoce, les ADNr apparaissent plus décondensés, sous forme de ponctuations relativement plus petites et plus nombreuses, organisées en « collier de perles » (figure R-6). A partir du stade 4-cellules tardif, l'organisation en collier de perles persiste. Cependant, dans certains NPB, le marquage devient plus diffus et plus abondant. Ce marquage diffus est encore plus présent au stade 8-cellules précoce dans le nucléolonème en expansion, et ce jusqu'au stade morula (figure R-6). Au stade morula, la masse fibrillaire dense (NPB) n'est plus présente, seul subsiste le marquage diffus du nucléolonème. Au stade blastocyste, on observe le même marquage, quoique moins étendu et aucune différence n'a été détectée entre l'ICM et le trophoctoderme (figure R-6). A partir du stade 4-cellules et jusqu'au stade blastocyste, des ponctuations plus intenses d'ADNr sont également visibles, en plus du signal diffus, dans le nucléolonème ou associées à l'hétérochromatine péricentromérique dans le nucléoplasme (figure R-6 ; flèches et tête de flèche respectivement). L'ensemble de ces observations suggèrent que les séquences d'ADNr sont de plus en plus décondensées (signaux FISH d'ADNr de plus en plus diffus).

Analyse quantitative

Les signaux FISH d'ADNr évoluant au cours du développement préimplantatoire, nous avons décidé de quantifier ces signaux. Cette analyse indique que le nombre total de signaux FISH d'ADNr en "amas" est de ~ 5 ($\pm 0,2$; $n=24$) dans chaque pronoyau au stade 1-cellule tardif et de ~ 7 ($\pm 0,5$; $n=6$) au stade 2-cellules précoce (figure R-7, ci-dessous). Ce nombre augmente significativement au stade 2 cellules tardif avec ~ 14 signaux d'ADNr détectés ($\pm 0,7$; $n=27$; $p<0,001$).

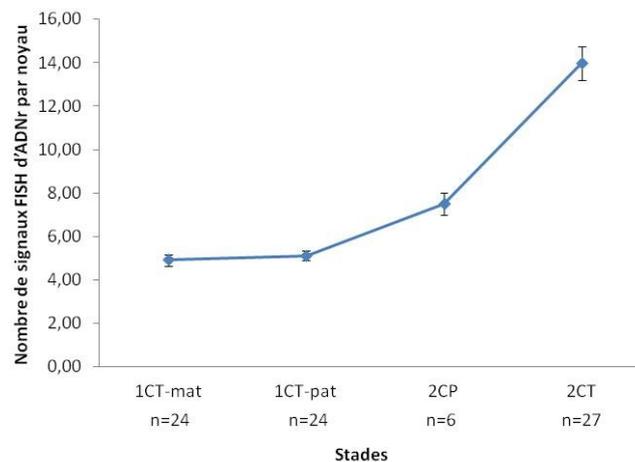


Figure R-7 : Evolution du nombre (moyenne) de signaux FISH d'ADNr du stade 1-cellule tardif (1CT) au stade 2-cellules tardif (2CT). Au stade 1-cellule chaque pronoyau, maternel (mat) et paternel (pat), a été analysé séparément. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le nombre total de noyaux analysés est indiqué sous l'axe des abscisses.

A partir du stade 2-cellules tardif, les signaux FISH d'ADNr étant de plus en plus hétérogène, nous avons déterminé plusieurs catégories de signaux sur la base de l'intensité et de la quantité de signal observées. Les différentes catégories ainsi établies sont présentées dans la figure R-8 et peuvent être distinguées selon les critères suivants :

- Type 1 (T1), signal FISH sous forme d'amas compacts, peu nombreux, associés aux NPB ;
- Type 2 (T2), signal plus décondensé, en collier de perles en périphérie des NPB ;
- Type 3 (T3), signal plus diffus, parsemé de quelques ponctuations plus intenses ;
- Types 4 (T4) signal très diffus, très étendu, avec de nombreuses ponctuations plus intenses.

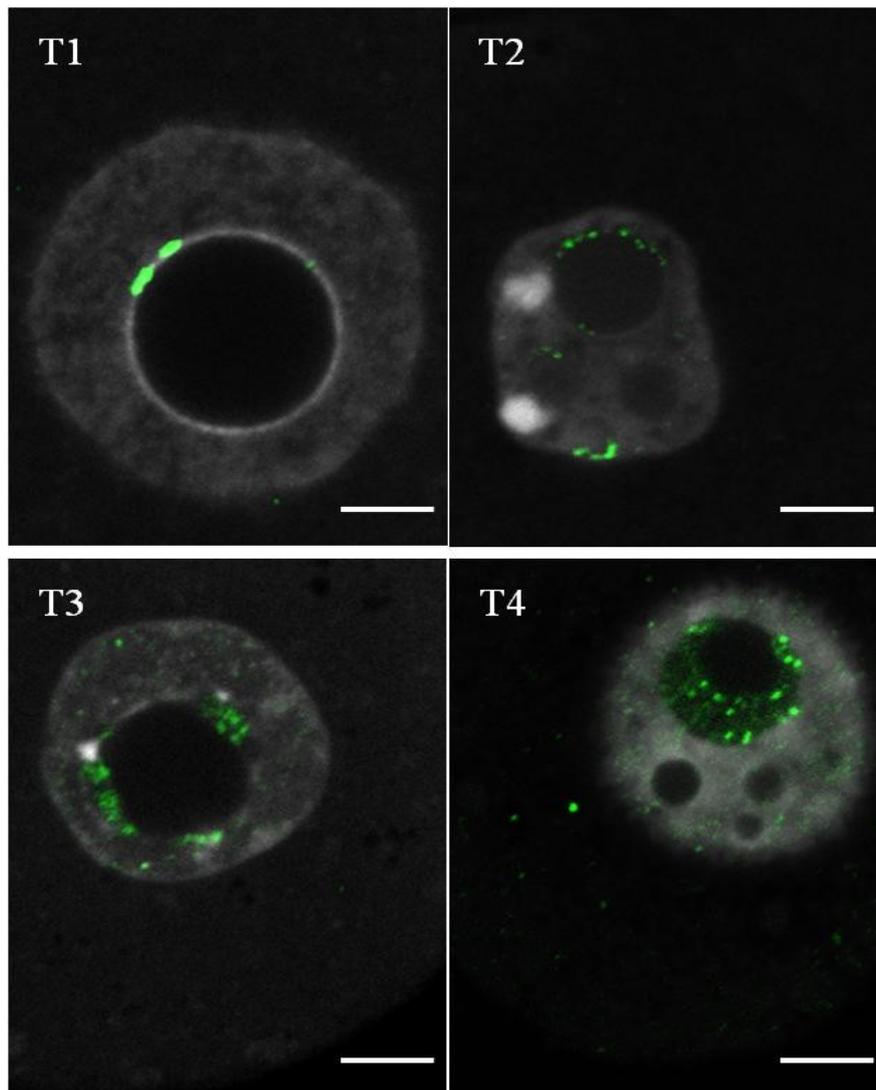


Figure R-8 : Exemples de signaux FISH d'ADNr (vert) observés et catégorisés de T1 à T4 en fonction de l'intensité et de la quantité de signal observées. Sections optiques acquises en microscopie confocale, avec contre-coloration de l'ADN en gris. Barre d'échelle: 5 μ m.

Alors qu'aux stades très précoces une seule catégorie de signal FISH d'ADNr de type T1 est observée ; on note l'apparition du signal plus décondensé de type T2 dès la fin du stade 2-cellules (figure R-9). Au stade 4-cellules précoce, on retrouve majoritairement des NPB de type T2 (~1,8 signaux par noyau ± 0,1 ; n=93) et de type T1 (~1,5 ± 0,1). Ces deux types de NPB (T1 et T2) sont ensuite de moins en moins fréquents, leur nombre diminuant dès le stade 4-cellules tardif (p<0,001 pour T1 et p=0,07 pour T2) et encore plus au stade 8-cellules précoce (p<0,001 pour T1 et T2).

En parallèle, on remarque l'apparition des NPB de type T3 (~1 signal par noyau ± 0,09 ; n=82) au stade 4-cellules tardif . Cette catégorie n'est cependant pas majoritaire (~1± 0,1 signaux de type T2 par noyau au stade 4-cellules tardif ; p=0,6). A partir du stade 8-cellules précoce, les ADNr présentent majoritairement un marquage en périphérie des NPB de type T4 (~1± 0,1 ; n=51 ; p<0,001). Il en est de même aux stades 8-cellules tardif et au stade 16-cellules précoce (~2 signaux de type T4 par noyau ± 0,1 ; n=44), suggérant un niveau de décondensation très élevé.

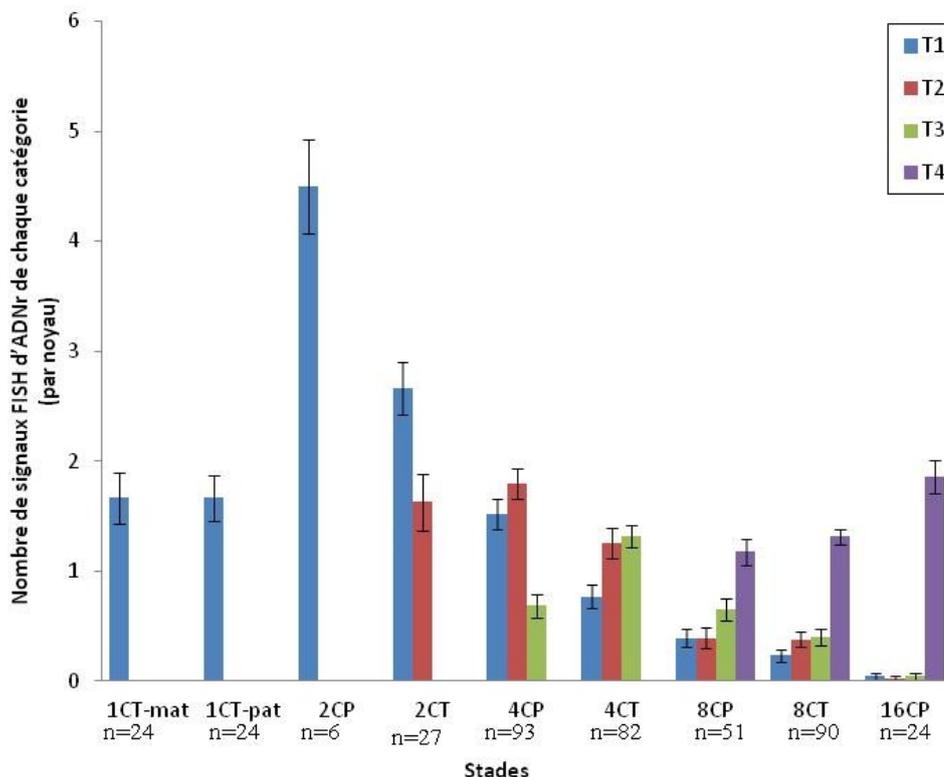


Figure R-9 : Répartition des différentes catégories de signaux FISH d'ADNr (T1 à T4) du stade 1-cellule tardif (1CT) au stade 16-cellules précoce. Au stade 1-cellule chaque pronoyau, maternel (mat) et paternel (pat), a été analysé séparément. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le nombre total de noyaux analysés est indiqué sous l'axe des abscisses.

Comme mentionné précédemment, les NPB ne sont plus visibles à partir du stade morula. A ce stade, et au stade blastocyste, les signaux FISH d'ADNr sont très diffus et la distribution des séquences d'ADNr est identique à celle observée au stade 16-cellules (Type 4).

I-2-4) Interaction entre ADNr et l'hétérochromatine péracentromérique.

Les distributions des séquences d'ADNr et des séquences satellites majeurs, en particulier leur proximité les unes par rapport aux autres, ont également été analysées de manière plus détaillée (figure R-10). Pour cela nous avons distingué les signaux FISH d'ADNr associés i) aux signaux FISH-SatMaj (satellites majeurs) formant des anneaux en périphérie des NPB, ii) aux agrégats plus allongés observés en périphérie des noyaux, et iii) aux amas plus ou moins compacts (chromocentres en formation) associés aux NPB ou iv) isolés dans le nucléoplasme.

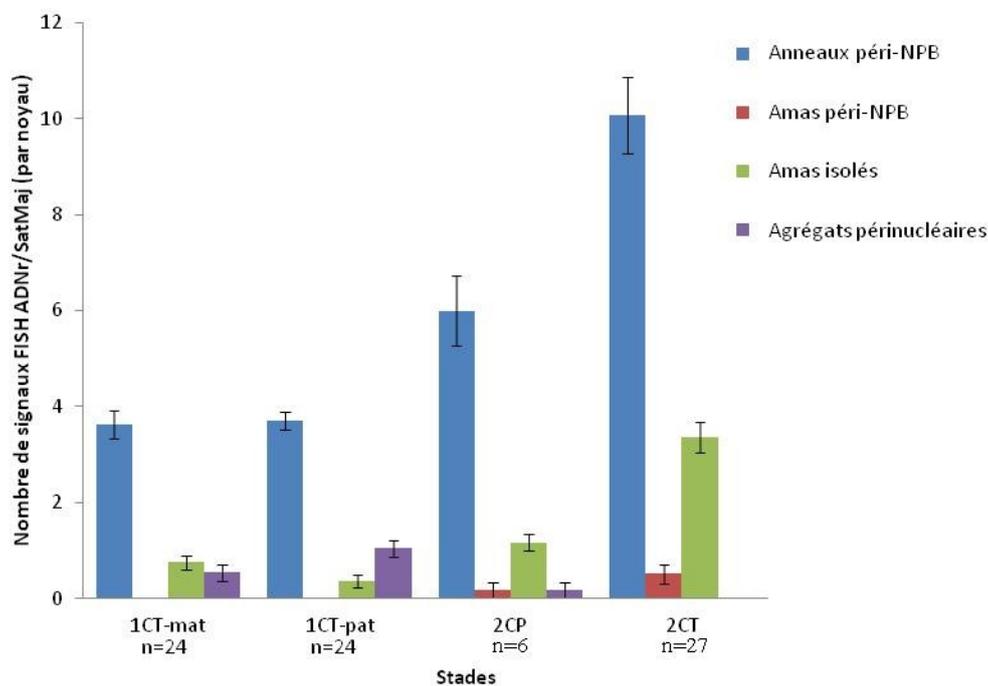


Figure R-10 : Répartition des différents types d'interactions entre signaux FISH d'ADNr et de séquences satellites majeurs (SatMaj) du stade 1-cellule tardif (1CT) au stade 2-cellules tardif (2CT). Au stade 1-cellule chaque pronoyau, maternel (mat) et paternel (pat), a été analysé séparément. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le nombre total de noyaux analysés est indiqué sous l'axe des abscisses.

Au stade 1-cellule tardif, on retrouve majoritairement les séquences d'ADNr associées à l'hétérochromatine péracentromérique organisée en anneaux autour des NPB, et ce dans chaque pronoyau (pronoyau maternel ~ 4 signaux $\pm 0,2$; pronoyau paternel ~ 4 signaux $\pm 0,1$; $n=24$). Ce nombre augmente significativement au stade 2-cellules précoce (~ 6 signaux $\pm 0,7$; $n=6$; $p=0,01$) et au stade 2-cellules tardif (~ 10 $\pm 0,7$; $n=27$; $p=0,001$). Ce type d'interaction est majoritaire à tous les stades étudiés. Néanmoins, au stade 1-cellule, certains signaux FISH d'ADNr sont associés aux agrégats allongés d'hétérochromatine située en périphérie des

pronoyaux, surtout dans le pronoyau paternel (~ 1 signal $\pm 0,1$; $n=24$; $p=0,03$ par rapport au pronoyau maternel). Cette catégorie de signal diminue au stade 2-cellules précoce ($0,1 \pm 0,1$; $n=6$; $p=0,0002$) et n'est plus observée au stade 2-cellules tardif.

Les signaux FISH d'ADNr associés aux amas d'hétérochromatine péricentromérique localisés en périphérie des NPB ne sont visibles qu'aux stades 2-cellules précoce ($0,1$ signal $\pm 0,1$; $n=6$) et 2-cellules tardif ($0,5 \pm 0,1$; $n=27$; $p>0,05$ entre ces deux stades). Par contre, les signaux associés aux amas d'hétérochromatine isolés dans le nucléoplasme sont observés plus fréquemment : dès le stade 1-cellule dans le pronoyau maternel (~ 1 signal ± 0 ; $n=24$) et le pronoyau paternel ($0,3 \pm 0$; $n=24$; $p>0,05$ entre pronoyaux), au stade 2-cellules précoce ($\sim 1 \pm 0,1$; $p<0,001$) et au stade 2-cellules tardif ($\sim 3 \pm 0,3$; $p<0,001$). Aux stades très précoces du développement, l'interaction entre les séquences d'ADNr et l'hétérochromatine péricentromérique semble se localier essentiellement en périphérie des NPB.

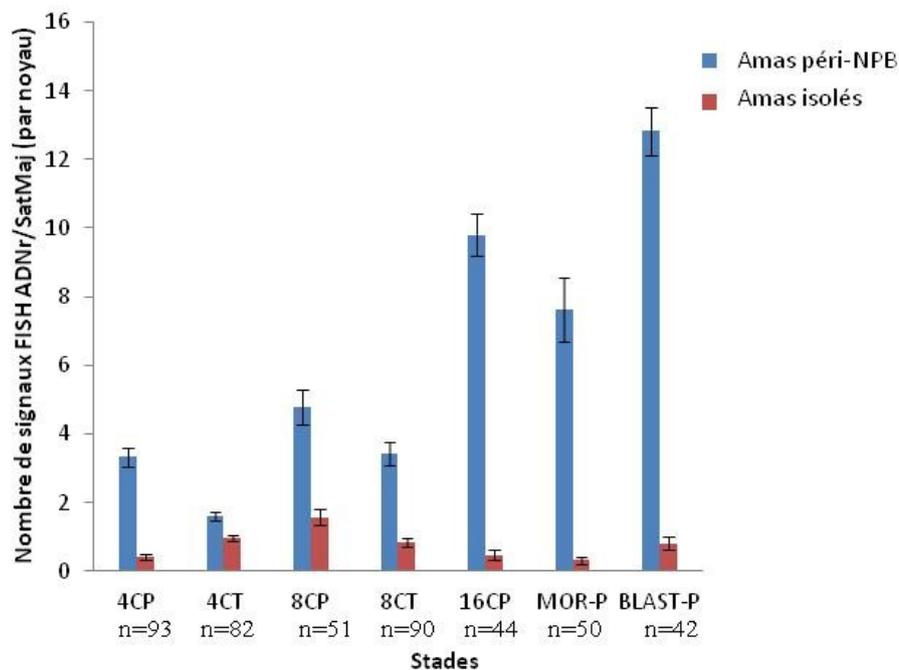


Figure R-11 : Répartition des différents types d'interactions entre signaux FISH d'ADNr et séquences satellites majeurs (SatMaj) du stade 4-cellules précoce (4CP) au stade blastocyste précoce (BLAST-P). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le nombre total de noyaux analysés est indiqué sous l'axe des abscisses.

A partir du stade 4-cellules (précoce et tardif), l'hétérochromatine péricentromérique ne s'organise plus sous forme d'anneaux mais plutôt d'amas plus ou moins compacts (figure R-11). Les signaux d'ADNr associés aux amas isolés dans le nucléoplasme sont très faiblement représentés jusqu'au stade blastocyste malgré une petite augmentation significative au stade 8-cellules précoce ($\sim 1 \pm 0,2$; $n=51$; $p<0,001$). Les signaux d'ADNr associés aux amas périnucléolaires sont observés majoritairement à tous les stades, avec une augmentation

significative de leur nombre du stade 4-cellules précoce (~ 3 signaux $\pm 0,2$; $n=93$) jusqu'au stade blastocyste (~ 13 signaux $\pm 0,6$; $n=42$; $p<0,001$). On note cependant une diminution de ce type d'interaction au cours du cycle cellulaire aux stades 4-cellules ($\sim 3 \pm 0,2$ versus $\sim 1 \pm 1.1$ entre le début et à la fin du stade ; $p<0,001$) et 8-cellules ($\sim 5 \pm 0,5$ versus $\sim 3 \pm 0,3$ entre le début et la fin du stade, $p=0,05$). En résumé, l'interaction entre les séquences d'ADNr et l'hétérochromatine péricentromérique est maintenue en périphérie des NPB/nucléoles tout au long du développement préimplantatoire.

I-2-5) Discussion et perspectives

Nucléogenèse et séquences d'ADNr

L'objectif de cette étude était d'analyser l'organisation des séquences d'ADNr et des séquences satellites majeurs au cours du développement préimplantatoire chez la souris. Dans un premier temps, nous avons montré que le nombre total de NPB augmente jusqu'au stade 2-cellules (précoce et tardif) puis diminue considérablement jusqu'au stade 16-cellules, suggérant que les NPB sont des structures dynamiques capables de fusionner, mécanisme déjà décrit dans le cas des nucléoles en cellules somatiques (Savino et al. 2001). Ces résultats sont cohérents avec les analyses bioinformatiques réalisées précédemment au laboratoire démontrant par ailleurs une augmentation du volume des NPB au cours du développement préimplantatoire (Aguirre-Lavin et al. 2012).

Les analyses que nous avons réalisées montrent également qu'il existe deux catégories de NPB dans les embryons de souris, chacune présentant une évolution différente au cours du développement. Certains NPB, essentiellement présents aux stades très précoces (1- et 2-cellules), ne sont associés ni aux séquences d'ADNr ni à l'hétérochromatine péricentromérique. D'autres en revanche sont associés aux séquences ADNr et à l'hétérochromatine péricentromérique. Ces NPB, majoritaires, persistent jusqu'au stade 16-cellules. Par ailleurs, nous avons montré (première partie de ma thèse) que c'est seulement au niveau des NPB associés au signaux UBF et NOPP140, protéines essentielles à l'activité transcriptionnelle des gènes ribosomiques, qu'apparaissent les compartiments nucléolaires formant le nucléole. Nous en concluons donc que les nucléoles se forment uniquement en périphérie des NPB associés aux séquences d'ADNr. La présence des séquences d'ADNr pourrait à la fois activer la nucléogenèse embryonnaire au stade 2-cellules tardif et favoriser le recrutement des protéines qui vont réinitier la ribogenèse, renforçant l'idée selon laquelle la formation du nucléole est liée à la production des ribosomes (Mélèse and Xue 1995).

Ces données de microscopie de fluorescence confirment les données de microscopie électronique obtenues précédemment (figure R-12) (Fakan and Odartchenko 1980; Geuskens and Alexandre 1984).

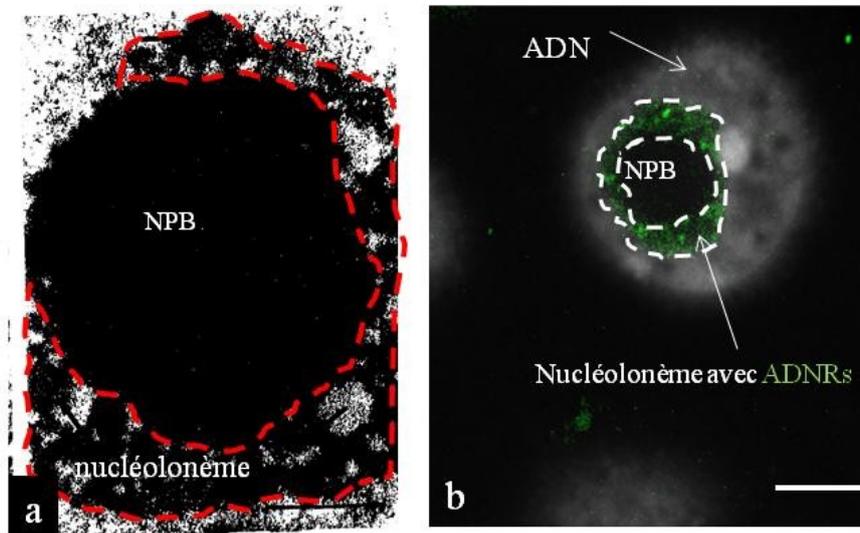


Figure R-12 : Formation du nucléolonème en périphérie des NPB: a) d'après les données de microscopie électronique (Geuskens et Alexandre, 1984) et montrant le nucléolonème (compartiment fibrillaire) en périphérie d'un NPB (masse fibrillaire dense), et b) d'après nos données de microscopie de fluorescence montrant la localisation des séquences d'ADNr en périphérie d'un NPB (stade 8-cellules). Barre d'échelle: 5µm

Après la formation des pronoyaux, les séquences ribosomiques seraient donc recrutées au niveau de certains NPB en périphérie desquels se forme le nucléole. Il existe donc une hétérogénéité au sein des NPB en termes d'interaction avec les séquences d'ADNr. Ces données renforcent l'idée selon laquelle les NPB sont également hétérogènes dans leur aptitude à interagir avec la machinerie transcriptionnelle ARN pol I (Zatsepina et al. 2003 ; Koné et al. 2016). Cependant, le(s) mécanisme(s) à l'origine de cette hétérogénéité reste(nt) inconnu(s).

Notre approche de FISH ne nous permet pas non plus d'identifier dans quel compartiment les séquences d'ADNr sont localisées au niveau ultrastructural. Il a été montré par Zatsepina et al. (1996) que les séquences d'ADNr et le facteur de transcription UBF co-localisent en cellules somatiques. Nous n'avons pas réalisé de co-marquage par immuno-FISH ; nous observons néanmoins que la localisation dans l'embryon précoce de souris des signaux d'ADNr est similaire à celle de la protéine UBF décrite précédemment (Koné et al. 2016) (figure R-13). Sachant qu'UBF est une protéine caractérisant le compartiment fibrillaire, nos données suggèrent que les séquences d'ADNr seraient localisées dans le compartiment fibrillaire du nucléole, en périphérie des NPB ; en accord avec les données de microscopie électronique

obtenues sur embryons de souris (Geuskens et Alexandre, 1984) et en cellules somatiques (Derenzini et al. 2006).

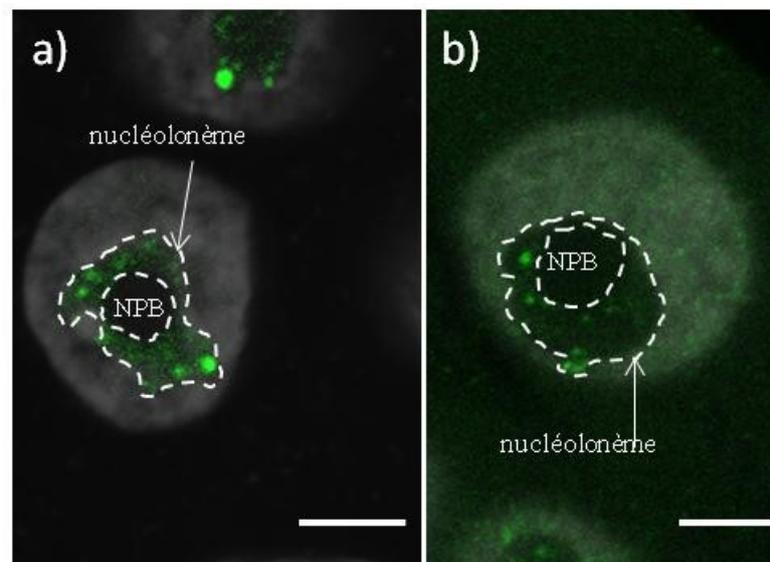


Figure R-13 : Localisation des signaux d'UBF et d'ADNr en périphérie des NPB. Exemple représentatif du stade 16-cellules. Images acquises en microscopie confocale (sections optiques) montrant que les séquences d'ADNr (a) et la protéine UBF (b) se distribuent (signal vert) de manière similaire dans le nucléolonème en périphérie des NPBs. Contre-coloration de l'ADN en gris. Barre d'échelle = 5µm.

Organisation des séquences d'ADNr : lien avec le statut transcriptionnel des embryons

Jusqu'au stade 2-cellules précoce, alors que la transcription des gènes ribosomiques n'est pas encore initiée, les signaux FISH d'ADNr semblent condensés et peu nombreux. Sachant que les séquences d'ADNr sont des séquences répétées en plusieurs copies constituant les NOR (McStay and Grummt, 2010), il est possible que les amas d'ADNr observés aux stades 1- et 2-cellules correspondent aux régions NOR compactées et inactives. Par la suite, à partir du stade 2-cellules tardif, lorsque la transcription est activée, des grappes composées de signaux FISH d'ADNr de tailles variables, avec des zones plus ou moins intenses apparaissent. Ces zones moins intenses pourraient correspondre aux séquences d'ADNr décondensées. En effet, en cellules somatiques, les séquences d'ADNr présentent une distribution « mixte » alternant régions condensées sous forme d'amas et régions décondensées sous forme de plus petits signaux plus ou moins nombreux (Wachtler et al. 1986; Schedle et al. 1992; Junéra et al. 1995; Zatssepina et al. 1996). Dans notre étude, cette distribution de type « somatique » est observée dès le stade 2-cellules tardif et est conservée jusqu'au stade blastocyste. Seul le niveau de décondensation et l'espace occupé par les séquences d'ADNr semble évoluer de manière progressive au cours du développement. Les signaux FISH d'ADNr apparaissent en effet de plus en plus diffus dans un espace de plus en plus étendu en périphérie des NPB,

comme le reflète la transition entre les différents types de NPB depuis le type T1 (spécifique des stades précoces) jusqu'au type T4 (spécifique des stades tardif). A chaque stade étudié, plusieurs types de NPB peuvent être observés suggérant que le processus de décondensation des séquences d'ADNr n'est pas synchrone entre NPB, ni au sein d'un même noyau ni au sein d'un même stade. Cependant, le type T4 peut être considéré comme le niveau de décondensation maximum puisqu'il est uniquement observé du stade 16-cellules au stade blastocyste. Cette évolution croissante du niveau de décondensation est en accord avec l'augmentation significative de la quantité d'ARNr observée par Pikó et Clegg (1982) dans l'embryon de souris entre le stade 2-cellules tardif (0,22 ng) et le stade blastocyste (1 ng). Cependant, le niveau de décondensation (T4) est atteint dès le stade 8-cellules précoce, alors que la quantité d'ARNr continue d'augmenter jusqu'au stade blastocyste. La décondensation progressive seule n'expliquerait donc pas l'augmentation des transcrits. Dans ce cas, d'autres mécanismes interviendraient et une des hypothèses plausibles serait l'augmentation du taux transcriptionnel de chaque site de transcription (Grummt 2010). Par ailleurs, la persistance de ponctuations plus intenses dans le nucléolonème jusqu'à des stades plus tardif suggère que la décondensation des séquences d'ADNr ne serait pas totale et que certaines séquences resteraient condensées malgré le redémarrage de la transcription. Il est important de noter qu'avec l'approche de FISH, la résolution des images acquises ne nous permet pas de déterminer le nombre précis de séquences d'ADNr impliquées dans chaque ponctuation ou amas de signal observé.

La similarité observée entre les signaux diffus de FISH-ADNr et de la protéine UBF (figure R-13) confirme que l'état de décondensation des séquences d'ADNr pourrait être lié à leur activité transcriptionnelle. En effet, la présence d'UBF est associée aux séquences ribosomiques actives ou en « pause » (Hamdane et al. 2014). En revanche, les séquences ribosomiques inactives en sont dépourvues en raison de la méthylation du domaine UCE du promoteur empêchant le recrutement d'UBF (McStay and Grummt 2008; Grummt 2010). Il est donc moins probable que les ponctuations intenses d'ADNr observées en FISH dans le nucléolonème correspondent aux ponctuations intenses d'UBF observées en immunomarquage (figure R-13). Il serait intéressant de mieux caractériser l'état transcriptionnel (actif ou inactif) des séquences d'ADNr correspond à ces ponctuations intenses de FISH.

Chez la souris, les NOR sont localisés sur plusieurs chromosomes (Henderson et al. 1974; Elsevier and Ruddle 1975; Dev et al. 1977). Le nombre de chromosome portant des NOR

varie en fonction de la souche de souris (Winking et al. 1980; Patkin et al. 1992; Kurihara et al. 1994; Longo et al. 2003). Dans le cas de notre étude, nous avons utilisé des embryons issus d'un croisement entre une femelle et un mâle C57BL6/CBA (génération F2). Sachant que la souche CBA comporte 6 NOR (sur les 3 paires de chromosomes 12, 25, 18 et parfois 16) et la souche C57BL6 en comporte 8 (sur les 4 paires de chromosomes 22,15,18 et 19), le nombre de NOR dans les embryons que nous avons analysés devrait donc être compris entre 6-8. Sur les chromosomes en mitose (figure R-14), nous détectons 8 paires de chromosomes porteurs de signaux FISH d'ADNr. Ces signaux apparaissent sous forme de « doublets » (figure R-14 ; flèches) et de structures plus allongées (tête de flèche), comme décrit en cellules somatiques (Heliot et al. 1997).

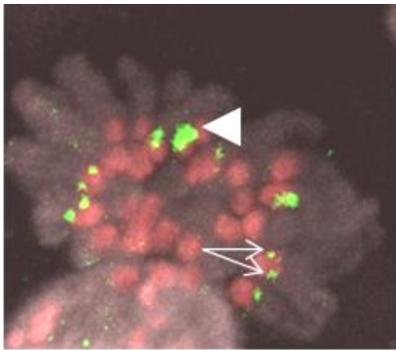


Figure R-14: Localisation des séquences d'ADNr sur les chromosomes dans un embryon de souris en mitose. En mitose, deux types de signaux d'ADNr (vert) sont observés à proximité des séquences SatMaj (rouge) : des doublets (flèches) et des structures plus allongées (tête de flèche). ADN en gris.

Par contre, en interphase, nous avons observé ~5 amas d'ADNr dans chaque pronoyau au stade 1-cellule, ~7 au stade 2-cellules précoce et ~14 au stade 2-cellules tardif. Ceci est probablement lié au fait qu'en interphase la chromatine est beaucoup moins condensée qu'en mitose. Les signaux FISH d'ADNr n'apparaissant plus sous forme de doublets il est alors difficile de les compter comme un seul NOR lors des analyses quantitatives. Par ailleurs, après la fécondation, les séquences d'ADNr associées à l'hétérochromatine péricentromérique sont recrutées en périphérie des NPB dans les pronoyaux en interphase, allant jusqu'à entourer soit complètement, soit partiellement les NPB. Ce processus accentue certainement l'étirement de la fibre chromatinienne et du signal FISH, rendant très difficile la quantification des NOR en tant que tels. Dans notre évaluation des signaux FISH chaque amas a donc été compté individuellement. Dans leurs travaux, Romanova et al. (2006) ont estimé le nombre de NOR dans des embryons précoces de souris F1 C57BL6/CBA comme étant égal à 7 aussi bien au stade 1-cellule qu'au stade 2-cellules. Cependant, leur estimation se base sur la quantification du nombre de « clusters » de signaux FISH relativement condensés. Ces auteurs ont en effet utilisé une technique de FISH-2D, moins résolutive que notre approche en 3D, ce qui pourrait expliquer pourquoi nous n'obtenons pas exactement les mêmes résultats.

Interaction entre les séquences d'ADNr et l'hétérochromatine péricentromérique

La détection simultanée des séquences d'ADNr et satellites majeurs par FISH nous a permis de mettre en évidence pour la première fois la juxtaposition en interphase de ces deux régions génomiques dans l'embryon de souris, jusqu'au stade blastocyste. Il apparaît que ces régions génomiques sont majoritairement associées en périphérie des NPB. Nous observons cependant la présence de signaux FISH d'ADNr associés à des amas d'hétérochromatine péricentromérique dans le nucléoplasme, surtout au stade 2-cellules tardif. Sachant qu'à ce stade l'hétérochromatine péricentromérique, initialement organisée en anneaux, se détache progressivement des NPB et se condense pour former les chromocentres dans le nucléoplasme (Aguirre-Lavin et al. 2012), il est probable que cela contribue à l'augmentation du nombre de séquences d'ADNr associées à des amas d'hétérochromatine dans le nucléoplasme.

La juxtaposition en interphase de séquences géniques aux chromocentres a déjà été décrite dans de cas de cellules lymphoïdes chez la souris (Brown et al. 1997; Brown et al. 1999) et chez l'homme (Francastel et al. 1999; Schübeler et al. 2000). L'hétérochromatine péricentromérique constitue en effet un environnement réfractaire à la transcription et la proximité de certaines séquences avec cette région est associée à une faible activité transcriptionnelle (Schübeler et al. 2000). Des observations similaires ont également été faites dans le cas de séquences d'ADNr condensées et inactives (Akhmanova et al. 2000 ; Guetg et al. 2010). Dans ce cas, l'association des séquences d'ADNr avec l'hétérochromatine péricentromérique pourrait favoriser la répression de leur transcription. Selon Guetg et al (2010), le complexe NoRC serait impliqué dans l'hétérochromatinisation des séquences péricentromériques et des ADNr. L'inhibition de la transcription des ADNr via le complexe NoRC serait donc indirecte.

Dans notre étude, nous avons observé l'association entre ADNr et amas d'hétérochromatine péricentromérique dès le stade 2-cellules tardif, surtout dans le nucléoplasme, et jusqu'au stade blastocyste, principalement en périphérie des NPB. Nous avons également observé, aux stades 4-cellules et 8-cellules, que cette interaction entre ADNr et hétérochromatine péricentromérique pourrait être influencée par le cycle cellulaire, le nombre d'ADNr associés aux amas d'hétérochromatine diminuant entre la phase G1 et la phase G2. On peut supposer que certaines séquences d'ADNr se dissocieraient des amas d'hétérochromatine péricentromérique au cours de la phase G2 afin de favoriser leur transcription. Un tel mécanisme de décondensation des ADNr en phase G2 a en effet été proposé en cellules somatiques lorsque la transcription des ADNr augmente (Junéra et al. 1995). L'absence de

données sur les stades 16-cellules tardif, morula tardif et blastocyste tardif ne nous permet malheureusement pas de conclure.

Malgré les fluctuations observées au cours du cycle cellulaire, les interactions entre ADNr et hétérochromatine péricentromérique en périphérie des NPB persistent jusqu'au stade blastocyste ce qui peut sembler surprenant étant donné que le taux de transcription des ADNr augmente jusqu'au stade blastocyste (Pikó et Clegg. 1982). Cela suggère que la présence de l'hétérochromatine péricentromérique au niveau de certaines séquences d'ADNr, bien qu'elle soit importante, ne semble pas affecter l'approvisionnement en ARNr nécessaire au cours du développement. Cependant, le nombre d'unités ribosomiques engagées dans ces interactions est inconnu et il est probable que ce nombre soit suffisamment faible pour ne pas perturber cet approvisionnement. Par ailleurs, comme mentionné précédemment, le taux de transcriptionnel de chaque unité ribosomique peut aussi varier et expliquer cette augmentation de la transcription (Grummt 2010).

I-2-5) Perspectives

Ces données montrent que dans l'embryon, comme dans les cellules somatiques, les séquences d'ADNr sont des séquences dynamiques, capables de se condenser/décondenser, probablement en fonction de leur état d'activité transcriptionnelle. Ces résultats renforcent donc l'idée selon laquelle l'organisation de la chromatine influence l'expression des gènes. Il semblerait que la régulation de la transcription des ADNr fasse notamment intervenir plusieurs mécanismes dont l'interaction avec l'hétérochromatine péricentromérique. Un suivi *in vivo* des séquences ADNr et des séquences satellites majeurs permettrait de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle des ADNr.

Par ailleurs, la différence d'organisation des séquences ribosomiques en fonction du statut transcriptionnel semble clairement établi. Néanmoins, seules des expériences de RNA-DNA FISH permettant de colocaliser les séquences génomiques et les transcrits nous permettrait de l'affirmer.

Enfin, dans l'embryon préimplantatoire de souris, nous ne connaissons pas l'identité et le nombre exact de séquences d'ADNr actives vs. inactives. Afin d'identifier les 3 états transcriptionnels (actif/inactif/en pause) décrit en cellules somatiques, il conviendrait de détecter les principaux complexes impliqués dans l'organisation de la chromatine des ADNr, notamment NoRC (dont TIP5), CSB et NurD ainsi que les ARNr 47S par immuno-RNA FISH. Sachant que les séquences d'ADNr condensées inactives sont caractérisées en cellules somatiques par la présence du complexe NoRC et notamment de la protéine TIP5 (Grummt

2010 ; Guetg et al. 2010), j'ai commencé à étudier la distribution de TIP5 dans l'embryon préimplantatoire de souris (figure R-15). Ces données préliminaires montrent que TIP5 est détectable aussi bien au cours de phases inactives de la transcription (stades 1- et 2-cellules précoces), que des phases actives (4- et 8-cellules). Comme attendu, TIP5 se localise en amas en périphérie de NPB aux stades précoces du développement (figure R-15, flèches) et dans le nucléolonème (notamment sous forme de ponctuations intenses; figure R-15 tête de flèche) aux stades plus tardifs. TIP5 pourrait donc être responsable de l'inactivation de certaines séquences d'ADNr dans les embryons, comme c'est le cas en cellules somatiques, mais ceci reste à confirmer.

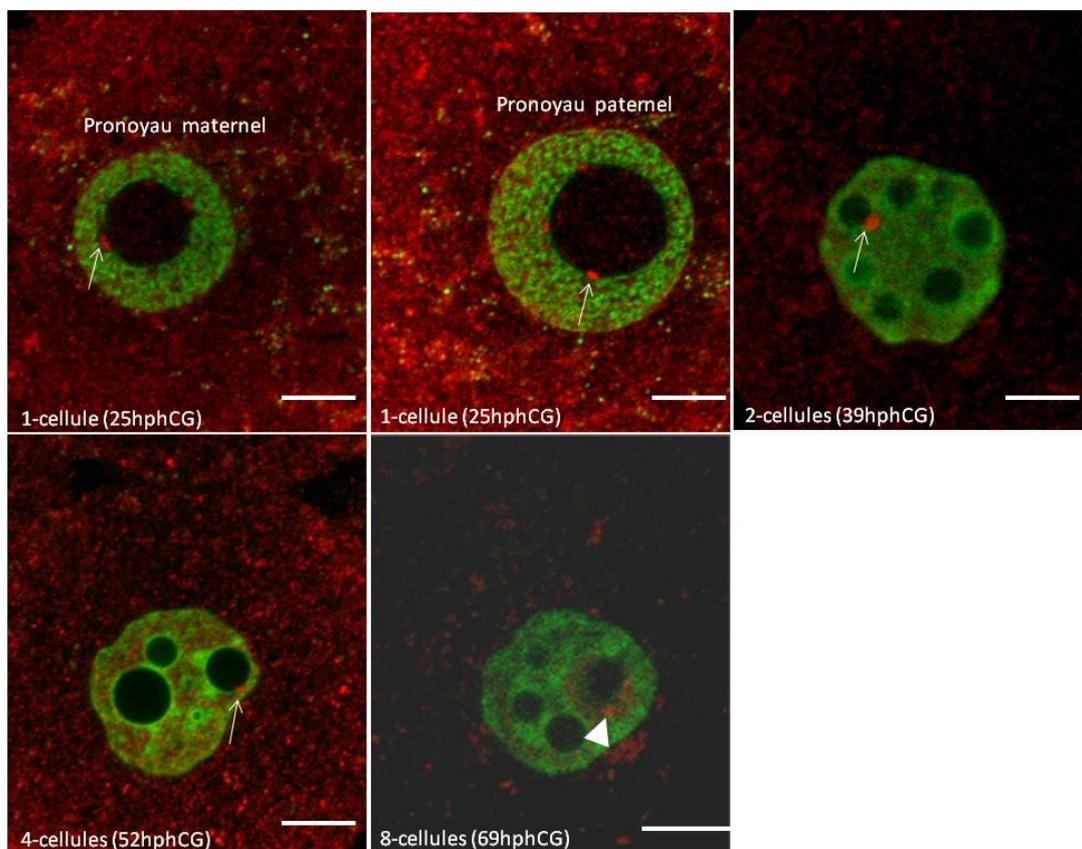


Figure R-15 : Distribution de la protéine TIP5 au cours du développement embryonnaire chez la souris. Images (sections optiques) acquises en microscopie confocale et représentant le signal TIP5 (rouge) avec contre-coloration de l'ADN (vert) aux stades : 1-cellule (25hphCG) dans le pronoyau maternel et le pronoyau paternel ; 2-cellules (39hphCG) ; 4-cellules précoces (52hphCG) ; 8-cellules tardif (69hphCG). Barre d'échelle = 5µm

Des co-marquages avec certaines marques épigénétiques permissives ou répressives apporteraient également des informations complémentaires très intéressantes.

Afin d'identifier de manière plus précise les séquences d'ADNr actives versus inactives, j'avais également envisagé de compléter nos données de FISH par une approche de pontage au

psoralen. Cependant l'utilisation de cette technique dans l'embryon de souris s'avère compliquée du fait de l'importante quantité de matériel biologique de départ nécessaire.

II-Organisation de l'hétérochromatine péracentromérique et contribution parentale

II-1) Introduction

Comme mentionné dans l'introduction, au début du développement de l'embryon de souris, l'hétérochromatine péracentromérique s'organise autour des NPB de manière asymétrique entre les deux pronoyaux. Après la fécondation, le recrutement de l'hétérochromatine péracentromérique autour des NPB a d'abord lieu dans le pronoyau maternel puis dans le paternel. Par ailleurs, la présence du NPB de l'ovocyte semble cruciale non seulement pour la formation des NPB dans l'embryon après la fécondation, mais aussi pour le maintien et la transcription de l'hétérochromatine péracentromérique (Fulka et Langerova. 2014). Il s'avère notamment que dans les embryons issus d'ovocytes énucléolés i) l'activité transcriptionnelle des séquences satellites au stade 2-cellules est perturbée et ii) le développement embryonnaire s'arrête (figure R-16). Il y aurait donc potentiellement parmi les facteurs provenant du NLB maternel des facteurs nécessaires à la transcription des régions péracentromériques. Cependant, l'énucléolation en fin de stade 1-cellule n'impacte pas la poursuite du développement (Kyogoku et al. 2014) suggérant que le rôle du NLB maternel est essentiel uniquement au cours du stade 1-cellule (figure R-16).

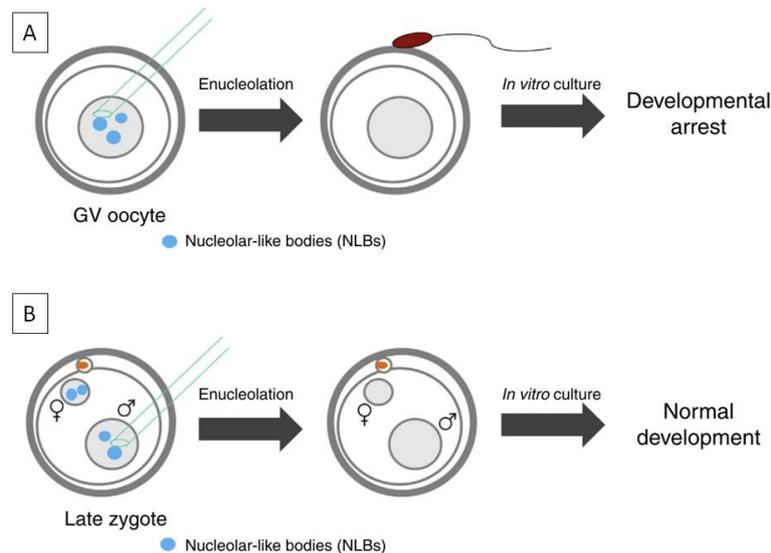


Figure R-16 : schéma illustrant les expériences d'énucléolation et leur impact sur le développement. A) Des embryons fécondés à partir d'ovocytes au stade GV préalablement énucléolés ne sont pas en mesure de se développer alors que B) des embryons énucléolés au stade 1-cellule (PN4/5) sont capables de se développer à terme. Source: Dang-Nguyen & Torres-Padilla, 2015.

Il est par ailleurs connu qu'après fécondation la transcription de l'hétérochromatine péricentromérique démarre dans l'embryon de souris dès la fin du stade 1-cellule, dans le pronoyau paternel (figure R-17) (Probst et al. 2010). Il y a notamment synthèse des transcrits « anti-sens »; l'inhibition de cette transcription empêchant la formation des chromocentres et entraînant un arrêt du développement au stade 2-cellules (Casanova et al. 2013). De plus, les ARN « sens », transcrits au stade 2-cellules sont exclusivement d'origine paternelle. Le génome paternel apporte donc la majorité des ARN « sens et anti-sens » dans l'embryon. Ces ARN ont donc un rôle crucial dans l'organisation et la transcription de l'hétérochromatine péricentromérique (Probst et al. 2010 ; Casanova et al. 2013).

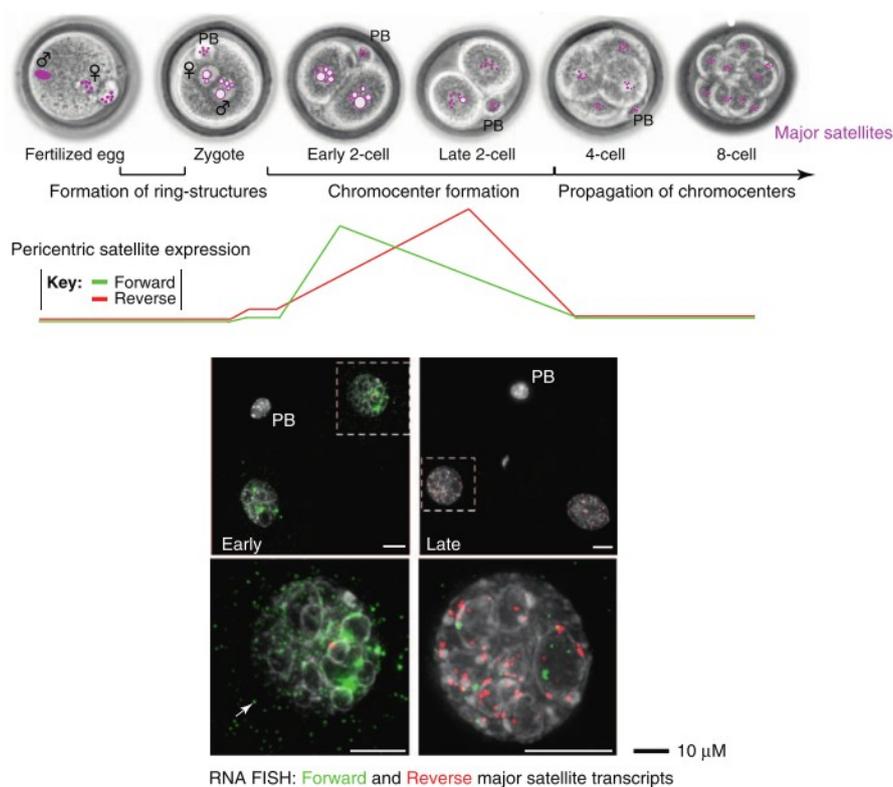


Figure R-17 : Expression des transcrits correspondant aux séquences péricentromériques. Partie supérieure: schéma illustrant l'expression de ces transcrits dans les deux sens d'orientation sens (forward) et antisens (reverse) et leur potentielle implication dans la formation des chromocentres au cours du développement embryonnaire (PB: polar body). Partie inférieure: images montrant des embryons au stade 2-cellules précoce et tardif dans lesquels les ARN sens (vert) et antisens (rouge) sont révélés par ARN-FISH, avec d'abord un projection en z des embryons puis un grossissement sur un noyau de blastomère (ADN en gris; barre d'échelle = 10 µm). Source: Probst et Almouzni, 2011

Au vu de ces données, je me suis intéressée dans la dernière partie de ma thèse à la contribution de chaque génome parental en termes d'organisation et de transcription de l'hétérochromatine péricentromérique dans l'embryon précoce de souris. Pour cela, j'ai utilisé des modèles embryonnaires diploïdes à constitution génomique uniparentale. Il s'agit d'embryons gynogénètes (2 pronoyaux maternels) et androgénètes (2 pronoyaux paternels)

produits dans deux conditions différentes (figure R-18). Dans la première condition les embryons ont été manipulés avant la formation des pronoyaux (manipulation « précoce »), c'est-à-dire avant le recrutement de l'hétérochromatine péricentromérique autour des NPB et le démarrage de leur transcription. Dans ce cas, les pronoyaux se forment et évoluent sans contribution du pronoyau de « sexe opposé ». Il s'agit d'embryons gynogénotes produits par parthénogenèse (Gyno-PaDi) et d'androgénotes produits par double ICSI (injection intracytoplasmique de deux têtes de spermatozoïdes) dans un ovocyte préalablement énucléé (Andro-ICSI).

Dans la deuxième condition, les embryons ont été manipulés plus tardivement, à la fin du stade 1-cellule (PN4) après le recrutement de l'hétérochromatine péricentromérique autour des NPB et l'initiation de la transcription. Il s'agit d'embryons produits par échange de pronoyaux (voir la partie matériel et méthodes). Dans ces embryons androgénotes (Andro-EchPN) et gynogénotes (Gyno-EchPN), les 2 pronoyaux étaient déjà formés avant l'échange, les pronoyaux ayant été en présence l'un de l'autre pendant la quasi totalité du premier cycle embryonnaire (~12 heures sur 18 au total).

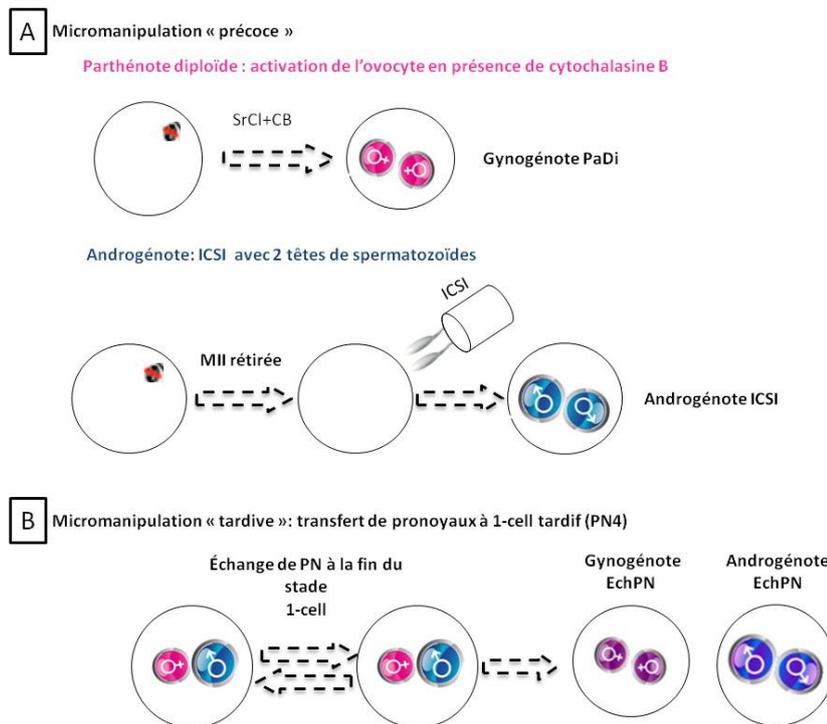


Figure R-18: Schéma illustrant la production des différents modèles embryonnaires diploïdes à constitution génomique uniparentale utilisés. Dans la première condition (A), les embryons ont été manipulés avant la formation des pronoyaux. Dans la seconde condition, les embryons ont été produits plus tardivement par échange de pronoyaux à la fin du stade 1-cellule (PN4). Les embryons gynogénotes (deux pronoyaux maternels) et androgénotes (2 pronoyaux paternels) ainsi obtenus sont tous diploïdes mais la formation des pronoyaux aura eu lieu soit en absence, soit en présence des pronoyaux de "sexe opposé".

En parallèle, des embryons fécondés naturellement et non manipulés ont été inclus dans l'étude comme zygotes témoins.

Afin d'étudier l'impact de ces manipulations sur la dynamique de l'hétérochromatine péricentromérique, j'ai tout d'abord analysé aux stades 1-cellule tardif, 2-cellules précoce et stade 2-cellules tardif l'organisation des séquences satellites majeurs et mineurs par ADN-FISH. Ensuite, j'ai étudié la dynamique transcriptionnelle des ARN « sens » et « anti-sens » issus des régions péricentromériques par ARN-FISH. Et enfin, j'ai analysé la cinétique de développement de ces différents embryons.

II-2) Résultats

II-2-1) Organisation des séquences satellites majeurs et mineurs

A partir des images acquises en microscopie confocale après ADN-FISH des séquences satellites majeurs et mineurs, j'ai pu identifier plusieurs critères intéressants que j'ai ensuite quantifiés, du stade 1-cellule tardif (pronoyaux paternel et maternel confondus) au stade 2-cellules tardif. Je me suis également intéressée au recouvrement des NPB par les séquences satellites et à la formation des chromocentres.

Interaction NPB/ séquences satellites majeurs et mineurs

Comme attendu (Aguirre-Lavin et al. 2012), les séquences satellites majeurs et mineurs sont principalement recrutées en périphérie des NPB dès le stade 1-cellule même si certaines séquences satellites ne s'associent pas aux NPB, surtout au stade 1-cellule tardif (figure R-20). Ce type de signal nucléoplasmique isolé, très minoritaire, a été observé dans tous les modèles embryonnaires analysés sans différence notable. Je me suis donc focalisée sur les NPB qu'ils soient associés aux séquences satellites majeurs et mineurs (NPB-SAT) ou dépourvus de signal (NPB-null) (figure R-20) et j'ai quantifié ces deux catégories de NPB dans les embryons gynogénètes et androgénètes ainsi que les zygotes témoins.

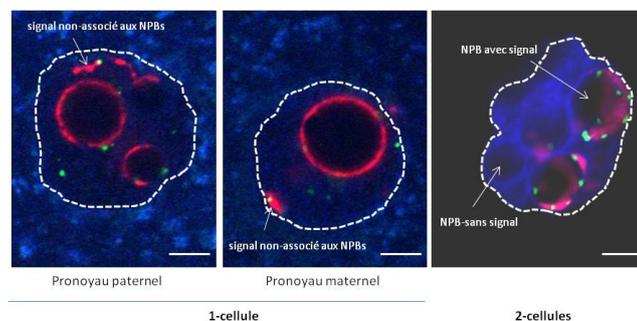


Figure R-20 : Exemples d'interactions entre les NPB et les signaux d'ADN-FISH obtenus avec les sondes spécifiques des satellites majeurs (rouge) et mineurs (vert). On distingue les signaux isolés dans le nucléoplasme, non associés aux NPB, les signaux associés aux NPB et les NPB sans signaux. Images (sections optiques) obtenues en microscopie confocale, avec contre-coloration de l'ADN (bleu). Sur ces exemples la périphérie des noyaux est délimitée par des pointillés. Barres d'échelle = 5 µm.

De plus, il s'avère que les séquences satellites majeurs et mineurs recouvrent en grande partie (voire entièrement) la surface des NPB au stade 1-cellule et 2-cellules précoce. Au stade 2-cellules, elles ont alors tendance à se dissocier des NPB pour former les chromocentres (figure R-19) (Aguirre-Lavin et al. 2012). Du fait de cette dynamique, la surface de recouvrement des NPB par les séquences satellites majeurs et mineurs évolue au cours du développement embryonnaire. J'ai donc étudié l'interaction entre NPB et séquences satellites majeurs et mineurs de manière plus détaillée : parmi les NPB-SAT, j'ai distingué trois types de recouvrement (r) (figure R-21): 1) lorsque la surface de recouvrement des NPB par les séquences satellites est supérieure ou égale à 50% ($\text{NPB-r} \geq 50\%$) formant des anneaux à la surface des NPB, 2) lorsque la surface de recouvrement est inférieure à 50% formant des arcs relativement fins à la surface des NPB ($\text{NPB-r} < 50\%$) et 3) lorsque la surface de recouvrement inférieure à 50% et que les séquences satellites s'agrègent à la surface des NPB formant des « arcs condensés » (NPB-arc condensé) avant dissociation de ces séquences et des NPB (Aguirre-Lavin et al. 2012).

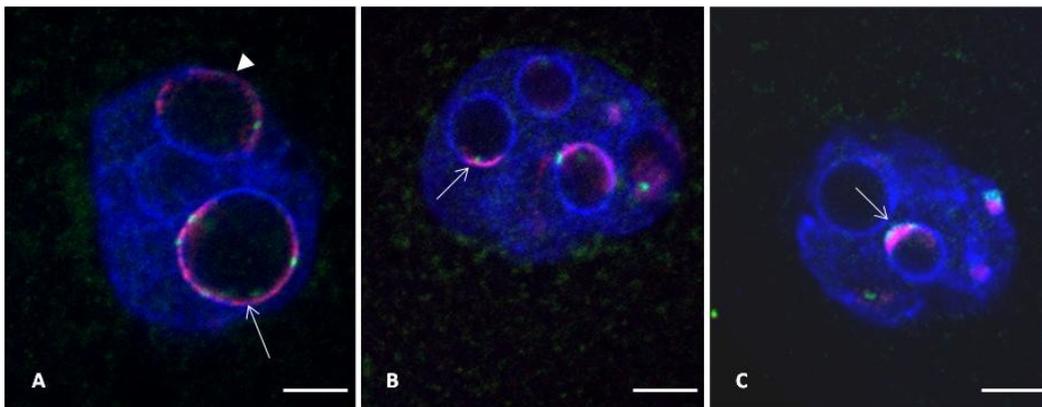


Figure R-21: Différents types de recouvrement des NPB par les séquences satellites majeurs et mineurs. A) Recouvrement inférieur à 50% (tête de flèche) et supérieur ou égal à 50% (flèche), B) recouvrement à moins de 50% de type arc simple, C) arc condensé (flèche). ADN contre-coloré en bleu, séquence satellites majeurs en rouge et mineurs en vert. Images (sections optiques) obtenues en microscopie confocale. Barre d'échelle = 5 μm .

➤ *Cas des zygotes témoins*

La quantification des NPB avec ou sans signal (Figure R-22 ci-contre) montre qu'au stade 1-cellule tardif, les NPB-SAT sont majoritaires ($\sim 3 \text{ NPB-SAT} \pm 0,4$ versus $\sim 1 \text{ NPB-null} \pm 0,4$; $n=22$; $p=0,05$). Le nombre de chacune de ces deux catégories de NPB augmente au stade 2-cellules précoce mais reste toujours plus élevé dans le cas des NPB-SAT ($\sim 8 \text{ NPB-SAT} \pm 0,3$ versus $\sim 3 \text{ NPB-null} \pm 0,3$; $n=52$; $p=0,01$). Au stade 2-cellules tardif, le nombre de NPB-SAT a tendance à diminuer ($\sim 7 \pm 0,2$; $n=56$; $p=0,05$). Les NPB-null restent néanmoins minoritaires ($p < 0,01$).

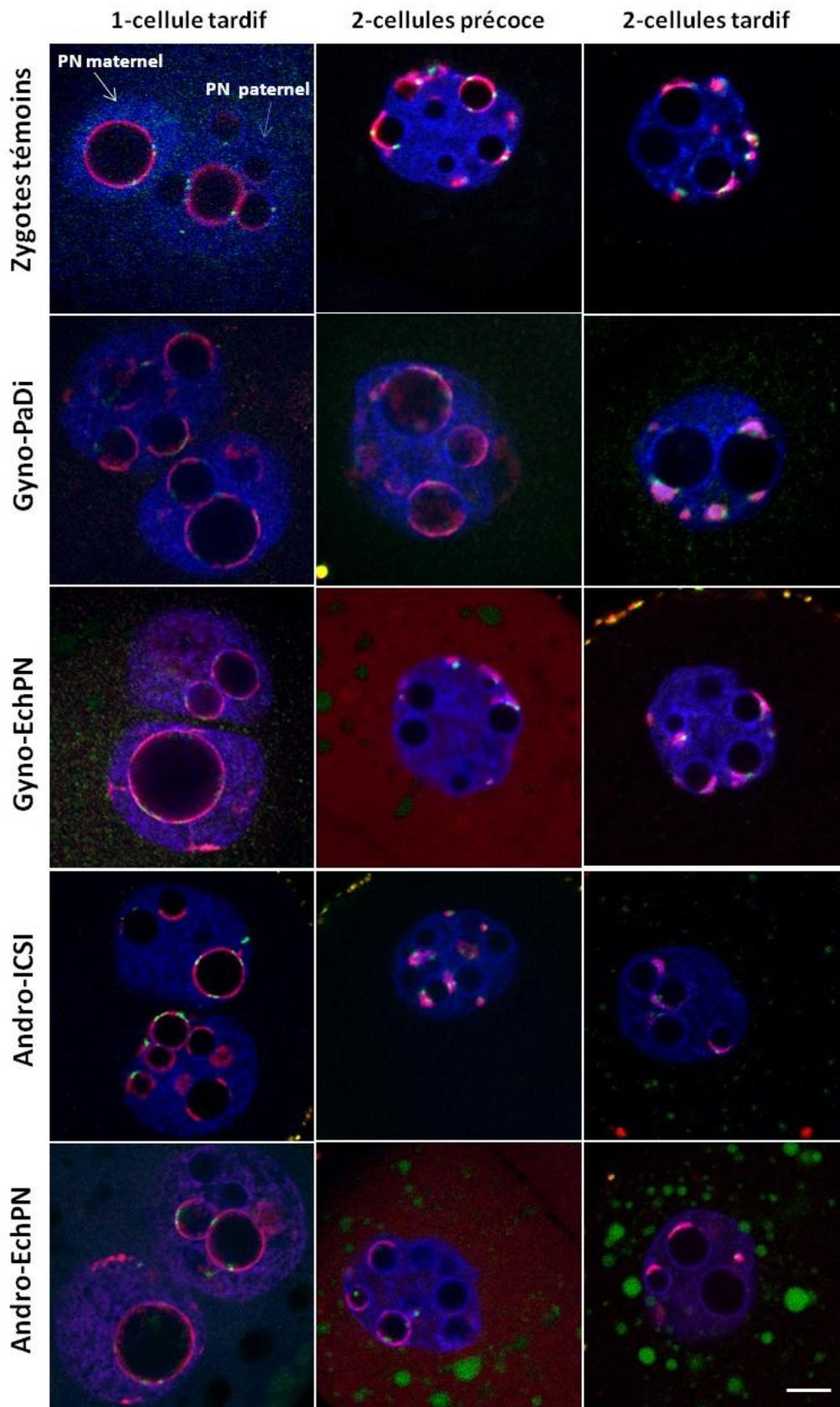


Figure R-19 : Exemples d'images d'ADN-FISH obtenues avec les sondes spécifiques des satellites majeurs (rouge) et mineurs (vert) sur nos différents modèles embryonnaires, du stade 1-cellule tardif au stade 2-cellules tardif. Images (sections optiques) obtenues en microscopie confocale, avec contre-coloration de l'ADN (bleu). Barres d'échelle = 5µm.

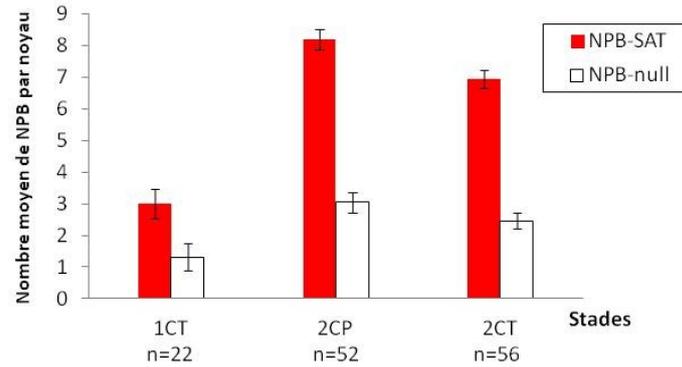


Figure R-22: Quantification du nombre moyen de NPB avec (NPB-SAT) ou sans signal (NPB-null) dans les zygotes témoins après ADN-FISH des séquences satellites majeurs/mineurs. Analyse réalisée au stade 1-cellule tardif (1CT) et au stade 2-cellules précoce (2CP) / tardif (2CT). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le nombre total de noyaux analysés (n) est indiqué sous l'axe des abscisses.

La surface de recouvrement des NPB par les séquences satellites majeurs et mineurs a ensuite été analysée (Figure R-23). Au stade 1-cellule tardif, on retrouve essentiellement des NPB-r $\geq 50\%$ (94%, $p < 0,01$). Au stade 2-cellules précoce, la proportion de NPB-r $\geq 50\%$ diminue ensuite considérablement (38% ; $p < 0,001$), alors que les pourcentages de NPB-r $< 50\%$ et NPB-arc condensés augmentent (de 2% à 27% pour les NPB-r $< 50\%$ et de 5 % à 38% pour les arcs condensés, $p < 0,001$). Au stade 2-cellules tardif, la proportion de NPB-r $\geq 50\%$ diminue encore légèrement (34% ; $p < 0,001$). On observe également moins de NPB-r $< 50\%$ (16% ; $p = 0,05$) tandis que la catégorie des NPB-arcs condensés augmente (47% ; $p = 0,05$) devenant ainsi majoritaire.

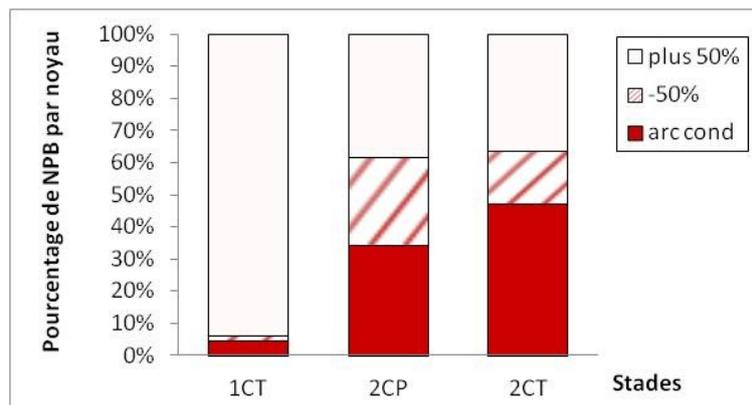


Figure R-23: Analyse des signaux d'ADN-FISH des séquences satellites majeurs/mineurs dans les zygotes témoins. Les pourcentages (moyenne) des différents types de recouvrement ($r \geq 50\%$, $r < 50\%$ et arcs condensés) sont indiqués. Le nombre total de noyaux et les stades analysés sont identiques à celui de la figure précédente.

Nos données sont cohérentes avec l'hypothèse selon laquelle la formation des arcs condensés serait associée à la dissociation des séquences satellites majeurs/mineurs des NPB au stade 2-cellules tardif (Aguirre-Lavin et al. 2012).

➤ *Comparaison entre embryons gynogénètes : Gyno-PaDi et Gyno-EchPN*

L'évolution des différentes catégories de NPB dans les embryons Gyno-PaDi et Gyno-EchPN est représentée dans la figure R-24. Dans les embryons Gyno-PaDi, la population de NPB est essentiellement composée au stade 1-cellule de NPB-SAT ($\sim 2 \pm 0,1$; $n= 98$). Ce n'est qu'au stade 2-cellules que l'on observe les NPB-null ($\sim 1 \pm 0,1$ à 2-cellules précoce et tardif ; $n= 74$ et 102 respectivement). Les NPB-SAT restent cependant majoritaires au cours du stade 2-cellules avec un maximum à 2-cellules précoce (~ 7 NPB-SAT ± 0.4 , $p<0,001$).

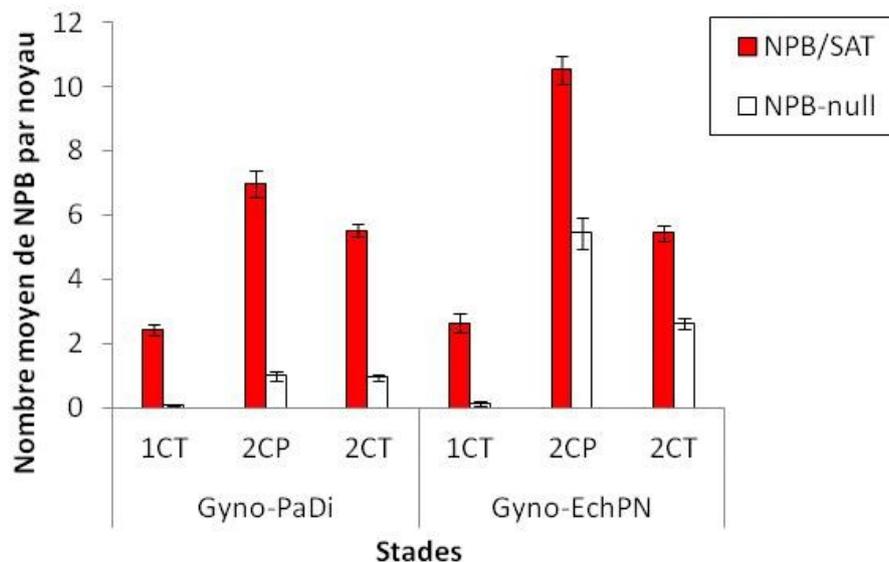


Figure R-24: Quantification du nombre moyen de NPB avec signal (NPB/SAT) ou sans signal (NPB-null) dans les gynogénètes après ADN-FISH des séquences satellites majeurs/mineurs. Analyse réalisée au stade 1-cellule tardif (1CT) et au stade 2-cellules précoce (2CP) / tardif (2CT). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le nombre total de noyaux analysés (n) est indiqué sous l'axe des abscisses.

La répartition des NPB- null et NPB-SAT dans les embryons Gyno-EchPN est similaire à celle des Gyno-PaDi : les NPB-SAT sont majoritaires à tous les stades étudiés (figure R-24). Néanmoins, on remarque que le nombre de NPB- null et NPB-SAT est, au stade 2-cellules précoce, très supérieur dans les embryons Gyno-EchPN en comparaison aux Gyno-PaDi avec notamment ~ 11 NPB-SAT $\pm 0,4$ dans les embryons Gyno-EchPN ($n= 52$, $p<0.001$ par rapport aux PaDi).

Au stade 1-cellule tardif, on retrouve des NPB- $r \geq 50\%$ aussi bien dans les embryons Gyno-PaDi ($n=98$) que dans les embryons Gyno-EchPN ($n=42$) (figure R-25). Les NPB- $r < 50\%$ et NPB-arcs condensés apparaissent surtout au stade 2-cellules. Cependant, le pourcentage de NPB-arcs condensés augmente considérablement plus entre le stade 1-cellule et le stade 2-cellules précoce dans les embryons Gyno-EchPN (de 0% à 76%, $p<0,001$) en comparaison aux Gyno-PaDi (de 3% à 10%, $p<0,001$). Dans les embryons Gyno-PaDi, le pourcentage de

NPB-arcs condensés atteint 49% seulement au stade 2-cellules tardif, alors que celui des NPB- $r \geq 50\%$ et NPB- $r < 50\%$ diminue (31% et 20%, respectivement).

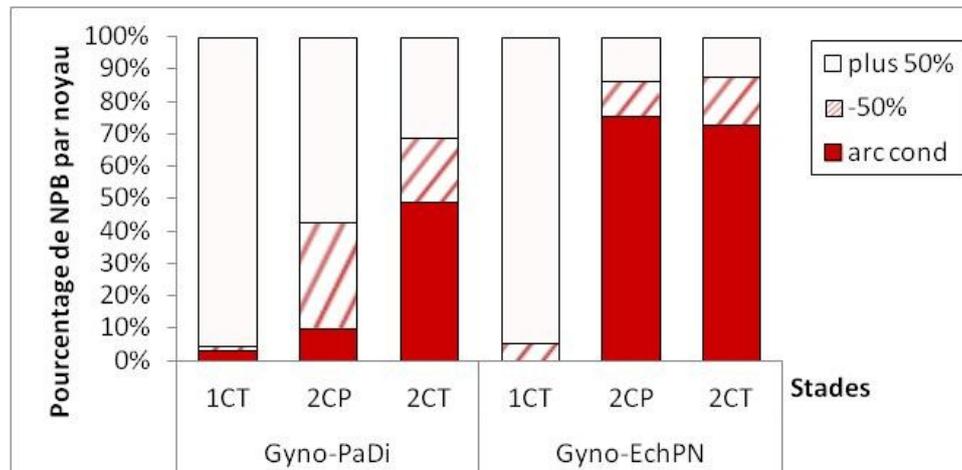


Figure R-25: Analyse des signaux d'ADN-FISH des séquences satellites majeurs/mineurs dans les gynogénètes. Les pourcentages (moyenne) des différents types de recouvrement ($r \geq 50\%$, $r < 50\%$ et arcs condensés) sont indiqués. Le nombre total de noyaux et les stades analysés sont identiques à celui de la figure précédente.

Ces données suggèrent que le regroupement des séquences satellites en périphérie des NPB démarre dès le stade 2-cellules précoce dans les embryons Gyno-EchPN alors que la cinétique des embryons Gyno-PaDi est plus proche de celle des zygotes témoins.

➤ *Comparaison entre les embryons Andro-ICSI et Andro-EchPN*

Dans les embryons Andro-ICSI, on observe majoritairement des NPB-SAT au stade 1-cellule ($\sim 3 \pm 0,2$; $n = 48$) (figure R-26). Par contre, bien que ce nombre augmente au stade 2-cellules précoce ($\sim 5 \pm 0,4$; $n = 58$; $p < 0,01$), cette valeur reste inférieure au nombre de NPB-null qui sont alors majoritaires ($\sim 9 \pm 0,6$; $p < 0,001$). Au stade 2-cellules tardif, le nombre de NPB-null chute brutalement ($\sim 3 \pm 0,2$; $p < 0,001$) et atteint une valeur similaire à celle des NPB-SAT ($\sim 3 \pm 0,2$).

Contrairement à ce qui a été observé pour les embryons Andro-ICSI, les NPB-SAT sont plus nombreux que les NPB-null à tous les stades analysés dans les embryons Andro-EchPN (figure R-26). Le nombre de NPB-SAT augmente notamment considérablement entre le stade 1-cellule ($\sim 2 \pm 0,2$; $n = 60$) et le stade 2-cellules précoce ($\sim 6 \pm 0,4$; $n = 56$, $p < 0,01$) mais reste identique au stade 2-cellules tardif ($\sim 6 \pm 0,2$; $n = 98$). Malgré l'augmentation du nombre de NPB-null entre le stade 1-cellule tardif ($\sim 1 \pm 0,1$; $n = 60$) et le stade 2-cellules précoce ($\sim 3 \pm 0,3$; $n = 56$; $p < 0,01$), cette catégorie de NPB reste minoritaire.

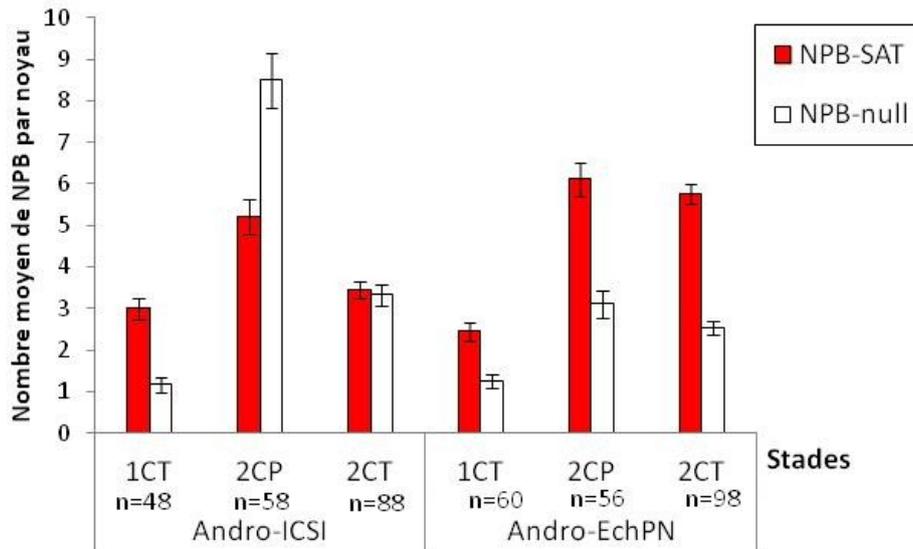


Figure R-26: Quantification du nombre moyen de NPBs avec signal (NPB-SAT) ou sans signal (NPB-null) dans les androgénotes après ADN-FISH des séquences satellites majeurs/mineurs. Analyse réalisée au stade 1-cellule tardif (1CT) et au stade 2-cellules précoce (2CP) / tardif (2CT). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le nombre total de noyaux analysés (n) est indiqué sous l'axe des abscisses.

Lorsqu'on analyse les critères de recouvrement des NPB, pour les embryons Andro-ICSI, on retrouve surtout des NPB-r $\geq 50\%$ au stade 1-cellule tardif (92%; figure R-27). A partir du stade 2-cellules précoce, le pourcentage de NPB-r $\geq 50\%$ diminue drastiquement (27% ; $p < 0,01$), parallèlement à l'augmentation des NPB-r $< 50\%$ et des NPB-arcs condensés (17% et 56%, respectivement). Dans le cas des NPB-arcs condensés, cette augmentation se poursuit au stade 2-cellules tardif (87%, $p < 0,01$).

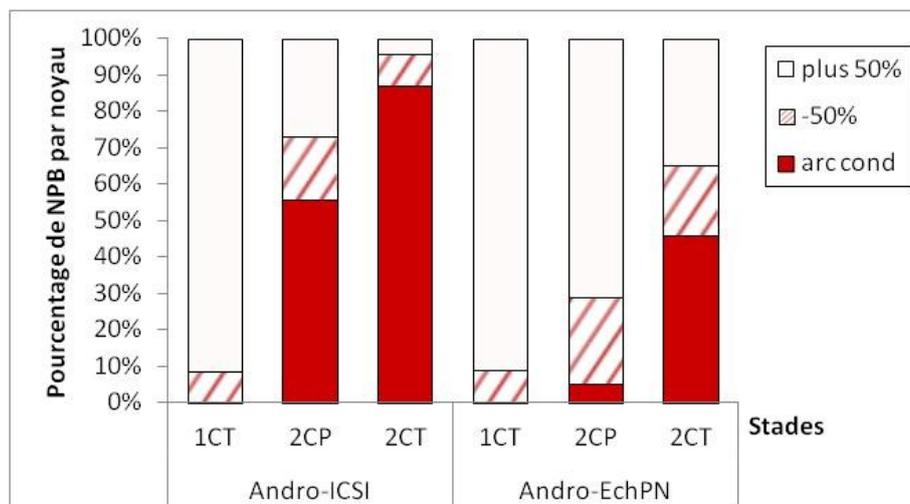


Figure R-27: Analyse des signaux d'ADN-FISH des séquences satellites majeurs/mineurs dans les androgénotes. Les pourcentages (moyenne) des différents types de recouvrement ($r \geq 50\%$, $r < 50\%$ et arcs condensés) sont indiqués. Le nombre total de noyaux et les stades analysés sont identiques à celui de la figure précédente.

Dans les embryons Andro-EchPN, on observe surtout des NPB- $r \geq 50\%$ au stade 1-cellule (92%). Cependant, au stade 2-cellules précoce, la diminution de ces NPB- $r \geq 50\%$ (71% ; $p < 0,001$) est moins drastique que dans les embryons Andro-ICSI. Les NPB- $r \geq 50\%$ restent majoritaires à ce stade malgré l'augmentation des NPB- $r < 50\%$ et des NPB-arcs condensés (24% et 5%, respectivement). Au stade 2-cellules tardif, la proportion de NPB- $r \geq 50\%$ diminue (35% ; $p < 0,01$) et celle des NPB-arcs condensés augmente considérablement (46% ; $p < 0,01$), toutefois moins que dans les embryons Andro-EchPN (87%).

Ces résultats suggèrent que les événements de regroupement des séquences satellites majeurs et mineurs sont "accélérés" dans les embryons Andro-ICSI qui présentent un pourcentage élevé de NPS-arcs condensés dès le stade 2-cellules précoce.

Formation des chromocentres

Lorsque les séquences satellites majeurs et mineurs ne sont plus associées aux NPB, elles apparaissent dans le nucléoplasme soit i) sous forme d'agrégats arrondis, aux contours réguliers - il s'agit de chromocentres compacts, soit) sous forme d'agrégats d'aspect irrégulier, aux contours non définis - chromocentres « non-compacts » (figure R-28). Les chromocentres non compacts sont considérés comme des formes intermédiaires avant d'atteindre la forme « compacte » (Aguirre-Lavin et al. 2012).

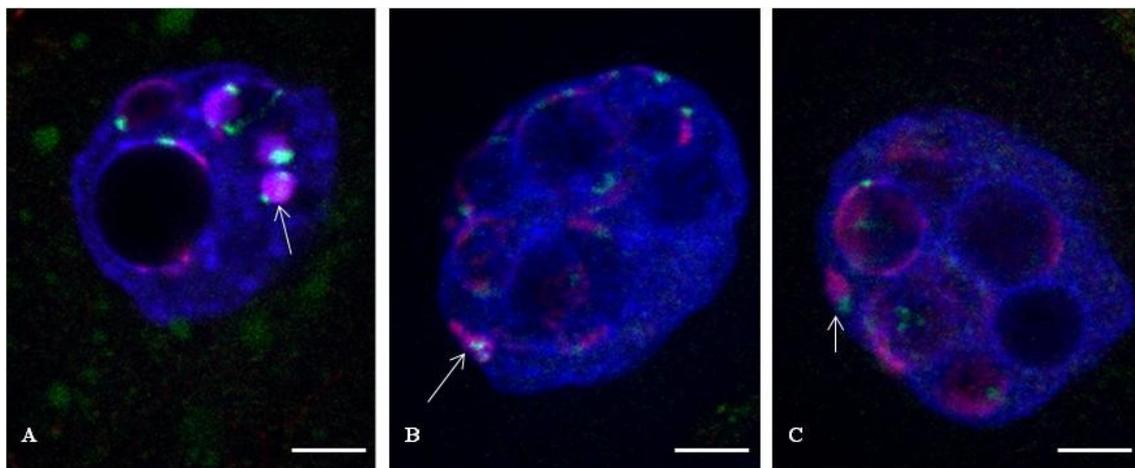


Figure R-28: Exemples de chromocentres. A) chromocentre compact (flèche); B et C) chromocentres non-compacts (flèches). ADN contre-coloré en bleu, séquence satellites majeurs en rouge et mineurs en vert. Images (sections optiques) obtenues en microscopie confocale. Barre d'échelle = 5 μ m.

Dans cette partie de mon travail, j'ai d'abord quantifié le nombre total de chromocentres puis déterminé le pourcentage de chaque forme (compacte versus non-compacte) dans les mêmes modèles embryonnaires que précédemment. Il est important de noter que cette quantification

ne tient pas compte de la localisation des signaux d'ADN-FISH (à proximité des NPB ou isolés dans le nucléoplasme).

➤ *Cas des zygotes témoins*

Comme attendu, les chromocentres sont très rarement observés au stade 1-cellule (figure R-29). Ce n'est qu'à partir du stade 2-cellules précoce qu'ils sont détectés (~ 7 chromocentres au total ± 0,4 ; n= 52), surtout sous forme compacte (~ 62%). Au stade 2-cellules tardif, le nombre de chromocentres est quasiment identique (~ 8 ± 0,4 ; n= 56, différence non significative), avec cependant un pourcentage plus important de chromocentres compacts (~75%, p<0,01).

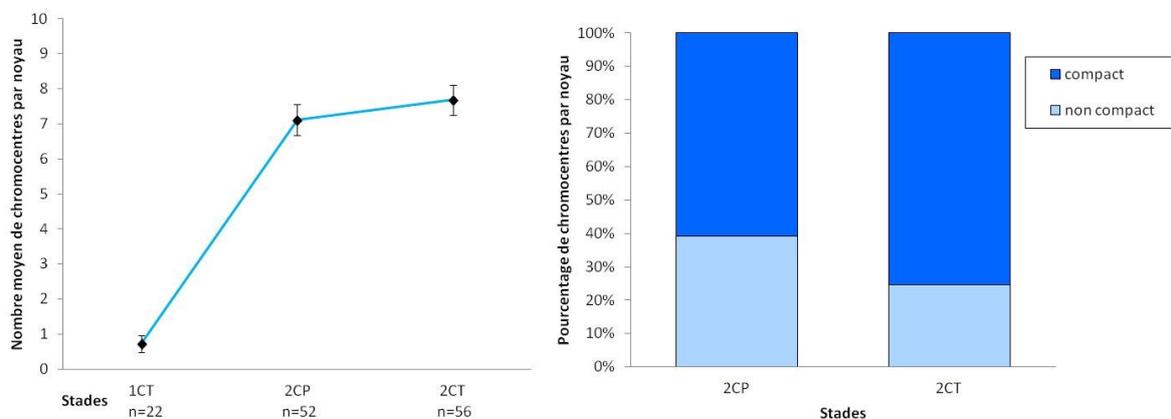


Figure R-29: Quantification du nombre moyen de chromocentres (par noyau) et analyse de leur état de compaction (compact/non compact) dans les zygotes témoins après ADN-FISH des séquences satellites majeurs/mineurs. Analyse réalisée au stade 1-cellule tardif (1CT) et au stade 2-cellules précoce (2CP) / tardif (2CT). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le nombre total de noyaux analysés est indiqué (n). L'analyse de la compaction n'a été réalisée qu'au stade 2-cellules.

➤ *Comparaison Gyno-PaDi et Gyno-EchPN*

Dans les embryons Gyno-PaDi et Gyno-EchPN, on observe très peu de chromocentres, non compact, au stade 1-cellule (~1 ± 0 ; Figure R-30). Dans les embryons Gyno-PaDi et Gyno-EchPN, le nombre de chromocentres augmente considérablement au stade 2-cellules précoce (~8 ± 0,3 ; n= 74 Gyno-PaDi et ~ 7 ± 0,5 ; n= 52 Gyno-EchPN; p<0,001) et ceux-ci sont majoritairement non-compacts (64% et 68% respectivement). Au stade 2-cellules tardif, on observe par contre une réduction du nombre de chromocentres dans les embryons Gyno-PaDi (~5 ± 0,2 généralement compacts ; n= 102 ; p<0,01), alors qu'il augmente dans les embryons Gyno-EchPN (~9 ± 0,5 ; généralement compacts; n= 94, p<0,01). Ces données suggèrent que la formation des chromocentres a bien lieu au stade 2-cellules dans les embryons Gyno-PaDi et les embryons Gyno-EchPN mais il semblerait que ce processus soit altéré dans les embryons Gyno-PaDi (pourcentage plus élevé de chromocentres compacts).

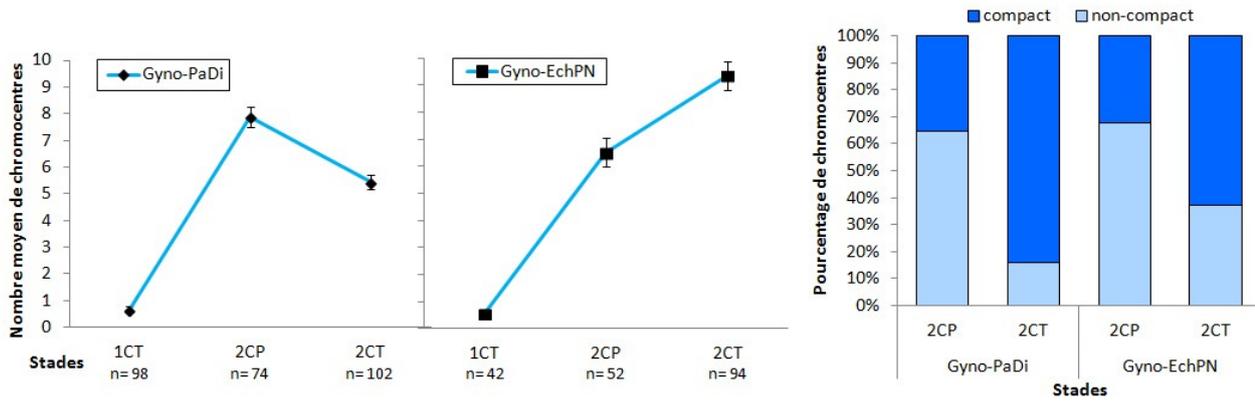


Figure R-30: Quantification du nombre moyen de chromocentres (par noyau) et analyse de leur état de compaction (compact/non compact) dans les gynogénètes après ADN-FISH des séquences satellites majeurs/mineurs. Analyse réalisée au stade 1-cellule tardif (1CT) et au stade 2-cellules précoce (2CP) / tardif (2CT). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le nombre total de noyaux analysés est indiqué (n). L'analyse de la compaction n'a été réalisée qu'au stade 2-cellules.

➤ *Comparaison entre Andro-ICSI et Andro-EchPN*

Au stade 1-cellule tardif, aucun chromocentre n'est observé dans les embryons Andro-ICSI et les embryons Andro-EchPN (figure R-31). Dans les embryons Andro-ICSI, les chromocentres apparaissent au stade 2-cellules précoce ($\sim 6 \pm 0,6$; n= 58), aussi bien sous forme non-compacte que compacte (51% vs. 49% respectivement). Le nombre de chromocentres reste constant au stade 2-cellules tardif ($\sim 6 \pm 0,3$; n= 88) mais les chromocentres sont alors majoritairement compacts (85%). Les chromocentres, plutôt de forme non-compacte (71%), sont également visibles à partir du stade 2-cellules précoce dans les embryons Andro-EchPN ($\sim 5 \pm 0,3$; n= 56). Au stade 2-cellules tardif, le nombre de chromocentres reste constant ($\sim 5 \pm 0,3$; n= 98), avec surtout une structure compacte (75%).

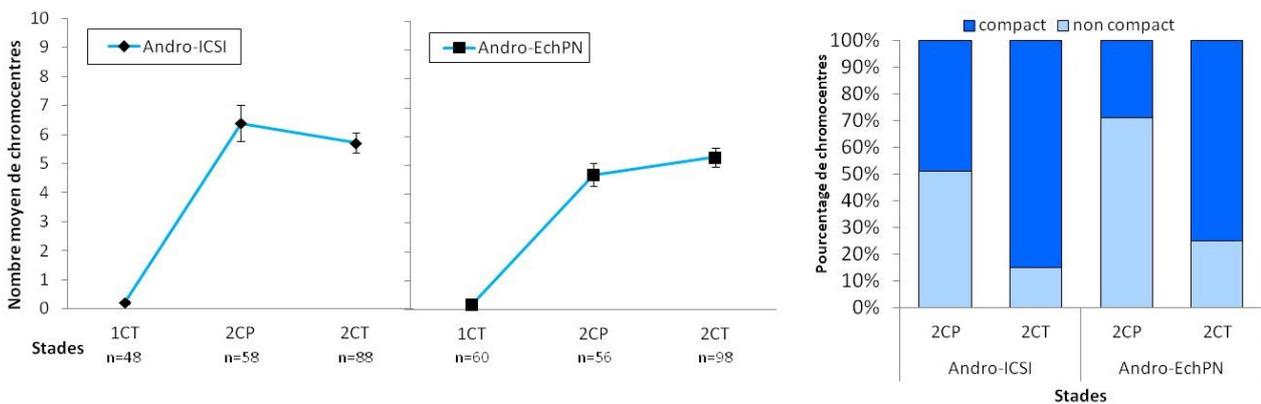


Figure R-31: Quantification du nombre moyen de chromocentres (par noyau) et analyse de leur état de compaction (compact/non compact) dans les androgénètes après ADN-FISH des séquences satellites majeurs/mineurs. Analyse réalisée au stade 1-cellule tardif (1CT) et au stade 2-cellules précoce (2CP) / tardif (2CT). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le nombre total de noyaux analysés est indiqué (n). L'analyse de la compaction n'a été réalisée qu'au stade 2-cellules.

Ces résultats montrent qu'indépendamment du moment de la manipulation des embryons, la formation des chromocentres ainsi que leur évolution au cours du développement sont relativement similaires entre les embryons Andro-ICSI et les embryons Andro-EchPN. Ces embryons Andro-ICSI présentent cependant un pourcentage plus élevé de chromocentres compacts que les zygotes témoins.

II-2-2) Transcription des séquences satellites majeurs

La suite de mon projet a consisté à analyser par ARN-FISH la transcription brin-spécifique des séquences satellites majeurs dans les embryons androgénotes et gynogénotes, ainsi que dans des embryons zygotes témoins. Pour cela, j'ai utilisé deux sondes LNA spécifiques des brins « sens » (forward en anglais) et « anti-sens » (reverse en anglais) (voir la partie matériel et méthodes). La spécificité de ces sondes a été testée sur des embryons zygotes traités ou non à la RNase (témoins positifs et négatifs respectivement). Dans les lots traités à la RNase, aucun signal n'a été détecté dans les embryons aussi bien au stade 1-cellule tardif qu'au stade 2-cellules tardif confirmant que le signal est bien spécifique des ARN des séquences satellites. Des exemples représentatifs des signaux de RNA-FISH obtenus (sans traitement RNase) sont présentés dans la figure R-32 (ci-après).

Les signaux obtenus par RNA-FISH sont de taille et de nombre variables. J'ai donc établi pour chaque sonde plusieurs critères de taille (de - à ++++) et de nombre (inférieur à 10 ; compris entre 10 et 30 ; supérieur à 30).

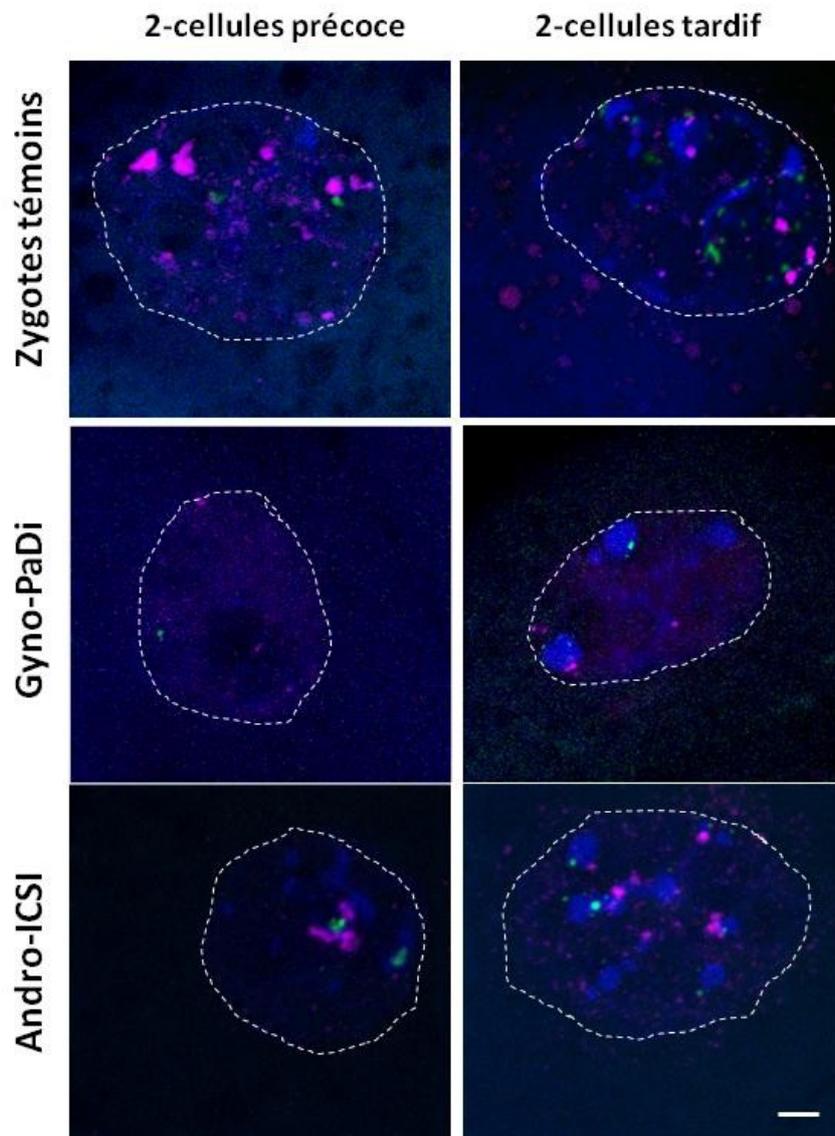
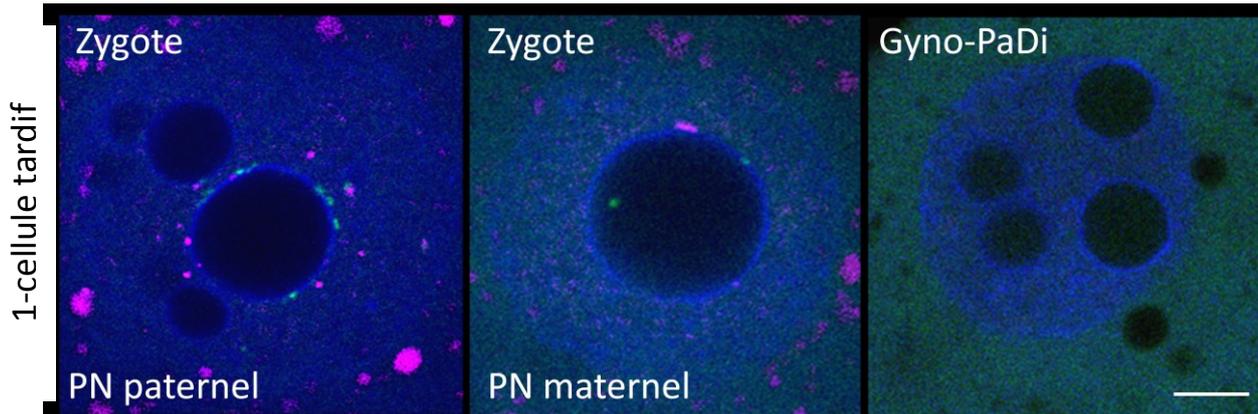


Figure R-32 : Exemples d'images d'ARN-FISH obtenues avec les sondes spécifiques des satellites majeurs sens (vert) et anti-sens (rouge) sur différents modèles embryonnaires, au stade 1-cellule tardif, 2-cellules précoce ou 2-cellules tardif. Images obtenues en microscopie confocale, avec contre-coloration de l'ADN (bleu). Section optique simple pour les stades 1-cellule et projection en z pour les stades 2-cellules. Au stade 2-cellules, la périphérie des noyaux est délimitée par des pointillés. Barres d'échelle = 5 μ m.

Les données obtenues pour chaque stade et chaque modèle embryonnaire sont résumées dans le tableau ci-dessous.

	1-cellule				2-cellules	
	PN4 ♂	PN4 ♀	PN5 ♂	PN5 ♀	précoce	tardif
Zygote	+ 10-30	-	+ 10-30	+ <10	++++ >30	+++ >30
	-	-	+ 10-30	+ <10	++ <10	++ >30
Gyno PaDi		-		-	+ 10-30	+ 10-30
		-		-	+ <10	+ 10-30
Gyno EchPN		-		+ <10	+ <10	+ 10-30 +++ >30
		-		+ <10	+ <10	+ >30
Andro ICSI	+ <10		+ 10-30		++++ >30	+++ >30
	-		- + <10		++ 0-30	+ >30
Andro EchPN	+ 10-30		+ 10-30		++++ >30	+++ >30
	-		- + >30		++ <10	+ >30

Tableau R-1: Analyse des signaux de ARN-FISH sur les séquences satellites majeurs dans les différents modèles embryonnaires aux stades 1-cellule et 2-cellules. Les critères taille de signaux (de + à +++) et leur nombre (<10, 10-30 ou >30) sont indiqués pour les sondes sens (fond vert) et antisens (fond rouge). Le symbole - est utilisé lorsqu'aucun signal n'a été détecté. Les signaux reportés sont ceux observés dans la majorité des embryons. Lorsque deux types de signaux ont été observés en % égaux, les deux cas de figures ont été reportés dans le tableau. Au stade 1-cellule, l'origine paternelle (♂) ou maternelle (♀) des génomes est également prise en compte.

➤ *Cas des zygotes témoins*

Dans les zygotes témoins, la transcription des brins sens et anti-sens démarre dès le stade 1-cellule (n=14) avec cependant une cinétique de transcription différente pour chaque brin. La transcription est initiée dans le pronoyau paternel, en commençant par le brin anti-sens uniquement à PN4, puis les deux ARN sens et anti-sens sont détectables au stade PN4/5. Ce n'est qu'à partir du stade PN5 que les ARN sens et anti-sens sont détectés dans les deux pronoyaux, bien que ces signaux soient toujours plus importants dans le pronoyau paternel. Au cours du stade 2-cellules le signal RNA-FISH anti-sens est toujours supérieur (en taille et en nombre) au signal sens, aussi bien au stade précoce (n=6) qu'au stade tardif (n=7).

➤ *Comparaison entre les embryons Gyno-PaDi et Gyno-EchPN*

Alors que les embryons Gyno-PaDi ne présentent aucun signal au stade 1-cellule (n=34), des transcrits sens et anti-sens sont faiblement détectés dans les Gyno-EchPN à PN5 (n=20). Au stade 2-cellules précoce. Le niveau de synthèse des ARN sens et anti-sens reste relativement

faible dans les embryons Gyno-EchPN (n=24) et apparaît dans les embryons Gyno-PaDi (n=34). Dans ces embryons, on peut noter que les ARN anti-sens sont les plus abondants. Au stade 2-cellules tardif, la synthèse de ces ARN semble s'intensifier légèrement dans les embryons Gyno-PaDi (n=34). On observe par contre une intensification du signal plus importante dans les Gyno-EchPN (n=16). Certains embryons (50%, n=8 sur 16) présentent même un signal antisens similaire à celui observé dans le groupe témoin.

➤ *Comparaison entre les embryons Andro-ICSI et Andro-EchPN*

Les ARN anti-sens sont exprimés dans les embryons Andro-ICSI dès le stade 1-cellule PN4 (n=28). Les ARN sens sont également détectés dans ~30% de ces embryons dès le stade PN5. Les niveaux de synthèse des ARN sens et anti-sens augmentent au cours du stade 2-cellules précoce (n=29) puis diminuent à 2-cellules tardif (n=66). Quel que soit le stade analysé, les ARN anti-sens restent majoritaires par rapport aux ARN sens.

Des observations similaires ont également été faites dans le cas des Andro-EchPN. Les ARN anti-sens sont détectés dès le stade 1-cellule PN4 alors que les ARN sens sont détectés à PN5 dans 50% des embryons seulement (n=28). Par la suite, le niveau de synthèse des ARN sens et anti-sens augmente fortement (2-cellules précoce, n=21) pour ensuite diminuer (2-cellules tardif, n=16). Malgré ces fluctuations, le niveau de synthèse des ARN anti-sens est toujours plus élevé que celui des ARN sens.

II-2-3) Cinétique de développement des embryons

Afin d'évaluer l'impact de ces différentes cinétiques de réorganisation 3D et de transcription des séquences satellites dans les gynogénètes et les androgénètes j'ai ensuite analysé leur développement *in vitro*. J'ai tout d'abord établi un « référentiel » de développement à partir de zygotes témoins (n=37), mis en culture au stade 1-cellule (J1) et observés chaque jour (J2, J3, J4, J5). Ces embryons atteignent le stade blastocyste en 5 jours (J5, 120 hphCG), dans ~90% des cas (figure R-33).

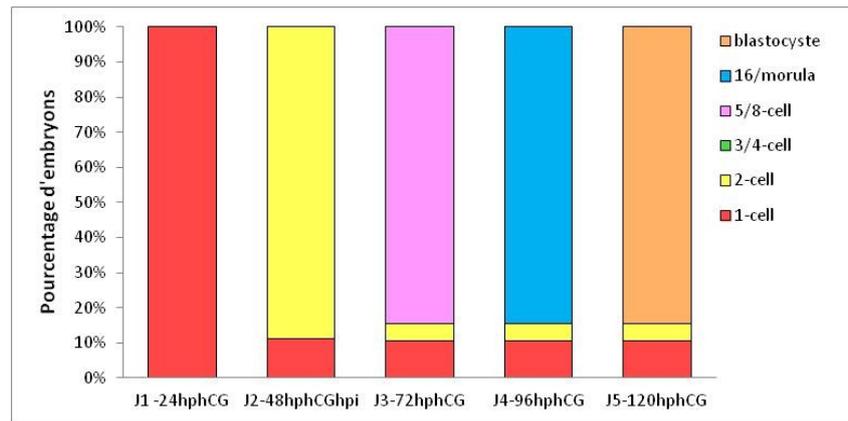


Figure R-33: Cinétique de développement des zygotes témoins

➤ *Comparaison entre Gyno-PaDi et Gyno-EchPN*

La cinétique de développement des embryons Gyno-PaDi (n=139) et Gyno-EchPN (n=22) jusqu'au stade blastocyste est présentée figure R-34. Dans les deux cas, les embryons clivent comme attendu à 2-cellules le lendemain de la mise en culture (~ 90% à 2-cellules pour les Gyno-PaDi et ~ 91% pour les Gyno-EchPN). Cependant, on observe moins d'embryons avec plus de 16-cellules à J4 dans les embryons Gyno-EchPN (~ 40%) que dans les embryons Gyno-PaDi (85%). Le pourcentage de blastocystes à J5 est également plus élevé dans le groupe des Gyno-EchPN (85%) que dans le groupe des Gyno-EchPN (40%). Ces données suggèrent que le développement préimplantatoire est perturbé dans le cas des Gyno-EchPN.

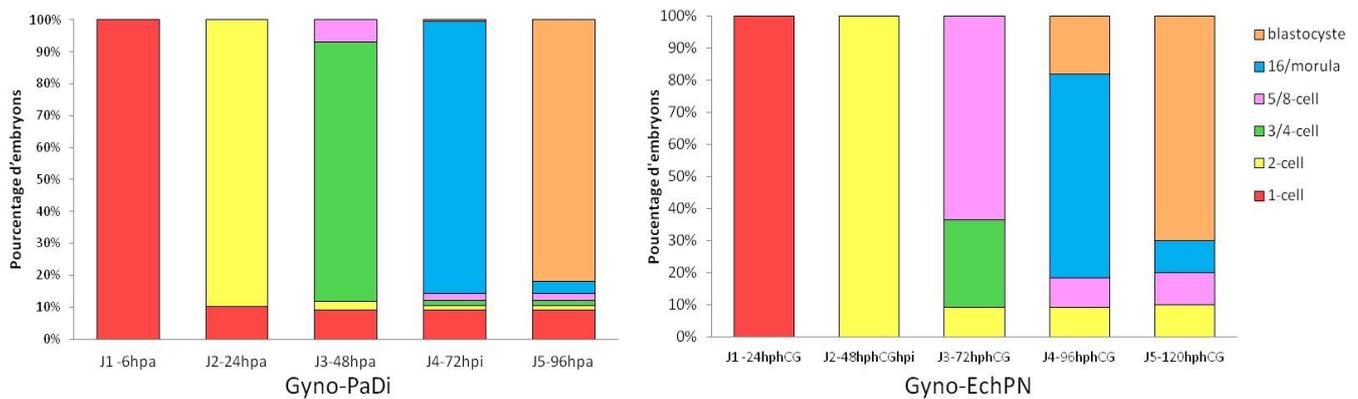


Figure R-34: Cinétique de développement des embryons gynogénètes

➤ *Comparaison entre Andro-ICSI et Andro-EchPN*

Dans les deux types d'embryons, Andro-ICSI (n=69) et Andro-EchPN (23), le clivage à 2-cellules a lieu à J2 pour, respectivement, 100% et 88% des embryons mis en culture (figure R-35). Cependant, le pourcentage d'embryon Andro-ICSI ayant atteint le stade 4-cellules à J3 est relativement faible (~ 29%) ; plus de la moitié des embryons restant bloqués au stade 2-

cellules (59%). La moitié des embryons atteignent le stade 4-cellules à J4 seulement et à J5 le pourcentage de blastocystes est très faible (~ 5%). Le développement des embryons Andro-EchPN est également perturbé à partir de J3. Seule une faible proportion (~ 22%) des embryons atteint le stade 8-cellules à J3, et la majorité des embryons semble bloquée à 4-cellules. Ainsi à J5, le pourcentage de blastocystes est également faible (~20%). Ces résultats suggèrent que le développement préimplantatoire des androgénotes (Andro-ICSI et Andro-EchPN) est fortement perturbé, dès le stade 4-cellules.

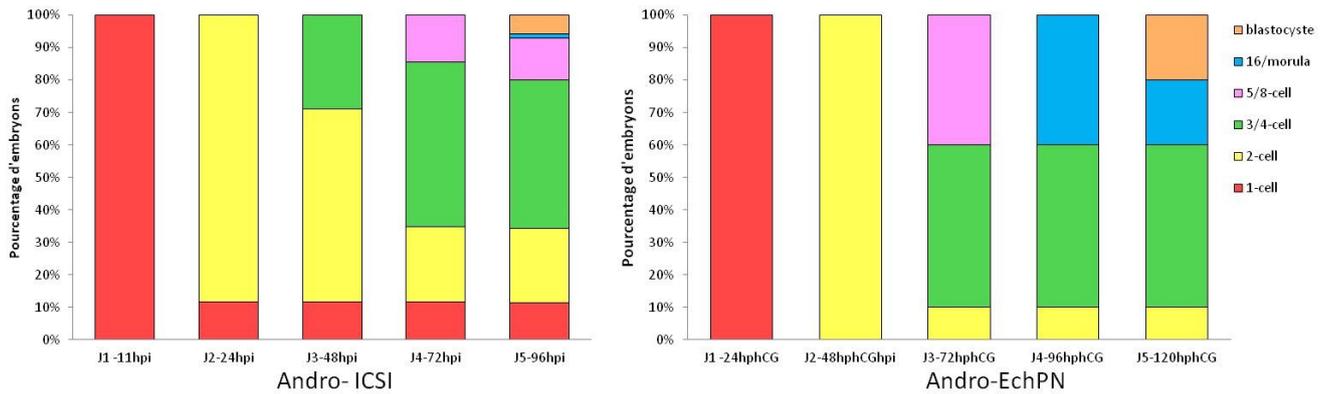


Figure R-35: Cinétique de développement des embryons androgénotes

II-2-4) Discussion

Dans cette partie de ma thèse, je me suis intéressée à la réorganisation de l'hétérochromatine péricentromérique autour des NPB et à la formation des chromocentres, deux événements qui sont essentiels au bon développement embryonnaire, et à la contribution des génomes - maternel et paternel - à l'aide de modèles embryonnaires monoparentaux produits soit au début soit à la fin du stade 1-cellule.

Cinétique de recrutement des séquences satellites autour des NPB et de synthèse des ARN MajSat

Dans les embryons zygotes témoins, nous observons par ADN-FISH que les séquences satellites majeurs et mineurs forment des anneaux ou des arcs en périphérie des NPB au stade 1-cellule tardif (PN4, PN5). Des agrégats sont parfois observés dans le nucléoplasme ou à la périphérie du noyau. Dans ces embryons, il n'existe aucune différence d'organisation de ces séquences entre les pronoyaux maternel et paternel. Ces observations sont cohérentes avec les données déjà décrites concernant l'organisation des séquences majeures et mineures dans l'embryon précoce de souris (Martin et al. 2006; Probst et al. 2007; Aguirre-Lavin et al. 2012). La présence d'agrégats indiquerait une certaine décondensation de l'hétérochromatine péricentromérique qui pourrait être associée à l'absence de HP1β (Martin et al. 2006; Merico et al. 2007; Aguirre-Lavin et al. 2012). Cette distribution des séquences satellites majeurs et

mineurs par rapport aux NPB au stade 1-cellule tardif est identique dans les embryons zygotes témoins et dans les embryons gynogénotes (Gyno-PaDi et Gyno-EchPN) ou androgénotes (Andro-IcSi et Andro-EchPN). La manipulation des embryons que nous avons réalisée n'a donc pas d'influence sur leur réorganisation au stade 1-cellule. Même si la manipulation est précoce (avant la formation des pronoyaux), le matériel nucléolaire maternel est donc capable de "recruter" les séquences satellites du génome paternel sans problème, aussi bien dans un pronoyau de zygote que dans les pronoyaux d'un androgénote.

Les mécanismes et facteurs impliqués dans ce recrutement des séquences satellites majeurs et mineurs à la périphérie des NPB restent inconnus. La protéine NPM2 est un candidat très intéressant. En effet, cette protéine nucléolaire, indispensable à la formation des nucléoles dans l'embryon précoce, semble également impliquée dans le processus d'hétérochromatinisation de ces séquences (Burns et al. 2003). De plus, les facteurs impliqués sont à priori associés au NLB d'origine maternelle étant donné que l'énucléation de l'ovocyte en GV perturbe ce processus (Fulka et Langerova, 2014). Il s'avère que l'énucléation perturbe non seulement la mise en place des anneaux d'hétérochromatine péri-NPB dans les embryons issus d'ovocytes énucléolés mais aussi l'activité transcriptionnelle des séquences satellites au stade 2-cellules. Cependant, ces auteurs n'ont pas analysé la transcription des séquences satellites au stade 1-cellule. Cela aurait pu être très intéressant sachant que la transcription de ces séquences démarre à ce stade.

La transcription des séquences satellites majeurs et la détection des ARN sens et anti-sens correspondants démarre en effet à la fin du stade 1-cellule, en même temps que l'expression du génome embryonnaire (activation mineure). Comme décrit par Probst et al. (2010), nous observons à PN4 des signaux d'ARN-FISH pour la sonde anti-sens dans le pronoyau paternel des embryons zygotes témoins. Un signal similaire est observé dans les pronoyaux d'origine paternelle des androgénotes ICSI et EchPN. Par contre nous n'observons à ce stade PN4 aucun signal anti-sens dans les embryons gynogénotes. Cependant, dans des embryons très tardif du stade 1-cellule (PN5), des signaux d'ARN anti-sens sont détectables dans les pronoyaux d'origine maternelle, aussi bien dans les embryons témoins zygotes que dans les embryons Gyno-EchPN. Ceci n'avait été que peu observé par Probst et al. 2010 (signal très faible dans 24% des embryons, données supplémentaires) probablement car les stades étudiés étaient plus précoces (PN4 et non PN5). L'origine de cet ARN anti-sens reste à déterminer : il pourrait s'agir d'ARN anti-sens transcrit par le génome maternel ou provenant du génome paternel par translocation. En effet, il n'est pas possible avec notre approche de RNA-FISH de

distinguer les ARN nouvellement transcrits des ARN déjà transcrits. Il est important de noter que les signaux ARN-FISH observés sont présents dans les pronoyaux au niveau de l'hétérochromatine péri-NPB mais aussi dans le cytoplasme, suggérant qu'effectivement une partie des ARN détectés ne sont pas des ARN nouvellement transcrits. Par ailleurs, l'absence de signal anti-sens dans les embryons Gyno-PaDi (qui n'ont pas été en présence du génome paternel contrairement aux embryons Gyno-EchPN) et le décalage d'une à deux heures (passage PN4-PN5) dans la détection de cet ARN dans le pronoyau maternel par rapport au paternel sont deux arguments supplémentaires en faveur de la translocation des ARN anti-sens d'un pronoyau à l'autre. L'ensemble de ces résultats renforce l'hypothèse selon laquelle la transcription du brin anti-sens serait d'origine paternelle (Casanova et al. 2013).

La synthèse de l'ARN sens des séquences satellites majeurs est aussi spécifique du stade 1-cellule très tardif (PN5). En effet, nous n'observons que très rarement du signal d'ARN sens, quel que soit le modèle embryonnaire au stade PN4, ce qui est cohérent avec les données de la littérature (Probst et al. 2010). Dans les embryons zygotes témoins, cet ARN sens se retrouve dans les deux pronoyaux. Un signal similaire est détecté dans les embryons Gyno-EchPN mais pas dans les embryons Gyno-PaDi ce qui aurait pu suggérer une origine paternelle comme pour l'ARN anti-sens. Cependant, nous avons remarqué que les embryons Andro-ICSI ne présentaient pas ou peu de signal sens, ainsi que 50% des embryons Andro-EchPN. Il est donc possible que la présence de ce brin sens soit dépendante du génome maternel, par translocation d'ARN sens ou d'un autre facteur "activateur" de transcription provenant du pronoyau maternel. Le fait que les embryons Gyno-PaDi ne présentent pas de signal ARN sens peut sembler contradictoire dans ce cas, sauf si par un mécanisme de rétro-action la présence de l'ARN anti-sens d'origine paternelle devient l'élément déclenchant la transcription de l'ARN sens d'origine maternelle (Figure R-36).

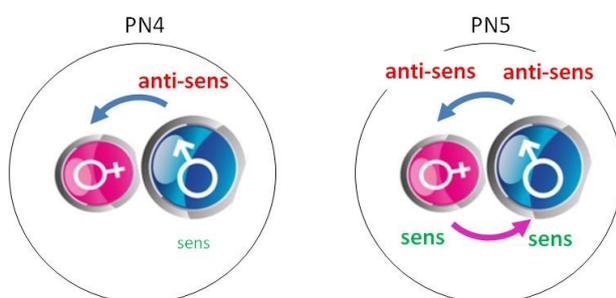


Figure R-36 : Modèle de boucle rétro-active entre les deux pronoyaux parentaux au stade 1-cellule : la transcription majoritaire du brin anti-sens des séquences satellites majeurs dans le pronoyau paternel à PN4 serait responsable de l'induction de la transcription de ces ARN dans le pronoyau maternel à PN5. L'ARN sens d'origine maternelle favoriserait ensuite la transcription du brin sens dans le pronoyau paternel.

Cette hypothèse pourrait expliquer la différence de signal sens observée dans les embryons Andro-ICSI (pas de génome maternel) versus les embryons Andro-EchPN (génome maternel présent avant l'échange). Décaler dans le temps l'échange de pronoyaux dans le cas des Andro-EchPN, afin de diminuer ou d'augmenter le temps de "communication" entre pronoyaux et donc de moduler cette hypothétique boucle rétro-active, pourrait apporter un élément de réponse. La micro-injection d'oligonucléotides LNA-DNA gapmers (Casanova et al. 2013) spécifiques d'un brin puis de l'autre dans nos modèles embryonnaires serait aussi très intéressante.

Hétérochromatinisation et formation des chromocentres

Les analyses réalisées sur les signaux d'ADN-FISH confirment la forte interaction qui existe également entre les NPB avec les séquences satellites majeurs et mineurs au stade 2-cellules. On observe notamment au stade 2-cellules précoce une majorité de NPB associés avec du signal ADN-FISH dans tous nos modèles embryonnaires, à l'exception des Andro-ICSI. Il est possible, que dans ces embryons Andro-ICSI qui présentent plus d'une douzaine de NPB, la dynamique de reformation des NPB soit impliquée. Au cours de la mitose, le NPB est dissous et le matériel est libéré dans le cytoplasme ; les NPB se reformant à l'interphase suivante (Zatsepina et al. 2003 ; Baran et al. 2001). Il est aussi possible que le matériel libéré dans le cytoplasme soit plus abondant dans ces embryons et qu'il serve à la reformation d'un nombre plus important de NPB après la première mitose. Ceci pourrait aussi être le cas pour les embryons Gyno-EchPN qui forment une quinzaine de NPB après la première mitose. Il est difficile d'établir une relation entre le mode de production de ces embryons (Andro-ICSI et Gyno-EchPN) et le nombre élevé de NPB observés, les mécanismes de reformation des NPB à l'interphase étant peu connus.

Les analyses bio-informatiques réalisées au laboratoire (Aguirre-Lavin et al. 2012) ont permis de montrer qu'au cours du stade 2-cellules, l'hétérochromatine péricentromérique, en périphérie des NPB se réorganisent en arcs condensés, puis se dissocie pour former les chromocentres à la fin du stade 2-cellules. Les analyses quantitatives réalisées dans cette dernière partie de ma thèse sur des embryons zygotes témoins sont cohérentes avec ces données. Le regroupement des séquences satellites majeurs et mineurs démarre effectivement au stade 2-cellules précoce (augmentation des NPB-arcs condensés parallèlement à la diminution des NPB- $r \geq 50\%$) et s'intensifie au stade 2-cellules tardif. Les embryons zygotes

témoins présentent 34% de NPB-arcs condensés dès le stade 2-cellules précoce et 75% de chromocentres compacts dès le stade 2-cellules tardif.

La forte interaction des NPB avec les séquences satellites majeurs et mineurs a également été observée dans tous les autres modèles embryonnaires. Cependant, dans les embryons Gyno-EchPN et Andro-ICSI, l'hétérochromatine péricentromérique s'organise majoritairement en arcs condensés dès le stade 2-cellules précoce (76% et 56% des NPB respectivement). Ces embryons présentaient par ailleurs un plus grand nombre de NPB, il est donc possible qu'il y ait un défaut dans le recrutement des séquences satellites. Cela ne semble pas altérer fortement la formation des chromocentres par la suite (61% et 87% de compacts, respectivement, à 2-cellules tardif et 75% dans les zygotes témoins). Le rôle des arcs au stade 2-cellules semble donc moins important ; comme le suggérait par ailleurs les expériences d'énucléation au stade 1-cellule tardif qui n'altère pas la poursuite du développement embryonnaire (Kyogoku et al. 2014).

La formation des chromocentres se déroule par ailleurs à la fin du stade 2-cellules dans tous nos modèles embryonnaires, avec 61 à 87% des chromocentres formés de type compact. L'absence de données sur les stades suivants ne nous permet pas de conclure sur la fin de ce processus qui prend fin au stade 4-cellules (Aguirre-Lavin et al. 2012). Contrairement à ce qui avait été suggéré par les études précédentes (Santenard et al. 2010 ; Probst et al. 2010; Casanova et al. 2013), la présence ou l'absence de transcrits issus des séquences satellites majeurs ne semble pas altérer la formation de ces chromocentres. En effet, les embryons Gyno-Padi forment 84% de chromocentres compacts alors que les transcrits sens et anti-sens sont très peu abondants dans ces embryons au stade 2-cellules tardif. A l'inverse, les embryons Gyno-EchPN présentent seulement 61% de chromocentres compacts alors que les transcrits anti-sens sont relativement abondants au stade 2-cellules tardif. Il faut cependant noter que les signaux de RNA-FISH pour les brins sens et anti-sens sont très hétérogènes.

Transcrits sens et anti-sens des séquences satellites majeurs

Globalement, les signaux anti-sens sont toujours plus importants que les signaux sens mais leur nombre et leur taille varient énormément dans nos différents modèles embryonnaires (tableau récapitulatif des principaux critères analysés ci-après).

	Regroupement des séquences SatMaj et formation de chromocentres		Synthèse des ANR SatMaj (antisens/sens)		Développement	
	% Arcs condensés (2CP)	% chromocentres compacts (2CT)	1cell tardif PN5	2cell tardif	> 8-cellules à J4	Blastocyste à J5
Zygotes	34%	75%	+/+	+++/>++	84%	84%
Gyno PaDi	10%	84%	-/-	+/>+	86%	85%
Gyno EchPN	76%	61%	+/>+	+ ou +++ +	82%	65%
Andro ICSI	56%	85%	+/>+ ou -	+++/>+	0%	5%
Andro EchPN	5%	75%	+/>+ ou -	+++/>+	40%	20%

Dans les embryons zygotes témoins les signaux ARN sens et anti-sens sont tous les deux abondants, principalement localisés sur l'hétérochromatine (soit autour des NPB soit dans les chromocentres). On note une légère diminution entre le stade 2-cellules précoce et le stade 2-cellules tardif alors que Probst et al. (2010) suggérait une cinétique très différente : ARN sens très abondant au début du cycle et ARN anti-sens peu abondant / ARN sens abondant et ARN sens peu abondant à la fin du cycle. Contrairement à ces auteurs nous n'avons pas effectué d'analyse par RT-qPCR afin de quantifier l'abondance de ces ARN; la difficulté de cette approche étant le problème de spécificité liée à la forte répétition de ces séquences. Par ailleurs, Casanova et al. (2013) ont par la suite suggéré qu'il pouvait y avoir un effet du cycle cellulaire sur la synthèse de ces transcrits avec un pic de synthèse de l'ARN sens lors de la phase S. Dans notre étude, tous les embryons ont été analysés en début de phase S (36hpcg pour les zygotes), plus tôt que dans les études réalisées par Probst et al. 2010 et Casanova et al. 2013 (39hpcg dans leur cas). Il est donc possible que nous n'ayons pas détecté le pic de synthèse de l'ARN sens qui aurait lieu à ce stade. Il aurait aussi été intéressant d'analyser des embryons au stade 4-cellules, stade à partir duquel la synthèse de ces transcrits semble diminuer fortement (Probst et al. 2010).

Dans les embryons Gyno-PaDi, les signaux ARN-FISH sens et anti-sens sont relativement faibles ce qui corrobore par contre les données de RT-qPCR de Casanova et al. (2013). Ces données montrent également que malgré l'absence d'ARN issus des séquences satellites majeurs au stade 1-cellule, ces embryons Gyno-PaDi sont capables de mettre en route cette synthèse d'ARN (sens et anti-sens), sans contribution paternelle. La contribution paternelle au cours du stade 1-cellule semble cependant favoriser une synthèse plus importante étant donné que les signaux ARN sens et anti-sens sont systématiquement de plus grande taille et/ou plus

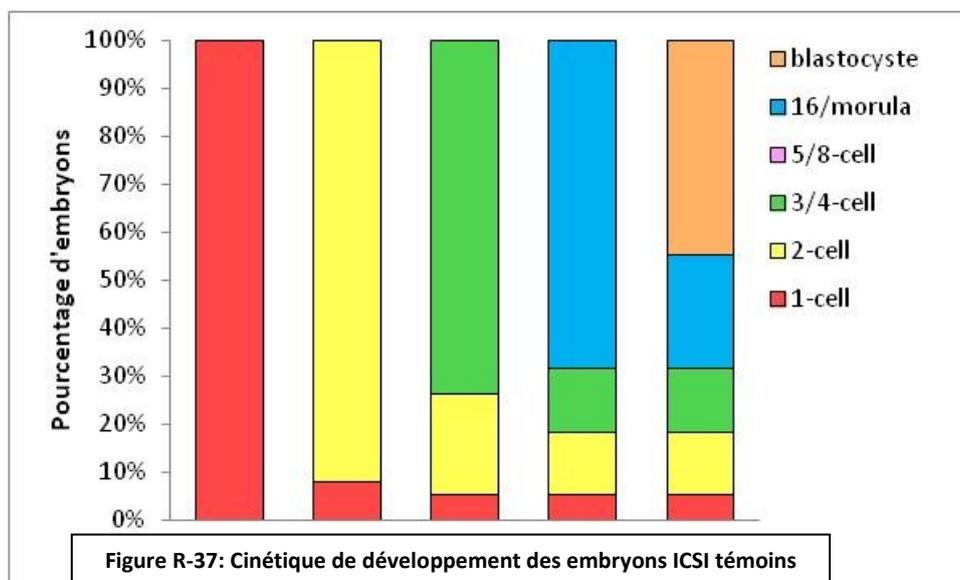
nombreux dans les autres groupes d'embryons: Gyno-EchPN / Andro-ICSI et Andro-EchPN. Il serait intéressant de micro-injecter des ARN anti-sens dans les embryons Gyno-PaDi et d'évaluer l'impact sur l'ARN sens afin d'estimer si l'embryon est capable de compenser. Les expériences "d'interférence" réalisées jusqu'à présent avaient pour objectif d'inhiber/de bloquer ces ARN sens et anti-sens afin de bloquer la formation des chromocentres (Probst et al. 2010 ; Casanova et al. 2013). Cependant, il est maintenant établi que la formation accéléré ou excessive de chromocentres n'est pas bénéfique à l'embryon non plus. C'est notamment ce qui a été observé dans les embryons issus de transfert de noyaux (technique de clonage) (Martin et al. 2006 ; Merico et al. 2007). Evaluer l'impact d'une compaction trop importante pourrait donc aussi apporter des informations intéressantes.

Dans ces embryons clonés, les chromocentres formés sont souvent très compacts, associés à des marques épigénétiques répressives présentent en excès. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteur d'enzymes ciblant des marques épigénétiques (comme la trichostatine A, inhibiteur d'HDAC) afin d'induire une ouverture de la chromatine, permet d'améliorer la réorganisation des chromocentres et le développement à terme des ces clones (Maalouf et al. 2009). Dans les embryons gynogénètes et androgénètes, il a été montré que les marques épigénétiques ont une distribution anormale. Les marques épigénétiques, normalement apposées asymétriquement entre le génome paternel et le génome maternel dans les embryons zygotes témoins, sont distribuées uniformément dans tout le noyau. C'est notamment le cas pour H3K9me3 et la méthylation de l'ADN dans les embryons gynogénètes (Barton et al. 2001; Merico et al. 2007). A l'inverse, les embryons androgénètes sont relativement déméthylés. La répression des transcrits de séquences satellites dans le génome maternel des zygotes et dans les embryons gynogénètes pourrait donc s'expliquer par la présence de la marque H3K9me3 (Probst et al. 2010; Casanova et al. 2013). Il conviendrait de confirmer cette hypothèse par immuno-RNA FISH dans nos modèles embryonnaires.

Impact sur la cinétique de développement des embryons

Il est connu que les embryons uniparentaux de mammifères sont incapables de se développer à terme. En effet, après implantation, les embryons gynogénètes sont relativement normaux en taille et en aspect, alors que les annexes extra embryonnaires évoluent très peu (Kono et al. 2004). A l'inverse, chez les androgénètes qui s'implantent, les tissus placentaires prédominants sont associés à des tissus embryonnaires mal développés (Obata et al. 2000). Ce phénomène, liée aux gènes soumis à empreinte (exprimés de façon monoallélique par un seul

allèle d'origine maternelle ou paternelle), ne bloque cependant pas totalement le développement préimplantatoire (Latham et al. 2002). Comme attendu, les embryons Gyno-PaDi se développent jusqu'au stade blastocyste aussi bien que les embryons témoins zygotes. (85% à J5). Le développement préimplantatoire est légèrement moins efficace dans le cas des embryons Gyno-EchPN (65% de blastocystes à J5). Afin de vérifier si la technique de transfert de pronoyaux en elle-même n'était pas délétère pour le développement, nous avons réalisé une série d'ICSI avec injection d'un spermatozoïde dans un ovocyte non énucléé (embryon biparental manipulé). Les résultats sont présentés dans la figure R-37 ci-dessous. Au vu de nos résultats, il s'avère que la technique de micromanipulation à l'aide d'un Piezo est relativement délétère pour le développement. Nos résultats sont cependant meilleurs que ceux publiés précédemment (5% de blastocystes gynogénotes par échange de PN) (Hu et al. 2015). Il serait important de vérifier les critères qui semblaient altérés dans les embryons Gyno-EchPN dans ces embryons ci afin d'écartier ceux qui pourraient être lié à la micromanipulation.



Il faut cependant retenir que le développement des embryons gynogénotes dans leur globalité est meilleur que celui des androgénotes : 5% de blastocystes pour les Andro-ICSI et 20% pour les Andro-EchPN. Le développement préimplantatoire des androgénotes s'avère effectivement peu efficace donnant entre 10 et 45% de blastocystes (Obata et al, 2000 ; Latham et al. 2002 ; Hu et al. 2015). Les embryons de caryotype YY sont particulièrement concernés : alors que les embryons XX peuvent éventuellement se développer, les embryons YY se bloquent au stade 3/4-cell à cause de l'expression aberrante de gènes soumis à empreinte (Hu et al. 2015). Il semblerait par ailleurs que ces embryons androgénotes ont un profil transcriptionnel RNA

Pol II-dépendant très réprimé (Bui et al. 2011). L'ensemble de ces données sont en accord avec nos propres observations : blocage du développement avant le stade 8 cellules pour une majorité des embryons et très peu de développement jusqu'au stade blastocyste.

Il est connu que l'inhibition des transcrits anti-sens des satellites majeurs empêche la formation des chromocentres et entraînant un arrêt du développement (Casanova et al. 2013). Il semblerait cependant que dans nos modèles embryonnaires des niveaux très faibles d'ARN anti-sens (Gyno-PaDi et Gyno-EchPN) ne soient pas corrélés à un mauvais développement préimplantatoire. Ceci suggère que même un niveau faible de transcrits de séquences satellites est suffisant pour assurer le développement embryonnaire préimplantatoire, sans contribution paternelle.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Au cours de cette thèse, je me suis intéressée au nucléole, siège de la biogenèse des ribosomes, dans l'embryon préimplantatoire de souris. Il n'y a pas véritablement de nucléole au début du développement mais des NPB, et bien qu'il existe quelques études dans la littérature, la question de la mise en place de nucléoles fonctionnels au cours du développement reste ouverte.

L'ensemble des données présentées sur la distribution des protéines nucléolaires UBF et NOPP140 montre qu'au cours de la période préimplantatoire, les compartiments FC et DFC apparaissent et s'organisent progressivement en périphérie des NPB pour donner un nucléole de type « somatique » au stade blastocyste. Les NPB hébergent la transcription des gènes ribosomiques au niveau de leur périphérie, interagissent avec les protéines impliquées dans la transcription et la maturation des gènes ribosomiques mais ne se transforment pas en nucléoles. Les NPB semblent donc plutôt jouer un rôle accessoire dans la nucléogenèse. NPB et nucléole correspondraient à deux structures bien distinctes qui apparaissent et coexistent à différents stades du développement. Les travaux de Fulka and Langerova (2014) et Kyogoku et al (2014) sur l'énucléolation des ovocytes et des embryons soutiennent cette conclusion. Par ailleurs, la mise en place des nucléoles fonctionnels semble étroitement liée au démarrage de la transcription des gènes ribosomiques au moment de l'EGA. Cela a été confirmé par utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'ARN pol I, le CX-5461, qui entraîne la séparation des différents compartiments nucléolaires (formation de lentilles) en périphérie des NPB et un arrêt de développement. La nucléogenèse et la transcription des gènes ribosomiques sont donc deux processus dépendant l'un de l'autre. Le redémarrage de la transcription des gènes ribosomiques au moment de l'EGA pourrait être considéré comme une étape cruciale dans la formation des nucléoles.

Nos données démontrent également pour la première fois que les protéines UBF et NOPP140 pourraient interagir directement au niveau du complexe ARN pol I dans l'embryon. Ceci est en accord avec l'idée d'une coopération entre UBF et NOPP140 mais également d'une implication potentielle de NOPP140 comme cofacteur transcriptionnel d'UBF ou comme facteur de transcription des gènes ribosomiques (Ueshima et al. 2014). Dans le cas de l'embryon préimplantatoire, des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine permettraient de déterminer si NOPP140 possède un site de fixation sur le promoteur des gènes ribosomiques ou si le rôle de NOPP140 dans la transcription des ADNr dépend de son interaction avec UBF et l'ARN pol I.

Il est aussi important de noter qu'il existe une hétérogénéité de distribution d'UBF et NOPP140 entre les NPB et au niveau des nucléoles se formant à leur périphérie. Il est possible que ce soit lié à la présence d'autres facteurs distribués de manière hétérogène entre les NPB. Les travaux de Biggiogera et al (1994) ont mis en évidence la présence d'ARN, de protéines nucléolaires telles que la fibrillarine, d'hnRNP et de snRNP dans les NPB d'embryons de souris mais leur composition exacte reste énigmatique. La composition des NPB isolés dès la formation des pronoyaux pourrait être étudiée et un suivi *in vivo* des protéines identifiées pourrait compléter cette analyse. La présence de séquences d'ADNr que j'ai observée en périphérie de certains NPB uniquement pourrait également expliquer cette hétérogénéité. Lors du démarrage de la transcription des gènes ribosomiques, il est possible que seuls les NPB associés aux séquences d'ADNr recrutent les protéines de la machinerie transcriptionnelle et de la maturation. Il serait intéressant de tester cette hypothèse par immuno-FISH et suivi *in vivo* des séquences d'ADNr et des protéines UBF et NOPP140 au cours du développement.

Concernant les séquences d'ADNr, j'ai également montré qu'une fois le génome embryonnaire activé, il y a décondensation progressive de ces séquences au cours du développement, suggérant un lien entre transcription et organisation des gènes ribosomiques comme en cellules somatiques. Cependant, le degré de décondensation des séquences d'ADNr est relativement hétérogène au sein d'un NPB, et d'un NPB à l'autre. Il existe probablement des séquences actives et d'autres inactives avec un niveau de condensation de la chromatine différent (Schedle et al. 1992 ; Junéra et al. 1995 ; Zatsepina et al. 1996). Une caractérisation plus précise des différents états d'organisation des ADNr et notamment de l'état « en pause » serait très intéressante. Il conviendrait également d'étudier les mécanismes de régulation de la transcription des ADNr (rôles des complexes de remodelage et des marques épigénétiques) dans ces embryons. Mes données ne sont actuellement pas suffisantes pour conclure à une similarité (ou pas) de ces mécanismes entre l'embryon et les cellules somatiques.

Un autre élément important dans la régulation de la transcription des ADNr est l'interaction de ces séquences avec l'hétérochromatine péricentromérique (Ahkmanova et al. 2000). Dans l'embryon, cette interaction persiste du stade 1-cellule jusqu'au stade blastocyste, aussi bien en périphérie des NPB que dans le nucléoplasme. Cette persistance suggère qu'un mécanisme répressif similaire à celui observé en cellules somatiques pourrait également exister en embryons. J'ai d'ailleurs détecté TIP5 (sous unité du complexe répresseur NoRC) dans l'embryon dès le stade 1-cellule en périphérie des NPB, où sont également détectées les

séquences d'ADNr et l'hétérochromatine péricentromérique. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les séquences d'ADNr associées aux chromocentres correspondraient aux séquences constitutivement inactives. Cependant, l'interaction entre ADNr et chromocentres semble augmenter au cours du développement préimplantatoire alors que la transcription des séquences d'ADNr augmente également ce qui peut sembler contradictoire. Il faut cependant rappeler que l'un des mécanismes de régulation des séquences d'ADNr passe par l'augmentation du taux transcriptionnel de chaque site de transcription. Il est possible que ce deuxième mécanisme se mette en place dans l'embryon au cours du développement préimplantatoire. Toutefois, mes données ont seulement permis la détection de signaux d'ADNr associées aux agrégats d'hétérochromatine péricentromérique mais le nombre exact de gènes séquences ribosomiques impliquées dans cette association reste à déterminer.

Dans le cas particulier du stade 1-cellule, l'interaction entre l'hétérochromatine péricentromérique et les séquences d'ADNr alors transcriptionnellement inactives est très importante. A ce stade, presque tous les signaux FISH d'ADNr sont localisés autour des NPB et sont imbriqués dans l'hétérochromatine péricentromérique (Aguirre-Lavin et al. 2012). Le NPB semble donc jouer un rôle primordial dans l'embryon après fécondation. Dans le cas d'embryons à constitution génomique uniparentale (gynogénètes et androgénètes), j'ai également observé que l'hétérochromatine péricentromérique se réorganise de manière similaire autour des NPB au stade 1-cellules et ce indépendamment des conditions de manipulation de ces embryons uniparentaux. Les NPB représenteraient donc des éléments structuraux essentiels, dont la présence est indispensable au stade 1-cellule (Fulka and Langerova. 2014). C'est également à ce stade que démarre la transcription des séquences satellites majeurs, suggérant qu'il pourrait y avoir un lien entre ces deux événements. J'ai démontré que la synthèse des ARN sens et anti-sens issus de ces séquences est effectivement initiée dans les embryons uniparentaux quelle que soit leur origine, après cette réorganisation des séquences satellites majeurs autour des NPB. Cependant, la mise en route de la transcription de ces séquences semble relativement faible dans les embryons gynogénètes et déséquilibrée (plus d'ARN anti-sens que sens) dans les androgénètes. Mes données apportent par ailleurs quelques informations sur la contribution de chacun des gamètes dans ce contexte, soulignant l'importance des ARN d'origine maternelle. En effet, il s'avère que les embryons Gyno-PaDi initient la transcription même en l'absence de tout "échange" avec le pronoyau paternel et se développent jusqu'au stade blastocyste, alors que dans les androgénètes la synthèse des ARN sens est perturbée et que ces embryons ne se développent

pas normalement (taux de blastocystes très faible). Il apparaît donc que les apports des deux gamètes sont complémentaires et conjointement requis pour une initiation adéquate de la transcription des séquences satellites majeurs. Toutefois, la fonction précise des ARN anti-sens et sens, aussi bien d'origine paternelle que maternelle, reste à déterminer. J'ai proposé un modèle "d'échange" entre pronoyaux au stade 1-cellule qu'il serait intéressant de tester et de valider.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Aapola U, Kawasaki K, Scott HS, Ollila J, Vihinen M, Heino M, Shintani A, Kawasaki K, Minoshima S, Krohn K, Antonarakis SE, Shimizu N, Kudoh J, Peterson P (2000) Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics* 65:293–8. doi: 10.1006/geno.2000.6168
2. Aapola U, Liiv I, Peterson P (2002) Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res* 30:3602–8.
3. Adenot PG, Mercier Y, Renard JP, Thompson EM (1997) Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* 124:4615–4625.
4. Adenot PG, Szöllösi MS, Geze M, Renard JP, Debey P (1991) Dynamics of paternal chromatin changes in live one-cell mouse embryo after natural fertilization. *Mol Reprod Dev* 28:23–34.
5. Aguirre-Lavin T, Adenot P, Bonnet-Garnier A, Lehmann G, Fleurot R, Boulesteix C, Debey P, Beaujean N (2012) 3D-FISH analysis of embryonic nuclei in mouse highlights several abrupt changes of nuclear organization during preimplantation development. *BMC Dev Biol* 12:30. doi: 10.1186/1471-213X-12-30
6. Ahmad Y, Boisvert F-M, Gregor P, Cogley A, Lamond AI (2009) NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Res* 37:D181–4. doi: 10.1093/nar/gkn804
7. Ajduk A (2006) Sperm Chromatin Remodeling after Intracytoplasmic Sperm Injection Differs from That of In Vitro Fertilization. *Biol Reprod* 75:442–451. doi: 10.1095/biolreprod.106.053223
8. Ajduk A, Małagocki A, Maleszewski M (2008) Cytoplasmic maturation of mammalian oocytes: development of a mechanism responsible for. *Reprod Biol* 8:3–22. doi: 10.1016/S1642-431X(12)60001-1
9. Akhmanova A, Verkerk T, Langeveld A, Grosveld F, Galjart N (2000) Characterisation of transcriptionally active and inactive chromatin domains in neurons. *J Cell Sci* 113 Pt 24:4463–4474.
10. Albert M, Peters AHFM (2009) Genetic and epigenetic control of early mouse development. *Curr Opin Genet Dev* 19:113–21. doi: 10.1016/j.gde.2009.03.004
11. Alcobia I, Dilão R, Parreira L (2000) Spatial associations of centromeres in the nuclei of hematopoietic cells: evidence for cell-type-specific organizational patterns. *Blood* 95:1608–15.
12. Almouzni G, Probst A V (2011) Heterochromatin maintenance and establishment: lessons from the mouse pericentromere. *Nucleus* 2:332–8. doi: 10.4161/nucl.2.5.17707
13. Andersen JS, Lam YW, Leung AKL, Ong S-E, Lyon CE, Lamond AI, Mann M (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433:77–83. doi: 10.1038/nature03207
14. Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AKL, Lam YW, Steen H, Mann M, Lamond AI (2002) Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* 12:1–11.
15. Andrade LE, Chan EK, Raska I, Peebles CL, Roos G, Tan EM (1991) Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *J Exp Med* 173:1407–19. doi: 10.1084/jem.173.6.1407
16. Angelier N, Tramier M, Louvet E, Coppey-Moisan M, Savino TM, De Mey JR, Hernandez-Verdun D (2005) Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. *Mol Biol Cell* 16:2862–71. doi:

- 10.1091/mbc.E05-01-0041
17. Angelov D, Molla A, Perche P, Khochbin S, Hans F, Co J, Bouvet P, Dimitrov S, Merci D De, Cedex LT, Lyon D (2003) The Histone Variant MacroH2A Interferes with Transcription Factor Binding and SWI / SNF Nucleosome Remodeling. *Mol Cell* 11:1033–1041.
 18. Anosova I, Melnik S, Tripsianes K, Kateb F, Grummt I, Sattler M (2015) A novel RNA binding surface of the TAM domain of TIP5/BAZ2A mediates epigenetic regulation of rRNA genes. *Nucleic Acids Res* 43:5208–20. doi: 10.1093/nar/gkv365
 19. Anton T, Bultmann S, Leonhardt H, Markaki Y (2014) Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system. *Nucleus* 5:163–72. doi: 10.4161/nucl.28488
 20. Aoki F, Worrall DMM, Schultz RMM (1997) Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 181:296–307. doi: 10.1006/dbio.1996.8466
 21. Austin CR (1961) Fertilization of mammalian eggs in vitro. *Int Rev Cytol* 12:337–59.
 22. Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jørgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merckenschlager M, Fisher AG (2006) Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* 8:532–8. doi: 10.1038/ncb1403
 23. Balhorn R (2007) The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 8:227. doi: 10.1186/gb-2007-8-9-227
 24. Balhorn R, Brewer L, Corzett M (2000) DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol Reprod Dev* 56:230–234. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(200006)56:2+<230::AID-MRD3>3.0.CO;2-V
 25. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska E a, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410:120–124. doi: 10.1038/35065138
 26. Baran V, Brochard V, Renard J-PJP, Flechon JEE (2001) Nopp 140 involvement in nucleologenesis of mouse preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 59:277–84. doi: 10.1002/mrd.1032
 27. Baran V, Veselá J, Koppel J (1993) Immunolocalization of DNA in preimplantation mouse embryos. *Folia Biol (Praha)* 39:100–5.
 28. Barton SC, Arney KL, Shi W, Niveleau A, Fundele R, Surani MA, Haaf T (2001) Genome-wide methylation patterns in normal and uniparental early mouse embryos. *Hum Mol Genet* 10:2983–7.
 29. Bártová E, Harni A, Uhlí R, Ra I, Galiová G, Orlova D, Kozubek S (2010) Structure and Epigenetics of Nucleoli in Comparison With Non-nucleolar Compartments. *J Histochem Cytochem* 58:391–403. doi: 10.1369/jhc.2009.955435
 30. Basu A, Das P, Chaudhuri S, Bevilacqua E, Andrews J, Barik S, Hatzoglou M, Komar AA, Mazumder B (2011) Requirement of rRNA methylation for 80S ribosome assembly on a cohort of cellular internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol* 31:4482–99. doi: 10.1128/MCB.05804-11
 31. Baxter J, Sauer S, Peters A, John R, Williams R, Caparros M-L, Arney K, Otte A, Jenuwein T, Merckenschlager M, Fisher AG (2004) Histone hypomethylation is an indicator of epigenetic plasticity in quiescent lymphocytes. *EMBO J* 23:4462–4472. doi: 10.1038/sj.emboj.7600414
 32. Bazett-Jones DP, Leblanc B, Herfort M, Moss T (1994) Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* 264:1134–7.
 33. Beaujean N (2014) Histone Post-Translational Modifications in Preimplantation Mouse Embryos and their Role in Nuclear Architecture. *Mol Reprod Dev* 112:100–112. doi:

- 10.1002/mrd.22268
34. Becker JS, Nicetto D, Zaret KS (2016) H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes. *Trends Genet* 32:29–41. doi: 10.1016/j.tig.2015.11.001
 35. Beisel C, Paro R (2011) Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat Rev Genet* 12:123–35. doi: 10.1038/nrg2932
 36. Belin S, Beghin A, Solano-González E, Bezin L, Brunet-Manquat S, Textoris J, Prats A-C, Mertani HC, Dumontet C, Diaz J-J (2009) Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. *PLoS One* 4:e7147. doi: 10.1371/journal.pone.0007147
 37. Bell S, Learned R, Jantzen H, Tjian R (1988) Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis.
 38. Bellier S, Chastant S, Adenot P, Vincent M, Renard JP, Bensaude O (1997) Nuclear translocation and carboxyl-terminal domain phosphorylation of RNA polymerase II delineate the two phases of zygotic gene activation in mammalian embryos. *EMBO J* 16:6250–62. doi: 10.1093/emboj/16.20.6250
 39. Bensaude O, Babinet C, Morange M, Jacob F (1983) Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo. *Nature* 305:331–3. doi: 10.1038/305331a0
 40. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125:315–26. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.041
 41. Biggiogera M, Martin T., Gordon J, Amalric F, Fakan S (1994) Physiologically Inactive Nucleoli Contain Nucleoplasmic Ribonucleoproteins: Immunoelectron Microscopy of Mouse Spermatids and Early Embryos. *Exp Cell Res* 213:55–63.
 42. Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6–21. doi: 10.1101/gad.947102
 43. Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BMM, Hess RA, Sutoksky P, Manandhar G, et al. (2007) A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology* 68 Suppl 1:147–155. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.05.058
 44. Bogdanović O, Veenstra GJC (2009) DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: Developmental requirements and function. *Chromosoma* 118:549–565. doi: 10.1007/s00412-009-0221-9
 45. Boisvert F, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI, Koningsbruggen S Van, Navascués J, Lamond AI, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI (2007) The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:574–85. doi: 10.1038/nrm2184
 46. Boland MJ, Nazor KL, Loring JF (2014) Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. *Circ Res* 115:311–324. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.301517
 47. Bolton VN, Oades PJ, Johnson MH (1984) The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol* 79:139–63.
 48. Bonnet-Garnier A, Feuerstein P, Chebrou M, Fleurot R, Jan HU, Debey P, Beaujean N (2012) Genome organization and epigenetic marks in mouse germinal vesicle oocytes. *Int J Dev Biol* 56:877–887. doi: 10.1387/ijdb.120149ab
 49. Boulon S, Verheggen C, Jady BE, Girard C, Pescia C, Paul C, Ospina JK, Kiss T, Matera AG, Bordonné R, Bertrand E (2004) PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli. *Mol Cell* 16:777–87. doi: 10.1016/j.molcel.2004.11.013
 50. Bouniol C, Nguyen E, Debey P (1995) Endogenous transcription occurs at the 1-cell stage in the mouse embryo. *Exp Cell Res* 218:57–62.

51. Bouniol-baly C, Hamraoui L, Guibert J, Beaujean N, Szo MS (1999) Differential Transcriptional Activity Associated with Chromatin Configuration in Fully Grown Mouse Germinal Vesicle Oocytes 1 and Pascale Debey. *Biol Reprod* 587:580–587. doi: 10.1095/biolreprod60.3.580
52. Bourgeois CA, Hubert J (1988) Spatial relationship between the nucleolus and the nuclear envelope: structural aspects and functional significance. *Int Rev Cytol* 111:1–52.
53. Bradsher J, Auriol J, Proietti de Santis L, Iben S, Vonesch JL, Grummt I, Egly JM (2002) CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol Cell* 10:819–29.
54. Braude P, Pelham H, Flach G, Lobatto R (1979) Post-transcriptional control in the early mouse embryo. *Nature* 282:102–5.
55. Braun RE (2001) Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 28:10–12. doi: 10.1038/ng0501-10
56. Brewer L, Corzett M, Lau EY, Balhorn R (2003) Dynamics of Protamine 1 Binding to Single DNA Molecules. *J Biol Chem* 278:42403–42408. doi: 10.1074/jbc.M303610200
57. Brewer LR, Corzett M, Balhorn R (1999) Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science* 286:120–3.
58. Brouwer A (2010) Spatial and Dynamic Organization of Molecular Structures in the Cell Nucleus. Universiteit Leiden, Amsterdam
59. Brown DD, Gurdon JB (1964) ABSENCE OF RIBOSOMAL RNA SYNTHESIS IN THE ANUCLEOLATE MUTANT OF XENOPUS LAEVIS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51:139–46.
60. Brown DD, Wensink PC, Jordan E (1972) A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *J Mol Biol* 63:57–73. doi: 10.1016/0022-2836(72)90521-9
61. Brown KE, Amoils S, Horn JM, Buckle VJ, Higgs DR, Merckenschlager M, Fisher AG (2001) Expression of alpha- and beta-globin genes occurs within different nuclear domains in haemopoietic cells. *Nat Cell Biol* 3:602–6. doi: 10.1038/35078577
62. Brown KE, Baxter J, Graf D, Merckenschlager M, Fisher AG (1999) Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell* 3:207–17.
63. Brown KE, Guest SS, Smale ST, Hahm K, Merckenschlager M, Fisher AG (1997) Association of Transcriptionally Silent Genes with Ikaros Complexes at Centromeric Heterochromatin. *Cell* 91:845–854. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80472-9
64. Brykczynska U, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, Roloff TC, Beisel C, Schübeler D, Stadler MB, Peters AHFM (2010) Articles Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Publ Gr* 17:679–687. doi: 10.1038/nsmb.1821
65. Bui H-T, Wakayama S, Mizutani E, Park K-K, Kim J-H, Van Thuan N, Wakayama T (2011) Essential role of paternal chromatin in the regulation of transcriptional activity during mouse preimplantation development. *Reproduction* 141:1–40. doi: 10.1530/REP-10-0109
66. Buratowski S (2000) Snapshots of RNA polymerase II transcription initiation. *Curr Opin Cell Biol* 12:320–5.
67. Burns KH, Viveiros MM, Ren Y, Wang P, DeMayo FJ, Frail DE, Eppig JJ, Matzuk MM (2003) Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* 300:633–6. doi: 10.1126/science.1081813
68. Burton A, Muller J, Tu S, Padilla-Longoria P, Guccione E, Torres-Padilla M-E (2013) Single-cell profiling of epigenetic modifiers identifies PRDM14 as an inducer of cell fate in the mammalian embryo. *Cell Rep* 5:687–701. doi: 10.1016/j.celrep.2013.09.044
69. Burton A, Torres-Padilla M-E (2010) Epigenetic reprogramming and development: a

- unique heterochromatin organization in the preimplantation mouse embryo. *Brief Funct Genomics* 9:444–454. doi: 10.1093/bfgp/elq027
70. Cairns C, McStay B (1995) Identification and cDNA cloning of a *Xenopus* nucleolar phosphoprotein, xNopp180, that is the homolog of the rat nucleolar protein Nopp140. *J Cell Sci* 108 (Pt 1:3339–3347.
 71. Calkhoven CF, Ab G (1996) Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem J* 329–42.
 72. Campanero MR, Armstrong MI, Flemington EK (2000) CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6481–6486. doi: 10.1073/pnas.100340697
 73. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2002) Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing.
 74. Carmo-Fonseca M, Ferreira J, Lamond A I (1993) Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis--evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. *J Cell Biol* 120:841–52. doi: 10.1083/jcb.120.4.841
 75. Carmo-fonseca M, Mendes-soares L, Campos I (2000) To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* 2:E107–E112. doi: 10.1038/35014078
 76. Carrell DT, Emery BR, Hammoud S (2007) Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: What is the link? *Hum Reprod Update* 13:313–327. doi: 10.1093/humupd/dml057
 77. Carron C, Balor S, Delavoie F, Plisson-Chastang C, Faubladiere M, Gleizes P-E, O'Donohue M-F (2012) Post-mitotic dynamics of pre-nucleolar bodies is driven by pre-ribosomal RNA processing. *J Cell Sci* 4532–4542. doi: 10.1242/jcs.106419
 78. Carvalho T, Almeida F, Calapez A, Lafarga M, Berciano MT, Carmo-Fonseca M (1999) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J Cell Biol* 147:715–28.
 79. Casanova M, Pasternak M, El Marjou F, Le Baccon P, Probst A V., Almouzni G, Marjou F El, Baccon P Le, Probst A V., ElMarjou F, LeBaccon P, Probst A V., Almouzni G (2013) Heterochromatin Reorganization during Early Mouse Development Requires a Single-Stranded Noncoding Transcript. *Cell Rep* 4:1156–1167. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.015
 80. Cascio SM, Wassarman PM (1982) Program of early development in the mammal: post-transcriptional control of a class of proteins synthesized by mouse oocytes and early embryos. *Dev Biol* 89:397–408.
 81. Cazaux B, Catalan J, Veyrunes F, Douzery EJ, Britton-Davidian J (2011) Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots?: a case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol Biol* 11:124. doi: 10.1186/1471-2148-11-124
 82. Ceccarelli M, Morosi L, Cionini PG (1998) Chromocenter association in plant cell nuclei: determinants, functional significance, and evolutionary implications. *Genome* 41:96–103. doi: 10.1139/g97-104
 83. Cerda MC, Berríos S, Fernández-Donoso R, Gargana S, Redi C (1999) Organisation of complex nuclear domains in somatic mouse cells. *Biol cell* 91:55–65.
 84. Chen D, Belmont AS, Huang S (2004) Upstream binding factor association induces large-scale chromatin decondensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15106–11. doi: 10.1073/pnas.0404767101
 85. Chen D, Huang S (2001) Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J Cell Biol* 153:169–76.
 86. Chen ES, Zhang K, Nicolas E, Cam HP, Zofall M, Grewal SIS (2008) Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly. *Nature* 451:734–7. doi: 10.1038/nature06561

87. Chen HK, Pai CY, Huang JY, Yeh NH (1999) Human Nopp140, which interacts with RNA polymerase I: implications for rRNA gene transcription and nucleolar structural organization. *Mol Cell Biol* 19:8536–8546.
88. Cheutin T, Gorski SA, May KM, Singh PB, Misteli T (2004) In vivo dynamics of Swi6 in yeast: evidence for a stochastic model of heterochromatin. *Mol Cell Biol* 24:3157–67.
89. Cheutin T, O'Donohue M-F, Beorchia A, Vandelaer M, Kaplan H, Deféver B, Ploton D, Thiry M (2002) Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. *J Cell Sci* 115:3297–3307.
90. Cho C, Jung-ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, Schultz RM, Hecht NB, Eddy EM (2003) Protamine 2 Deficiency Leads to Sperm DNA Damage and Embryo Death in Mice. *Biol Reprod* 69:211–217. doi: 10.1095/biolreprod.102.015115
91. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 28:82–86. doi: 10.1038/ng0501-82
92. Chouinard LA (1971) A light- and electron-microscope study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. *J Cell Sci* 9:637–63.
93. Christians E, Campion E, Thompson EM, Renard JP (1995) Expression of the HSP 70.1 gene, a landmark of early zygotic activity in the mouse embryo, is restricted to the first burst of transcription. *Development* 121:113–22.
94. Christman JK (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21:5483–5495. doi: 10.1038/sj.onc.1205699
95. Cisterna B, Biggiogera M (2010) Ribosome biogenesis: from structure to dynamics. *Int Rev Cell Mol Biol* 284:67–111. doi: 10.1016/S1937-6448(10)84002-X
96. Clegg KB, Pikó L (1982) RNA synthesis and cytoplasmic polyadenylation in the one-cell mouse embryo. *Nature* 295:343–4.
97. Clegg KB, Pikó L (1983) Quantitative aspects of RNA synthesis and polyadenylation in 1-cell and 2-cell mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 74:169–82.
98. Clos J, Normann A, Ohrlein A, Grummt I (1986) The core promoter of mouse rDNA consists of two functionally distinct domains. *Nucleic Acids Res* 14:7581–95.
99. Cmarko D, Verschure PJ, Rothblum LI, Hernandez-Verdun D, Amalric F, van Driel R, Fakan S (2000) Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem Cell Biol* 113:181–7.
100. Comai L (2004) Mechanism of RNA polymerase I transcription. *Adv Protein Chem* 67:123–55. doi: 10.1016/S0065-3233(04)67005-7
101. Conconi A, Widmer RM, Koller T, Sogo JM (1989) Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* 57:753–61.
102. Cong R, Das S, Douet J, Wong J, Buschbeck M, Mongelard F, Bouvet P (2014) MacroH2A1 histone variant represses rDNA transcription. *Nucleic Acids Res* 42:181–192. doi: 10.1093/nar/gkt863
103. Cong R, Das S, Ugrinova I, Kumar S, Mongelard F, Wong J, Bouvet P (2012) Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Res* 40:9441–9454. doi: 10.1093/nar/gks720
104. Conway E, Healy E, Bracken AP (2015) PRC2 mediated H3K27 methylations in cellular identity and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 37:42–8. doi: 10.1016/j.ceb.2015.10.003
105. Cooper S, Dienstbier M, Hassan R, Schermelleh L, Sharif J, Blackledge NP, De Marco V, Elderkin S, Koseki H, Klose R, Heger A, Brockdorff N (2014) Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Rep* 7:1456–70. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.012
106. Copenhaver GP, Putnam CD, Denton ML, Pikaard CS (1994) The RNA polymerase I

- transcription factor UBF is a sequence-tolerant HMG-box protein that can recognize structured nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 22:2651–7.
107. Corden JL (1990) Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 15:383–7.
 108. Corry GN, Tanasijevic B, Barry ER, Krueger W, Rasmussen TP (2009) Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation development. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev* 313:297–313. doi: 10.1002/bdrc.20165
 109. Crozet N (1983) Effects of actinomycin D and cycloheximide on the nucleolar ultrastructure of porcine oocytes. *Biol Cell* 48:25–9.
 110. Crozet N, Motlik J, Szollosi D (1981) NUCLEOLAR FINE-STRUCTURE AND RNA-SYNTHESIS IN PORCINE OOCYTES DURING THE EARLY STAGES OF ANTRUM FORMATION. *Biol Cell* 41:35–41.
 111. Cryderman DE, Cuaycong MH, Elgin SC, Wallrath LL (1998) Characterization of sequences associated with position-effect variegation at pericentric sites in *Drosophila* heterochromatin. *Chromosoma* 107:277–85.
 112. Dahmus ME (1996) Phosphorylation of mammalian RNA polymerase II. *Methods Enzymol* 273:185–93.
 113. Dang-Nguyen TQ, Torres-Padilla ME (2015) How cells build totipotency and pluripotency: Nuclear, chromatin and transcriptional architecture. *Curr Opin Cell Biol* 34:9–15. doi: 10.1016/j.ceb.2015.04.006
 114. Dawlaty MM, Ganz K, Powell BE, Hu Y-C, Markoulaki S, Cheng AW, Gao Q, Kim J, Choi S-W, Page DC, Jaenisch R (2011) Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell Stem Cell* 9:166–75. doi: 10.1016/j.stem.2011.07.010
 115. de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M, Koseki H, Brockdorff N (2004) Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* 7:663–76. doi: 10.1016/j.devcel.2004.10.005
 116. Debey P, Renard JP, Coppey-Moisan M, Monnot I, Geze M (1989) Dynamics of chromatin changes in live one-cell mouse embryos: a continuous follow-up by fluorescence microscopy. *Exp Cell Res* 183:413–33.
 117. Debey P, Szöllösi MS, Szöllösi D, Vautier D, Girousse A, Besombes D, Szollosi MS, Szollosi D, Vautier D, Girousse A, Besombes D (1993) Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics. *Mol Reprod Dev* 36:59–74. doi: 10.1002/mrd.1080360110
 118. Denissov S, Lessard F, Mayer C, Stefanovsky V, van Driel M, Grummt I, Moss T, Stunnenberg HG (2011) A model for the topology of active ribosomal RNA genes. *EMBO Rep* 12:231–7. doi: 10.1038/embor.2011.8
 119. Deplus R, Brenner C, Burgers WA, Putmans P, Kouzarides T, de Launoit Y, Fuks F (2002) Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res* 30:3831–8. doi: 10.1093/nar/gkf509
 120. Derenzini M, Pasquinelli G, O'Donohue M-F, Ploton D, Thiry M (2006) Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem* 54:131–45. doi: 10.1369/jhc.5R6780.2005
 121. Derenzini M, Thiry M, Goessens G (1990) Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem* 38:1237–56.
 122. Dev VG, Tantravahi R, Miller DA, Miller OJ (1977) Nucleolus organizers in *Mus musculus* subspecies and in the RAG mouse cell line. *Genetics* 86:389–98.
 123. Dieker W, Derijck AAHA, Heijden GW Van Der, Muller S, Berden JHM, Braat DDM, Vlag J Van Der, Boer P De, van der Heijden GW, Dieker JW, Derijck AAHA, Muller S, Berden JHM, Braat DDM, van der Vlag J, de Boer P (2005) Asymmetry in Histone H3

- variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech Dev* 122:1008–1022. doi: 10.1016/j.mod.2005.04.009
124. Dimario PJ (2004) Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. *Int Rev Cytol* 239:99–178. doi: 10.1016/S0074-7696(04)39003-0
125. Dimitrova E, Turberfield AH, Klose RJ (2015) Histone demethylases in chromatin biology and beyond. *EMBO Rep* 16:1620–1639. doi: 10.15252/embr.201541113
126. Dousset T, Wang C, Chen D (2000) Initiation of Nucleolar Assembly Is Independent of RNA Polymerase I Transcription. *Mol Cell Biol* 11:2705–2717.
127. Drané P, Ouararhni K, Depaux A, Shuaib M, Hamiche A (2010) The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev* 24:1253–65. doi: 10.1101/gad.566910
128. Drygin D, Lin A, Bliesath J, Ho CB, O'Brien SE, Proffitt C, Omori M, Haddach M, Schwaebe MK, Siddiqui-Jain A, Streiner N, Quin JE, Sanij E, Bywater MJ, Hannan RD, Ryckman D, Anderes K, Rice WG (2011) Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res* 71:1418–1430. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1728
129. Drygin D, O'Brien SE, Hannan RD, McArthur GA, Von Hoff DD (2014) Targeting the nucleolus for cancer-specific activation of p53. *Drug Discov Today* 19:259–65. doi: 10.1016/j.drudis.2013.08.012
130. Dubois MF, Nguyen VT, Dahmus ME, Pagès G, Pouysségur J, Bensaude O (1994) Enhanced phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II upon serum stimulation of quiescent cells: possible involvement of MAP kinases. *EMBO J* 13:4787–97.
131. Dundr M, Hebert MD, Karpova TS, Stanek D, Xu H, Shpargel KB, Meier UT, Neugebauer KM, Matera AG, Misteli T (2004) In vivo kinetics of Cajal body components. *J Cell Biol* 164:831–842. doi: 10.1083/jcb.200311121
132. Dundr M, Hoffmann-Rohrer U, Hu Q, Grummt I, Rothblum LI, Phair RD, Misteli T (2002) A kinetic framework for a mammalian RNA polymerase in vivo. *Science* 298:1623–6. doi: 10.1126/science.1076164
133. Dundr M, Misteli T (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 356:297–310.
134. Dundr M, Olson MO (1998) Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis. *Mol Biol Cell* 9:2407–22.
135. Dvorák M, Stastná J, Cech S, Trávník P, Horký D (1978) The differentiation of rat ova during cleavage. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 55:3–131.
136. Earley K, Lawrence RJ, Pontes O, Reuther R, Enciso AJ, Silva M, Neves N, Gross M, Viegas W, Pikaard CS (2006) Erasure of histone acetylation by Arabidopsis HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes Dev* 20:1283–93. doi: 10.1101/gad.1417706
137. Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V, Elgin SC (1990) Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9923–7.
138. Eissenberg JC, Morris GD, Reuter G, Hartnett T (1992) The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics* 131:345–52.
139. Elsevier SM, Ruddle FH (1975) Location of genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA within the genome of *Mus musculus*. *Chromosoma* 52:219–28.
140. Engel W, Zenzes MT, Schmid M (1977) Activation of mouse ribosomal RNA genes at

- the 2-cell stage. *Hum Genet* 38:57–63.
141. Eppig JJ, Schroeder C (1989) Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod* 41:268–276. doi: 10.1095/biolreprod41.2.268
 142. Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F (1994) Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 164:1–9. doi: 10.1006/dbio.1994.1175
 143. Evers R, Grummt I (1995) Molecular coevolution of mammalian ribosomal gene terminator sequences and the transcription termination factor TTF-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5827–31.
 144. Evers R, Smid A, Rudloff U, Lottspeich F, Grummt I (1995) Different domains of the murine RNA polymerase I-specific termination factor mTTF-I serve distinct functions in transcription termination. *EMBO J* 14:1248–56.
 145. Eymery A, Callanan M, Vourc'h C (2009) The secret message of heterochromatin: new insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription. *Int J Dev Biol* 53:259–268. doi: 10.1387/ijdb.082673ae
 146. Fakan S, Odartchenko N (1980) Ultrastructural organization of the cell nucleus in early mouse embryos. *Biol Cell* 37:211–217.
 147. Feng W, Yonezawa M, Ye J, Jenuwein T, Grummt I (2010) PHF8 activates transcription of rRNA genes through H3K4me3 binding and H3K9me1/2 demethylation. *Nat Struct Mol Biol* 17:445–450. doi: 10.1038/nsmb.1778
 148. Ferreira J, Carmo-Fonseca M (1995) The biogenesis of the coiled body during early mouse development. *Development* 121:601–12.
 149. Festenstein R, Sharghi-Namini S, Fox M, Roderick K, Tolaini M, Norton T, Saveliev A, Kioussis D, Singh P (1999) Heterochromatin protein 1 modifies mammalian PEV in a dose- and chromosomal-context-dependent manner. *Nat Genet* 23:457–61. doi: 10.1038/70579
 150. Flach G, Johnson MH, Braude PR, Taylor RA, Bolton VN (1982) The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J* 1:681–6.
 151. Fléchon JE, Kopečný V (1998) The nature of the “nucleolus precursor body” in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. *Zygote* 6:183–91.
 152. Francastel C, Schübeler D, Martin DI, Groudine M (2000) Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:137–43. doi: 10.1038/35040083
 153. Francastel C, Walters MC, Groudine M, Martin DI (1999) A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centromeric heterochromatin. *Cell* 99:259–69.
 154. Franchini D, Schmitz K-M, Petersen-Mahrt SK (2012) 5-Methylcytosine DNA Demethylation: More Than Losing a Methyl Group. *Annu Rev Genet* 46:419–41. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155451
 155. Franklin SG, Zweidler A (1977) Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature* 266:273–275. doi: 10.1038/266273a0
 156. Frehlick LJ, Eirín-López JM, Ausió J (2007) New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Bioessays* 29:49–59. doi: 10.1002/bies.20512
 157. Friedrich JK, Panov KI, Cabart P, Russell J, Zomerdijk JCBM (2005) TBP-TAF complex SL1 directs RNA polymerase I pre-initiation complex formation and stabilizes upstream binding factor at the rDNA promoter. *J Biol Chem* 280:29551–8. doi: 10.1074/jbc.M501595200
 158. Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F (2003) Ribosome assembly in

- eukaryotes. *Gene* 313:17–42.
159. Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T (2003) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 31:2305–2312. doi: 10.1093/nar/gkg332
 160. Fulka H, Langerova A (2014) The maternal nucleolus plays a key role in centromere satellite maintenance during the oocyte to embryo transition. *Development* 141:1694–704. doi: 10.1242/dev.105940
 161. Gall JG (2001) A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. *FEBS Lett* 498:164–7.
 162. Gall JG (2000) Cajal bodies: the first 100 years. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:273–300. doi: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.273
 163. Gall JG (2003) The centennial of the Cajal body. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:975–80. doi: 10.1038/nrm1262
 164. Gall JG, Bellini M, Wu Z, Murphy C (1999) Assembly of the Nuclear Transcription and Processing Machinery: Cajal Bodies (Coiled Bodies) and Transcriptosomes. *Mol Biol Cell* 10:4385–4402.
 165. Ganot P, Bortolin ML, Kiss T (1997) Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* 89:799–809.
 166. Gartenberg M (2009) Heterochromatin and the cohesion of sister chromatids. *Chromosom Res* 17:229–238. doi: 10.1007/s10577-008-9012-z
 167. Gaszner M, Felsenfeld G (2006) Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet* 7:703–713. doi: 10.1038/nrg1925
 168. Gautier T, Fomproix N, Masson C, Azum-Gélade MC, Gas N, Hernandez-Verdun D (1994) Fate of specific nucleolar perichromosomal proteins during mitosis: cellular distribution and association with U3 snoRNA. *Biol cell* 82:81–93.
 169. Gautier T, Masson C, Quintana C, Arnoult J, Hernandez-Verdun D (1992a) The ultrastructure of the chromosome periphery in human cell lines. An in situ study using cryomethods in electron microscopy. *Chromosoma* 101:502–10.
 170. Gautier T, Robert-Nicoud M, Guilly MN, Hernandez-Verdun D (1992b) Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis. A study by confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci* 729–37.
 171. Ge H, Zhao Y, Chait BT, Roeder RG (1994) Phosphorylation negatively regulates the function of coactivator PC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12691–5. doi: 10.1073/pnas.91.26.12691
 172. Gébrane-Younès J, Fomproix N, Hernandez-Verdun D (1997) When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. *J Cell Sci* 2429–40.
 173. Geuskens M, Alexandre H (1984) Ultrastructural and autoradiographic studies of nucleolar development and rDNA transcription in preimplantation mouse embryos. *Cell Differ* 14:125–134. doi: 10.1016/0045-6039(84)90037-X
 174. Goessens G (1984) Nucleolar structure. *Int Rev Cytol* 87:107–58.
 175. Goll MG, Bestor TH (2005) Eukaryotic Cytosine Methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74:481–514. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721
 176. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh C-L, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH (2006) Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311:395–8. doi: 10.1126/science.1120976
 177. Goodpasture C, Bloom SE (1975) Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53:37–50.
 178. Goolam M, Scialdone A, Graham SJL, Macaulay IC, Jedrusik A, Hupalowska A, Voet T, Marioni JC, Zernicka-Goetz M (2016) Heterogeneity in Oct4 and Sox2 Targets Biases

- Cell Fate in 4-Cell Mouse Embryos. *Cell* 165:61–74. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.047
179. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD (2008) DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res* 647:30–8. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.08.006
180. Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thévenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S, others (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* 176:283.
181. Gräff J, Mansuy IM (2008) Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav Brain Res* 192:70–87. doi: 10.1016/j.bbr.2008.01.021
182. Greenblatt J (1997) RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:310–9.
183. Grewal SI, Klar AJ (1996) Chromosomal inheritance of epigenetic states in fission yeast during mitosis and meiosis. *Cell* 86:95–101.
184. Grigoryev SA a., Nikitina T, Pehrson JR, Singh PB, Woodcock CL (2004) Dynamic relocation of epigenetic chromatin markers reveals an active role of constitutive heterochromatin in the transition from proliferation to quiescence. *J Cell Sci* 117:6153. doi: 10.1242/jcs.01537
185. Grob A, Collieran C, McStay B (2014) Construction of synthetic nucleoli in human cells reveals how a major functional nuclear domain is formed and propagated through cell division. *Genes Dev* 28:220–30. doi: 10.1101/gad.234591.113
186. Grummt I (2003) Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* 17:1691–1702. doi: 10.1101/gad.1098503R.GENES
187. Grummt I (2010) Wisely chosen paths--regulation of rRNA synthesis: delivered on 30 June 2010 at the 35th FEBS Congress in Gothenburg, Sweden. *FEBS J* 277:4626–39. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07892.x
188. Grummt I (2007) Different epigenetic layers engage in complex crosstalk to define the epigenetic state of mammalian rRNA genes. *Hum Mol Genet* R21-7. doi: 10.1093/hmg/ddm020
189. Grummt I, Längst G (2013) Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1829:393–404. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.10.004
190. Gu B, Lee MG (2013) Histone H3 lysine 4 methyltransferases and demethylases in self-renewal and differentiation of stem cells. *Cell Biosci* 3:39. doi: 10.1186/2045-3701-3-39
191. Guenatri M, Bailly D, Maison C, Almouzni G (2004) Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J Cell Biol* 166:493–505. doi: 10.1083/jcb.200403109
192. Guetg C, Lienemann P, Sirri V, Grummt I, Hernandez-Verdun D, Hottiger MO, Fussenegger M, Santoro R (2010) The NoRC complex mediates the heterochromatin formation and stability of silent rRNA genes and centromeric repeats. *EMBO J* 29:2135–46. doi: 10.1038/emboj.2010.17
193. Guillemain C, Maleszewska M, Guais A, Maës J, Rouyez MCM-C, Yacia A, Fichelson S, Goodhardt M, Francastel C, Maes J (2009) Chromatin modifications in hematopoietic multipotent and committed progenitors are independent of gene subnuclear positioning relative to repressive compartments. *Stem Cells* 27:108–115. doi: 10.1634/stemcells.2008-0755
194. Guillot P, Martin S, Pombo A (2005) The organization of transcription in the nucleus of mammalian cells. In: Hemmerich P, Diekmann S (eds) *isions of the cell nucleus*. ASP, CA, pp 95–105
195. Haaf T (2001) The battle of the sexes after fertilization: behaviour of paternal and

- maternal chromosomes in the early mammalian embryo. *Chromosome Res* 9:263–71.
196. Haaf T, Ward DC (1995) Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. *Exp Cell Res* 219:604–11. doi: 10.1006/excr.1995.1270
 197. Hadjiolov AA (1985) Ribosome Biogenesis in the Life Cycle of Normal and Cancer Cells. Springer Vienna, pp 165–196
 198. Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS (2004) Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell* 6:117–131.
 199. Hamdane N, Stefanovsky VY, Tremblay MG, Németh A, Paquet E, Lessard F, Sanij E, Hannan R, Moss T (2014) Conditional Inactivation of Upstream Binding Factor Reveals Its Epigenetic Functions and the Existence of a Somatic Nucleolar Precursor Body. *PLoS Genet* 10:e1004505. doi: 10.1371/journal.pgen.1004505
 200. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR (2009) Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460:473–478. doi: 10.1038/nature08162
 201. Hanada K, Song CZ, Yamamoto K, Yano K, Maeda Y, Yamaguchi K, Muramatsu M (1996) RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. *EMBO J* 15:2217–26.
 202. Hannan KM, Hannan RD, Rothblum LI (1998) Transcription by RNA polymerase I. *Front Biosci* 3:d376-98.
 203. Hardin JH, Spicer SS, Greene WB (1969) The paranucleolar structure, accessory body of Cajal, sex chromatin, and related structures in nuclei of rat trigeminal neurons: a cytochemical and ultrastructural study. *Anat Rec* 164:403–31. doi: 10.1002/ar.1091640403
 204. Harel J, Hanania N, Tapiero H, Harel L (1968) RNA replication by nuclear satellite DNA in different mouse cells. *Biochem Biophys Res Commun* 33:696–701.
 205. Harr JC, Gonzalez-Sandoval A, Gasser SM (2016) Histones and histone modifications in perinuclear chromatin anchoring: from yeast to man. *EMBO Rep* 17:e201541809. doi: 10.15252/embr.201541809
 206. Hata K, Okano M, Lei H, Li E (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 129:1983–1993.
 207. Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Nozaki N, Kimura H (2009) Visualizing histone modifications in living cells: spatiotemporal dynamics of H3 phosphorylation during interphase. *J Cell Biol* 187:781–90. doi: 10.1083/jcb.200904137
 208. Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* 7:1395–402.
 209. Heix J, Vente A, Voit R, Budde A, Michaelidis TM, Grummt I (1998) Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *EMBO J* 17:7373–81. doi: 10.1093/emboj/17.24.7373
 210. Heix J, Zomerdijk JCBM, Ravanpay A, Tjian R, Grummt I (1997) Cloning of murine RNA polymerase I-specific TAF factors: conserved interactions between the subunits of the species-specific transcription initiation factor TIF-IB/SL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1733–8. doi: 10.1073/pnas.94.5.1733
 211. Heliot L, Kaplan H, Lucas L, Klein C, Beorchia a, Doco-Fenzy M, Menager M, Thiry M, O'Donohue MF, Ploton D (1997) Electron tomography of metaphase nucleolar organizer regions: evidence for a twisted-loop organization. *Mol Biol Cell* 8:2199–2216.
 212. Henderson AS, Eicher EM, Yu MT, Atwood KC (1974) The chromosomal location of ribosomal DNA in the mouse. *Chromosoma* 49:155–60.

213. Henderson SL, Sollner-Webb B (1990) The mouse ribosomal DNA promoter has more stringent requirements in vivo than in vitro. *Mol Cell Biol* 10:4970–3.
214. Henery CC, Miranda M, Wiekowski M, Wilmut I, DePamphilis ML (1995) Repression of gene expression at the beginning of mouse development. *Dev Biol* 169:448–60. doi: 10.1006/dbio.1995.1160
215. Henras AK, Plisson-Chastang C, O’Donohue M-F, Chakraborty A, Gleizes P-E (2014) An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6:225–42. doi: 10.1002/wrna.1269
216. Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A (2003) The human Dnmt2 has residual DNA-(Cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem* 278:31717–31721. doi: 10.1074/jbc.M305448200
217. Hernandez-verdun D (2006a) Nucleolus : from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol* 125:127–137. doi: 10.1007/s00418-005-0046-4
218. Hernandez-verdun D (2006b) The nucleolus : a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol* 126:135–148. doi: 10.1007/s00418-006-0212-3
219. Hernandez-Verdun D (2011) Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus* 2:189–194. doi: 10.4161/nucl.2.3.16246
220. Hernandez-Verdun D, Hubert J, Bourgeois C, Bouteille M (1978) [Ultrastructural identification of the nucleolus organizer by the silver staining technic]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 287:1421–3.
221. Hernandez-Verdun D, Louvet E (2004) [The nucleolus: structure, functions, and associated diseases]. *Med Sci (Paris)* 20:37–44. doi: 10.1051/medsci/200420137
222. Hernandez-Verdun D, Roussel P, Gébrane-Younès J (2002) Emerging concepts of nucleolar assembly. *J Cell Sci* 115:2265–70.
223. Hewitt SL, High FA, Reiner SL, Fisher AG, Merkenschlager M (2004) Nuclear repositioning marks the selective exclusion of lineage-inappropriate transcription factor loci during T helper cell differentiation. *Eur J Immunol* 34:3604–13. doi: 10.1002/eji.200425469
224. Hiragami K, Festenstein R (2005) Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cell Mol Life Sci* 62:2711–26. doi: 10.1007/s00018-005-5287-9
225. Hirose F, Ohshima N, Kwon E-J, Yoshida H, Yamaguchi M (2002) Drosophila Mi-2 negatively regulates dDREF by inhibiting its DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* 22:5182–93.
226. Hörz W, Altenburger W (1981) Nucleotide sequence of mouse satellite DNA. *Nucleic Acids Res* 9:683–96.
227. Howlett SK (1986) A set of proteins showing cell cycle dependent modification in the early mouse embryo. *Cell* 45:387–96.
228. Howlett SK, Bolton VN (1985) Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. *J Embryol Exp Morphol* 87:175–206.
229. Hozák P, Cook PR, Schöfer C, Mosgöller W, Wachtler F (1994) Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J Cell Sci* 639–48.
230. Hozák P, Novák JT, Smetana K (1989) Three-dimensional reconstructions of nucleolus-organizing regions in PHA-stimulated human lymphocytes. *Biol cell* 66:225–33.
231. Hozák P, Schöfer C, Sylvester J, Wachtler F (1993) A study on nucleolar DNA: isolation of DNA from fibrillar components and ultrastructural localization of different DNA probes. *J Cell Sci* 1199–205.
232. Hsieh C-L, Lin C-L, Liu H, Chang Y-J, Shih C-J, Zhong CZ, Lee S-C, Tan BC-M (2011) WDHD1 modulates the post-transcriptional step of the centromeric silencing pathway. *Nucleic Acids Res* 39:4048–62. doi: 10.1093/nar/gkq1338

- 233.Hsu TC, Arrighi FE (1971) Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes. *Chromosoma* 34:243–53.
- 234.Hu CH, McStay B, Jeong SW, Reeder RH (1994) xUBF, an RNA polymerase I transcription factor, binds crossover DNA with low sequence specificity. *Mol Cell Biol* 14:2871–82. doi: 10.1128/MCB.14.5.2871
- 235.Hu M, Zhao Z, TuanMu L-C, Wei H, Gao F, Li L, Ying J, Zhang S (2015) Analysis of imprinted gene expression and implantation in haploid androgenetic mouse embryos. *Andrologia* 47:102–8. doi: 10.1111/and.12222
- 236.Hud NV, Allen MJ, Downing KH, Lee J, Balhorn R (1993) Identification of the Elemental Packing Unit of DNA in Mammalian Sperm Cells by Atomic Force Microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193:1347–1354.
- 237.Hud N V., Downing KH, Balhorn R (1995) A constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensates. *Proc Natl Acad Sci* 92:3581–3585. doi: 10.1073/pnas.92.8.3581
- 238.Hunter T, Karin M (1992) The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70:375–87.
- 239.Iguchi-Arigo SMM, Schaffner W (1989) CpG methylation of the cAMP- responsive enhancer / promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* 612–619. doi: 10.1101/gad.3.5.612
- 240.Ingham PW (1985) A clonal analysis of the requirement for the trithorax gene in the diversification of segments in *Drosophila*. *Embryol exp Morph* 89:349–365.
- 241.Inoue A, Aoki F (2010) Role of the nucleoplasmin 2 C-terminal domain in the formation of nucleolus-like bodies in mouse oocytes. *FASEB J* 24:485–94. doi: 10.1096/fj.09-143370
- 242.Inoue A, Ogushi S, Saitou M, Suzuki MG, Aoki F (2011) Involvement of mouse nucleoplasmin 2 in the decondensation of sperm chromatin after fertilization. *Biol Reprod* 85:70–77. doi: 10.1095/biolreprod.110.089342
- 243.Inoue A, Zhang Y (2011) Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science* 334:194. doi: 10.1126/science.1212483
- 244.Iqbal K, Jin S-G, Pfeifer GP, Szabó PE (2011) Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3642–7. doi: 10.1073/pnas.1014033108
- 245.Isaac C, Yang Y, Meier UT (1998) Nopp140 Functions as a Molecular Link Between the Nucleolus and the Coiled Bodies. *J Cell Biol* 142:319–329.
- 246.Ito S, Alessio ACD, Taranova O V, Hong K, Sowers LC, Zhang Y, D'Alessio AC (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion , ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466:1129–1133. doi: 10.1038/nature09303
- 247.Jack K, Bellodi C, Landry DM, Niederer RO, Meskauskas A, Musalgaonkar S, Kopmar N, Krasnykh O, Dean AM, Thompson SR, Ruggero D, Dinman JD (2011) rRNA pseudouridylation defects affect ribosomal ligand binding and translational fidelity from yeast to human cells. *Mol Cell* 44:660–6. doi: 10.1016/j.molcel.2011.09.017
- 248.Jansa P, Grummt I (1999) Mechanism of transcription termination: PTRF interacts with the largest subunit of RNA polymerase I and dissociates paused transcription complexes from yeast and mouse. *Mol Gen Genet* 262:508–14.
- 249.Jansa P, Mason SW, Hoffmann-Rohrer U, Grummt I (1998) Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *EMBO J* 17:2855–64. doi: 10.1093/emboj/17.10.2855
- 250.Jantzen HM, Admon a, Bell SP, Tjian R (1990) Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 344:830–836.
- 251.Jantzen HM, Chow AM, King DS, Tjian R (1992) Multiple domains of the RNA

- polymerase I activator hUBF interact with the TATA-binding protein complex hSL1 to mediate transcription. *Genes Dev* 6:1950–63.
252. Jeanblanc M, Salvaing J, Mason K, Debey P, Beaujean N (2008) [Embryonic genome activation]. *Gynecol Obstet Fertil* 36:1126–32. doi: 10.1016/j.gyobfe.2008.07.015
 253. Jedrusik A, Parfitt D-E, Guo G, Skamagki M, Grabarek JB, Johnson MH, Robson P, Zernicka-Goetz M (2008) Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes Dev* 22:2692–706. doi: 10.1101/gad.486108
 254. Jeltsch A, Nellen W, Lyko F (2006) Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. *Trends Biochem Sci* 31:306–8. doi: 10.1016/j.tibs.2006.04.005
 255. Jeppesen P, Mitchell A, Turner B, Perry P (1992) Antibodies to defined histone epitopes reveal variations in chromatin conformation and underacetylation of centric heterochromatin in human metaphase chromosomes. *Chromosoma* 101:322–32.
 256. Jiménez-García LF, Segura-Valdez ML, Ochs RL, Echeverría OM, Vázquez-Nin GH, Busch H (1993) Electron microscopic localization of ribosomal DNA in rat liver nucleoli by nonisotopic in situ hybridization. *Exp Cell Res* 207:220–5.
 257. Jiménez-García LF, Segura-Valdez ML, Ochs RL, Rothblum LI, Hannan R, Spector DL (1994) Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol Biol Cell* 5:955–66.
 258. Jodar M, Selvaraju S, Sandler E, Diamond MP, Krawetz SA (2013) The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum Reprod Update* 19:604–624. doi: 10.1093/humupd/dmt031
 259. Joseph A, Mitchell AR, Miller OJ (1989) The organization of the mouse satellite DNA at centromeres. *Exp Cell Res* 183:494–500.
 260. Jost KL, Haase S, Smeets D, Schrode N, Schmiedel JM, Bertulat B, Herzel H, Cremer M, Cardoso MC (2011) 3D-Image analysis platform monitoring relocation of pluripotency genes during reprogramming. *Nucleic Acids Res* 39:e113. doi: 10.1093/nar/gkr486
 261. Junéra HR, Masson C, Géraud G, Hernandez-Verdun D (1995) The three-dimensional organization of ribosomal genes and the architecture of the nucleoli vary with G1, S and G2 phases. *J Cell Sci* 3427–41.
 262. Kaiser K, Stelzer G, Meisterernst M (1995) The coactivator p15 (PC4) initiates transcriptional activation during TFIIA-TFIID-promoter complex formation. *EMBO J* 14:3520–3527.
 263. Kalitsis P, Griffiths B, Choo KHA (2006) Mouse telocentric sequences reveal a high rate of homogenization and possible role in Robertsonian translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8786–91. doi: 10.1073/pnas.0600250103
 264. Kanka J, Hozák P, Heyman Y, Chesné P, Degrolard J, Renard JP, Fléchon JE (1996) Transcriptional activity and nucleolar ultrastructure of embryonic rabbit nuclei after transplantation to enucleated oocytes. *Mol Reprod Dev* 43:135–44. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199602)43:2<135::AID-MRD1>3.0.CO;2-S
 265. Kaplan G, Abreu SL, Bachvarova R (1982) rRNA accumulation and protein synthetic patterns in growing mouse oocytes. *J Exp Zool* 220:361–70. doi: 10.1002/jez.1402200311
 266. Karin M (1991) Signal transduction and gene control. *Curr Opin Cell Biol* 3:467–73.
 267. Kigami D, Minami N, Takayama H, Imai H (2003) MuERV-L is one of the earliest transcribed genes in mouse one-cell embryos. *Biol Reprod* 68:651–4.
 268. Kim H, Abeysirigunawardena SC, Chen K, Mayerle M, Ragunathan K, Luthey-Schulten Z, Ha T, Woodson SA (2014) Protein-guided RNA dynamics during early ribosome assembly. *Nature* 506:334–338. doi: 10.1038/nature13039

269. Kipling D, Warburton PE (1997) Centromeres, CENP-B and Tigger too. *Trends Genet* 13:141–5.
270. Kiss-László Z, Henry Y, Bachellerie JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T (1996) Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85:1077–88.
271. Kleene KC, Distel RJ, Hecht NB (1985) Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding mouse protamine 1. *Biochemistry* 24:719–722.
272. Knibiehler B, Navarro A, Mirre C, Stahl A (1977) Localization of ribosomal cistrons in the quail oocyte during meiotic prophase I. *Exp Cell Res* 110:153–7.
273. Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, Huang Y, Cunniff K, Nardone J, Laiho A, Tahiliani M, Sommer CA, Mostoslavsky G, Lahesmaa R, Orkin SH, Rodig SJ, Daley GQ, Rao A (2011) Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 8:200–13. doi: 10.1016/j.stem.2011.01.008
274. Komissarov AS, Gavrilova E V, Demin SJ, Ishov AM, Podgornaya OI (2011) Tandemly repeated DNA families in the mouse genome. *BMC Genomics* 12:531. doi: 10.1186/1471-2164-12-531
275. Kone MC, Fleurot R, Chebrout M, Debey P, Beaujean N, Bonnet-Garnier A (2016) Three-Dimensional Distribution of UBF and Nopp140 in Relationship to Ribosomal DNA Transcription During Mouse Preimplantation Development. *Biol Reprod* 94:95–95. doi: 10.1095/biolreprod.115.136366
276. Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Park ES, Seo J-S, Ogawa H (2004) Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature* 428:860–4. doi: 10.1038/nature02402
277. Kopečný V, Landa V, Pavlok A (1995) Localization of nucleic acids in the nucleoli of oocytes and early embryos of mouse and hamster: An autoradiographic study. *Mol Reprod Dev* 41:449–458. doi: 10.1002/mrd.1080410407
278. Kopečný V, Pavlok A (1975) Autoradiographic study of mouse spermatozoan arginine-rich nuclear protein in fertilization. *J Exp Zool* 191:85–96. doi: 10.1002/jez.1401910109
279. Kosak ST, Groudine M (2004) Gene order and dynamic domains. *Science* 306:644–647. doi: 10.1126/science.1103864
280. Kourmouli N, Jeppesen P, Mahadevhaiah S, Burgoyne P, Wu R, Gilbert DM, Bongiorni S, Prantera G, Fanti L, Pimpinelli S, Shi W, Fundele R, Singh PB (2004) Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J Cell Sci* 117:2491–501. doi: 10.1242/jcs.01238
281. Kretzschmar M, Kaiser K, Lottspeich F, Meisterernst M (1994) A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators. *Cell* 78:525–534. doi: 10.1016/0092-8674(94)90429-4
282. Kubiak JZ, Weber M, de Pennart H, Winston NJ, Maro B (1993) The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *EMBO J* 12:3773–8. doi: 8404848
283. Kuehn M, Arnheim N (1983) Nucleotide sequence of the genetically labile repeated elements 5' to the origin of mouse rRNA transcription. *Nucleic Acids Res* 11:211–24.
284. Kuhn A, Deppert U, Grummt I (1990) A 140-base-pair repetitive sequence element in the mouse rRNA gene spacer enhances transcription by RNA polymerase I in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7527–31.
285. Kuhn A, Grummt I (1987) A novel promoter in the mouse rDNA spacer is active in vivo and in vitro. *EMBO J* 6:3487–92.
286. Kunkle M, Longo FJ, Magun BE (1978) Nuclear protein changes in the maternally and paternally derived chromatin at fertilization. *J Exp Zool* 203:371–80. doi:

- 10.1002/jez.1402030305
287. Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K, Yanagimachi R (1996) Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol Reprod* 55:789–95.
288. Kurihara Y, Suh DS, Suzuki H, Moriwaki K (1994) Chromosomal locations of Ag-NORs and clusters of ribosomal DNA in laboratory strains of mice. *Mamm Genome* 5:225–228. doi: 10.1007/BF00360550
289. Kyogoku H, Fulka J, Wakayama T, Miyano T (2014) De novo formation of nucleoli in developing mouse embryos originating from enucleolated zygotes. *Development* 1034:2255–2259. doi: 10.1242/dev.106948
290. Lachner M, O’Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410:116–20. doi: 10.1038/35065132
291. Lafontaine DLJ (2015) Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nat Struct Mol Biol* 22:11–19. doi: 10.1038/nsmb.2939
292. Lafontaine DL, Bousquet-Antonelli C, Henry Y, Caizergues-Ferrer M, Tollervey D (1998) The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes Dev* 12:527–37.
293. Lake RJ, Fan H-Y (2013) Structure, function and regulation of CSB: a multi-talented gymnast. *Mech Ageing Dev* 134:202–11. doi: 10.1016/j.mad.2013.02.004
294. Lamond a I, Carmo-Fonseca M (1993) The coiled body. *Trends Cell Biol* 3:198–204. doi: 10.1016/0962-8924(93)90214-L
295. Latham KE, Akutsu H, Patel B, Yanagimachi R (2002) Comparison of gene expression during preimplantation development between diploid and haploid mouse embryos. *Biol Reprod* 67:386–92.
296. Latham KE, Garrels JI, Chang C, Solter D (1991) Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development* 112:921–32.
297. Laurincik J, Hyttel P, Kopečný V (1995) DNA synthesis and pronucleus development in pig zygotes obtained in vivo: an autoradiographic and ultrastructural study. *Mol Reprod Dev* 40:325–32. doi: 10.1002/mrd.1080400308
298. Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, Viegas W, Pikaard CS (2004) A Concerted DNA Methylation/Histone Methylation Switch Regulates rRNA Gene Dosage Control and Nucleolar Dominance. *Mol Cell* 13:599–609. doi: 10.1016/S1097-2765(04)00064-4
299. Laybourn PJ, Dahmus ME (1990) Phosphorylation of RNA polymerase IIA occurs subsequent to interaction with the promoter and before the initiation of transcription. *J Biol Chem* 265:13165–73.
300. Le Guezennec X, Vermeulen M, Brinkman AB, Hoeijmakers WAM, Cohen A, Lasonder E, Stunnenberg HG (2006) MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Mol Cell Biol* 26:843–51. doi: 10.1128/MCB.26.3.843-851.2006
301. Learned RM, Learned TK, Haltiner MM, Tjian RT (1986) Human rRNA transcription is modulated by the coordinate binding of two factors to an upstream control element. *Cell* 45:847–57.
302. Leblanc B, Read C, Moss T (1993) Recognition of the *Xenopus* ribosomal core promoter by the transcription factor xUBF involves multiple HMG box domains and leads to an xUBF interdomain interaction. *EMBO J* 12:513–25.
303. Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72:73–84. doi: 10.1016/0092-8674(93)90051-Q

304. Lee MT, Bonneau AR, Giraldez AJ (2014) Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:581–613. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013027
305. Leger-Silvestre I, Gas N (2004) The nucleolar ultrastructure in yeast. In: Academic/Plenum K (ed) *The Nucleolus*. New York, pp 21–28
306. Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AAHA, Braunschweig U, Perez-burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AHFM (2003) Suv39h⁻-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. *Curr Biol* 13:1192–1200. doi: 10.1016/S
307. Lepikhov K, Walter J (2004) Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote. *BMC Dev Biol* 4:12. doi: 10.1186/1471-213X-4-12
308. Leung AKL, Trinkle-Mulcahy L, Lam YW, Andersen JS, Mann M, Lamond AI (2006) NOPdb: Nucleolar Proteome Database. *Nucleic Acids Res* 34:D218-20. doi: 10.1093/nar/gkj004
309. Li B, Carey M, Workman JL (2007) The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* 128:707–719. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.015
310. Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915–926. doi: 10.1016/0092-8674(92)90611-F
311. Li J, Längst G, Grummt I, Bazett-Jones D, Leblanc B, Herfort M, Moss T, et al. (2006) NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes. *EMBO J* 25:5735–41. doi: 10.1038/sj.emboj.7601454
312. Li L, Lu X, Dean J (2013) The maternal to zygotic transition in mammals. *Mol Aspects Med* 34:919–38. doi: 10.1016/j.mam.2013.01.003
313. Lindell TJ, Weinberg F, Morris PW, Roeder RG, Rutter WJ (1970) Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin. *Science* 170:447–9.
314. Ling T, Xie W, Luo M, Shen M, Zhu Q, Zong L, Zhou T, Gu J, Lu Z, Zhang F, Tao W (2013) CHD4/NuRD maintains demethylation state of rDNA promoters through inhibiting the expression of the rDNA methyltransferase recruiter TIP5. *Biochem Biophys Res Commun* 437:101–107. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.06.045
315. Lippincott-Schwartz J (2002) Cell biology: ripping up the nuclear envelope. *Nature* 416:31–2. doi: 10.1038/416031a
316. Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:444–56. doi: 10.1038/35073068
317. Liu H, Kim J-M, Aoki F (2004) Regulation of histone H3 lysine 9 methylation in oocytes and early pre-implantation embryos. *Development* 131:2269–2280. doi: 10.1242/dev.01116
318. Lo SJ, Lee C-C, Lai H-J (2006) The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings. *Cell Res* 16:530–538. doi: 10.1038/sj.cr.7310070
319. Longo F, Garagna S, Merico V, Orlandini G, Gatti R, Scandroglio R, Redi CA, Zuccotti M (2003) Nuclear localization of NORs and centromeres in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mol Reprod Dev* 66:279–290. doi: 10.1002/mrd.10354
320. Louvet E, Junéra HR, Le Panse S, Hernandez-Verdun D (2005) Dynamics and compartmentation of the nucleolar processing machinery. *Exp Cell Res* 304:457–70. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.11.018
321. Loyola A, Tagami H, Bonaldi T, Roche D, Quivy JP, Imhof A, Nakatani Y, Dent SYR, Almouzni G (2009) The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep* 10:769–75. doi: 10.1038/embor.2009.90

322. Lu J, Gilbert DM (2007) Proliferation-dependent and cell cycle-regulated transcription of mouse pericentric heterochromatin. *J Cell Biol* 179:411–421. doi: 10.1083/jcb.200706176
323. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251–60. doi: 10.1038/38444
324. Lundgren M, Chow CM, Sabbattini P, Georgiou A, Minaee S, Dillon N (2000) Transcription factor dosage affects changes in higher order chromatin structure associated with activation of a heterochromatic gene. *Cell* 103:733–43.
325. Ma J, Flemr M, Stein P, Berninger P, Malik R, Zavolan M, Svoboda P, Schultz RM (2010) MicroRNA activity is suppressed in mouse oocytes. *Curr Biol* 20:265–70. doi: 10.1016/j.cub.2009.12.042
326. Maalouf WE, Aguirre-Lavin T, Herzog L, Bataillon I, Debey P, Beaujean N (2010) Three-dimensional fluorescence in situ hybridization in mouse embryos using repetitive probe sequences. *Methods Mol Biol* 659:401–8. doi: 10.1007/978-1-60761-789-1_31
327. Maalouf WE, Liu Z, Brochard V, Renard J-P, Debey P, Beaujean N, Zink D (2009) Trichostatin A treatment of cloned mouse embryos improves constitutive heterochromatin remodeling as well as developmental potential to term. *BMC Dev Biol* 9:11. doi: 10.1186/1471-213X-9-11
328. Machyna M, Heyn P, Neugebauer KM (2013) Cajal bodies: Where form meets function. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4:17–34. doi: 10.1002/wrna.1139
329. Machyna M, Kehr S, Straube K, Kappei D, Buchholz F, Butter F, Ule J, Hertel J, Stadler PF, Neugebauer KM (2014) The coilin interactome identifies hundreds of small noncoding RNAs that traffic through Cajal bodies. *Mol Cell* 56:389–99. doi: 10.1016/j.molcel.2014.10.004
330. Machyna M, Neugebauer KM, Staněk D (2015) Coilin: The first 25 years. *RNA Biol* 12:590–6. doi: 10.1080/15476286.2015.1034923
331. Maden B. (1990) The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 39:241–303.
332. Maison C, Almouzni G (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:296–304. doi: 10.1038/nrm1355
333. Maison C, Bailly D, Peters AHFM, Quivy J-PP, Roche D, Taddei A, Lachner M, Jenuwein T, Almouzni G (2002) Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* 30:329–34. doi: 10.1038/ng843
334. Mann MRW, Bartolomei MS (2002) Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biol* 3:REVIEWS1003.
335. Manuelidis L (1985) Indications of centromere movement during interphase and differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 450:205–21.
336. Marilley M, Gassend-Bonnet G (1989) Supercoiled loop organization of genomic DNA: a close relationship between loop domains, expression units, and replicon organization in rDNA from *Xenopus laevis*. *Exp Cell Res* 180:475–89.
337. Marilley M, Pasero P, Got C (1992) Molecular dissection of a specific nuclear domain: the chromatin region of the ribosomal gene cluster in *Xenopus laevis*. *Exp Cell Res* 202:87–97.
338. Martens JHA, O’Sullivan RJ, Braunschweig U, Opravil S, Radolf M, Steinlein P, Jenuwein T (2005) The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J* 24:800–12. doi: 10.1038/sj.emboj.7600545
339. Martin C, Beaujean N, Brochard V, Audouard C, Zink D, Debey P (2006) Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development. *Dev Biol*

- 292:317–332. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.01.009
340. Martínez-A C, van Wely KHM (2011) Centromere fission, not telomere erosion, triggers chromosomal instability in human carcinomas. *Carcinogenesis* 32:796–803. doi: 10.1093/carcin/bgr069
341. Mason K, Liu Z, Aguirre-Lavin T, Beaujean N (2012) Chromatin and epigenetic modifications during early mammalian development. *Anim Reprod Sci* 134:45–55. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.08.010
342. Mason SW, Wallisch M, Grummt I (1997) RNA polymerase I transcription termination: similar mechanisms are employed by yeast and mammals. *J. Mol. Biol.* 268:229–234.
343. Matera AG (1999) Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol* 9:302–9.
344. Matera AG, Ward DC (1993) Nucleoplasmic organization of small nuclear ribonucleoproteins in cultured human cells. *J Cell Biol* 121:715–27.
345. Matsuda Y, Chapman VM (1995) Application of fluorescence in situ hybridization in genome analysis of the mouse. *Electrophoresis* 16:261–72.
346. Matsumoto K, Anzai M, Nakagata N, Takahashi A, Takahashi Y, Miyata K (1994) Onset of paternal gene activation in early mouse embryos fertilized with transgenic mouse sperm. *Mol Reprod Dev* 39:136–40. doi: 10.1002/mrd.1080390203
347. Mattson BA, Albertini DF (1990) Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol Reprod Dev* 25:374–383. doi: 10.1002/mrd.1080250411
348. Mayer C, Schmitz KM, Li J, Grummt I, Santoro R (2006) Intergenic Transcripts Regulate the Epigenetic State of rRNA Genes. *Mol Cell* 22:351–361. doi: 10.1016/j.molcel.2006.03.028
349. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T (2000a) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403:501–2. doi: 10.1038/35000654
350. Mayer W, Smith A, Fundele R, Haaf T (2000b) Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos. *J Cell Biol* 148:629–34.
351. McKeown PC, Shaw PJ (2009) Chromatin: Linking structure and function in the nucleolus. *Chromosoma* 118:11–23. doi: 10.1007/s00412-008-0184-2
352. McNairn AJ, Gilbert DM (2003) Epigenomic replication: Linking epigenetics to DNA replication. *BioEssays* 25:647–656. doi: 10.1002/bies.10305
353. McStay B, Frazier MW, Reeder RH (1991) xUBF contains a novel dimerization domain essential for RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* 5:1957–68.
354. McStay B, Grummt I (2008) The Epigenetics of rRNA Genes: From Molecular to Chromosome Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24:131–157. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175259
355. Meehan RR, Kao CF, Pennings S (2003) HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *EMBO J* 22:3164–3174. doi: 10.1093/emboj/cdg306
356. Meier UT, Blobel G (1994) NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria. *J Cell Biol* 127:1505–14.
357. Meier UT, Blobel G (1990) A Nuclear Localization Signal Binding Protein in the Nucleolus. *J Cell Biol* 111:2235–2245.
358. Mélése T, Xue Z (1995) The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol* 7:319–24.
359. Mellor J (2005) The dynamics of chromatin remodeling at promoters. *Mol Cell* 19:147–57. doi: 10.1016/j.molcel.2005.06.023
360. Mellor J (2006) Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet* 22:320–9. doi: 10.1016/j.tig.2006.03.008
361. Merico V, Barbieri J, Zuccotti M, Joffe B, Cremer T, Redi CA, Solovei I, Garagna S

- (2007) Epigenomic differentiation in mouse preimplantation nuclei of biparental, parthenote and cloned embryos. *Chromosom Res* 15:341–360. doi: 10.1007/s10577-007-1130-5
362. Miao LL., Chang C. C, Tsai WW., Lee S. (1997) Identification and characterization of a nucleolar phosphoprotein, Nopp140, as a transcription factor. Identification and Characterization of a Nucleolar Phosphoprotein, Nopp140, as a Transcription Factor. *Mol Cell Biol* 17:230–239.
363. Miller D, Brinkworth M, Iles D (2010) Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139:287. doi: 10.1530/REP-09-0281
364. Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S (2007) Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J Reprod Dev* 53:707–715. doi: 10.1262/jrd.19029
365. Mirre C, Stahl A (1978) Ultrastructure and activity of the nucleolar organizer in the mouse oocyte during meiotic prophase. *J Cell Sci* 31:79–100.
366. Misteli T (2010) Higher-order genome organization in human disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000794. doi: 10.1101/cshperspect.a000794
367. Mitchell AR (1996) The mammalian centromere: its molecular architecture. *Mutat Res* 372:153–62.
368. Monneron A, Bernhard W (1969) Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastruct Res* 27:266–88.
369. Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clément F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana JC (1997) Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil Suppl* 51:3–23.
370. Moore GPM (1975) The RNA polymerase activity of the preimplantation mouse embryo.
371. Moore GPM, Lintern-Moore S, Peters H, Faber M (1974) RNA SYNTHESIS IN THE MOUSE OOCYTE.
372. Moore SC, Ausió J (1997) Major Role of the Histones H3-H4 in the Folding of the Chromatin Fiber. *Biochem Biophys Res Commun* 230:136–139. doi: 10.1006/bbrc.1996.5903
373. Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W (2005) Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* R47-58. doi: 10.1093/hmg/ddi114
374. Mosgöller W (2004) Nucleolar ultrastructure in vertebrates. In: Olson MOJ (ed) *The Nucleolus*. Kluwer Academic/Plenum, New York,
375. Moss T, Stefanovsky VY (2002) At the center of eukaryotic life. *Cell* 109:545–8.
376. Motte PM, Loppes R, Menager M, Deltour R (1991) Three-dimensional electron microscopy of ribosomal chromatin in two higher plants: a cytochemical, immunocytochemical, and in situ hybridization approach. *J Histochem Cytochem* 39:1495–506.
377. Mozzetta C, Boyarchuk E, Pontis J, Ait-Si-Ali S (2015) Sound of silence: the properties and functions of repressive Lys methyltransferases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:499–513. doi: 10.1038/nrm4029
378. Muchardt C, Guillemé M, Seeler JS, Trouche D, Dejean A, Yaniv M (2002) Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1 α . *EMBO Rep* 3:975–981. doi: 10.1093/embo-reports/kvf194
379. Mullineux ST, Lafontaine DLJ (2012) Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: Where do we stand? *Biochimie* 94:1521–1532. doi: 10.1016/j.biochi.2012.02.001
380. Muro E, Gébrane-Younis J, Jobart-Malfait A, Louvet E, Roussel P, Hernandez-Verdun D (2010) The traffic of proteins between nucleolar organizer regions and prenucleolar bodies governs the assembly of the nucleolus at exit of mitosis. *Nucleus* 1:202–211. doi:

10.4161/nucl.1.2.11334

381. Murphy C, Wang Z, Roeder RG, Gall JG (2002) RNA polymerase III in Cajal bodies and lampbrush chromosomes of the *Xenopus* oocyte nucleus. *Mol Biol Cell* 13:3466–76. doi: 10.1091/mbc.E02-05-0281
382. Murzina N, Verreault A, Laue E, Stillman B (1999) Heterochromatin dynamics in mouse cells: Interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol Cell* 4:529–540. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80204-X
383. Muth V, Nadaud S, Grummt I, Voit R (2001) Acetylation of TAF I 68, a subunit of TFIIB / SL1, activates RNA polymerase I transcription. *EMBO J* 20:1353–1362.
384. Naish SJ, Perreault SD, Foehner AL, Zirkin BR (1987) DNA synthesis in the fertilizing hamster sperm nucleus: sperm template availability and egg cytoplasmic control. *Biol Reprod* 36:245–53.
385. Narayanan A, Lukowiak A, Jády BE, Dragon F, Kiss T, Terns RM, Terns MP (1999) Nucleolar localization signals of box H/ACA small nucleolar RNAs. *EMBO J* 18:5120–30. doi: 10.1093/emboj/18.18.5120
386. Nicoloso M, Qu LH, Michot B, Bachellerie JP (1996) Intron-encoded, antisense small nucleolar RNAs: the characterization of nine novel species points to their direct role as guides for the 2'-O-ribose methylation of rRNAs. *J Mol Biol* 260:178–95. doi: 10.1006/jmbi.1996.0391
387. Nothias J, Majumder S, Kaneko KJ, Depamphilis ML (1995) Regulation of Gene Expression at the Beginning of Mammalian Development. *J Biol Chem* 270:22077–22080.
388. O'Mahony DJ, Smith SD, Xie W, Rothblum LI (1992a) Analysis of the phosphorylation, DNA-binding and dimerization properties of the RNA polymerase I transcription factors UBF1 and UBF2. *Nucleic Acids Res* 20:1301–8.
389. O'Mahony DJ, Xie WQ, Smith SD, Singer HA, Rothblum LI (1992b) Differential phosphorylation and localization of the transcription factor UBF in vivo in response to serum deprivation. In vitro dephosphorylation of UBF reduces its transactivation properties. *J Biol Chem* 267:35–8.
390. O'Sullivan AC, Sullivan GJ, McStay B (2002) UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol* 22:657–68.
391. Oakberg EF (1968) Relationship between stage of follicular development and RNA synthesis in the mouse oocyte. *Mutat Res* 6:155–65.
392. Obata Y, Ono Y, Akuzawa H, Kwon OY, Yoshizawa M, Kono T (2000) Post-implantation development of mouse androgenetic embryos produced by in-vitro fertilization of enucleated oocytes. *Hum Reprod* 15:874–80.
393. Ochs RL, Lischwe MA, Shen E, Carroll RE, Busch H (1985) Nucleologenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma* 92:330–6.
394. Ogg SC, Lamond A. (2002) Cajal bodies and coilin--moving towards function. *J Cell Biol* 159:17–21. doi: 10.1083/jcb.200206111
395. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99:247–57.
396. Okano M, Xie S, Li E (1998) Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 26:2536–2540. doi: 10.1093/nar/26.11.2536
397. Osley MA (1991) The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu Rev Biochem* 60:827–861. doi: 10.1146/annurev.bi.60.070191.004143
398. Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA (2004) Reproductive

- biology: Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 429:154–154. doi: 10.1038/429154a
399. Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote.
400. Pai CY, Chen HK, Sheu HL, Yeh NH (1995) Cell-cycle-dependent alterations of a highly phosphorylated nucleolar protein p130 are associated with nucleogenesis. *J Cell Sci* 108 (Pt 5):1911–20.
401. Panov KI, Friedrich JK, Russell J, Zomerdijk JCBM (2006) UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *Embo J* 25:3310–3322. doi: 10.1038/sj.emboj.7601221
402. Pardue ML, Gall JG (1970) Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168:1356–8.
403. Patkin EL, Kustova ME, Dyban AP (1992) [Cytological study of the nucleolus organizer regions in the chromosomes of CBA and C57BL mice and their hybrids]. *Ontogenez* 23:632–7.
404. Paul S, Knott JG (2014) Epigenetic control of cell fate in mouse blastocysts: the role of covalent histone modifications and chromatin remodeling. *Mol Reprod Dev* 81:171–82. doi: 10.1002/mrd.22219
405. Paushkin S, Gubitz AK, Massenet S, Dreyfuss G (2002) The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* 14:305–12.
406. Payne JM, Laybourn PJ, Dahmus ME (1989) The transition of RNA polymerase II from initiation to elongation is associated with phosphorylation of the carboxyl-terminal domain of subunit IIa. *J Biol Chem* 264:19621–9.
407. Paynton B V, Rempel R, Bachvarova R (1988) Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Dev Biol* 129:304–14.
408. Pébusque MJ, Seïte R (1981) Electron microscopic studies of silver-strained proteins in nucleolar organizer regions: location in nucleoli of rat sympathetic neurons during light and dark periods. *J Cell Sci* 51:85–94.
409. Peculis BA, Steitz JA (1993) Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the *Xenopus* oocyte. *Cell* 73:1233–45.
410. Pelava A, Schneider C, Watkins NJ (2016) The importance of ribosome production, and the 5S RNP–MDM2 pathway, in health and disease. *Biochem Soc Trans* 44:1086–1090. doi: 10.1042/BST20160106
411. Perreault SD, Naish SJ, Zirkin BR (1987) The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biol Reprod* 36:239–244. doi: 10.1095/biolreprod36.1.239
412. Perreault SD, Wolff RA, Zirkin BR (1984) The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev Biol* 101:160–167. doi: 10.1016/0012-1606(84)90126-X
413. Pertile MD, Graham AN, Choo KHA, Kalitsis P (2009) Rapid evolution of mouse Y centromere repeat DNA belies recent sequence stability. *Genome Res* 19:2202–13. doi: 10.1101/gr.092080.109
414. Peters AHFM, Kubicek S, Mechtler K, O’Sullivan RJ, Derijck AAHA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JHA, Jenuwein T (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* 12:1577–89.
415. Peters AHFM, O’Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schöfer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T (2001) Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian

- heterochromatin and genome stability. *Cell* 107:323–337. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00542-6
416. Peterson CL, Laniel M-A (2004) Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14:R546–51. doi: 10.1016/j.cub.2004.07.007
417. Phair RD, Misteli T (2000) High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* 404:604–9. doi: 10.1038/35007077
418. Pikaard CS, Pape LK, Henderson SL, Ryan K, Paalman MH, Lopata MA, Reeder RH, Sollner-Webb B (1990) Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA. *Mol Cell Biol* 10:4816–25.
419. Pikó L, Clegg KB (1982) Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos. *Dev Biol* 89:362–378.
420. Platani M, Goldberg I, Swedlow JR, Lamond AI (2000) In vivo analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells. *J Cell Biol* 151:1561–1574. doi: 10.1083/jcb.151.7.1561
421. Plohl M, Luchetti A, Mestrovic N, Mantovani B (2008) Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* 409:72–82. doi: 10.1016/j.gene.2007.11.013
422. Posfai E, Kunzmann R, Brochard V, Salvaing J, Cabuy E, Roloff TC, Liu Z, Tardat M, van Lohuizen M, Vidal M, Beaujean N, Peters AHFM (2012) Polycomb function during oogenesis is required for mouse embryonic development. *Genes Dev* 26:920–932. doi: 10.1101/aad.188094.112
423. Prescott DM, Bender MA (1962) Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells. *Exp Cell Res* 26:260–8.
424. Probst A V., Okamoto I, Casanova M, Marjou F El, Baccon P Le, Elmarjou F, Le P, Almouzni G, Marjou F El, Baccon P Le, El Marjou F, Le Baccon P, Almouzni G (2010) A Strand-Specific Burst in Transcription of Pericentric Satellites Is Required for Chromocenter Formation and Early Mouse Development. *Dev Cell* 19:625–638. doi: 10.1016/j.devcel.2010.09.002
425. Probst A V., Santos F, Reik W, Almouzni G, Dean W (2007) Structural differences in centromeric heterochromatin are spatially reconciled on fertilisation in the mouse zygote. *Chromosoma* 116:403–415. doi: 10.1007/s00412-007-0106-8
426. Prosser J, Frommer M, Paul C, Vincent PC (1986) Sequence relationships of three human satellite DNAs. *J Mol Biol* 187:145–55.
427. Pugh BF (1996) Mechanisms of transcription complex assembly. *Curr Opin Cell Biol* 8:303–11.
428. Putnam CD, Copenhaver GP, Denton ML, Pikaard CS (1994) The RNA polymerase I transactivator upstream binding factor requires its dimerization domain and high-mobility-group (HMG) box 1 to bend, wrap, and positively supercoil enhancer DNA. *Mol Cell Biol* 14:6476–88.
429. Puvion-Dutilleul F, Bachellerie JP, Puvion E (1991) Nucleolar organization of HeLa cells as studied by in situ hybridization. *Chromosoma* 100:395–409.
430. Puvion-Dutilleul F, Puvion E, Bachellerie JP (1997) Early stages of pre-rRNA formation within the nucleolar ultrastructure of mouse cells studied by in situ hybridization with a 5' ETS leader probe. *Chromosoma* 105:496–505.
431. Racki WJ, Richter JD (2006) CPEB controls oocyte growth and follicle development in the mouse.
432. Rai K, Chidester S, Zavala C V., Manos EJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR (2007) Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish. *Genes Dev* 21:261–266. doi: 10.1101/gad.1472907
433. Ram PT, Schultz RM (1993) Reporter gene expression in G2 of the 1-cell mouse embryo.

- Dev Biol 156:552–6. doi: 10.1006/dbio.1993.1101
434. Rapozzi V, Cogoi S, Xodo LE (2006) Antisense locked nucleic acids efficiently suppress BCR/ABL and induce cell growth decline and apoptosis in leukemic cells. *Mol Cancer Ther* 5:1683–92. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0006
435. Raska I, Andrade LE, Ochs RL, Chan EK, Chang CM, Roos G, Tan EM (1991) Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp Cell Res* 195:27–37. doi: 10.1016/0014-4827(91)90496-H
436. Raška I, Koberna K, Malínský J, Fidlerová H, Mašata M (2004) The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* 96:579–594. doi: 10.1016/j.biolcel.2004.04.015
437. Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R (2014) Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1839:155–168. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.08.004
438. Razin A, Riggs AD (1980) DNA methylation and gene function. *Science* 210:604–10.
439. Razin S V, Hancock R, Iarovaia O, Westergaard O, Gromova I, Georgiev GP (1993) Structural-functional organization of chromosomal DNA domains. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58:25–35.
440. Rea S, Eisenhaber F, O’Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406:593–9. doi: 10.1038/35020506
441. Recher L, Whitescarver J, Briggs L (1969) The fine structure of a nucleolar constituent. *J Ultrastruct Res* 29:1–14.
442. Reeder RH (1999) Regulation of RNA polymerase I transcription in yeast and vertebrates. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62:293–327.
443. Reinhart BJ, Bartel DP (2002) Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* 297:1831. doi: 10.1126/science.1077183
444. Reynolds N, Salmon-Divon M, Dvinge H, Hynes-Allen A, Balasooriya G, et al. (2012) NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression. *EMBO J* 31:593–605. doi: 10.1038/emboj.2011.431
445. Ribeiro-Mason K, Boulesteix C, Brochard V, Aguirre-Lavin T, Salvaing J, Fleurot R, Adenot P, Maalouf WE, Beaujean N (2012) Nuclear dynamics of histone H3 trimethylated on lysine 9 and/or phosphorylated on serine 10 in mouse cloned embryos as new markers of reprogramming? *Cell Reprogram* 14:283–94. doi: 10.1089/cell.2011.0071
446. Rime H, Neant I, Guerrier P, Ozon R (1989) 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), a reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the mouse oocyte. *Dev Biol* 133:169–179. doi: 10.1016/0012-1606(89)90308-4
447. Robert-Fortel I, Junéra HR, Géraud G, Hernandez-Verdun D (1993) Three-dimensional organization of the ribosomal genes and Ag-NOR proteins during interphase and mitosis in PtK1 cells studied by confocal microscopy. *Chromosoma* 102:146–57.
448. Rodman TC, Pruslin FH, Allfrey VG (1984) Protamine-DNA association in mammalian spermatozoa. *Exp Cell Res* 150:269–81.
449. Rodman TC, Pruslin FH, Hoffmann HP, Allfrey VG (1981) Turnover of basic chromosomal proteins in fertilized eggs: a cytoimmunochemical study of events in vivo. *J Cell Biol* 90:351–61.
450. Romanova L, Korobova F, Noniashvili E, Dyban A, Zatsepina O (2006) High Resolution Mapping of Ribosomal DNA in Early Mouse Embryos by Fluorescence Collection of Embryos. *Biol Reprod* 815:807–15. doi: 10.1095/biolreprod.105.047340
451. Rothstein JL, Johnson D, DeLoia JA, Skowronski J, Solter D, Knowles B (1992) Gene expression during preimplantation mouse development. *Genes Dev* 6:1190–201.

452. Roussel P, André C, Comai L, Hernandez-Verdun D (1996) The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol* 133:235–46.
453. Roussel P, André C, Masson C, Géraud G, Hernandez-verdun D (1993) Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J Cell Sci* 337:327–337.
454. Rowbotham SP, Barki L, Neves-Costa A, Santos F, Dean W, Hawkes N, Choudhary P, Will WR, Webster J, Oxley D, Green CM, Varga-Weisz P, Mermoud JE (2011) Maintenance of silent chromatin through replication requires SWI/SNF-like chromatin remodeler SMARCD1. *Mol Cell* 42:285–96. doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.036
455. Rozinek J, Antalíková L, Petr J (1991) Ultrastructural localization of basic lysine-rich proteins during the nucleogenesis in preimplantation mouse embryos. *Folia Biol (Praha)* 37:101–9.
456. Russell J, Zomerdijk JCBM (2005) RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci* 30:87–96. doi: 10.1016/j.tibs.2004.12.008
457. Russell J, Zomerdijk JCBM (2006) The RNA polymerase I transcription machinery. *Biochem Soc* 73:203–216.
458. Ruzov A, Tsenkina Y, Serio A, Dudnakova T, Fletcher J, Bai Y, Chebotareva T, Pells S, Hannoun Z, Sullivan G, Chandran S, Hay DC, Bradley M, Wilmut I, De Sousa P (2011) Lineage-specific distribution of high levels of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mammalian development. *Cell Res* 21:1332–42. doi: 10.1038/cr.2011.113
459. Sabbattini P, Lundgren M, Georgiou A, Chow C, Warnes G, Dillon N (2001) Binding of Ikaros to the lambda5 promoter silences transcription through a mechanism that does not require heterochromatin formation. *EMBO J* 20:2812–22. doi: 10.1093/emboj/20.11.2812
460. Saksouk N, Simboeck E, Déjardin J (2015) Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* 8:3. doi: 10.1186/1756-8935-8-3
461. Salvaing J, Aguirre-Lavin T, Boulesteix C, Lehmann G, Debey P, Beaujean N (2012) 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine Spatiotemporal Profiles in the Mouse Zygote. *PLoS One* 7:20–23. doi: 10.1371/journal.pone.0038156
462. Sanij E, Hannan RD (2009a) The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin. *Epigenetics* 4:374–382.
463. Sanij E, Hannan RD (2009b) The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin. *Epigenetics* 4:374–82.
464. Sanij E, Poortinga G, Sharkey K, Hung S, Holloway TP, Quin J, Robb E, Wong LH, Thomas WG, Stefanovsky V, Moss T, Rothblum L, Hannan KM, McArthur GA, Pearson RB, Hannan RD (2008) UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *J Cell Biol* 183:1259–74. doi: 10.1083/jcb.200805146
465. Santenard A, Ziegler-Birling C, Koch M, Tora L, Bannister AJ, Torres-Padilla M-E (2010) Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat Cell Biol* 12:853–62. doi: 10.1038/ncb2089
466. Santoro R, Grummt I (2005) Epigenetic mechanism of rRNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodeling, and DNA methylation. *Mol Cell Biol* 25:2539–46. doi: 10.1128/MCB.25.7.2539-2546.2005
467. Santoro R, Grummt I (2001) Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. *Mol Cell* 8:719–25.
468. Santoro R, Li J, Grummt I (2002) The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet* 32:393–6. doi: 10.1038/ng1010
469. Sarmiento OF, Digilio LC, Wang Y, Perlin J, Herr JC, Allis CD, Coonrod SA (2004) Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development. *J*

- Cell Sci 117:4449–59. doi: 10.1242/jcs.01328
470. Sato S, Yano H, Makimoto Y, Kaneta T, Sato Y (2005) Nucleolonema as a fundamental substructure of the nucleolus. *J Plant Res* 118:71–81. doi: 10.1007/s10265-005-0204-8
471. Savino TM, Gébrane-younès J, De Mey J, Sibarita JB, Hernandez-Verdun D, Mey J De, Sibarita JB, Hernandez-Verdun D (2001) Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* 153:1097–110. doi: 10.1083/jcb.153.5.1097
472. Schedle A, Willheim M, Zeitelberger A, Gessl A, Frauendorfer K, Schöfer C, Wachtler F, Schwarzacher HG, Boltz-Nitulescu G (1992) Nucleolar morphology and rDNA in situ hybridisation in monocytes. *Cell Tissue Res* 269:473–80.
473. Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18:1251–62. doi: 10.1101/gad.300704
474. Schübeler D, Francastel C, Cimbara DM, Reik A, Martin DI, Groudine M (2000) Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus. *Genes Dev* 14:940–50.
475. Schultz DC, Friedman JR, Rauscher FJ (2001) Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev* 15:428–43. doi: 10.1101/gad.869501
476. Schultz RM (1993) Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays* 15:531–538. doi: 10.1002/bies.950150806
477. Schultz RM (2002) The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* 8:323–331. doi: 10.1093/humupd/8.4.323
478. Schwarzacher HG, Wachtler F (1991) The functional significance of nucleolar structures. *Ann Genet* 34:151–60.
479. Sepulveda-Rincon LP, del Llano Solanas E, Serrano-revuelta E, Ruddick L, Maalouf WE, Beaujean N (2016) Early epigenetic reprogramming in fertilized, cloned, and parthenogenetic embryos. *Theriogenology* 86:91–98. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.022
480. Shaman JA, Yamauchi Y, Steven Ward W, Ward WS (2007) The sperm nuclear matrix is required for paternal DNA replication. *J Cell Biochem* 102:680–688. doi: 10.1002/jcb.21321
481. Shao GB, Ding HM, Gong AH (2008) Role of histone methylation in zygotic genome activation in the preimplantation mouse embryo. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* 44:115–120. doi: 10.1007/s11626-008-9082-4
482. Shav-tal Y, Blechman J, Darzacq X, Montagna C, Dye BT, Patton JG, Singer RH, Zipori D (2005) Dynamic Sorting of Nuclear Components into Distinct Nucleolar Caps during Transcriptional Inhibition. *Mol Biol Cell* 16:2395–2413. doi: 10.1091/mbc.E04
483. Shaw PJ, Highett MI, Beven AF, Jordan EG (1995) The nucleolar architecture of polymerase I transcription and processing. *EMBO J* 14:2896–906.
484. Shen M, Zhou T, Xie W, Ling T, Zhu Q, Zong L, Lyu G, Gao Q, Zhang F, Tao W (2013) The Chromatin Remodeling Factor CSB Recruits Histone Acetyltransferase PCAF to rRNA Gene Promoters in Active State for Transcription Initiation. *PLoS One* 8:e62668. doi: 10.1371/journal.pone.0062668
485. Sidhu SK, Minks J, Chang SC, Cotton AM, Brown CJ (2008) X chromosome inactivation: heterogeneity of heterochromatin. *Biochem Cell Biol* 86:370–9. doi: 10.1139/o08-100
486. Singh PB (1994) Molecular mechanisms of cellular determination: their relation to chromatin structure and parental imprinting. *J Cell Sci* 2653–68.
487. Singh PB, Miller JR, Pearce J, Kothary R, Burton RD, Paro R, James TC (1991) A

- sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic Acids Res* 19:789.
488. Sirri V, Jourdan N, Hernandez-Verdun D, Roussel P (2016) Sharing of mitotic pre-ribosomal particles between daughter cells. *J Cell Sci* 129:1592–604. doi: 10.1242/jcs.180521
489. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D (2000) In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J Cell Biol* 148:259–70.
490. Sirri V, Urcuqui-inchima S, Hernandez-verdun D, Roussel P (2008) Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 129:13–31. doi: 10.1007/s00418-007-0359-6
491. Sleeman JE (2003) Cajal body proteins SMN and Coilin show differential dynamic behaviour in vivo. *J Cell Sci* 116:2039–2050. doi: 10.1242/jcs.00400
492. Sleeman JE, Ajuh P, Lamond AI (2001) snRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. *J Cell Sci* 114:4407–19.
493. Sleeman JE, Lamond AI (1999) Nuclear organization of pre-mRNA splicing factors. *Curr Opin Cell Biol* 11:372–7. doi: 10.1016/S0955-0674(99)80052-0
494. Smothers JF, Henikoff S (2000) The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr Biol* 10:27–30. doi: 10.1016/S0960-9822(99)00260-2
495. Snaar S, Wiesmeijer K, Jochemsen AG, Tanke HJ, Dirks RW (2000) Mutational analysis of fibrillarin and its mobility in living human cells. *J Cell Biol* 151:653–62.
496. Spector DL, Landon S, O’Keefe RT (1993) Organization of RNA polymerase II transcription and pre-mRNA splicing within the mammalian cell nucleus. *Biochem Soc Trans* 21:918–20.
497. Stefanovsky VY, Pelletier G, Bazett-Jones DP, Crane-Robinson C, Moss T (2001) DNA looping in the RNA polymerase I enhancer is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. *Nucleic Acids Res* 29:3241–7.
498. Strohner R, Nemeth A, Jansa P, Hofmann-Rohrer U, Santoro R, Längst G, Grummt I (2001) NoRC - A novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *EMBO J* 20:4892–4900. doi: 10.1093/emboj/20.17.4892
499. Strohner R, Németh A, Nightingale KP, Grummt I, Becker PB, Längst G (2004) Recruitment of the nucleolar remodeling complex NoRC establishes ribosomal DNA silencing in chromatin. *Mol Cell Biol* 24:1791–8.
500. Strumpf D, Mao C-A, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J (2005) Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 132:2093–102. doi: 10.1242/dev.01801
501. Suh N, Baehner L, Moltzahn F, Melton C, Shenoy A, Chen J, Blelloch R (2010) MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. *Curr Biol* 20:271–7. doi: 10.1016/j.cub.2009.12.044
502. Sun FL, Cuaycong MH, Elgin SC (2001) Long-range nucleosome ordering is associated with gene silencing in *Drosophila melanogaster* pericentric heterochromatin. *Mol Cell Biol* 21:2867–79. doi: 10.1128/MCB.21.8.2867-2879.2001
503. Sun S, Yu F, Zhang L, Zhou X (2016) EZH2, an on-off valve in signal network of tumor cells. *Cell Signal* 28:481–7. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.02.004
504. Svoboda P, Flehr M (2010) The role of miRNAs and endogenous siRNAs in maternal-to-zygotic reprogramming and the establishment of pluripotency. *EMBO Rep* 11:590–7. doi: 10.1038/embor.2010.102
505. Szenker E, Ray-Gallet D, Almouzni G (2011) The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res* 21:421–434. doi: 10.1038/cr.2011.14

506. Szollosi D (1971) Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube. *Am J Anat* 130:209–25. doi: 10.1002/aja.1001300207
507. Szollosi D, Hunter RH (1973) Ultrastructural aspects of fertilization in the domestic pig: sperm penetration and pronucleus formation. *J Anat* 116:181–206.
508. Taddei A, Maison C, Roche D, Almouzni G (2001) Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol* 3:114–20. doi: 10.1038/35055010
509. Taddei A, Roche D, Sibarita JB, Turner BM, Almouzni G (1999) Duplication and maintenance of heterochromatin domains. *J Cell Biol* 147:1153–66.
510. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324:930–5. doi: 10.1126/science.1170116
511. Takeuchi IK, Takeuchi YK (1986) Ultrastructural localization of Ag-NOR proteins in full-grown oocytes and preimplantation embryos of mice. *J Electron Microsc (Tokyo)* 35:280–7.
512. Takeuchi IK, Takeuchi YK (1982) Ultrastructural and cytochemical studies on nucleolus-like bodies in early postimplantation rat embryos. *Cell Tissue Res* 226:257–66.
513. Takizawa T, Gudla PR, Guo L, Lockett S, Misteli T (2008) Allele-specific nuclear positioning of the monoallelically expressed astrocyte marker GFAP. *Genes Dev* 22:489–98. doi: 10.1101/gad.1634608
514. Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM, Hannon GJ (2008) Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453:534–8. doi: 10.1038/nature06904
515. Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y (2011) Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146:1016–1028. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.008
516. Tang F, Kaneda M, O’Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, Lee C, Tarakhovskiy A, Lao K, Surani MA (2007) Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 21:644–8. doi: 10.1101/gad.418707
517. Tardat M, Albert M, Kunzmann R, Liu Z, Kaustov L, Thierry R, Duan S, Brykczynska U, Arrowsmith CH, Peters AHFM (2015) Cbx2 Targets PRC1 to Constitutive Heterochromatin in Mouse Zygotes in a Parent-of-Origin-Dependent Manner. *Mol Cell* 58:157–171. doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.013
518. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA (1990) Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26:90–100. doi: 10.1002/mrd.1080260113
519. Terns MP, Terns RM (2001) Macromolecular complexes: SMN--the master assembler. *Curr Biol* 11:R862-4.
520. Terranova R (2008) [The many faces of constitutive heterochromatin]. *Med Sci* 24:720–724. doi: 10.1051/medsci/20082489720
521. Terranova R, Sauer S, Merkschlager M, Fisher AG (2005) The reorganisation of constitutive heterochromatin in differentiating muscle requires HDAC activity. *Exp Cell Res* 310:344–356. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.07.031
522. Thiry M (1991) Location of rRNA gene transcription sites within Ehrlich tumor cell nucleoli. *Bull Assoc Anat (Nancy)* 75:33–7.
523. Thiry M, Cheutin T, Lamaye F, Thelen N, Meier UT, Donohue MO, Ploton D, Ploton MODD (2009) Localization of Nopp140 within mammalian cells during interphase and

- mitosis. *Histochem Cell Biol* 132:129–140. doi: 10.1007/s00418-009-0599-8
524. Thomas Meier U, Blobel G (1992) Nopp 140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. *Cell* 70:127–138. doi: 10.1016/0092-8674(92)90539-O
525. Tollervey D, Lehtonen H, Jansen R, Kern H, Hurt EC (1993) Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 72:443–57.
526. Tománek M, Kopecný V, Kanka J (1989) Genome reactivation in developing early pig embryos: an ultrastructural and autoradiographic analysis. *Anat Embryol (Berl)* 180:309–16.
527. Torres-Padilla ME, Bannister AJ, Hurd PJ, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M (2006) Dynamic distribution of the replacement histone variant H3.3 in the mouse oocyte and preimplantation embryos. *Int J Dev Biol* 50:455–461. doi: 10.1387/ijdb.052073mt
528. Torres-Padilla M-E, Parfitt D-E, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M (2007) Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 445:214–8. doi: 10.1038/nature05458
529. Torres-Padilla ME, Zernicka-Goetz M (2006) Role of TIF1 α as a modulator of embryonic transcription in the mouse zygote. *J Cell Biol* 174:329–338. doi: 10.1083/jcb.200603146
530. Toussaint M, Levasseur G, Tremblay M, Paquette M, Conconi A (2005) Psoralen photocrosslinking, a tool to study the chromatin structure of RNA polymerase I-transcribed ribosomal genes. *Biochem Cell Biol* 83:449–459. doi: 10.1139/O05-141
531. Trerè D, Pession A, Derenzini M (1989) The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res* 184:131–7.
532. Tsai Y-T, Lin C-I, Chen H-K, Lee K-M, Hsu C-Y, Yang S-J, Yeh N-H, Lin YTÆC, Lee ÆHCÆK, Yeh CHÆSYÆN (2008) Chromatin tethering effects of hNopp140 are involved in the spatial organization of nucleolus and the rRNA gene transcription. *J Biomed Sci* 15:471–486. doi: 10.1007/s11373-007-9226-7
533. Tuan JC, Zhai W, Comai L (1999) Recruitment of TATA-binding protein-TAFI complex SL1 to the human ribosomal DNA promoter is mediated by the carboxy-terminal activation domain of upstream binding factor (UBF) and is regulated by UBF phosphorylation. *Mol Cell Biol* 19:2872–9.
534. Tucker KE, Berciano MT, Jacobs EY, LePage DF, Shpargel KB, Rossire JJ, Chan EK, Lafarga M, Conlon RA, Matera AG (2001) Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy gene product. *J Cell Biol* 154:293–307. doi: 10.1083/jcb.200104083
535. Uehara T, Yanagimachi R (1977) Behavior of nuclei of testicular, caput and cauda epididymal spermatozoa injected into hamster eggs. *Biol Reprod* 16:315–21.
536. Ueshima S, Nagata K, Okuwaki M (2014) Upstream binding factor-dependent and pre-rRNA transcription-independent association of pre-rRNA processing factors with rRNA gene. *Biochem Biophys Res Commun* 443:22–27. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.039
537. Van Blerkom J (1981) Structural relationship and posttranslational modification of stage-specific proteins synthesized during early preimplantation development in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7629–33.
538. van der Heijden GW, Derijck AAHA, Ramos L, Giele M, van der Vlag J, de Boer P (2006) Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol* 298:458–469. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.06.051
539. van der Heijden GW, Dieker JW, Derijck AAHA, Muller S, Berden JHM, Braat DDM, van der Vlag J, de Boer P (2005) Asymmetry in histone H3 variants and lysine

- methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech Dev* 122:1008–22. doi: 10.1016/j.mod.2005.04.009
540. Vasseur M, Condamine H, Duprey P (1985) RNAs containing B2 repeated sequences are transcribed in the early stages of mouse embryogenesis. *EMBO J* 4:1749–1753.
541. Verdaasdonk JS, Bloom K (2011) Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:320–32. doi: 10.1038/nrm3107
542. Verreault A, Kaufman PD, Kobayashi R, Stillman B (1996) Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* 87:95–104.
543. Vettese-Dadey M, Grant PA, Hebbes TR, Crane-Robinson C, Allis CD, Workman JL (1996) Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *EMBO J* 15:2508–18.
544. Vissel B, Choo KH (1989) Mouse major (gamma) satellite DNA is highly conserved and organized into extremely long tandem arrays: implications for recombination between nonhomologous chromosomes. *Genomics* 5:407–14.
545. Vissel B, Choo KH (1987) Human alpha satellite DNA--consensus sequence and conserved regions. *Nucleic Acids Res* 15:6751–2.
546. Voit R, Kuhn A, Sander EE, Grummt I (1995) Activation of mammalian ribosomal gene transcription requires phosphorylation of the nucleolar transcription factor UBF. *Nucleic Acids Res* 23:2593–2599. doi: 10.1093/nar/23.14.2593
547. Voit R, Schnapp A, Kuhn A, Rosenbauer H, Hirschmann P, Stunnenberg HG, Grummt I (1992) The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *EMBO J* 11:2211–8.
548. Wachtler F, Hopman AH, Wiegant J, Schwarzacher HG (1986) On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei. Studies with a new, non-autoradiographic in situ hybridization method. *Exp Cell Res* 167:227–40.
549. Waggener JM, DiMario PJ (2002) Two splice variants of Nopp140 in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell* 13:362–81. doi: 10.1091/mbc.01-04-0162
550. Wallace H, Birnstiel ML (1966) Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer. *Biochim Biophys Acta* 114:296–310.
551. Wallrath LL, Elgin SC (1995) Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev* 9:1263–77.
552. Wang C, Query CC, Meier UT, Al WET, Iol MOLCELLB (2002) Immunopurified small nucleolar ribonucleoprotein particles pseudouridylylate rRNA independently of their association with phosphorylated Nopp140. *Mol Cell Biol* 22:8457–66. doi: 10.1128/MCB.22.24.8457
553. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2004) Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431:873–8. doi: 10.1038/nature02985
554. Ward WS (2010) Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 16:30–6. doi: 10.1093/molehr/gap080
555. Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, Chiba H, Kohara Y, Kono T, Nakano T, Surani MA, Sakaki Y, Sasaki H (2008) Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 453:539–43. doi: 10.1038/nature06908
556. Watkins NJ, Bohnsack MT (2012) The box C/D and H/ACA snoRNPs: Key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3:397–414. doi: 10.1002/wrna.117
557. Whelan G, Kreidl E, Wutz G, Egner A, Peters J-M, Eichele G (2012) Cohesin acetyltransferase *Esco2* is a cell viability factor and is required for cohesion in pericentric

- heterochromatin. *EMBO J* 31:71–82. doi: 10.1038/emboj.2011.381
558. Wickramasinghe D, Ebert KM, Albertini DF (1991) Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Dev Biol* 143:162–172. doi: 10.1016/0012-1606(91)90063-9
559. Wiekowski M, Miranda M, DePamphilis ML (1991) Regulation of gene expression in preimplantation mouse embryos: effects of the zygotic clock and the first mitosis on promoter and enhancer activities. *Dev Biol* 147:403–14.
560. Wiekowski M, Miranda M, DePamphilis ML (1993) Requirements for promoter activity in mouse oocytes and embryos distinguish paternal pronuclei from maternal and zygotic nuclei. *Dev Biol* 159:366–78. doi: 10.1006/dbio.1993.1248
561. Wijchers PJ, Geeven G, Eyres M, Bergsma AJ, Janssen M, Verstegen M, Zhu Y, Schell Y, Vermeulen C, de Wit E, de Laat W (2015) Characterization and dynamics of pericentromere-associated domains in mice. *Genome Res* 25:958–69. doi: 10.1101/gr.186643.114
562. Winking H, Nielsén K, Gropp A (1980) Variable positions of NORs in *Mus musculus*. *Cytogenet Cell Genet* 26:158–64.
563. Wong AK, Rattner JB (1988) Sequence organization and cytological localization of the minor satellite of mouse. *Nucleic Acids Res* 16:11645–61.
564. Wongtawan T, Taylor JE, Lawson KA, Wilmot I, Pennings S (2011) Histone H4K20me3 and HP1 α are late heterochromatin markers in development, but present in undifferentiated embryonic stem cells. *J Cell Sci* 124:1878–90. doi: 10.1242/jcs.080721
565. Workman JL (2006) Nucleosome displacement in transcription. *Genes Dev* 20:2009–17. doi: 10.1101/gad.1435706
566. Worrad DM, Ram PT, Schultz RM (1994) Regulation of gene expression in the mouse oocyte and early preimplantation embryo: developmental changes in Sp1 and TATA box-binding protein, TBP. *Development* 120:2347–2357.
567. Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W, Walter J (2011) 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun* 2:241. doi: 10.1038/ncomms1240
568. Wu G, Schöler HR (2014) Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regen (London, England)* 3:7. doi: 10.1186/2045-9769-3-7
569. Xenopoulos P, Kang M, Puliafito A, Di Talia S, Hadjantonakis A-K (2015) Heterogeneities in Nanog Expression Drive Stable Commitment to Pluripotency in the Mouse Blastocyst. *Cell Rep*. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.010
570. Xie W, Ling T, Zhou Y, Feng W, Zhu Q, Stunnenberg HG, Grummt I, Tao W (2012) The chromatin remodeling complex NuRD establishes the poised state of rRNA genes characterized by bivalent histone modifications and altered nucleosome positions. *Proc Natl Acad Sci* 109:8161–8166. doi: 10.1073/pnas.1201262109
571. Yamazaki T, Yamagata K, Baba T (2007) Time-lapse and retrospective analysis of DNA methylation in mouse preimplantation embryos by live cell imaging. *Dev Biol* 304:409–419. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.12.046
572. Yanagimachi R (1978) Sperm-egg association in animals. *Curr Top Dev Biol* 12:83–105.
573. Yang Y, Isaac C, Wang C, Meier UT (2000) Conserved Composition of Mammalian Box H / ACA and Box C / D Small Nucleolar Ribonucleoprotein Particles and Their Interaction with the Common Factor Nopp140. *Mol Biol Cell* 11:567–577.
574. Yankulov K, Yamashita K, Roy R, Egly JM, Bentley DL (1995) The transcriptional elongation inhibitor 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription factor IIIH-associated protein kinase. *J Biol Chem* 270:23922–5.
575. Yelick PC, Balhorn R, Johnson P a, Corzett M, Mazrimas J a, Kleene KC, Hecht NB

- (1987) Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Mol Cell Biol* 7:2173–9. doi: 10.1128/MCB.7.6.2173.Updated
576. Yuan X, Feng W, Imhof A, Grummt I, Zhou Y (2007) Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol Cell* 27:585–95. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.021
577. Zatssepina O, Baly C, Chebrout M, Debey P (2003) The Step-Wise Assembly of a Functional Nucleolus in Preimplantation Mouse Embryos Involves the Cajal (Coiled) Body. *Dev Biol* 83:66–83. doi: 10.1006/dbio.2002.0865
578. Zatssepina O V, Bouniol-Baly C, Amirand C, Debey P (2000) Functional and molecular reorganization of the nucleolar apparatus in maturing mouse oocytes. *Dev Biol* 223:354–70. doi: 10.1006/dbio.2000.9762
579. Zatssepina O V, Schöfer C, Weipoltshammer K, Mosgoeller W, Almeder M, Stefanova VN, Jordan EG, Wachtler F (1996) The RNA polymerase I transcription factor UBF and rDNA are located at the same major sites in both interphase and mitotic pig embryonic kidney (PK) cells. *Cytogenet Cell Genet* 73:274–8.
580. Zeng F, Schultz RM (2005) RNA transcript profiling during zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 283:40–57. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.03.038
581. Zernicka-Goetz M, Ciemerych M a, Kubiak JZ, Tarkowski a K, Maro B (1995) Cytostatic factor inactivation is induced by a calcium-dependent mechanism present until the second cell cycle in fertilized but not in parthenogenetically activated mouse eggs. *J Cell Sci* 108 (Pt 2:469–74.
582. Zhang P, Ni X, Guo Y, Guo X, Wang Y, Zhou Z, Huo R, Sha J, Soyol S, et al. (2009) Proteomic-based identification of maternal proteins in mature mouse oocytes. *BMC Genomics* 10:348. doi: 10.1186/1471-2164-10-348
583. Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13:1924–35.
584. Zhou Y, Grummt I (2005) The PHD finger/bromodomain of NoRC interacts with acetylated histone H4K16 and is sufficient for rDNA silencing. *Curr Biol* 15:1434–8. doi: 10.1016/j.cub.2005.06.057
585. Zhou Y, Santoro R, Grummt I (2002) The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *EMBO J* 21:4632–40.
586. Zhu Z, Wang Y, Li X, Wang Y, Xu L, Wang X, Sun T, Dong X, Chen L, Mao H, Yu Y, Li J, Chen PA, Chen CD (2010) PHF8 is a histone H3K9me2 demethylase regulating rRNA synthesis. *Cell Res* 20:794–801. doi: 10.1038/cr.2010.75
587. Zink LM, Hake SB (2016) Histone variants: Nuclear function and disease. *Curr Opin Genet Dev* 37:82–89. doi: 10.1016/j.gde.2015.12.002
588. Zomerdijk JC, Beckmann H, Comai L, Tjian R (1994) Assembly of transcriptionally active RNA polymerase I initiation factor SL1 from recombinant subunits. *Science* 266:2015–8.
589. Zuccotti M, Piccinelli A, Giorgi Rossi P, Garagna S, Redi CA (1995) Chromatin organization during mouse oocyte growth. *Mol Reprod Dev* 41:479–85. doi: 10.1002/mrd.1080410410

Titre : Nucléologénèse et régulation de l'expression de l'hétérochromatine péricentromérique dans l'embryon précoce de souris

Mots clés : embryon, souris, hétérochromatine, nucléole, ribosomique

Chez la souris, la période de développement préimplantatoire est caractérisée par plusieurs événements dont le principal est l'activation du génome embryonnaire (EGA), qui se déclenche entre les stades 1 cellule tardif (phase mineure) et 2-cellules tardif (phase majeure). Parmi les ARN transcrits, on retrouve entre autres les ARN ribosomiques, nécessaires à la formation des ribosomes et les ARN issus de l'hétérochromatine péricentromériques (ARN sens et anti-sens) importants pour l'hétérochromatinisation.

Il est connu que les ARN ribosomiques sont synthétisés dans le nucléole. Dans l'embryon, après la fécondation, le nucléole se présente sous forme de précurseurs de nucléoles (NPB). Ces NPB évoluent ensuite pendant le développement embryonnaire pour former les nucléoles mais les mécanismes impliqués dans la formation des nucléoles restent peu connus.

De plus, il existe très peu de données sur l'organisation des gènes ribosomiques en fonction de leur statut transcriptionnel (actif ou inactif) dans les embryons. C'est pourquoi je me suis intéressée au cours de cette thèse à la nucléologénèse et à l'organisation des gènes ribosomiques dans l'embryon préimplantatoire de souris.

Par ailleurs, il est connu qu'après la fécondation, les deux pronoyaux parentaux (paternel et maternel) évoluent de façon asynchrone, l'hétérochromatine péricentromérique s'organisant plus rapidement autour des NPBs dans le pronoyau maternel. Dans un second temps, je me suis donc intéressée à la fonction majeure qu'aurait le NPB dans la réorganisation de l'hétérochromatine péricentromérique et à la contribution de chaque gamète au cours des premiers stades du développement.

Title : Nucleogenesis and regulation of pericentric heterochromatin expression in the early mouse embryo

Keywords : embryo, mouse, heterochromatin, nucleoli, ribosomal

In mice, the preimplantation period is characterized by several events, the most important is the activation of the embryonic genome (EGA) taking place between the late 1-cell (minor phase) and late 2-cell (major phase) stages. Among the genes expressed are the ribosomal DNAs required for the formation of the ribosomes and the pericentromeric heterochromatin (sense and antisense RNA) important for the formation of heterochromatin clusters. It is known that the ribosomal RNAs are synthesized in the nucleolus. In the embryo after fertilization, the nucleolus is replaced by nucleolus precursor bodies (NPBs). These NPBs then evolve during embryonic development to form nucleoli but the mechanisms involved in the formation of nucleoli remain mostly unknown.

Moreover, there are very few data on the organization of ribosomal genes based on their transcriptional status (active or inactive) in embryos. I therefore focused during my PhD thesis on the nucleogenesis process and on the organization of ribosomal genes in the mouse preimplantation embryo.

Furthermore, it is well known that the two parental pronuclei (paternal and maternal) progress asynchronously after fertilization, the pericentromeric heterochromatin organizing faster around NPBs in the maternal pronucleus. In the second part of my thesis, I therefore focused on the role NPBs may have in the organization of pericentromeric heterochromatin during development and on the contribution of each gamete.