

# L'embryon préimplantatoire : acquis et nouveautés

## Established knowledge and upcoming developments on preimplantation embryos

Véronique Duranthon

UMR BDR, Inra, ENVA, université Paris Saclay, Jouy en Josas, France

**Résumé.** La période préimplantatoire du développement des Mammifères est de durée variable selon les espèces. La phase commune à l'ensemble des Euthériens s'étend de la fécondation à la formation du blastocyste, dans lequel sont spécifiés l'épiblaste et deux lignages extraembryonnaires : le trophoctoderme et l'endoderme primitif. Au cours de cette période, l'embryon passe d'un contrôle maternel à un contrôle embryonnaire du développement. Cette transition repose sur l'activation transcriptionnelle progressive de son génome et sur l'utilisation puis la dégradation de l'information maternelle. La formation du génome d'un zygote totipotent à partir des génomes des gamètes différenciés suppose une reprogrammation intense de l'épigénome embryonnaire. Les données récentes mettent en évidence une organisation particulière de la chromatine embryonnaire, corrélée à une expression faible et non régulée de l'ensemble du génome au début du développement. Cette situation évolue progressivement vers une organisation canonique de la chromatine et une régulation précise de l'expression génique. Puis, la spécification des premiers lignages suppose des régulations fines de l'expression génique. Les mécanismes de leur mise en place sont bien connus chez la souris, mais ne sont vraisemblablement pas toujours conservés entre espèces.

**Mots clés :** transition materno-embryonnaire, reprogrammation épigénétique, spécification des lignages

**Abstract.** Mammalian embryo implants at different and species-specific stages, so that the length of preimplantation phase greatly varies with species. The phase common to all species extends from fertilization to formation of a blastocyst with three specified lineages : epiblast and two extraembryonic ones trophoctoderm and primitive endoderm (also called hypoblast). During this period, the embryo goes from a maternal to an embryonic control of its development. This transition relies on both the progressive transcriptional activation of the embryonic genome and the use and degradation of maternal information. Building a totipotent zygotic genome from two genomes of highly differentiated gametes implies extensive reprogramming of the embryonic epigenome. Recent data evidenced specific features of chromatin organization in early embryo, correlated to a weak and promiscuous gene expression. This progressively evolves towards a more canonical chromatin organization and a precise regulation of gene expression. Then, first lineages specification relies on fine tuning of gene expression. The mechanisms responsible for this are well known in the mouse model but may vary with species.

**Key words:** maternal to embryo transition, epigenetic reprogramming, lineage specification

La période préimplantatoire du développement des mammifères commence lors de la fécondation et se termine lors de la mise en place des premiers contacts cellulaires permanents entre le conceptus et l'endomètre maternel qui initie l'implantation. Elle est de durée très variable selon les espèces et non proportionnelle à la durée totale de la gestation. De plus, le stade de développement atteint par l'embryon lors de l'implantation est également très différent selon l'espèce (tableau 1). Une autre différence remarquable entre espèces concerne

le devenir des tissus extraembryonnaires avant l'implantation : l'embryon de lapin est caractérisé par une croissance très rapide de son trophoblaste, qui reste sphérique et peut atteindre 5 mm de diamètre lors de l'implantation, de même l'embryon de jument reste sphérique et peut atteindre plusieurs centimètres de diamètre avant implantation alors que les embryons de porc, de brebis et de vache voient leurs tissus extraembryonnaires subir une phase d'élongation remarquable, le conceptus atteignant plusieurs dizaines de centimètres de longueur avant l'implan-

Médecine  
de la **Reproduction**

Tirés à part : V. Duranthon

**Tableau 1. Durée de la phase préimplantatoire, stade de développement atteint lors de l'implantation et durée de gestation chez différentes espèces de mammifères euthériens.**

Espèce	Durée phase préimplantatoire (en jours)	Stade de développement	Durée totale gestation (en jours)
Souris	4,5	Blastocyste	21
Lapin	6,5	Gastrulation	30
Homme	6,5	Blastocyste	280
Porc	13-14	Gastrulation	115
Mouton	15	Neurulation	145
Bovin	20	Neurulation	280
Cheval	30	Organogenèse	330

tation. L'épiblaste, à partir duquel se développera le fœtus, peut lui aussi présenter des différences d'évolution. En particulier, une des spécificités de l'embryon des primates est de ségréger l'amnios, un tissu extra-embryonnaire, à partir de l'épiblaste juste après l'implantation. Face à de telles variations entre espèces, nous restreindrons notre propos à la phase commune à toutes les espèces de mammifères euthériens, à savoir la période de développement allant de la fécondation à la formation d'un blastocyste c'est-à-dire d'un embryon constitué de trois lignages cellulaires distincts : épiblaste, hypoblaste et trophoblaste, organisés autour d'une cavité remplie de fluide, le blastocèle. Parmi les Euthériens, nous excluons de notre propos les Afrothériens, dont les modalités de formation du blastocyste sont très différentes de celles rencontrées chez les autres espèces.

La période de développement allant de la fécondation à la formation du blastocyste commence par une succession de divisions cellulaires à volume total constant, appelées clivages. Puis ont lieu les premiers événements morphogénétiques initiés lors de la compaction, avec l'établissement des premières interactions entre les cellules, et qui aboutissent à la spécification des lignages et aux premières différenciations. L'embryon de mammifères, qui contient peu de réserves, différencie d'abord les tissus extra-embryonnaires nécessaires à son implantation. Ainsi, certaines cellules se spécifient très tôt pour assurer des fonctions nutritionnelles, cependant que d'autres sont maintenues dans un état pluripotent (capable de participer aux trois feuilletts embryonnaires) jusqu'au moment de la différenciation de ces trois feuilletts. À l'implantation, chez la souris et l'homme, trois lignages cellulaires distincts sont spécifiés dans l'embryon :

- le trophoctoderme, à partir duquel se développera le placenta,
- l'endoderme primitif (également appelé hypoblaste dans les autres espèces), qui participera à la formation du sac vitellin,

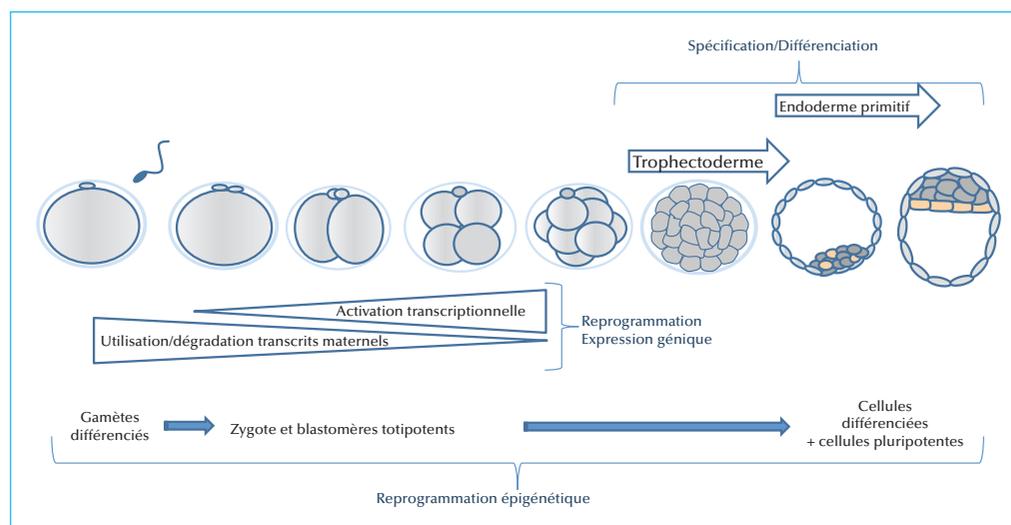
- l'épiblaste, qui composera tous les tissus embryonnaires et contribuera aussi à certains tissus extra-embryonnaires.

D'un point de vue moléculaire, la période s'étendant de la fécondation au stade blastocyste s'avère d'une extrême complexité ; c'est en effet la période de formation d'un nouveau génome fonctionnel à partir des génomes haploïdes hérités de chacun des gamètes. C'est, pour ce génome, une période d'intense reprogrammation épigénétique puisque, à partir des deux génomes des gamètes différenciés, se forme le génome d'un zygote totipotent (capable à lui seul de donner lieu au développement d'un organisme entier) et que se met en place un programme d'expression génique embryonnaire totalement distinct de ceux exprimés lors des gamétogénèses (*figure 1*).

### Activation transcriptionnelle d'un génome nouvellement formé

La fécondation met en présence du cytoplasme ovocytaire les génomes haploïdes issus des deux gamètes, dont les chromatines sont dans des états très différents : le génome ovocytaire est en métaphase 2, le génome spermatique est sous une forme très compacte due au remplacement de la plupart des histones nucléosomales par des protamines. Ces génomes évoluent séparément au sein des deux pronoyaux pendant tout le premier cycle cellulaire. Ils ne fusionnent que lors de la syngamie qui précède immédiatement la première division de mitose. Chacun des génomes gamétiques est transcriptionnellement inactif. L'activation transcriptionnelle du génome embryonnaire (EGA) est progressive, où l'on distingue deux phases, dites mineure et majeure. L'activation majeure du génome coïncide :

- avec le stade de blocage du développement observé, si l'on cultive l'embryon en présence d'inhibiteurs de transcription,



**Figure 1.** Enjeux cellulaires et moléculaires de la période fécondation-formation du blastocyste. La figure représente un « embryon théorique » pour lequel l'activation majeure du génome embryonnaire aurait lieu au stade 4-8 cellules.

– avec l'augmentation brutale du nombre de gènes transcrits et de la quantité de ribonucléotides incorporés.

Ce stade varie selon l'espèce : exceptionnellement précoce chez la souris (stade deux cellules), il est plus tardif chez toutes les autres espèces (stade quatre cellules chez l'homme et le porc, huit cellules chez le lapin, le bovin et le mouton). Il avait néanmoins été repéré depuis longtemps que cette phase d'activation majeure était précédée d'une période d'activation mineure, au cours de laquelle l'embryon est capable d'incorporer des ribonucléotides à faible niveau et de transcrire des plasmides exogènes, sans toutefois reconnaître les séquences régulatrices de la transcription de type *enhancer* dans ces plasmides. Il était difficile d'identifier, au cours de cette période, des gènes transcrits ou des fonctions codées par le génome embryonnaire :

- la transcription de séquences rétrovirales endogènes avait été repérée comme étant la plus précoce [1],
- une activité inhibant la fragmentation de l'ovocyte après fécondation avait été décrite [2],
- plus récemment, la transcription de séquences répétées péricentromériques avait été montrée [3].

L'analyse par séquençage de l'ARN (RNA-seq) du transcriptome d'embryons de souris en phase d'activation mineure a apporté un éclairage nouveau sur cette période et a permis de mieux intégrer l'ensemble des observations précédemment accumulées [4]. En effet elle a mis en lumière une transcription tout à fait particulière de l'ensemble du génome (gènes codants comme régions intergénomiques), à très faible niveau. De façon remarquable, cette transcription n'est pas régulée par les signaux habituels d'initiation et de terminaison de transcription,

et les transcrits synthésés ne sont pas maturés par épissage des introns. Plus de 4 000 gènes ont été identifiés comme transcrits à ce stade, dont 268 sont exprimés de façon transitoire et spécifique à cette période. Il est probable que la plupart de ces transcrits ne sont pas fonctionnels, puisque non épissés ; toutefois, des gènes dépourvus d'introns ou de longs ARN non codants pourraient être fonctionnels. C'est seulement lors de la réplication du stade deux cellules dans l'embryon de souris, et donc avec le début de l'activation transcriptionnelle majeure, que la transcription acquiert son caractère régulé habituel, avec initiation et terminaison aux sites « canoniques » reconnus dans les cellules somatiques. L'embryon en phase d'activation mineure a donc une activité transcriptionnelle très particulière. Cette phase commence au cours du stade une cellule et se termine au début du stade deux cellules chez la souris, mais elle est plus longue chez les autres espèces – par exemple chez le lapin, l'aptitude à transcrire est repérée dès le stade une cellule [5], alors que l'activation majeure a lieu au stade huit cellules. Par ailleurs, cette phase d'activation mineure apparaît comme nécessaire à la poursuite du développement : en effet chez la souris, son inhibition transitoire compromet le développement au-delà du stade deux cellules, alors qu'une inhibition transitoire de même durée de la phase d'activation majeure ne fait que retarder le développement ultérieur de l'embryon [6]. Cette transcription particulière de la phase mineure pourrait être requise pour la mise en place progressive des structures chromatinienne qui permettent ensuite une transcription régulée.

Tout aussi récemment, l'identification du gène *DUX4/Dux* comme potentiel gène *master* de l'activation du génome a également considérablement fait évoluer notre compréhension du mécanisme. Ce gène identifié chez

---

l'homme et la souris code un facteur de transcription, DUX-C, capable de se lier à des régions de chromatine très condensées et de les ouvrir. Il induit alors la transcription de deux séries de gènes :

- les uns, très conservés entre espèces, dont *ZSCAN*, impliqué dans l'extension des télomères,
- les autres, remarquables par le fait qu'ils constituent pour chaque espèce un ensemble de gènes corégulés dont les promoteurs sont situés dans des séquences rétrovirales endogènes spécifiques d'espèce, et dont la transcription est spécifique de l'EGA précoce [7].

La surexpression de *DUX4/Dux* dans des cellules souches embryonnaires, aussi bien humaines que murines, entraîne la reprogrammation de l'expression de l'ensemble de ces gènes. À l'opposé, son inhibition dans l'embryon de souris entraîne une EGA défectueuse [8]. DUX-C est codé par des séquences répétées présentes en grand nombre de copies dans les régions macrosatellites, de sorte que même si chaque répétition est transcrite à très faible niveau, la quantité de transcrits accumulée peut être suffisante pour produire des protéines fonctionnelles. Exprimé au tout début de l'EGA mineure, ce facteur de transcription pourrait enclencher le programme d'expression génique spécifique de l'EGA. L'identification des facteurs maternels qui activent l'expression de *DUX/Dux* est en cours. Chez la souris, DPPA2 et DPPA4, deux protéines liant l'ADN présentes dans l'ovocyte, pourraient jouer ce rôle [9].

Les gènes transcrits à partir de la phase majeure de l'EGA, dans l'embryon de souris, sont majoritairement liés à la régulation de la transcription, à la synthèse et à la maturation des ARN et à la traduction des protéines [10]. Chez l'homme, on observe des gènes annotés comme participant à la régulation négative de la transcription [11].

Pendant toute la période qui sépare la fécondation de l'activation transcriptionnelle majeure du génome embryonnaire, les fonctions nécessaires au développement de l'embryon sont codées par l'information maternelle stockée en cours d'ovogénèse. Cette information est alors régulée au niveau post-transcriptionnel pour rendre les ARN traductibles et les protéines fonctionnelles. Le recrutement traductionnel des transcrits maternels nécessaires au développement commence dès la maturation ovocytaire. Toutefois, la population de transcrits chargée sur les polysomes, donc en cours de traduction, évolue encore lors de la fécondation avec, dans le zygote de souris, une surreprésentation des transcrits impliqués dans la synthèse et le métabolisme des macromolécules et la synthèse des protéines [12]. Le recrutement régulé de ces transcrits maternels fait appel à la modification post-traductionnelle des *RNA-binding proteins* (il y en a plus de 200 différentes dans l'ovocyte de souris) qui contribuent à séquestrer ces transcrits hors de la machinerie traductionnelle pendant l'ovogénèse. Outre le fait que la dégradation des transcrits maternels suit le plus souvent leur traduction,

la dégradation régulée du pool de transcrits maternels est nécessaire à l'activation du génome embryonnaire [13]. On sait que certains composants de la machinerie de dégradation des transcrits maternels sont eux-mêmes codés par des transcrits maternels et ne sont traduits en protéines que lors de la maturation ovocytaire. C'est le cas pour des protéines du complexe de retrait de la coiffe des ARN avant leur dégradation par des exonucléases [14]. Il apparaît néanmoins aussi que la dégradation de certains transcrits maternels n'est complète qu'après l'EGA, et que certains facteurs codés par le génome embryonnaire sont impliqués dans cette dégradation plus tardive. Curieusement, contrairement à ce qui est décrit chez toutes les autres espèces modèles (drosophile, poisson zèbre, xénope), il semble que les micro-ARN (miRNA) synthétisés à partir de l'EGA ne soient pas impliqués dans ce phénomène de dégradation et donc dans la transition materno-embryonnaire chez la souris [15]. Ceci pourrait être particulier à la souris. En effet chez cette espèce, qui privilégie la voie des petits ARN interférents (siRNA) endogènes pour cette fonction, une insertion rétrovirale spécifique confère à l'enzyme Dicer ovocytaire, responsable de la production des siRNA, une efficacité très supérieure à ce qui est rapporté dans les autres espèces [16]. Chez les autres mammifères, la voie des miRNA pourrait être davantage impliquée dans l'élimination des transcrits maternels nécessaire au bon déroulement de l'EGA, et donc à la reprogrammation de l'expression génique permettant le passage d'un programme ovocytaire à un programme embryonnaire d'expression génique.

Les premiers stades du développement constituent donc une période tout à fait particulière, au cours de laquelle coexistent information maternelle en cours de traduction puis de dégradation et premiers transcrits embryonnaires – parmi lesquels ceux synthétisés en phase mineure de l'EGA ne sont probablement pas tous fonctionnels. Ces deux types d'information interagissent : les facteurs maternels participent à l'activation du génome embryonnaire. Celui-ci code notamment pour certains facteurs impliqués dans la régulation des facteurs ovocytaires. Enfin, la phase d'activation mineure s'avère fonctionnellement importante et pourrait contribuer à l'organisation ultérieure de la chromatine destinée, à partir de la phase majeure, à une régulation transcriptionnelle plus semblable à celle des cellules somatiques.

## Reprogrammation épigénétique du génome embryonnaire

L'épigénome étant porteur de l'information nécessaire à l'identité cellulaire et à son maintien lors des divisions mitotiques, il est modifié au cours du développement, rendant irréversible l'engagement des cellules dans les différentes voies de différenciation. La reproduction

sexuée suppose deux cycles de reprogrammation globale de l'épigénome :

- le premier a lieu dans les cellules germinales primordiales et précède l'apposition des épigénomes sex-spécifiques des gamètes. Le spermatozoïde et l'ovocyte ont en effet des épigénomes particuliers, marqueurs de leur identité de cellules germinales différenciées,
- le second a lieu au cours du développement préimplantatoire. En effet, lors de la fécondation, le retour à l'état de totipotence du zygote et des premiers blastomères de l'embryon suppose une reprogrammation épigénétique rapide des génomes parentaux hérités des gamètes.

La compréhension de cette reprogrammation évolue beaucoup avec les techniques disponibles pour l'analyser. Parmi les marques épigénétiques étudiées, la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones, par acétylation et méthylation notamment, sont certainement les plus documentées dans l'embryon précoce pour lequel la quantité de matériel disponible pour des analyses est longtemps restée très limitante.

Les premières mises en évidence de la reprogrammation épigénétique au cours du développement préimplantatoire concernaient la méthylation de l'ADN et reposaient sur des marquages par immunofluorescence de la 5-méthylcytosine dans l'embryon de souris. Ils mettaient en évidence une asymétrie de déméthylation entre les deux génomes parentaux après la fécondation, avec une déméthylation rapide et pratiquement complète du génome paternel, et une déméthylation plus progressive au cours des clivages du génome hérité de l'ovocyte. Les mécanismes de déméthylation différaient également entre ces deux génomes selon leur origine parentale : le génome paternel était supposé être déméthylé de façon active, alors que le génome maternel l'aurait été de façon passive, par dilution au cours des divisions de clivage du fait de l'absence de l'activité de l'ADN-méthyltransférase de maintien (DNMT1), qui, lors de la réplication de l'ADN, recopie l'état de méthylation du brin d'ADN de la cellule mère. Ces données se sont trouvées renforcées par les premières publications mettant en évidence la présence d'hydroxyméthylcytosine, intermédiaire de la réaction de déméthylation active par les enzymes de la famille TET (pour *ten-eleven translocation enzymes*), exclusivement dans le pronoyau paternel [17]. Il a finalement été admis que, chez la souris, la déméthylation du génome embryonnaire était pratiquement complète et atteignait son niveau minimal au stade morula-blastocyste. En période péri-implantatoire se produit une reméthylation *de novo*, liée chez la souris à l'activité de l'enzyme DNMT3B principalement. Elle se produit également dans l'embryon des autres espèces, mais le stade auquel elle survient n'est pas connu avec autant de précision. À l'issue de cette reméthylation, la méthylation de l'ADN atteint un niveau plus élevé dans l'épiblaste que dans les lignages

extraembryonnaires. Cette reméthylation est indispensable à la poursuite du développement et les embryons de souris *knock-out* pour DNMT1 ou DNMT3B meurent au stade correspondant à cette reméthylation, qui constitue donc un événement de développement essentiel [18]. La littérature spécifiait toutefois qu'une déméthylation plus ménagée que chez la souris était observée dans les embryons des autres espèces. La miniaturisation récente des techniques d'analyse moléculaire de la méthylation a permis d'affiner la connaissance de ces événements. Chez la souris, il est maintenant établi que la déméthylation des génomes issus des gamètes n'est pas totale au cours du développement préimplantatoire et que certaines séquences sont protégées de cette déméthylation. C'est le cas bien sûr pour les allèles méthylés des gènes soumis à empreinte parentale, mais également pour certaines séquences répétées comme les rétrotransposons actifs de type IAP (pour *intracisternal A-particle*) chez la souris, pour les séquences répétées de type LINE1 et pour des régions appelées *germline differentially methylated regions* (gDMR), dont la fonction reste incomprise à ce jour mais dont l'allèle maternel garde jusqu'au stade blastocyste un fort niveau de méthylation hérité de l'ovocyte.

La déméthylation au cours du développement préimplantatoire apparaît donc maintenant comme partielle et spécifique. Le génome embryonnaire, à ces stades, est certes moins méthylé que celui des gamètes ou celui de l'embryon postimplantatoire, mais il n'est pas totalement déméthylé. Les mécanismes responsables de cette déméthylation partielle sont certainement beaucoup plus complexes que ce qui avait été précédemment décrit et sont encore en cours d'étude [19]. Il n'en demeure pas moins que les génomes paternel et maternel, dont les états de méthylation sont différents dans les gamètes, font l'objet de régulations différentes au cours de la période. Dans l'embryon humain, le profil de déméthylation est également très dynamique au cours de la période, certaines régions précises du génome, en particulier des séquences répétées de type SINE, LINE, LTR<sup>1</sup> et Alu, étant même activement transitoirement reméthylées au cours du stade une cellule et entre les stades quatre et huit cellules. Globalement, la méthylation diminue entre le stade zygote et le stade quatre cellules où elle atteint son niveau minimal, elle réaugmente au stade huit cellules, puis diminue entre le stade huit cellules et le stade blastocyste. Tout au long de la période de clivage le génome paternel est moins méthylé que le maternel, cette tendance persiste après reméthylation dans les tissus fœtaux et placentaires [20]. Ces données sont néanmoins à considérer avec précaution puisqu'elles sont obtenues sur des embryons issus de fécondation et développement *in vitro*, et que la

<sup>1</sup> Respectivement petits et longs éléments nucléaires intercalés (SINE et LINE) et séquences terminales longues répétées (LTR).

---

culture *in vitro* peut induire des modifications de la cinétique de déméthylation [21].

Les modifications post-traductionnelles des histones au cours de la reprogrammation du génome embryonnaire ont également été très étudiées par immunofluorescence (voir [22] pour revue). Ici encore, on observe des changements très dynamiques des modifications d'histones dans les pronoyaux du zygote. Ces changements sont dissymétriques, du fait des états très différents des chromatines du spermatozoïde et de l'ovocyte. Une partie seulement de la chromatine du spermatozoïde (10 % chez l'homme, 1 % chez la souris) reste sous forme nucléosomale. Le reste est davantage compacté, du fait du remplacement des histones par les protamines. Juste après la fécondation, la majorité de la chromatine du spermatozoïde subit donc d'abord un remplacement de ses protamines par des histones. Beaucoup de marques épigénétiques s'avèrent plus rapidement éliminées du pronoyau paternel que du pronoyau maternel. Globalement, au cours du développement, on observe conjointement un effacement progressif des marques d'histones liées à une forte compaction de la chromatine, et donc à sa répression transcriptionnelle, et à une apposition des marques d'histones liées à une relaxation de la chromatine et donc à une plus grande accessibilité à la machinerie transcriptionnelle. Ces modifications sont nécessaires à l'activation transcriptionnelle du génome embryonnaire, mais elles ne suffisent pas, à elles seules, à la provoquer. Des approches plus fonctionnelles sont actuellement développées, par inhibition des enzymes responsables de l'apposition de ces marques épigénétiques ou par utilisation d'inhibiteurs de ces enzymes. Elles aboutissent généralement à une diminution des taux de blastocystes obtenus et à une moindre qualité de ces blastocystes [23]. Bien évidemment, ces approches visent actuellement à inhiber une à une les modifications de ces marques épigénétiques, alors que la reprogrammation du génome embryonnaire fait appel à une combinaison coordonnée de nombreuses modifications.

Pour les modifications d'histones comme pour la méthylation de l'ADN, des analyses moléculaires pangénomiques sont réalisées depuis deux ans et ont permis d'affiner considérablement notre connaissance de ce niveau de reprogrammation épigénétique. En particulier, les analyses d'immunoprécipitation de chromatine avec des anticorps spécifiques des différentes marques d'histone, puis de séquençage systématique du produit de précipitation (ChiP-seq) ont mis en évidence les régions du génome associées à certaines marques d'histones dans les gamètes et dans l'embryon. Elles ont en particulier mis en évidence une répartition non canonique de certaines histones comme H3K4me3 (histone 3 triméthylée sur la lysine 4, marque habituellement permissive pour la transcription) qui, dans l'ovocyte, en fin d'ovogénèse,

est répartie sur de larges domaines de chromatine incluant des zones intergéniques, au lieu de se trouver concentrée sur d'étroits domaines correspondant aux sites d'initiation de transcription des gènes dont elle rend possible la transcription. Sa fonction dans ces larges domaines non canoniques reste discutée [24]. D'autres marques d'histones comme H3K27me3 ont aussi une répartition non canonique dans la chromatine de l'ovocyte, où elle occupe de larges domaines couvrant des régions intergéniques au lieu de se concentrer uniquement sur les promoteurs de gènes du développement dont elle contribue à assurer la répression [25]. Après fécondation, le zygote hérite donc de chromatine atypique quant à la répartition des marques d'histones. Cette distribution des marques d'histones est modifiée progressivement, pour aboutir, lors de l'activation transcriptionnelle majeure du génome, à une répartition canonique des marques d'histones, et notamment de H3K4me3, qui se localise alors spécifiquement sur les promoteurs des gènes actifs. Il est en revanche essentiel de noter que l'activation transcriptionnelle mineure correspond à une période où la répartition canonique de ces marques d'histones n'est pas encore établie et où la mobilité des histones est inhabituellement élevée, marquant une structure relâchée de la chromatine [26]. Ceci pourrait contribuer à l'expression génique non conventionnelle observée à ce stade.

Dans le noyau des cellules somatiques, une organisation de la chromatine d'ordre supérieur aux nucléosomes est décrite, définissant des domaines d'accessibilité de la chromatine aux facteurs régulateurs de la transcription. Une cartographie de ces domaines d'accessibilité commence à être établie dans les gamètes et l'embryon précoce de souris par différentes méthodes. L'intégration des résultats issus de ces différentes méthodes reste à faire ; il apparaît néanmoins que le paysage chromatinien est particulièrement labile au cours de la période qui sépare la fécondation de l'activation transcriptionnelle majeure du génome embryonnaire, et que la phase d'activation mineure du génome est caractérisée par une chromatine particulièrement « relâchée » et permissive, notamment autour de certaines séquences répétées comme les rétrotransposons. Les analyses des structures d'organisation tridimensionnelle d'ordre encore supérieur comme les TAD (pour *transcription associated domains*), qui définissent de grands domaines chromosomiques communs à tous les types cellulaires de l'organisme, au sein desquels les séquences géniques et intergéniques sont susceptibles d'interagir alors qu'elles ne le font pas si elles appartiennent à des TAD distincts, montrent également que la chromatine des premiers stades du développement est particulière dans son organisation, et très dynamique. Dans l'embryon de souris, les TAD, d'abord absents, ne se constituent que progressivement pour n'atteindre leur

organisation somatique qu'à partir du stade huit cellules, soit deux cycles cellulaires après l'activation transcriptionnelle majeure du génome [27].

Pour des structures d'ordre encore supérieur, les compartiments, comme pour la méthylation de l'ADN ou les modifications d'histones, une certaine asymétrie entre les allèles parentaux est révélée chez la souris, avec une organisation plus précoce de la chromatine paternelle qui pourrait être liée à la présence de ces compartiments dans le sperme et à leur absence dans l'ovocyte [28]. Cette asymétrie persiste parfois jusqu'au stade huit cellules chez la souris.

L'inactivation d'un des chromosomes X chez les embryons femelles constitue un autre événement épigénétique essentiel de la période préimplantatoire, pour la poursuite du développement. Ce processus a lieu dès les stades 4-8 cellules dans l'embryon de souris, et y assure la compensation de dosage génique [29]. Dans cette espèce, un phénomène d'empreinte parentale induit l'inactivation précoce du chromosome X paternel, qui sera définitivement maintenue dans le trophoctoderme et les tissus extraembryonnaires, alors qu'il y aura réactivation de ce chromosome dans la masse cellulaire interne (ICM) avant l'inactivation aléatoire de l'un des deux chromosomes dans l'épiblaste. Chez la souris, l'inactivation précoce est médiée par l'expression monoallélique d'un long transcrite non codant *Xist*, dont l'accumulation sur le chromosome qui l'exprime entraîne le recrutement des complexes protéiques qui remodelent la chromatine et assurent l'inactivation transcriptionnelle. De façon tout à fait surprenante, le phénomène d'empreinte parentale assurant une inactivation très précoce du X paternel chez la souris n'est retrouvé ni dans les embryons de lapin ni dans l'embryon humain [30]. *XIST* est pourtant exprimé chez ces embryons, mais de façon biallélique, et cette expression n'aboutit pas à l'inactivation du chromosome. Dans l'embryon humain, un autre ARN non codant, *XACT*, absent chez la souris, s'accumule sur les chromosomes X actifs et pourrait contrebalancer l'accumulation de *XIST*, de sorte que la mise en place d'une compensation de dosage génique pourrait résulter de l'action antagoniste de ces deux transcrits non codants [31]. Dans les cellules du blastocyste humain femelle, les deux chromosomes X expriment et sont recouverts par les transcrits *XIST* et *XACT*. Certains auteurs ont proposé qu'un mécanisme d'« amortissement » de l'expression de chacun des deux chromosomes X précède, dans l'embryon humain, l'inactivation de l'un d'entre eux [32], mais cette hypothèse est soumise à controverse. Dans l'embryon de bovin, qui s'implante beaucoup plus tardivement, la compensation de dosage génique n'est perceptible qu'au cours de l'élongation du conceptus. Quelle que soit l'espèce, cette compensation de dosage génique pourrait être nécessaire à l'obtention d'un trophoblaste fonctionnel en vue de l'implantation.

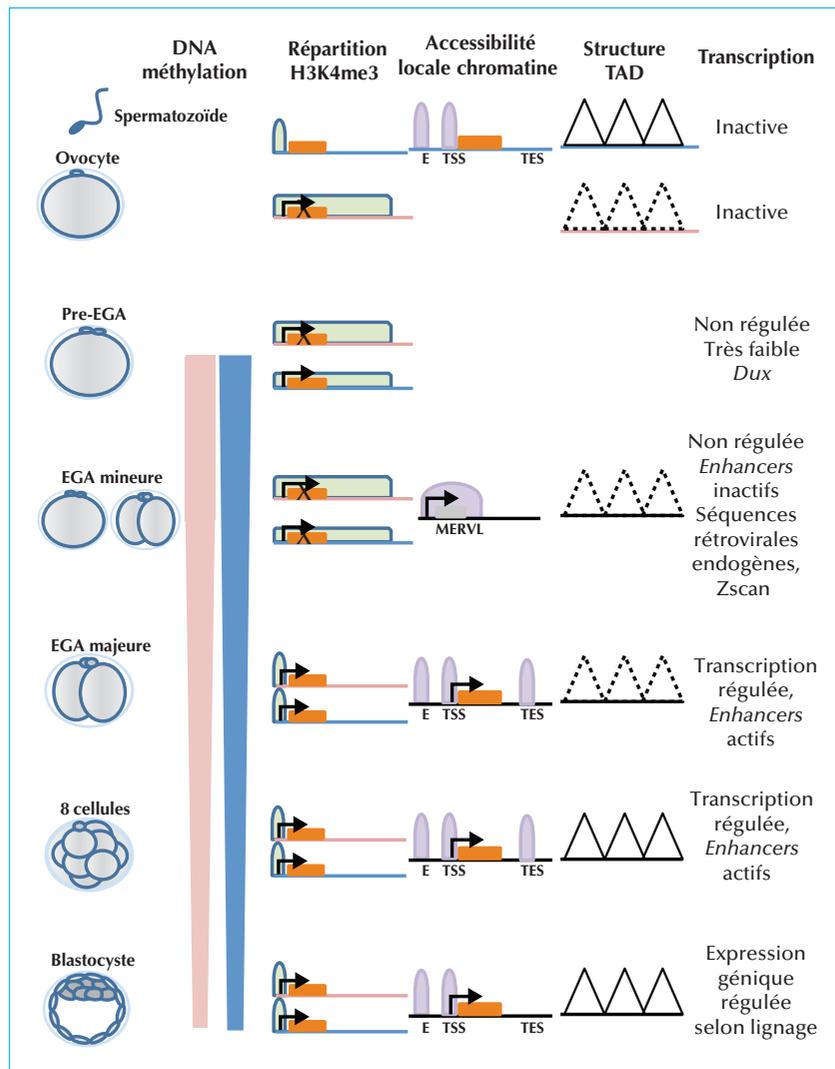
L'embryon de souris, dont l'implantation est très précoce par rapport aux autres espèces, pourrait avoir sélectionné, par le biais d'un mécanisme lié à l'empreinte parentale, un mode d'inactivation très rapide de l'un des deux chromosomes X dans le trophoctoderme [30].

Les stades de clivages de l'embryon préimplantatoire sont donc très particuliers en ceci qu'ils sont le siège de remaniements importants du méthylome, des histones et de la structure tridimensionnelle de la chromatine embryonnaire (figure 2). Les relations entre les modifications de ces différents niveaux constitutifs de l'épigénome embryonnaire, d'une part, et entre ces remaniements et l'activation transcriptionnelle du génome embryonnaire, d'autre part, restent à explorer.

### Mise en place des premiers lignages

Les premiers événements morphogénétiques, dans l'embryon de mammifères, sont la polarisation des blastomères et la compaction. Chez la souris, ces deux événements sont pratiquement concomitants et se produisent au stade huit cellules. La compaction suppose des modifications des tensions de surface des cellules de l'embryon, permettant un étalement des contacts intercellulaires et un aplanissement de la surface des cellules. Elle met en jeu les molécules d'adhésion cellulaire cadhérine E, présentes aux contacts intercellulaires et sur des filopodes qui relient les cellules à leurs voisines ainsi que la contractilité du cytosquelette d'actomyosine des cellules. Bien que constituant le premier événement morphogénétique repérable, la compaction est d'ampleur variable selon les lignées de souris et elle ne s'avère pas absolument nécessaire à la formation d'un blastocyste [33].

La polarisation engendre une organisation cellulaire de type épithélial, avec, pour chaque blastomère, un domaine apical enrichi en microvillosités et en protéines telles que JAM1, Ezrin, protéine kinase C (PKC), PARD3, PARD6b, et des régions de contacts intercellulaires enrichies en PAR1 (une sérine/thréonine protéine kinase), cadhérine E,  $\beta$ -caténine, épithine et vézatine [34]. Le domaine apical des blastomères contribue à orienter le fuseau des divisions mitotiques ultérieures, qui seront dans leur majorité asymétriques, et engendreront deux cellules filles distinctes, dont l'une seulement – celle qui reste en position externe – sera pourvue d'un domaine apical. De cette façon, deux types cellulaires distincts sont générés dans l'embryon de stade seize cellules. La division asymétrique ne suffit pas, à elle seule, à expliquer la mise en place et le maintien du pool de cellules internes. Un autre phénomène participe au tri et à l'internalisation de certaines cellules : à partir du stade seize cellules, des ondes de contraction périodique parcourent certains blastomères.



**Figure 2.** Activation transcriptionnelle et reprogrammation épigénétique du génome de l'embryon de souris. Une déméthylation partielle et asymétrique des génomes parentaux est observée entre la fécondation et le stade blastocyste. L'EGA mineure est marquée par une répartition non canonique, en larges domaines couvrant des régions géniques et intergéniques, de l'histone H3 triméthylée sur la lysine 4 (H3K4me3), héritée de l'ovocyte, une structure chromatinienne relâchée en particulier dans de larges domaines couvrant des séquences rétrovirales endogènes. Cette structuration particulière de la chromatine est corrélée à une expression à faible niveau de l'ensemble du génome embryonnaire, non régulée par les signaux canoniques. À partir de l'EGA majeure, la chromatine acquiert une organisation plus canonique bien que les TAD (pour *transcription associated domains*) n'apparaissent que plus tard. La régulation de l'expression génique devient « classique », les *enhancers* des gènes sont actifs. Au stade blastocyste, le programme d'expression génique diffère selon les lignages. Les composantes paternelle et maternelle du génome embryonnaire sont représentées respectivement en bleu et en rose quand une asymétrie est connue. E : *enhancer*, TSS : *transcription start site*, TES : *transcription end site*. MERVL : séquence rétrovirale endogène du génome de souris.

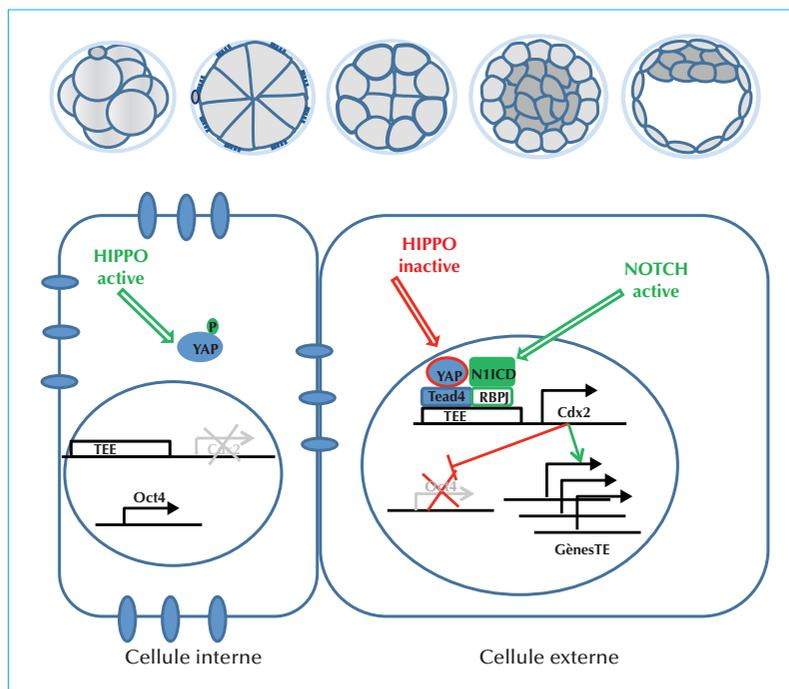
Elles sont limitées dans les blastomères externes par le domaine apical des cellules et par les contacts intercellulaires. Il se forme donc un anneau de contraction à la surface des cellules, dont l'intensité varie avec l'importance du domaine apical hérité des blastomères du stade huit cellules. Or, les blastomères, dont la contractilité dépasse un certain seuil, sont internalisés pendant le stade seize cellules, et contribueront à former l'ICM [33]. Ainsi, des différences de contractilité contribuent à l'engagement

des cellules dans les deux premiers lignages. En effet, à partir de ce stade, les cellules externes se différencieront en trophoctoderme, alors que les cellules internes formeront la masse cellulaire interne. Les programmes d'expression génique de ces deux types cellulaires commencent à diverger (voir [35] pour revue). Les facteurs de transcription OCT4 et CDX2, initialement coexprimés dans les cellules de la morula, se restreignent respectivement aux cellules de l'ICM et à celles du trophoctoderme, et ceci de manière

exclusive. L'expression de *Cdx2* dans les cellules externes est indispensable à la formation du trophoctoderme et à la répression d'*Oct4*. Inversement, l'expression d'*Oct4* est nécessaire au maintien de la répression de *Cdx2* dans les cellules de l'ICM. L'expression de chacun de ces gènes entraîne, au sein des cellules, la mise en place de réseaux de régulation de gènes qui assurent l'identité des cellules engagées soit vers l'ICM, soit vers le trophoctoderme. Les embryons mutants privés de l'expression d'*Oct4* forment un blastocyste dont l'ICM dégénère, ceux privés de *Cdx2* cavitent et forment un jeune blastocyste dont le trophoctoderme dégénère. Les mécanismes aboutissant à l'expression exclusive et réciproque de ces deux facteurs de transcription sont maintenant bien connus chez la souris (figure 3). En particulier, l'activation de la voie de signalisation Hippo, induite par la densité des contacts cellulaires dans les cellules internes, aboutit à la phosphorylation de la protéine Yap (pour *yes-associated protein*), qui reste séquestrée dans le cytoplasme. Au contraire, dans les cellules externes, en absence d'activation de la voie Hippo, cette même protéine Yap présente sous forme non phosphorylée pénètre dans le noyau où, coopérant avec le facteur de transcription TEAD4, elle induit la transcription du gène *Cdx2* [36]. La voie Hippo n'agit pas seule pour cette spécification : la voie Notch, active

spécifiquement dans les cellules externes du jeune blastocyste, coopère avec elle pour la spécification du trophoctoderme [37]. Dans l'embryon de souris, cette spécification repose donc sur la non-activation de la voie Hippo et sur l'activation de la voie Notch. Chez la souris, la première spécification des lignages ICM *versus* trophoctoderme repose donc sur un positionnement différentiel des cellules qui induit des programmes différents d'expression génique.

La deuxième étape de spécification, celle de l'épiblaste et de l'endoderme primitif, est radicalement différente chez la souris. Elle est initiée au sein de l'ICM du blastocyste de 3,5 jours, où certaines cellules expriment GATA6, facteur de transcription marqueur de l'endoderme primitif, alors que d'autres expriment NANOG, facteur de transcription marqueur de l'épiblaste [35]. Ces deux types cellulaires étant distribués en « poivre et sel » au sein de l'ICM. Comme pour *Oct4* et *Cdx2* lors de l'étape précédente, *Gata6* et *Nanog* sont d'abord coexprimés au stade jeune blastocyste (trente-deux cellules), puis leur expression devient exclusive au stade soixante-quatre cellules. Les embryons mutants pour *Nanog* ne différencient que de l'endoderme primitif, ceux mutants pour *Gata 6*, que de l'épiblaste. Les cellules précurseurs de l'endoderme primitif exprimant *Gata 6* migrent ensuite



**Figure 3.** Spécification du trophoctoderme de l'embryon de souris. La position des cellules : interne (gris foncé) ou externe (gris clair) résulte de divisions asymétriques aux stades 8 et 16 cellules et de l'internalisation de blastomères présentant une plus forte contractilité. Dans les cellules internes, les contacts cellulaires activent la voie Hippo, Yap phosphorylée est maintenu dans le cytoplasme et les cellules expriment *Oct4*. Dans les cellules externes, la voie Hippo est inactive, Yap entre dans le noyau et, conjointement avec les effecteurs de la voie Notch, active *Cdx2*. *CDX2* réprime *Oct4* et active un réseau de gènes spécifiques du trophoctoderme.

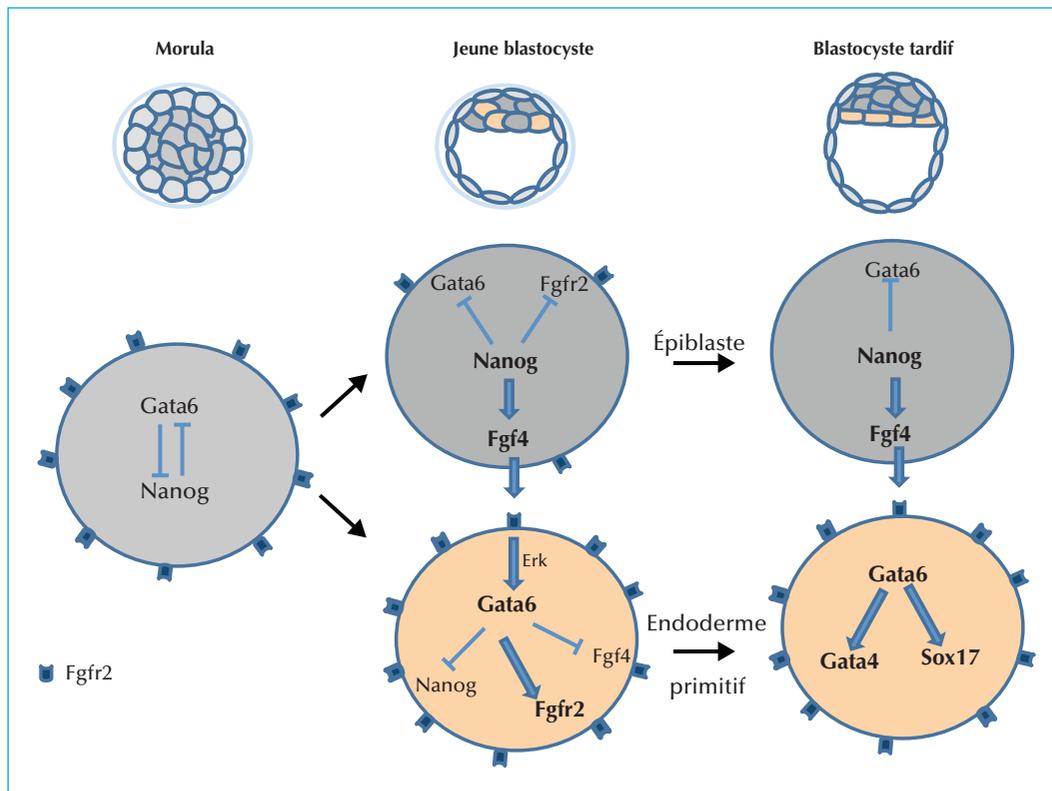
vers la face interne de l'ICM où elles forment une monocouche en regard de la cavité blastocélique puis se polarisent de façon individuelle [38]. La spécification précède donc ici la localisation cellulaire. Les mécanismes moléculaires qui président à cette spécification font l'objet de beaucoup d'études. Il est établi qu'elle implique des inhibitions réciproques entre *Nanog* et *Gata6* au sein de chaque cellule d'une part, et une signalisation intercellulaire reposant sur la production du facteur de croissance des fibroblastes 4 (FGF4) par les cellules internes de la morula exprimant fortement *Nanog* (et donc pas *Gata6*), et l'expression de récepteurs tyrosine kinase, le récepteur 2 des FGF (FGFR2) en particulier, par les cellules exprimant peu *Nanog* et donc surtout *Gata6*. Au sein de la cellule, GATA6 induit ensuite dans le blastocyste plus âgé l'expression de marqueurs plus tardifs de l'endoderme primitifs tels que *Gata4* et *Sox17* (figure 4). Les cellules précurseurs de l'épiblaste et de l'endoderme primitif proviennent toutes des cellules internes générées par les deux cycles de divisions asymétriques (huit à seize cellules et seize à trente-deux cellules). Les étapes initiales de la spécification de ces cellules en épiblaste ou en endoderme primitif dépendent de la quantité de FGF4 présente dans leur microenvironnement, quantité qui elle-même dépend

du nombre de cellules internes issues de chacune des deux divisions asymétriques.

Ces deux étapes de spécification telles que décrites chez la souris sont-elles généralisables aux autres espèces de mammifères beaucoup moins documentées ?

Des différences sont observées sur le timing et l'ampleur du phénomène de polarisation des blastomères : elle est plus tardive chez le bovin et le lapin, aux stades 9-15 et trente-deux cellules respectivement. De plus, dans ces deux espèces, elle ne concerne pas l'ensemble des blastomères, de sorte que l'apparition de deux types cellulaires distincts résulte d'une acquisition de polarité et non d'une perte de polarité. La compaction se produit après la polarisation chez le bovin (stade trente-deux cellules) et l'internalisation de certaines cellules précède la compaction [39].

Par ailleurs, plusieurs types de données récentes indiquent que les mécanismes moléculaires de spécification des premiers lignages pourraient ne pas être totalement conservés entre espèces. Concernant les gènes impliqués dans la première spécification, le rôle d'OCT4 dans les étapes précoces du développement pourrait être différent entre la souris et l'homme : des expériences



**Figure 4.** Spécification de l'endoderme primitif de l'embryon de souris (simplifié d'après Chazaud *et al.* 2016 [35]). La spécification repose sur une inhibition réciproque de *Gata6* et de *Nanog* et la synthèse de FGF4 par les cellules exprimant *Nanog*. FGF4 active, par son récepteur FGFR2, la voie ERK dans les précurseurs de l'endoderme primitif exprimant *Gata6*.

d'édition de génome dans l'embryon humain montrent que son expression serait nécessaire plus tôt que chez la souris. En effet, les embryons humains ne l'exprimant pas ne parviennent pas à former des blastocystes, alors que les embryons de souris forment des blastocystes, qui ensuite collapsent. Par ailleurs, les cellules mutées pour *OCT4* dans l'embryon humain sous-expriment non seulement des gènes marqueurs de l'épiblaste, mais aussi des gènes du trophoctoderme, dont *CDX2*, et de l'endoderme primitif, ce qui n'est pas le cas chez la souris [40]. L'antagonisme entre *OCT4* et *CDX2*, primordial dans l'embryon de souris pour assurer l'étape de spécification ICM/trophoctoderme, ne semble pas non plus conservé chez les autres mammifères. En effet, l'expression de *CDX2* dans le trophoctoderme apparaît seulement après la cavitation dans le blastocyste expansé chez l'homme et le lapin [41, 42]. L'expression d'*OCT4*, quant à elle, est maintenue dans le trophoctoderme chez la plupart des espèces non murines [42, 43], en particulier chez l'homme, l'expression d'*OCT4* et de *CDX2* ne devient exclusive qu'à partir du jour 6, soit beaucoup plus tard que dans le blastocyste de souris. Il apparaît que les régions de fixation de ces facteurs de transcription en amont des gènes dont ils régulent l'expression sont peu conservées entre mammifères, ceci pourrait expliquer des différences dans les interactions entre ces facteurs et leurs gènes cibles. Ainsi, *CDX2* interagit avec l'*enhancer* d'*Oct4* pour réprimer ce gène chez la souris, mais pas chez le bovin, où il ne réprime donc pas *OCT4* [44]. En revanche, dans l'embryon de primate, le gène *GATA3* est capable de réprimer *OCT4* et d'induire la différenciation trophoctodermique. Il constitue donc un bon gène candidat pour la spécification du trophoctoderme et pourrait jouer le rôle assuré par *Cdx2* chez la souris [45].

La deuxième étape de spécification, celle des pré-curseurs de l'endoderme primitif, est, chez la souris, sous la dépendance des récepteurs à tyrosine kinase *FGFR2*, et de la voie de signalisation des MAP-kinases (*MEK*, *ERK*). L'influence de cette voie a été testée chez différentes espèces :

- son inhibition pharmacologique entraîne chez la souris une expression ectopique du facteur de pluripotence *Nanog* dans toutes les cellules de la masse cellulaire empêchant la spécification de l'endoderme primitif et l'apparition de cellules exprimant *Gata6*,
- chez le bovin, le même type de traitement réduit la proportion de cellules *GATA6* positives sans les supprimer totalement,
- chez l'homme le traitement est sans effet [46],
- chez le lapin il supprime les cellules *GATA6* positives sans entraîner l'expression ectopique de *NANOG* [47].

Ces différences révèlent vraisemblablement des régulations différentes de la spécification de l'endoderme primitif.

La possibilité, très récente, d'analyser le transcriptome des cellules uniques a donné lieu à plusieurs études visant à analyser, chez l'homme, la spécification des premiers lignages à partir des profils d'expression génique des cellules individuelles de l'embryon [32, 48, 49]. Outre le fait qu'aucun consensus n'existe encore sur la façon de mener les analyses statistiques de ce type de données, les auteurs se heurtent à la difficulté de définir précisément les stades des embryons humains, qui par ailleurs sont issus de procréation médicalement assistée (PMA), et dont le potentiel de développement ultérieur est inconnu. Néanmoins, ces études mettent en évidence des similitudes mais aussi des différences entre la souris et l'homme dans les réseaux de gènes exprimés dans l'ICM, le trophoctoderme, l'épiblaste et l'endoderme primitif [11] (voir [39] pour revue), alors que, plus tôt, jusqu'au stade morula, les modules de gènes coexprimés sont plutôt conservés [50]. Ceci confirme que les modalités de spécification décrites chez la souris ne sont vraisemblablement pas extrapolables en tout point aux autres espèces.

## Conclusion

Les mécanismes moléculaires et cellulaires de la période fécondation-formation du blastocyste ont jusqu'ici été documentés principalement chez la souris, pour laquelle les embryons sont facilement accessibles et les outils génétiques très puissants, mais qui à elle seule ne peut constituer un modèle pour tous les autres mammifères. La meilleure connaissance des génomes et le développement des outils destinés à leur édition devraient aboutir dans les années à venir à une vision de cette période enrichie par davantage de comparaisons entre espèces.

Quelle que soit l'espèce, cette période est déterminante pour la construction du phénotype du futur individu. Ceci s'explique par la mise en place de l'épiblaste, de l'endoderme primitif et du trophoctoderme, respectivement précurseurs du fœtus, de la vésicule vitelline impliquée dans sa nutrition et du placenta, organe connu pour son rôle programmeur du phénotype, et par les remaniements intenses de l'épigénome embryonnaire dont on sait qu'il enregistre et mémorise les variations d'environnement. L'embryon préimplantatoire s'avère de ce fait particulièrement sensible à des modifications de son environnement aussi bien *in vivo* (statut nutritionnel ou physiopathologique de la mère) qu'*in vitro* (application des procédures de PMA), qui peuvent avoir des effets à long terme sur le nouveau-né et l'adulte. La miniaturisation des analyses moléculaires qui permettra notamment de prendre en compte la variabilité interembryons, le développement d'approches non invasives et l'intégration des données acquises dans différentes conditions d'environnement devraient permettre prochainement de mieux

comprendre les voies mises en jeu dans l'adaptation immédiate de l'embryon à son environnement pour en réduire les conséquences à plus long terme. Une attention renouvelée devra également être portée aux conditions dans lesquelles se déroulent les gamétogenèses, tant il apparaît que l'apport des gamètes à l'embryon préimplantatoire dépasse leur seul contenu génomique.

**Liens d'intérêt :** Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## Références

1. Kigami D, Minami N, Takayama H, Imai H. MuERV-L is one of the earliest transcribed genes in mouse one-cell embryos. *Biol Reprod* 2003 ; 68 : 651-4.
2. Han Z, Mtango NR, Zhong Z, Vassena R, Latham KE. Early transcription from the maternal genome controlling blastomere integrity in mouse two-cell-stage embryos. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010 ; 298 : C1235-1244.
3. Probst AV, Okamoto I, Casanova M, El Marjou F, Le Baccon P, Almouzni G. A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev Cell* 2010 ; 19 : 625-38.
4. Abe K-I, Yamamoto R, Franke V, et al. The first murine zygotic transcription is promiscuous and uncoupled from splicing and 3' processing. *EMBO J* 2015 ; 34 : 1523-37.
5. Christians E, Rao VH, Renard JP. Sequential acquisition of transcriptional control during early embryonic development in the rabbit. *Dev Biol* 1994 ; 164 : 160-72.
6. Abe K-I, Funaya S, Tsukioka D, et al. Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018 ; 115 : E6780-8.
7. Hendrickson PG, Doráis JA, Grow EJ, et al. Conserved roles of mouse DUX and human DUX4 in activating cleavage-stage genes and MERVL/HERVL retrotransposons. *Nat Genet* 2017 ; 49 : 925-34.
8. De Iaco A, Planet E, Coluccio A, Verp S, Duc J, Trono D. DUX-family transcription factors regulate zygotic genome activation in placental mammals. *Nat Genet* 2017 ; 49 : 941-5.
9. Eckersley-Maslin M, Alda-Catalinas C, Blotenburg M, Kreibich E, Krueger C, Reik W. Dppa2 and Dppa4 directly regulate the Dux-driven zygotic transcriptional program. *Genes Dev* 2019 ; 33 : 194-208.
10. Zeng F, Schultz RM. RNA transcript profiling during zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 2005 ; 283 : 40-57.
11. Boroviak T, Stirparo GG, Dietmann S, et al. Single cell transcriptome analysis of human, marmoset and mouse embryos reveals common and divergent features of preimplantation development. *Dev Camb Engl* 2018 ; 145 : dev167833.
12. Potireddy S, Vassena R, Patel BG, Latham KE. Analysis of polysomal mRNA populations of mouse oocytes and zygotes: dynamic changes in maternal mRNA utilization and function. *Dev Biol* 2006 ; 298 : 155-66.
13. Ma J, Flehr M, Strnad H, Svoboda P, Schultz RM. Maternally recruited DCP1A and DCP2 contribute to messenger RNA degradation during oocyte maturation and genome activation in mouse. *Biol Reprod* 2013 ; 88 : 11.
14. Mehlmann LM. Losing mom's message: requirement for DCP1A and DCP2 in the degradation of maternal transcripts during oocyte maturation. *Biol Reprod* 2013 ; 88 : 10.
15. Ma J, Flehr M, Stein P, et al. MicroRNA activity is suppressed in mouse oocytes. *Curr Biol CB* 2010 ; 20 : 265-70.
16. Flehr M, Malik R, Franke V, et al. A retrotransposon-driven dicer isoform directs endogenous small interfering RNA production in mouse oocytes. *Cell* 2013 ; 155 : 807-16.
17. Iqbal K, Jin S-G, Pfeifer GP, Szabó PE. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 ; 108 : 3642-7.
18. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999 ; 99 : 247-57.
19. Canovas S, Ross PJ, Kelsey G, Coy P. DNA methylation in embryo development: epigenetic impact of ART (assisted reproductive technologies). *Bioessays* 2017 ; 39 : 1700106.
20. Zhu P, Guo H, Ren Y, et al. Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nat Genet* 2018 ; 50 : 12-9.
21. Salvaing J, Peynot N, Bedhane MN, et al. Assessment of "one-step" versus "sequential" embryo culture conditions through embryonic genome methylation and hydroxymethylation changes. *Hum Reprod* 2016 ; 31 : 2471-83.
22. Beaujean N. Histone post-translational modifications in preimplantation mouse embryos and their role in nuclear architecture. *Mol Reprod Dev* 2014 ; 81 : 100-12.
23. Chung N, Bogliotti YS, Ding W, et al. Active H3K27me3 demethylation by KDM6B is required for normal development of bovine preimplantation embryos. *Epigenetics* 2017 ; 12 : 1048-56.
24. Dahl JA, Jung I, Aanes H, et al. Broad histone H3K4me3 domains in mouse oocytes modulate maternal-to-zygotic transition. *Nature* 2016 ; 537 : 548-52.
25. Liu X, Wang C, Liu W, et al. Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. *Nature* 2016 ; 537 : 558-62.
26. Ooga M, Fulka H, Hashimoto S, Suzuki MG, Aoki F. Analysis of chromatin structure in mouse preimplantation embryos by fluorescent recovery after photobleaching. *Epigenetics* 2016 ; 11 : 85-94.
27. Ke Y, Xu Y, Chen X, et al. 3D chromatin structures of mature gametes and structural reprogramming during mammalian embryogenesis. *Cell* 2017 ; 170 : 367-81.
28. Xu Q, Xie W. Epigenome in early mammalian development: inheritance, reprogramming and establishment. *Trends Cell Biol* 2018 ; 28 : 237-53.
29. Borensztein M, Syx L, Ancelin K, et al. Xist-dependent imprinted X inactivation and the early developmental consequences of its failure. *Nat Struct Mol Biol* 2017 ; 24 : 226-33.

- 30.** Okamoto I, Patrat C, Thépot D, *et al.* Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* 2011 ; 472 : 370-4.
- 31.** Vallot C, Patrat C, Collier AJ, *et al.* XACT noncoding RNA competes with XIST in the control of X chromosome activity during human early development. *Cell Stem Cell* 2017 ; 20 : 102-11.
- 32.** Petropoulos S, Edsgård D, Reinius B, *et al.* Single-cell RNA-Seq reveals lineage and X chromosome dynamics in human preimplantation embryos. *Cell* 2016 ; 167 : 285.
- 33.** Maître J-L. Mechanics of inner cell mass formation. *Biol Aujourd'hui* 2017 ; 211 : 137-48.
- 34.** Saini D, Yamanaka Y. Cell polarity-dependent regulation of cell allocation and the first lineage specification in the preimplantation mouse embryo. *Curr Top Dev Biol* 2018 ; 128 : 11-35.
- 35.** Chazaud C, Yamanaka Y. Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development* 2016 ; 143 : 1063-74.
- 36.** Nishioka N, Inoue K, Adachi K, *et al.* The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell* 2009 ; 16 : 398-410.
- 37.** Rayon T, Menchero S, Nieto A, *et al.* Notch and hippo converge on Cdx2 to specify the trophectoderm lineage in the mouse blastocyst. *Dev Cell* 2014 ; 30 : 410-22.
- 38.** Gerbe F, Cox B, Rossant J, Chazaud C. Dynamic expression of Lrp2 pathway members reveals progressive epithelial differentiation of primitive endoderm in mouse blastocyst. *Dev Biol* 2008 ; 313 : 594-602.
- 39.** Pfeffer PL. Building principles for constructing a mammalian blastocyst embryo. *Biology* 2018 ; 7(3):41.
- 40.** Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, *et al.* Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature* 2017 ; 550 : 67-73.
- 41.** Niakan KK, Eggan K. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Dev Biol* 2013 ; 375 : 54-64.
- 42.** Chen C-H, Xu J, Chang W-F, *et al.* Dynamic profiles of Oct-4, Cdx-2 and acetylated H4K5 in *in-vivo*-derived rabbit embryos. *Reprod Biomed Online* 2012 ; 25 : 358-70.
- 43.** Khan DR, Dubé D, Gall L, *et al.* Expression of pluripotency master regulators during two key developmental transitions: EGA and early lineage specification in the bovine embryo. *PLoS One* 2012 ; 7 : e34110.
- 44.** Berg DK, Smith CS, Pearton DJ, *et al.* Trophectoderm lineage determination in cattle. *Dev Cell* 2011 ; 20 : 244-55.
- 45.** Krendl C, Shaposhnikov D, Rishko V, *et al.* GATA2/3-TFAP2A/C transcription factor network couples human pluripotent stem cell differentiation to trophectoderm with repression of pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017 ; 114 : E9579-88.
- 46.** Kuijk EW, van Tol LTA, Van de Velde H, *et al.* The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development* 2012 ; 139 : 871-82.
- 47.** Piliszek A, Madeja ZE, Plusa B. Suppression of ERK signalling abolishes primitive endoderm formation but does not promote pluripotency in rabbit embryo. *Development* 2017 ; 144 : 3719-30.
- 48.** Yan L, Yang M, Guo H, *et al.* Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 2013 ; 20 : 1131-9.
- 49.** Blakeley P, Fogarty NME, Del Valle I, *et al.* Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Development* 2015 ; 142 : 3613.
- 50.** Xue Z, Huang K, Cai C, *et al.* Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 2013 ; 500 : 593-7.