



université PARIS-SACLAY

ETUDE DE L'ARCHITECTURE NUCLÉAIRE AU COURS DE L'EMBRYOGÉNÈSE NORMALE ET APRÈS LE CLONAGE PAR TRANSFERT DU NOYAU

**Par Monsieur Andrey PICHUGIN Discipline : Génétique Cellulaire et Moléculaire
Laboratoire : INRA**

La reprogrammation au cours de la fécondation et du développement pré-implantatoire de l'embryon fécondé in vitro (IVF) chez les mammifères est un processus complexe qui permet le retour à un état indifférencié des cellules hautement spécialisées que sont les gamètes lors de la syngamie, puis leur différenciation progressive en différents lignages cellulaires dans l'embryon. Ces processus comprennent des changements dans la structure de la chromatine, dans les modifications épigénétiques et dans l'architecture nucléaire des noyaux embryonnaires. L'objectif de cette étude était de mettre en place des approches pour la compréhension de processus de modifications épigénétiques et de l'architecture nucléaire dans les embryons précoces. Nous avons tiré parti de la comparaison entre embryons normaux (FIV) et issus de transfert de noyau (TN) dans l'espèce bovine où le développement pré-implantatoire s'étant sur une période suffisamment longue pour caractériser la dynamique des événements de reprogrammation nucléaire avant la mise en route de l'activation majeure du génome

embryonnaire. Dans les embryons FIV et une partie des embryons TN, l'hétérochromatine apparaît dans un état dispersé, et ceci jusqu'au stade 8-cellule ; puis sous une forme condensée qui correspond à l'association bien caractéristique de blocs d'hétérochromatine et d'H3K9me3 avec les centromères, connues sous le nom de chromocentres. Cependant, une partie significative des embryons TN montrent une altération de la dynamique d'hétérochromatinisation révélée par une condensation précoce, dès le stade 2-cellule, de HP1 et H3K9-me3. Dans une seconde approche, nous avons utilisé des cellules sénescences comme cellules donneuses de noyau de façon à tester l'influence de l'organisation structurale du noyau donneur sur l'organisation structurale des noyaux dans les embryons clonés. Les arrangements tridimensionnels à large échelle de l'hétérochromatine dans les noyaux sénescents TN récapitulent la dynamique observée dans les études précédentes. Le présent travail nous a permis de mettre en évidence une distinction entre des embryons TN avec une reprogrammation normale et des embryons TN avec une anomalie au niveau de l'organisation structurale du noyau.

A b s t r a c t :

Developmental reprogramming during mammalian fertilization and pre-implantation development in in vitro fertilized (IVF) embryos is a complex process that allows the highly differentiated gametes to revert to undifferentiated cell types following syngamy and then gradually differentiate into individual cell lineages. These processes involve changes in chromatin structure, in global epigenetic modifications and in nuclear architecture of embryonic nuclei. The objective of the present study was to develop approaches for understanding the phenomena of changes of epigenetic modifications and of nuclear architecture in early embryos. We used the possibility to compare normal (IVF) and nuclear transfer (NT) embryos in bovine species where the pre-implantation development is long enough to assess the nuclear dynamics of reprogramming events before major embryonic genome activation. In IVF and some NT embryos, heterochromatin was observed in dispersed state up to the 8-cell stage, and then in a condensed pattern corresponding to the well characterized as chromocenters constituted by blocks of heterochromatin. However, a significant part of NT embryos underwent an altered dynamics of heterochromatinization characterized by a precocious heterochromatin condensation as soon as the 2-cell stage. In a second approach, we used senescent somatic cells as donors for nuclear transfer experiments in order to assess the influence of structural organization of donor cell nucleus on structural organization of nuclei in cloned embryos. Surprisingly, the large-scale three-dimensional arrangement of heterochromatin within the senescent-NT nucleus recapitulated the dynamics observed in IVF or somatic non-senescent NT embryos, similar to those

observed in the previous investigation. The present work allowed us to point out the distinction between NT embryos with correct and abnormal developmental reprogramming as well as to demonstrate that the impact of nuclear organization of heterochromatin in the donor cell on structural organization of nucleus in NT embryos is relatively low.

INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES

Catherine LABBE, Directeur de Recherche, Habilité à diriger des Recherches, à l'INRA de Rennes, Le Rheu- Rapporteur **Yegor VASSETZKY**, Directeur de Recherche, Habilité à diriger des Recherches, à l'Institut Gustave Roussy, Villejuif- Rapporteur **Christophe ESCUDE**, Chargé de Recherche, au Museum National de l'Histoire Naturelle, Paris - Examineur **Nathalie BEAUJEAN-BOBINEAU**, Directrice de Recherche, à l'Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas - Examinatrice **Muriel MAMBRINI-DOUDET**, Directrice de Recherche, à l'Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas - Examinatrice **Bernadette LIMBOURG-BOUCHON**, Professeur des Universités à l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines - Examineur **Xavier VIGNON**, Directeur de Recherche, à l'Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas - Directeur de thèse