



HAL
open science

État des lieux des connaissances sur les mécanismes autour du développement de l'embryon de mammifère entre morula et blastula

Emma Nest

► **To cite this version:**

Emma Nest. État des lieux des connaissances sur les mécanismes autour du développement de l'embryon de mammifère entre morula et blastula. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03981167

HAL Id: dumas-03981167

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03981167v1>

Submitted on 9 Feb 2023

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.

Année 2022

**ÉTAT DES LIEUX DES CONNAISSANCES SUR LES
MÉCANISMES AUTOUR DU DÉVELOPPEMENT DE
L'EMBRYON DE MAMMIFÈRE ENTRE MORULA ET
BLASTULA**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 15 décembre 2022

par

Emma, Louise, Marie, NEST

sous la direction de

Alline DE PAULA REIS

JURY

Président du jury :	M. Yves Millemann	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Alline DE PAULA REIS	Maître de Conférences à l'EnvA
Examineur :	M. Laurent TIRET	Professeur à l'EnvA

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



Version du 8 février 2022

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigé	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Maître de conférences HDR	DPASP
M	Blot	Stephane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loic	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Fédérighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guénec	Christelle	Maître de conférences HDR	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
M	Perrot	Sébastien	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Benckekroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Constant	Bienne	Maître de conférences	DPASP
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
Mme	Decambon	Adeline	Maître de conférences	DEPEC
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences associé	DPASP
M	Desbois	Christophe	Maître de conférences	DEPEC
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guélin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
M	Mauffré	Vincent	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mespouhès-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Ravary-Plumioën	Béangère	Maître de conférences	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse, M. Yves MILLEMANN, Professeur à l'EnvA,
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,
Hommage respectueux.

A Mme Aline DE PAULA REIS, Maître de conférences à l'EnvA,
Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, pour m'avoir guidée tout au long de la réalisation de
ce travail, pour sa gentillesse et sa disponibilité,
Sincères remerciements.

A M. Laurent TIRET, Professeur à l'EnvA,
Pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse,
Hommage respectueux.

Table des matières

Liste des abréviations.....	5
Introduction	7
Première partie : Le développement embryonnaire précoce	9
1. Déroulé des évènements cellulaires	9
A. <i>La segmentation.....</i>	9
B. <i>Formation de la morula</i>	10
a. Activation du génome embryonnaire.....	10
b. Compaction.....	10
c. Polarisation	10
d. Différenciation	11
C. <i>Formation de la blastula.....</i>	11
a. Croissance et prolifération cellulaire	11
b. Blastulation	12
c. Eclosion et deuxième différenciation.....	12
D. <i>Fin du développement embryonnaire précoce</i>	13
2. Marqueurs.....	14
A. <i>Les marqueurs de la polarisation (et de la compaction).....</i>	14
a. Complexe Rho ROCK et cytosquelette	14
b. Système Par-aPKC.....	14
c. Ezrine.....	15
d. Jonctions serrées.....	15
B. <i>Les marqueurs de la première différenciation.....</i>	16
a. Marqueurs de la masse cellulaire interne.....	16
b. Marqueurs du trophoctoderme	16
c. Chez le bovin	17
C. <i>Les marqueurs de la seconde différenciation</i>	18
a. Gènes de l'épiblaste.....	18
b. Gènes de l'endoderme primitif	19
c. Chez le bovin	20
Deuxième partie : La formation de la morula	23
1. La compaction.....	23
A. <i>Mécanismes physico-chimiques</i>	24
a. Déformation des cellules et loi de Young-Dupré	24
b. Internalisation des cellules	25
B. <i>Mécanismes biomoléculaires.....</i>	28
a. Cadherine E.....	28
b. Cytosquelette	30
c. Chez le bovin	31
2. Différenciation en trophoblaste et en masse cellulaire interne	33
A. <i>Théories historiques sur l'origine de la différenciation.....</i>	33
a. Théorie de la prédétermination	33
b. Théorie « inside-outside »	33
c. Théorie de la polarité	33
d. Théorie de l'auto-organisation.....	34
e. Remise en question récente	34
B. <i>Mécanismes biomoléculaires.....</i>	35
a. La voie de signalisation Hippo	35
b. La voie de signalisation Notch	44
c. La voie de signalisation Wnt	44
d. Cytosquelette d'actine myosine	45

C. Aspects mécaniques	45
3. Aspects métaboliques	46
A. Besoins énergétiques.....	46
B. Substrats	46
a. Pyruvate et lactate	46
b. Lipides.....	47
c. Glycogène.....	47
d. Acides aminés.....	47
C. Viabilité et métabolisme	48
Troisième partie : La formation de la blastula.....	51
1. La formation du blastocœle	51
A. Mécanismes physico-chimiques	51
a. Flux de liquide depuis le milieu extérieur	51
b. Formation de microcavités	54
c. Réunion en une cavité unique.....	56
d. Régulation du volume du blastocœle	62
B. Mécanismes biomoléculaires.....	67
a. Etablissement du gradient.....	67
b. Importance des jonctions serrées	68
c. Place du cytosquelette	69
d. Chez le bovin	70
C. L'axe abembryonnaire-embryonnaire	72
2. Différenciation en épiblaste et endoderme	73
A. Mécanismes biomoléculaires.....	73
a. Organisation des précurseurs des deux lignages dans la MCI	73
b. Induction de l'endoderme par l'épiblaste.....	73
c. Positionnement des cellules EPr et prolifération de l'Epi	75
d. Polarisation cellules EPr	76
e. Chez le bovin	78
B. Mécanismes physico-chimiques	78
a. Intervention mécanique du blastocœle	78
b. Rôle des microcavités comme microenvironnement	79
c. Positionnement des cellules de l'endoderme	79
3. Eclosion	82
A. Aspects mécaniques.....	82
a. Site d'éclosion.....	83
b. Contractions de la blastula.....	84
c. Projections du trophoctoderme	84
d. Approche mécanique des forces qui permettent l'éclosion	84
B. Aspects biomoléculaires	85
a. Digestion enzymatique de la zone pellucide	85
b. Régulation de l'éclosion	85
4. Aspects métaboliques	86
A. Augmentation de la demande énergétique.....	86
B. Adaptations du métabolisme embryonnaire.....	87
a. Les carburants de la blastula	87
b. La glycolyse aérobie	87
c. PKM2, une enzyme embryonnaire.....	91
Discussion.....	93
Conclusion.....	95
Liste des références bibliographiques	97

Liste des Figures

Figure 1 : premières divisions cellulaires de l'embryon de bovin (microscopie à fond clair) (Santos Monteiro <i>et al.</i> , 2021).	9
Figure 2 : Stades consécutifs du développement préimplantatoire de la souris et du bovin. Images sur fond clair d'embryons <i>in vivo</i> (souris) et <i>in vitro</i> (bovin), échelle non respectée . (Plusa et Piliszek, 2020).....	11
Figure 3 : Images 3D obtenues par tomographie en cohérence optique des différents composants d'une blastula de bovin (Masuda <i>et al.</i> , 2021).....	12
Figure 4 : Termes et concepts concernant l'embryon de bovin durant la période pré-implantatoire (Peippo <i>et al.</i> , 2011)	13
Figure 5 : Résumé des deux phases de la polarisation chez la souris au stade huit cellules. (Zhu <i>et al.</i> , 2017).	15
Figure 6 : Récapitulatif des marqueurs principaux des deux tissus obtenus après la première différenciation embryonnaire (Karasek <i>et al.</i> , 2020).....	17
Figure 7 : Schéma des interactions entre les marqueurs de l'épiblaste et ceux de l'endoderme primitif.	20
Figure 8 : Modifications morphologiques chez l'embryon préimplantatoire de souris lors de la compaction, au microscope optique (haut) et électronique (bas) (White <i>et al.</i> , 2016).	23
Figure 9 : Adhésion de deux cellules reposant sur une surface et équilibre des forces (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021)	25
Figure 10 : Changement d'orientation du fuseau mitotique (losanges vert) selon le grand axe de la cellule en fonction de sa hauteur et du nombre de cellules à volume constant (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021).....	26
Figure 11 : Représentation schématique d'un doublet de cellules avec leurs angles de contact et leurs tensions superficielles (Maître <i>et al.</i> , 2016).....	27
Figure 12 : Modélisation tridimensionnelle de blastomères d'un embryon de souris projetant des filopodes (Fierro-González <i>et al.</i> , 2013).....	29
Figure 13 : La compaction de l'embryon de souris (Plusa et Piliszek, 2020)	31
Figure 14 : Photographies d'embryons de bovins au cours de la compaction (Van Soom <i>et al.</i> , 1997).....	32
Figure 15 : Modèles historiques décrivant la première différenciation dans l'embryon de souris (Wennekamp <i>et al.</i> , 2013).	35
Figure 16 : Schéma simplifié de la cascade centrale de la voie de signalisation Hippo chez la souris (Hirate et Sasaki, 2014).	37

Figure 17 : La structure des domaines des protéines de la famille Amot et des protéines interagissant avec Amot (Hirate et Sasaki, 2014)	39
Figure 18 : Schéma simplifié de la signalisation de Hippo (Karasek <i>et al.</i> , 2020).....	41
Figure 19 : Modèle de formation d'une cavité unique (Torres-Sánchez <i>et al.</i> , 2021).....	53
Figure 20 : Paramétrisation géométrique de deux cavités échangeant des fluides via un "tuyau". de diamètre (Dumortier <i>et al.</i> , 2019).....	57
Figure 21 : Contact cellulaire lors de la cavitation dans une blastula de souris, avec <i>YTE</i> et <i>YMC1</i> les tensions de surface des microcavités au contact respectif du TE et de la MCI et représentation de certains échanges ioniques (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021).....	59
Figure 22 : Modèle d'une blastula de souris lors de la cavitation avec de multiples microcavités et flux de fluide (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021)	61
Figure 23 : Modèle pour le contrôle volumique de la cavité dans une cellule (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021)	62
Figure 24 : Photographies d'une vidéo au microscope de blastula de souris (Niimura, 2003). (flèches) (Niimura, 2003)	65
Figure 25 : Schéma du recrutement tension-dépendant de la vinculine aux jonctions serrées (JS), potentiellement via une liaison au cytosquelette (CS) d'actine-myosine, alors que l'étirement des cellules du TE augmente pendant l'extension cavitaire (Chan <i>et al.</i> , 2019)	70
Figure 26 : Photographies d'un embryon de souris et d'un embryon de bovin au stade blastula, échelle 50 µm (Kohri <i>et al.</i> , 2019).....	71
Figure 27 : Modèle schématique de l'expression génétique des cellules de la MCI au cours de la deuxième différenciation. (Allègre <i>et al.</i> , 2022).....	74
Figure 28 : Aspects moléculaires de la différenciation en épiblaste et endoderme chez la souris. (Soszyńska <i>et al.</i> , 2019).	77
Figure 29 : Affinité cellulaire entre deux cellules. (Yanagida <i>et al.</i> , 2022).	80
Figure 30 : Schéma montrant comment les fluctuations de surface et la fluidité cellulaire régulent le tri cellulaire dans la MCI de l'embryon précoce de souris (Yanagida <i>et al.</i> , 2022).....	81
Figure 31 : Ecllosion d'un embryon de souris par un "trou d'épingle » (A) ou par une rupture (B) (échelle : 100 µm) (Leonavicius <i>et al.</i> , 2018)	82
Figure 32 : Ecllosion d'embryons de bovins par l'un ou l'autre des pôles de l'axe embryonnaire-abembryonnaire (Negrón-Pérez et Hansen, 2017).	83
Figure 33 : Fonctionnement résumé de la glycolyse dans le contexte de la blastula (Lunt et Vander Heiden, 2011).....	90

Liste des abréviations

ADP : adénosine diphosphate
Amot : Angiomotine
aPKC : *atypical protein kinase C*
ARNm : acide ribonucléique messager
ATP : adénosine triphosphate
ATPase : adénosine triphosphatase
Axe A-E : axe abembryonnaire-embryonnaire
Cdh1 : cadhérine 1 ou E
Cdx2 : *caudal related homeobox 2*
CoA : Coenzyme A
Cops : *COP9 signalosome complex subunits*
CPE : *Clostridium perfringens enterotoxin*
EGA : *embryonic genome activation* ou activation du génome embryonnaire
Eomes : eomésodermine
Epi : épiblaste
EPr : endoderme primitif
ERK : *extracellular signal regulated kinases*
FBP : fructose biphosphate
Gata : *gata binding protein*
Gsk3 : *glycogen synthase kinase 3*
GTP : guanosine triphosphate
Hippo : voie de signalisation hippo
IFNT : interféron τ
Isp : *implantation serine proteinase*
Klf : *Krüppel-like factor*
Lats : *large tumor suppressor*
Ldh : *lactate dehydrogenase*
Lif : *leukemia inhibition factor*
MAPK : *mitogen activated protein kinases*
MAS : *malate aspartate shuttle*
MCI : masse cellulaire interne
MCT : Transporteurs monocarboxylés
MDCK : *Madin Darby canine kidney*
MEC : matrice extra-cellulaire
Merlin : *moesin-ezrin-radixin like protein*
Mst : *mammalian sterile twenty-like*
MYH : *myosin heavy chain*
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : NAD réduit
Nf2 : neurofibromine 2
NICD : *intracellular domain of notch receptor*
Oct4 : *octamer binding transcription factor 4*
P : phosphate

Par : *partinoning defective protein*
Par-Vegf : Vegf poly adéno ribosylé
Pdgfra : *platelet derived growth factor receptor alpha*
Pdh : pyruvate déshyrogénase
PEP : phosphoénolpyruvate
PG : prostaglandine
PGAM : phosphoglycérate mutase
PK : phosphokinase
PKC : *protein kinase C*
Pou5f1 : *POU class homeobox 1*
PPP : *pentose phosphate pathway*
RBPJ : *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*
Sbno : *strawberry notch*
Sox : *sex determining region Y box*
SPECC : *sperm antigenwith calponin homology and coiled-coil domains*
Stk : *serine threonine kinase*
Taz : *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*
TE : trophectoderme
TEE : *trophectoderm enhancer*
Tead4 : *TEA domain transcription factor 4*
TEPs : *trophectodermal projections*
TGFβ : *transforming growth factor beta*
TRAF : *tumor necrosis factor receptor associated factor*
Vegf : *vascular endothelial growth factor*
Yap : *yes associated protein*
ZO : *zonula occludens*

Introduction

Le développement embryonnaire désigne le passage de la cellule-œuf issue de la fécondation à un embryon autonome. Il est jalonné d'étapes dont la trame globale reste assez similaire pour les mammifères : segmentation, blastulation, gastrulation, organogénèse.

Des anomalies lors de ces étapes peuvent altérer la viabilité de l'embryon. Connaître et comprendre le déroulement du développement embryonnaire et ses mécanismes permettrait de déterminer les caractéristiques d'un embryon apte à se développer en individu fonctionnel. De la sorte, il serait possible de mieux reconnaître à un stade très précoce un embryon viable d'un non-viable, une technique utile notamment lors de la mise en place d'un projet de transfert embryonnaire chez le bovin. Cependant, cette opération est coûteuse pour l'éleveur en comparaison avec une insémination classique, et la fiabilité du contrôle de la qualité des embryons peut encore être améliorée.

Des travaux de recherche sont donc en cours avec pour but de trouver de nouveaux critères visant à discriminer plus efficacement les embryons viables des autres. Plusieurs études portent particulièrement sur les stades morula, où l'embryon de 8 à 16 cellules subit le phénomène de compaction, et blastula, caractérisée par la formation d'une cavité entre les cellules chez les mammifères. Des mécanismes variés et intriqués sont à l'origine des transformations menant à ces deux stades, tant au niveau biomoléculaire que physico-chimique. Ceux-ci, ainsi que l'ordre dans lequel ils se déroulent et la hiérarchie existante entre eux ne sont encore connus que partiellement et, surtout, ils ne sont pas intégrés dans une vision globale de l'embryon.

Notre étude a pour objectif de proposer un état des lieux des connaissances sur les mécanismes à plusieurs échelles qui permettent le développement de l'embryon entre le stade morula et le stade blastula, et leur importance relative.

Dans un premier temps, nous allons présenter la chronologie globale des événements importants qui affectent l'embryon jusqu'à la formation de la blastula avec les marqueurs moléculaires principaux impliqués dans ces transformations cellulaires. Nous étudierons ensuite plus particulièrement la morula, et les mécanismes qui mènent à sa formation, tant au niveau physique et chimique qu'au niveau biomoléculaire et métabolique, puis enfin la blastula, sous des angles similaires.

Première partie : Le développement embryonnaire précoce

Il s'agira dans un premier temps de décrire la biologie du développement embryonnaire précoce, en rappelant les événements majeurs qui s'y déroulent depuis la fécondation jusqu'à l'implantation de l'embryon dans l'endomètre maternel, période souvent décrite comme le développement embryonnaire précoce ou pré-implantatoire.

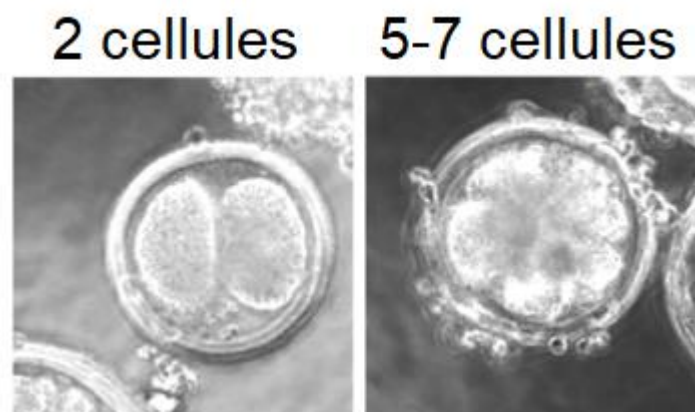
1. Déroulé des événements cellulaires

Lors de la fécondation, le contact entre le spermatozoïde et la zone pellucide qui entoure l'ovocyte déclenche la libération de granules corticales et le durcissement de la zone pellucide, empêchant la polyspermie. La fusion des membranes du spermatozoïde et de l'ovocyte permet le rapprochement des deux noyaux, et ainsi la poursuite des événements génétiques entamés avant la rencontre. Les grandes étapes à partir de la fécondation chez le mammifère et en particulier chez le bovin sont expliquées ci-après et résumées dans la Figure 2 jusqu'au stade blastula.

A. La segmentation

Après la fécondation, la cellule-œuf nouvellement formée subit une série de divisions cellulaires désignées sous le nom de segmentation (Figure 1). La première division intervient environ 24h après ovulation chez le bovin, un peu plus tardivement *in vitro* (26 à 29h) (Laurincík *et al.*, 1998). Les premières divisions sont caractérisées par la réplication du contenu nucléaire avec conservation du volume total de l'embryon, et donc diminution de la taille des cellules. En l'absence de croissance cellulaire, le métabolisme de l'embryon à ce stade très précoce stagne et est relativement faible (*in vitro*) en comparaison avec les stades suivants (Thompson *et al.*, 1996). Les cellules qui sont issues des premières divisions sont sphériques. Chez les mammifères, ces mitoses sont dites holoblastiques, c'est-à-dire qu'elles concernent l'intégralité de l'embryon (par opposition aux cellules-œufs contenant du vitellus) (Peippo *et al.*, 2011 ; Hasley *et al.*, 2017).

Figure 1 : premières divisions cellulaires de l'embryon de bovin (microscopie à fond clair) (Santos Monteiro *et al.*, 2021).



B. Formation de la morula

L'embryon prend le nom de morula après réalisation d'une série de phénomènes morphogénétiques présentés succinctement ci-après.

a. Activation du génome embryonnaire

Le deuxième et le troisième cycle de divisions sont relativement rapides (stade huit cellules), le quatrième est plus lent, avec concomitamment une activation du génome embryonnaire (*embryonic genome activation* - EGA). Cela désigne la « prise de contrôle » de l'embryon sur lui-même, via le commencement de la transcription de son génome. Juste après la fécondation, ce sont les ARN et protéines maternels (appelés facteurs maternels, issus de gènes dits à « effet maternel » ou « *maternal-effect genes* ») qui permettent le bon déroulé du développement (Tadros et Lipshitz, 2009). Ce sont eux aussi qui initient l'EGA lui-même et donc la transition vers un contrôle embryonnaire du développement (Tadros et Lipshitz, 2009 ; Khan *et al.*, 2012). Le moment correspondant à l'EGA varie selon les espèces, chez les rongeurs on le situe au stade 2 cellules, entre 4 et 8 chez l'humain, et entre 8 et 16 cellules chez le bovin, et chez l'ovine également (Plusa et Piliszek, 2020). Selon les espèces, l'EGA se produit en une ou plusieurs grandes vagues de transcriptions (Tadros et Lipshitz, 2009).

b. Compaction

A partir du stade 16 cellules chez le bovin (8 cellules chez la souris), l'embryon commence également à se compacter. Cela correspond à la fois à l'internalisation de certaines cellules vers le centre de l'embryon et à la déformation des cellules les plus externes, qui de sphériques deviennent polygonales pour permettre ces internalisations. Les cellules ne sont plus aisément distinguables les unes des autres, en comparaison avec le stade pré-compaction. De la sorte l'embryon prend une forme approximativement sphérique, semblable à une mûre, et est désigné sous le nom de morula (32 cellules) (Peippo *et al.*, 2011 ; Pedersen *et al.*, 2017). Cette compaction s'effectue par le biais de forces contractiles et adhésives liées au cytosquelette et aux contacts entre cellules (Maître, 2017). Au stade 16 cellules *in vitro*, entre 0 et 4 cellules sont en position internes, c'est-à-dire sans surface en contact avec le milieu extra-embryonnaire (Watanabe *et al.*, 2014 ; Niwayama *et al.*, 2019).

Comme l'EGA, la compaction démarre plus tôt chez d'autres espèces de mammifères, telles que la souris (dès le stade 8 cellules) et l'humain (entre 8 et 16) (Plusa et Piliszek, 2020).

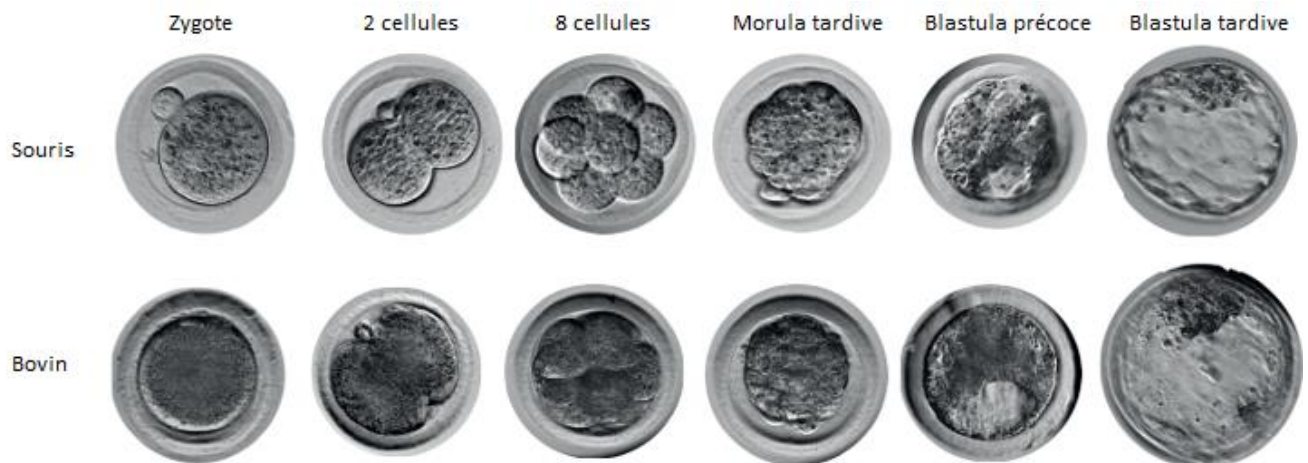
c. Polarisation

Conjointement à la compaction (stade 16 cellules), une polarisation de certaines cellules se met en place. On observe sur les surfaces qui ne sont pas en contact avec d'autres cellules, donc face au milieu extérieur, la formation d'un domaine apical concentré en protéines typiques de la polarisation (c'est-à-dire qui seront retrouvées également dans les domaines polaires d'autres types de cellules que les blastomères) (Louvet-Vallée *et al.*, 2001 ; Vinot *et al.*, 2005). Ce domaine est également caractérisé par la formation de microvillosités (Louvet-Vallée *et al.*, 2001). Ainsi, des cellules polarisées émergent, avec un domaine apical différent en termes de morphologie et de composition moléculaire de leur domaine basolatéral, tandis que d'autres cellules, celles qui sont internalisées, restent non polarisées. Les divisions cellulaires des cellules polaires peuvent

produire deux cellules-filles polaires (division symétrique) ou bien une polaire et une apolaire (division asymétrique) (Sasaki, 2015).

Bien que concomitantes, et impliquant des protéines communes, la polarisation et la compaction sont des phénomènes indépendants qui ne reposent pas l'un sur l'autre (Hirate *et al.*, 2013).

Figure 2 : Stades consécutifs du développement préimplantatoire de la souris et du bovin. Images sur fond clair d'embryons *in vivo* (souris) et *in vitro* (bovin), échelle non respectée . (Plusa et Piliszek, 2020)



d. Différenciation

La polarisation et la compaction font partie des mécanismes qui déclenchent à la même période (16 cellules) les cascades de signaux qui permettent la toute première différenciation en lignages cellulaires. Ainsi les cellules externes deviendront les cellules du trophoctoderme (TE), un tissu proche d'un épithélium qui participe à la formation des annexes fœtales et notamment du placenta. D'autre part les cellules internes deviendront la masse cellulaire interne (MCI) qui forme tout l'embryon (Chazaud, 2008 ; Pedersen *et al.*, 2017). Cette première différenciation repose sur des mécanismes de signalisation moléculaire régulés par divers paramètres cellulaires, comme la position, la polarité, l'adhésion (Wennekamp *et al.*, 2013 ; Plusa et Piliszek, 2020).

Malgré cette différenciation, les blastomères de mammifères sont caractérisés par leur plasticité (Klimczewska *et al.*, 2018). Ils conservent ainsi malgré les premiers clivages la totipotence, c'est-à-dire la capacité à partir d'une cellule de former un individu entier, jusqu'au stade deux cellules pour les souris, jusqu'à huit cellules chez le bovin ((Plusa et Piliszek, 2020). Au-delà de ce stade, et jusqu'à plus de 100 cellules (chez la souris), les cellules de la MCI sont dites pluripotentes, et peuvent adopter tous les destins cellulaires mais pas former à elles-seules un individu entier (Klimczewska *et al.*, 2018).

C. Formation de la blastula

a. Croissance et prolifération cellulaire

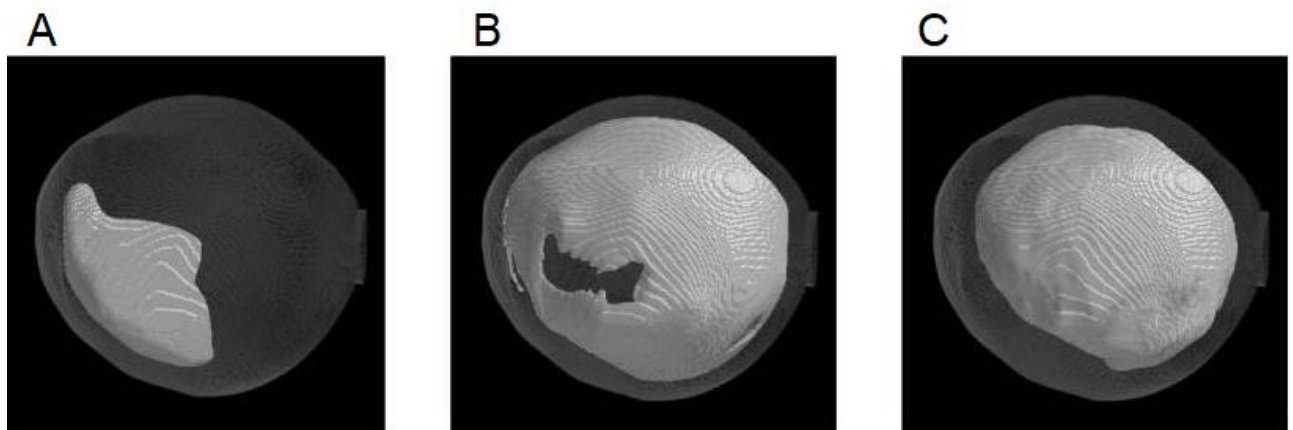
Par la suite, au niveau du jour 4 à 5 (24 à 48 cellules), les divisions cellulaires deviennent beaucoup plus rapides, et le métabolisme augmente fortement. L'embryon commence alors à croître effectivement, en taille et en masse. Aux jours 6 à 7 on parle de blastocyste expansé pour

désigner le commencement de cette croissance. Celle-ci a aussi pour conséquence d'affiner la zone pellucide qui entoure l'embryon.

b. Blastulation

Les cellules externes différenciées en cellules épithéliales du TE scellent l'embryon de l'extérieur par des jonctions serrées et des desmosomes, et développent une capacité de transport d'eau passif via des aquaporines, ainsi qu'une capacité de transport d'ions actif par des Na⁺/K⁺/ATP ases (Marikawa et Alarcon, 2012). Ceci permet une accumulation progressive de fluide sous la forme de gouttelettes dans l'embryon via des transports osmotiques et ioniques. Au fur et à mesure ces microcavités se rejoignent par échanges de fluide et permettent la formation d'une cavité de fluide à l'intérieur de l'embryon, le blastocœle (Chazaud, 2008). Sa formation, la cavitation ou blastulation, donne à l'embryon le nom de blastula ou blastocyste. Les blastomères faisant partie du TE sont autour du blastocœle, tandis que la masse interne cellulaire est repoussée à un pôle de l'embryon (Figure 3) (Pedersen *et al.*, 2017 ; Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a).

Figure 3 : Images 3D obtenues par tomographie en cohérence optique des différents composants d'une blastula de bovin (Masuda *et al.*, 2021).



Note : (A) Masse cellulaire interne, (B) trophoctoderme, (C) blastocœle.

Cette asymétrie visible de l'embryon permet de désigner le premier axe dit « abembryonnaire-embryonnaire » (A-E), où le pôle embryonnaire est celui où est concentré la MCI et le pôle abembryonnaire est celui qui est opposé au premier, avec uniquement le blastocœle et le trophoctoderme (Garbutt *et al.*, 1987).

c. Ecllosion et deuxième différenciation

Vers le jour 8 pour le bovin, et 4 pour la souris, l'expansion de la blastula fragilise la zone pellucide, et sa dissolution locale permet alors l'écllosion, c'est-à-dire l'extraction de l'embryon hors de la zone pellucide (Leonavicius *et al.*, 2018 ; Artus *et al.*, 2020). L'embryon de bovin possède alors en moyenne 300 cellules *in vivo* (contre 170 en moyenne *in vitro*) (Ushijima *et al.*, 2008).

Le deuxième différenciation du développement embryonnaire des mammifères voit la MCI se diviser en un épiblaste supérieur (Epi) et l'endoderme primitif (EPr) qui va entourer l'Epi en le séparant du blastocœle (Peippo *et al.*, 2011 ; Pedersen *et al.*, 2017). Elle est effective à la même période que l'écllosion mais les premiers marqueurs des deux tissus apparaissent dès le stade 16

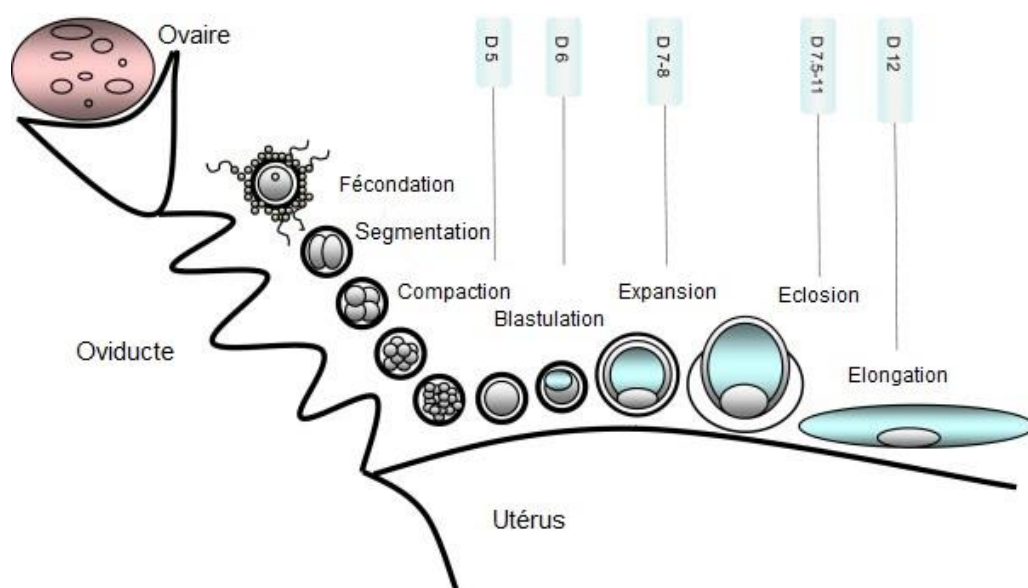
à 32 cellules (Allègre *et al.*, 2022) Les cellules précurseurs de ces deux tissus sont d'abord distribuées de manière apparemment aléatoire dans la MCI jusqu'au stade 32 cellules, avant de s'organiser en deux couches distinctes (Kang *et al.*, 2013). L'épiblaste est un tissu pluripotent qui va permettre par la suite le développement de tous les tissus embryonnaires ainsi que du mésoderme extra-embryonnaire, tandis que l'endoderme primitif ou hypoblaste est un tissu épithélial qui va former le sac vitellin (Chazaud *et al.*, 2006 ; Chazaud, 2008). De même que pour la MCI, des cellules issues de l'épiblaste ou l'endoderme, même avec des caractéristiques morphologiques déjà différentes peuvent contribuer aux trois lignées jusqu'au stade 140 cellules chez la souris (Grabarek *et al.*, 2012).

La temporalité des événements et notamment le nombre de cellules à chaque étape diffèrent selon les espèces de mammifères, avec notamment chez des espèces à période pré implantatoire plus longue comme le bovin un nombre de cellules plus grand à chaque étape que chez la souris (Plusa et Piliszek, 2020). La différenciation et le positionnement spatial des différentes couches de cellules qui forment l'embryon restent cependant cruciaux chez les mammifères en général pour le bon déroulement de la suite du développement, notamment l'implantation (Plusa et Piliszek, 2020).

D. Fin du développement embryonnaire précoce

L'embryon subit ensuite un remaniement de tous les blastomères, la gastrulation, au jour 12, puis une élongation, jusqu'au jour 14. L'implantation ou attachement correspond au moment où l'embryon libre dans l'utérus se fixe sur une paroi de l'endomètre et permet l'établissement d'une connexion entre la mère et l'embryon. Elle nécessite une communication délicate entre l'endomètre et l'embryon pour être couronnée de succès. Elle se produit à une date très variable selon les espèces, indépendamment du temps de gestation : 19-20 jours chez le bovin, 4,5 jours chez la souris, 6 à 10 jours chez l'humain (Zhang *et al.*, 2013 ; Pedersen *et al.*, 2017). Il s'agit d'un processus long qui se déroule sur plusieurs semaines chez le bovin, chez qui il démarre par une connexion entre les enveloppes fœtales et l'endomètre (Chavatte-Palmer et Guillomot, 2007 ; Peippo *et al.*, 2011). La période préimplantatoire est résumée dans la Figure 4.

Figure 4 : Termes et concepts concernant l'embryon de bovin durant la période pré-implantatoire (Peippo *et al.*, 2011)



2. Marqueurs

L'étude de l'expression de certains gènes, que ce soit de leur ARNm ou de leur protéine, permet de distinguer l'appartenance ou la future appartenance d'une cellule à une certaine lignée, que ce soit le trophoctoderme, la MCI, ou plus tard l'épiblaste ou l'hypoblaste. Souvent en effet les marqueurs sont signe de la spécialisation d'une cellule, c'est-à-dire de son engagement dans une lignée, mais pas forcément de la détermination, le stade irréversible où la différenciation est actée.

Les gènes évoqués par la suite codent pour la majorité d'entre eux pour des facteurs de transcription qui peuvent agir directement sur d'autres gènes.

Malgré la proximité organisationnelle des embryons de mammifères, notamment de souris, d'humain et de bovin, l'expression des marqueurs moléculaires des différents lignages et les scénarios transcriptionnels peuvent diverger, même si les grands axes directionnels restent conservés entre espèces (Plusa et Piliszek, 2020). Ici, les marqueurs seront présentés d'abord chez l'embryon de souris, où ils ont été le plus étudiés, puis chez le bovin, par comparaison.

A. Les marqueurs de la polarisation (et de la compaction)

En même temps que la compaction a lieu une polarisation des cellules qui bordent l'embryon, en contact avec le milieu extérieur, avec formation d'un domaine apical qui fait face au milieu extérieur différent du domaine basolatéral en contact avec les autres cellules. Cette polarisation est marquée par l'enrichissement du domaine apical en certaines protéines, en éléments du cytosquelette (microtubules, actine) et par la formation de microvillosités. Elle se déroule en deux phases : initiation et maturation décrite dans la Figure 5.

La polarisation des cellules externes se déroule également chez le bovin, avec un enrichissement apical en protéines *in vitro* en partie similaires à celles de la souris *in vivo* (Gerri *et al.*, 2020).

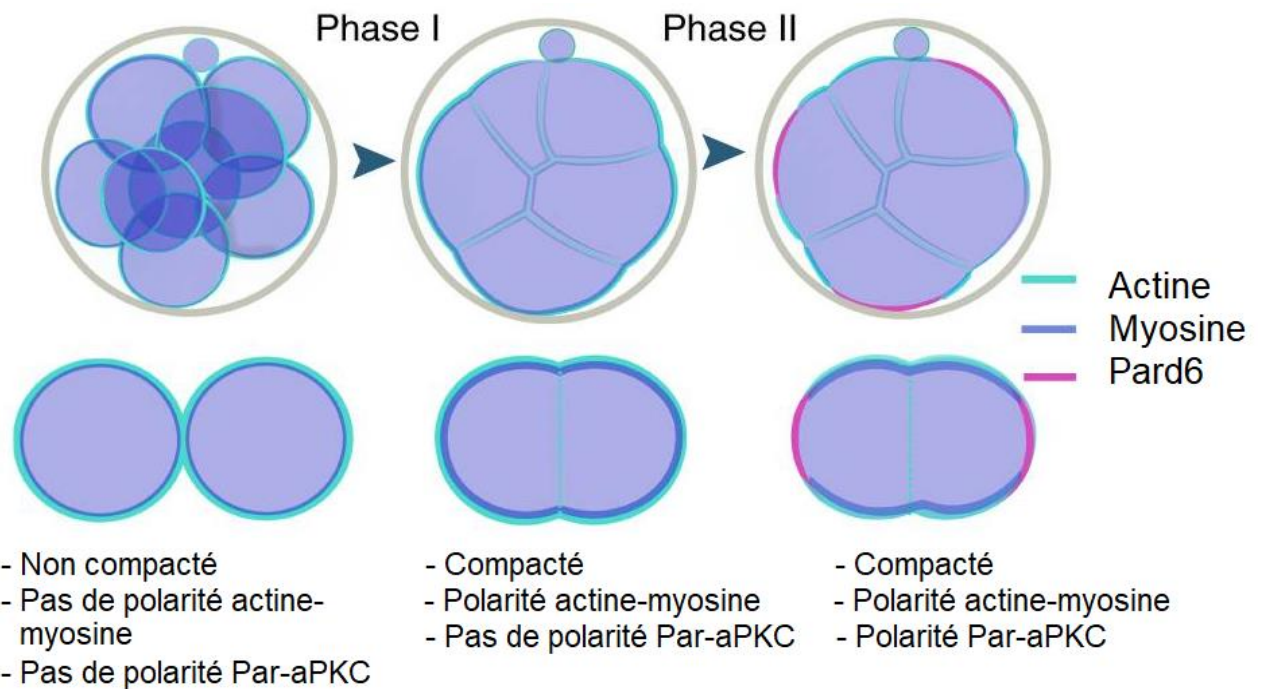
a. Complexe Rho ROCK et cytosquelette

ROCK est une sérine-thréonine kinase qui est activée via son interaction avec des GTPases RHO, d'où le nom de leur complexe Rho-ROCK, qui intervient dans la régulation de nombreux phénomènes cellulaires, dont la polarité, mais aussi la morphologie, la contraction, la division, l'expression génique (Amano *et al.*, 2010). La première phase de l'établissement de la polarité repose sur le recrutement du cytosquelette d'actine-myosine par Rho-ROCK, dont l'inhibition empêche la polarisation (Amano *et al.*, 2010 ; Zhu *et al.*, 2017 ; Saadeldin *et al.*, 2021). Les microtubules agissent par ailleurs de manière redondante (et moins importante) par rapport à l'actine myosine (Zhu *et al.*, 2017). Enfin le cytosquelette d'actine-myosine participe activement à la compaction de l'embryon comme cela sera développé dans le chapitre suivant.

b. Système Par-aPKC

Le système Par-aPKC (*Partinoning defective-atypical protein kinase C*) permet dans de nombreuses cellules dont les blastomères l'établissement d'une polarité (Hong, 2018). En particulier ce sont Par3 et Pard6b qui, associées à aPKC promeuvent la deuxième phase de l'organisation du domaine apical notamment via des interactions avec les microtubules et l'actine-myosine préétablis (Vinot *et al.*, 2005 ; Zhu *et al.*, 2017).

Figure 5 : Résumé des deux phases de la polarisation chez la souris au stade huit cellules. (Zhu et al., 2017).



Note : Durant la première phase (initiation), l'embryon commence à se compacter et l'actine-myosine se polarise au domaine apical. Pendant la seconde phase (maturation), l'embryon est compacté et le domaine apical entame une maturation et les composants du système Par se polarisent à leur tour.

c. Ezrine

L'ezrine est une protéine retrouvée dans diverses cellules où se forment des microvillosités, notamment dans les cellules intestinales où elle a été découverte (Louvet-Vallée et al., 2001). Elle permet des interactions entre membrane et cytosquelette en se liant aux filaments d'actine. Durant la période de polarisation, l'ezrine est présente sur toute la surface des membranes des cellules de l'embryon et se relocalise ensuite dans le domaine apical des cellules externes, recrutée par les filaments d'actine (Zhu et al., 2020). L'ezrine est ensuite plus particulièrement dans les microvillosités au fur et à mesure qu'elles apparaissent, suggérant un rôle dans la genèse de ces microvillosités (Louvet-Vallée et al., 2001 ; Zhu et al., 2020). Enfin, l'enrichissement en ezrine du domaine apical a pour effet de le rigidifier, ce qui modifie sa réaction aux mouvements du cytosquelette et participe au phénomène de compaction (Y. Liu et al., 2012).

d. Jonctions serrées

La différenciation entre les deux domaines, apical et basolatéral, est également marquée par leur séparation par des jonctions serrées. Celles-ci empêchent le démantèlement des deux domaines en bloquant la fluidité membranaire (Mihajlović et Bruce, 2017). La formation et la maturation correcte de ces jonctions est permise notamment par le système Par-aPKC (Mihajlović et Bruce, 2017).

La polarisation des blastomères fait partie des événements qui participent à la différenciation TE/MCI. Ainsi lorsque la polarité cellulaire est perturbée, l'expression des marqueurs du

trophectoderme est diminuée tandis que celle des marqueurs de la MCI est augmentée, il s'agit donc d'un élément essentiel à la formation du trophoctoderme (Alarcon, 2010).

B. Les marqueurs de la première différenciation

La MCI d'abord puis l'épiblaste ensuite sont caractérisés par des cellules pluripotentes, c'est-à-dire qui peuvent former n'importe quel type de cellule (à distinguer des cellules totipotentes, qui peuvent former un individu entier). Les gènes qui caractérisent la formation de ces deux entités ont donc des fonctions axées sur le maintien de la pluripotence et l'évitement de la différenciation. A l'inverse les gènes permettant la différenciation en TE vont déclencher des modifications cellulaires et réprimer la pluripotence. Les marqueurs principaux sont résumés dans la Figure 6.

a. Marqueurs de la masse cellulaire interne

La MCI est marquée principalement par l'expression de gènes qui permettent de maintenir sa pluripotence. Trois gènes principaux émergent, avec tout d'abord Oct4 (*octamer binding transcription factor 4* aussi appelé Pou5f1, *POU class 5 homeobox 1*), réprimé dans le TE et donc exprimé progressivement seulement dans les cellules devenant la MCI, permet le maintien d'un lignage pluripotent (Palmieri *et al.*, 1994 ; Nichols *et al.*, 1998). Oct4 n'est pas indispensable pour l'initiation de la pluripotence (Wu et Schöler, 2014).

D'autre part, Sox2 (*SRY [Sex determining region Y] box 2*) est un autre régulateur de la pluripotence indispensable à la formation de la MCI puis de l'épiblaste (Avilion *et al.*, 2003). Il est détecté de manière extrêmement précoce avant l'EGA puisqu'il existe déjà dans l'ovocyte (où il est d'origine maternelle) (Keramari *et al.*, 2010). Sox2 et Oct4 sont capables de se lier, et d'exercer un rétrocontrôle positif sur eux-mêmes pour maintenir l'auto-renouvellement des cellules pluripotentes (Okumura-Nakanishi *et al.*, 2005 ; Masui *et al.*, 2007).

Le complexe Sox2-Oct4 peut également se lier au promoteur de Nanog, dernier des trois gènes principaux qui permet la formation de la MCI et de l'épiblaste, exprimé uniquement dans la MCI et après la compaction (Chambers *et al.*, 2003 ; Mitsui *et al.*, 2003 ; Rodda *et al.*, 2005). Sox2-Oct4 n'est pas suffisant pour initier l'activation du gène Nanog mais la liaison avec le promoteur permet le maintien de son expression et la poursuite de la formation des lignées pluripotentes (Rodda *et al.*, 2005). Nanog est également indispensable au développement de l'embryon, sans lequel il n'est pas viable (Silva *et al.*, 2009).

Nanog, Oct4 et Sox2 sont ainsi les marqueurs principaux de la masse cellulaire interne.

b. Marqueurs du trophoctoderme

Comme pour la MCI, trois gènes principaux émergent parmi les marqueurs du trophoctoderme, ainsi qu'une famille de facteurs de transcriptions étudiée plus récemment.

Le gène *Caudal related homeobox 2* (Cdx2) permet la différenciation en TE, ainsi que la répression d'Oct4 dans le TE, qui lui-même réprime Cdx2 dans la MCI (Niwa *et al.*, 2005). En l'absence de Cdx2, Nanog est également exprimé de manière ectopique dans les cellules externes, suggérant une répression de Nanog également par Cdx2 (Strumpf *et al.*, 2005 ; Ralston et Rossant, 2008). Cdx2 n'est pas à l'origine de la « décision » de différenciation en TE, il en est plutôt l'effecteur, et agit en aval de cette décision (Ralston et Rossant, 2008). En effet, sa suppression n'empêche pas la formation du blastocœle, mais à des stades plus tardifs certains

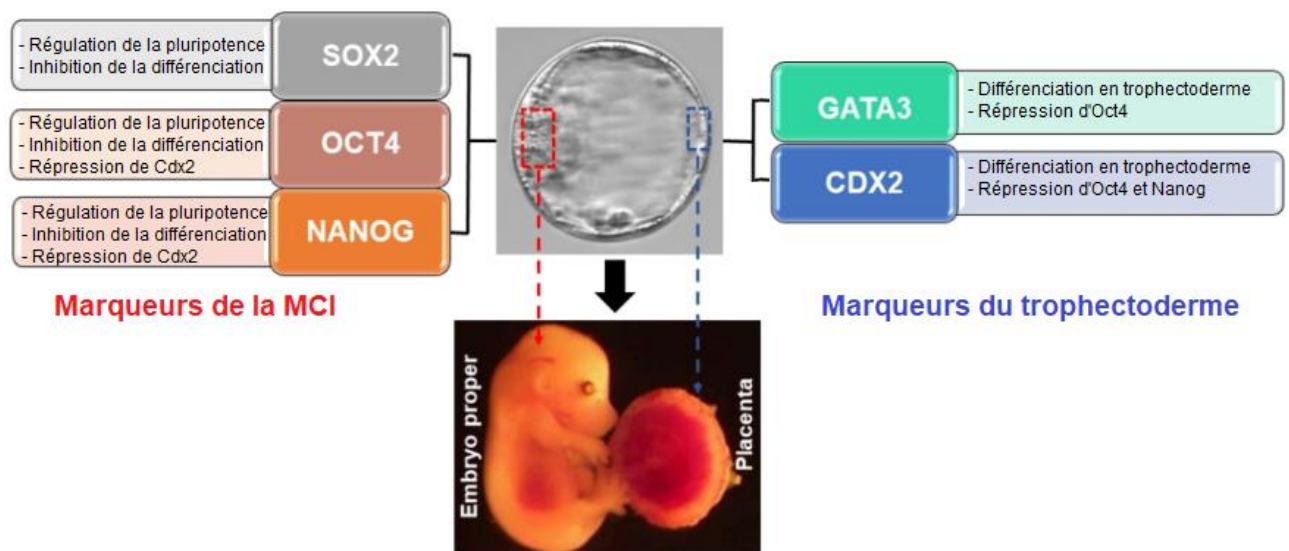
composants des jonctions serrées qui caractérisent les cellules du TE sont désorganisées, et la cavité s'effondre (Strumpf *et al.*, 2005 ; Ralston et Rossant, 2008). Dans la MCI, Cdx2 est réprimé par Oct4 et Nanog (Karasek *et al.*, 2020).

Le gène *GATA binding protein 3* (Gata3) joue un rôle proche, ciblé par les mêmes gènes, et ayant des cibles communes à Cdx2 (comme Oct4, qu'il réprime également) et des cibles indépendantes décrites notamment par Ralston *et al.* (2010). Gata3 et Cdx2 sont restreints au trophoctoderme (Ralston *et al.*, 2010). Gata3 a par ailleurs un effet de régulation direct sur Cdx2 en se liant sur un intron de Cdx2 (Home *et al.*, 2009), même s'il n'est pas indispensable à son expression (Ralston *et al.*, 2010). Cdx2 et Gata3 sont les marqueurs principaux du trophoctoderme, mais d'autres existent, comme Eomes ou la famille Klf.

Le gène Eomes (Eomésodermine) a quant à lui une action pro-TE à la fois parallèle à Cdx2, avec une action redondante de différenciation, et en aval de Cdx2, dont il est une cible (Niwa *et al.*, 2005). Son expression est réduite en l'absence de Cdx2, suggérant une régulation positive par ce dernier (Strumpf *et al.*, 2005). Selon Strumpf *et al.* (2005), les embryons mutés sur les gènes Eomes et Cdx2 sont incapables de former le trophoctoderme qui permet la rétention de liquide, donc la cavitation et la formation de la blastula et sont voués à la mort (*in vivo*).

Enfin, la famille des *Krüppel-like-factors* (Klf) a été récemment étudiée à la lumière des premières différenciations, révélant que Klf4 et 5 ont un rôle redondant dans l'émergence des deux lignées, agissant en amont de Nanog et de Cdx2 (Kinisu *et al.*, 2021). Cependant, si Klf5 est exprimé de manière ubiquitaire au stade préimplantatoire, il est plus présent dans les cellules externes au stade blastula (Lin *et al.*, 2010). Son absence chez les embryons mutés n'empêche pas la formation de la cavité mais son expansion est diminuée (Lin *et al.*, 2010).

Figure 6 : Récapitulatif des marqueurs principaux des deux tissus obtenus après la première différenciation embryonnaire (Karasek *et al.*, 2020).



c. Chez le bovin

Les études précédemment évoquées ont été menées sur la souris. En ce qui concerne le bovin, quelques spécificités apparaissent, du moins pour les embryons produits *in vitro* qui concernent la majorité des études.

Chez les embryons de bovins produits *in vitro*, Sox2 et Nanog sont compartimentés plus précocement qu'Oct4 dans la MCI, qui lui est coexprimé avec Cdx2 dans le TE plus longtemps, jusqu'au stade de l'expansion de blastocyste (Berg *et al.*, 2011 ; Sakurai *et al.*, 2016). La répression mutuelle entre Cdx2 et Oct4 observée chez la souris est moins flagrante (Berg *et al.*, 2011) voire absente (Sakurai *et al.*, 2016) selon les auteurs. Oct4 chez le bovin n'est ainsi pas nécessaire à la répression de Cdx2 dans la MCI (Simmet *et al.*, 2018), et ne possède d'ailleurs pas la région régulatrice nécessaire pour le faire (Berg *et al.*, 2011).

Sox2 et Nanog sont donc meilleurs candidats pour la gestion de la pluripotente au moment de la première différenciation (Khan *et al.*, 2012). Les trois (avec Oct4) restent cependant des biomarqueurs importants de la MCI (Goissis et Cibelli, 2014 ; Sharma *et al.*, 2021).

Du côté du TE, Gata3 est comme pour la souris indispensable à la différenciation en trophoctoderme, ce qui n'est pas le cas de Cdx2, bien qu'il soit exprimé dans le TE malgré tout (Sakurai *et al.*, 2016 ; Negrón-Pérez et Hansen, 2017). Cdx2 semble cependant détenir un rôle dans la mesure où les embryons de bovins (*in vitro*) dans lesquels il est invalidé montraient moins de prolifération cellulaire, et où comme pour la souris, Cdx2 semble participer à la régulation de Nanog (Sakurai *et al.*, 2016).

Par ailleurs, l'interféron τ (IFNT) est un marqueur du trophoctoderme spécifique aux ruminants, qui est régulé par Cdx2 (Sakurai *et al.*, 2009).

C. Les marqueurs de la seconde différenciation

Les cellules caractérisées comme appartenant à l'épiblaste ou à l'endoderme apparaissent entre le stade 16 et le stade 32 cellules (Allègre *et al.*, 2022). Comme à l'étape précédente, les marqueurs de l'épiblaste sont en majorité des gènes promouvant la pluripotente et réprimant la différenciation, tandis que les gènes de l'endoderme initient la différenciation.

a. Gènes de l'épiblaste

Certains des gènes nécessaires à la formation de l'épiblaste ont déjà été évoqués plus haut. En premier lieu Nanog, qui devient encore plus central à cette étape du développement, de par sa nécessité à la fois pour l'initiation de l'épiblaste et pour celle de l'endoderme (Allègre *et al.*, 2022). Nanog est d'abord exprimé par toutes les cellules de la MCI avant d'être progressivement restreint aux précurseurs de l'épiblaste (Silva *et al.*, 2009).

Alors qu'à l'étape précédente le maintien de Nanog dépend de l'expression de Sox 2 et Oct4, la situation s'inverse, l'expression de Sox2 devient dépendante de Nanog (Allègre *et al.*, 2022), et l'absence d'Oct4 n'empêche pas le maintien de l'expression de Nanog (Frum *et al.*, 2013). De plus, Nanog permet aussi de potentialiser les interactions entre Sox2 et Oct4, entre Sox2 et Klf4 (Allègre *et al.*, 2022). Nanog est plutôt requis pour l'initiation de l'épiblaste que pour son maintien (Chambers *et al.*, 2003).

Nanog agit aussi en amont d'un autre marqueur, Fgf4 (*Fibroblast Growth Factor 4*) et de ses récepteurs de la famille Fgfr, en particulier Fgfr2 et Fgfr1 (Kang *et al.*, 2013 ; Soszyńska *et al.*, 2019). Fgf4 est sécrétée par les cellules précurseurs de l'épiblaste et permet la différenciation en endoderme des cellules voisines, mais il reste un marqueur des cellules épiblastiques (Chazaud *et al.*, 2006 ; Kang *et al.*, 2013). Nanog est nécessaire pour permettre l'expression de Fgf4 et l'augmenter jusqu'aux niveaux suffisants pour initier les programmes de différenciation dans les

cellules avoisinantes (Frankenberg *et al.*, 2011 ; Allègre *et al.*, 2022). Fgf4 est aussi dirigé par Oct4, qui permet sa production conjointement à Nanog (Nichols *et al.*, 1998 ; Frum *et al.*, 2013)

Oct4 est nécessaire à la répression Nanog-dépendante de Gata6, un marqueur de l'endoderme, dans certaines cellules de la MCI (Frum *et al.*, 2013). Gata6, est cependant également absolument nécessaire à la formation de l'épiblaste (Allègre *et al.*, 2022)

Ainsi, Sox2, Oct4, Nanog et Fgf4 sont des marqueurs de l'épiblaste.

b. Gènes de l'endoderme primitif

Gata6 est le marqueur clef des cellules de l'endoderme (Cai *et al.*, 2008 ; Schrode *et al.*, 2014 ; Bessonard *et al.*, 2016). Au départ, toutes les cellules de la MCI l'expriment, conjointement à Nanog, puis Gata6 est restreint progressivement aux cellules de l'endoderme (Chazaud *et al.*, 2006 ; Schrode *et al.*, 2014). Les cellules sont considérées précurseurs de l'Epi quand elles expriment préférentiellement Nanog et précurseurs de l'EPr quand elles expriment préférentiellement Gata6 (Chazaud *et al.*, 2006 ; Guo *et al.*, 2010). Ces deux types de cellules semblent réparties aléatoirement, en une disposition dite en « poivre et sel », dans la MCI au stade 32 cellules, avant la différenciation où elles sont organisées en couches (Chazaud *et al.*, 2006). L'évolution de la présence des marqueurs dans ces cellules se fait par exclusion mutuelle (Plusa *et al.*, 2008 ; Silva *et al.*, 2009). Ainsi Nanog inhibe l'expression de Gata6 et réciproquement (Frankenberg *et al.*, 2011 ; Schrode *et al.*, 2014 ; Allègre *et al.*, 2022).

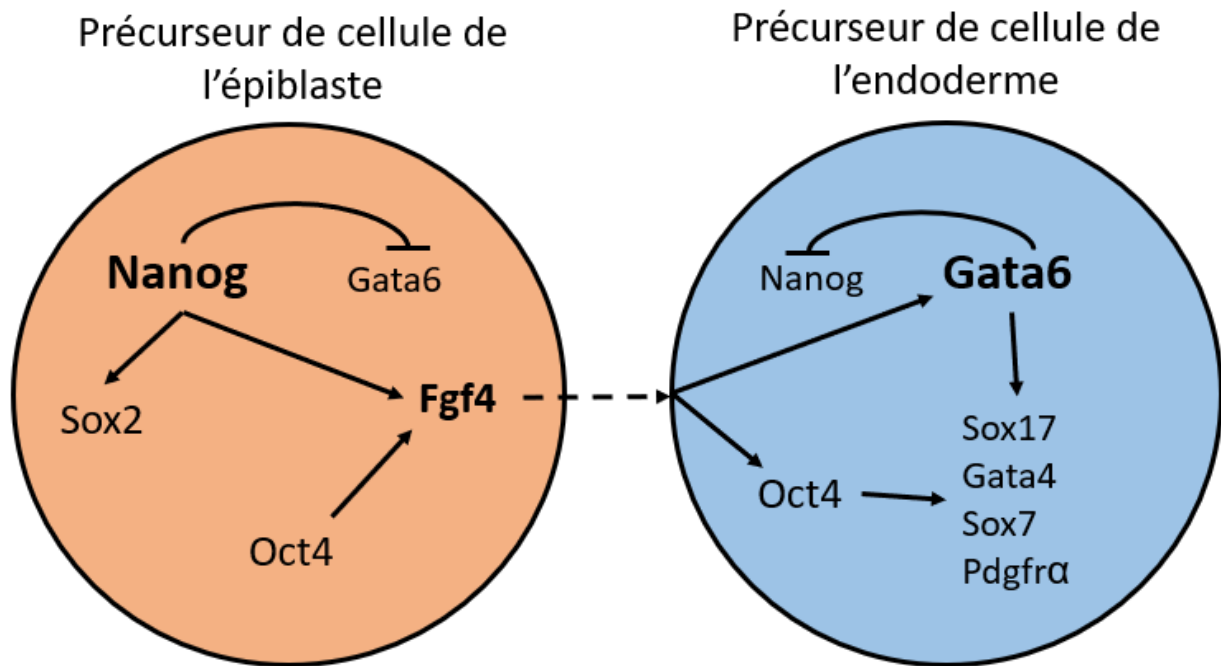
Le maintien de l'expression de Gata6 requiert la présence de Fgf4. En l'absence de Fgf4, certains marqueurs de l'endoderme sont présents mais pas autant activés que sur un embryon sauvage, comme Gata6 et Sox17 (Guo *et al.*, 2010), tandis que d'autres plus en aval sont complètement absents, comme Gata4 ou Sox7 (Kang *et al.*, 2013). Globalement, Fgf4 est nécessaire pour la poursuite correcte du développement de l'endoderme, il permet la distribution poivre et sel des précurseurs Epi et Pre. De manière équivalente, puisque la production de Fgf4 dépend de Nanog, celui-ci est également indispensable à la formation de l'EPr (Silva *et al.*, 2009 ; Frankenberg *et al.*, 2011 ; Kang *et al.*, 2013 ; Allègre *et al.*, 2022).

Oct4 agit également en aval de Fgf4, dans les cellules voisines de cellules productrices de Fgf4, en réponse à ce signal exogène, Oct4 permet l'activation de multiples gènes de l'endoderme (Frum *et al.*, 2013). Une faible activation est possible indépendamment d'Oct4 (Frum *et al.*, 2013 ; Mulas *et al.*, 2018).

Enfin le marqueur Pdgfra (*platelet derived growth factor receptor alpha*) est un autre marqueur spécifique de l'endoderme, dont l'expression dépend de la présence de Gata6 (Artus *et al.*, 2010). Sa présence pourrait à la fois permettre la prolifération des cellules de l'endoderme et réguler l'importance de l'épiblaste, cependant, son rôle exact dans la formation de l'endoderme n'est pas déterminé et potentiellement non indispensable (Artus *et al.*, 2010 ; Lin *et al.*, 2017).

Ainsi, Pdgfra, Gata6, Gata4, Sox7 et Sox17 sont des marqueurs de l'endoderme primitif. La séquence de leur activation semble être la suivante : Gata6, puis Sox17, puis Gata4 et enfin Sox7 (Artus *et al.*, 2011). La Figure 7 résume les relations entre les marqueurs de l'épiblaste et ceux de l'endoderme primitif.

Figure 7 : Schéma des interactions entre les marqueurs de l'épiblaste et ceux de l'endoderme primitif.



c. Chez le bovin

Chez le bovin, Nanog est également nécessaire à la formation mais surtout au maintien de l'épiblaste, son absence diminue l'expression d'autres marqueurs épiblastiques comme Sox2 (Khan *et al.*, 2012 ; Goissis et Cibelli, 2014 ; Ortega *et al.*, 2020). De la même manière que chez la souris, le trio Nanog-Oct4-Sox2 est nécessaire au maintien de la pluripotence, dans la MCI puis dans l'épiblaste (Berg *et al.*, 2011 ; Khan *et al.*, 2012 ; Goissis et Cibelli, 2014 ; Ortega *et al.*, 2020). En outre Nanog est nécessaire à l'exclusion progressive de Gata6 des cellules destinées à l'épiblaste (Khan *et al.*, 2012 ; Simmet *et al.*, 2018).

En revanche son rôle dans l'initiation de l'endoderme semble moins caractérisé que chez la souris (Ortega *et al.*, 2020). La conversion de cellules précurseurs en cellules de l'EPR par sécrétion de Fgf4 par les cellules épiblastiques semble dépendre de Nanog comme chez la souris, et l'expression de Sox17 médiée par Fgf4 est bien dépendante de Nanog (Springer *et al.*, 2021). Cependant, contrairement à ce qui se déroule chez la souris, Sox17 peut être exprimé chez le bovin malgré l'absence complète de Nanog, il semble exister un autre facteur déclenchant l'expression de ces marqueurs de l'endoderme (Springer *et al.*, 2021).

L'expression de Nanog est par ailleurs dépendante d'Oct4 ce qui est en fort contraste avec l'embryon de souris (Sakurai *et al.*, 2016 ; Simmet *et al.*, 2018). Oct4 est aussi nécessaire pour l'expression de Fgf4, cette fois de manière similaire à ce qui est observé chez la souris (Sakurai *et al.*, 2016).

Dans l'endoderme, Gata6 et Sox17 font aussi partie des marqueurs principaux chez le bovin (Khan *et al.*, 2012 ; Verónica M Negrón-Pérez et Hansen, 2017 ; Kohri *et al.*, 2019).

Le développement embryonnaire préimplantatoire est marqué d'étapes morphogénétiques majeures : la formation de la morula, avec la compaction et la différenciation en masse cellulaire interne et trophoctoderme, puis la formation de la blastula, avec apparition du blastocœle, deuxième différenciation cellulaire en épiblaste et endoderme, et l'éclosion de l'embryon. Des marqueurs moléculaires spécifiques aux interactions complexes sont le reflet de ces étapes.

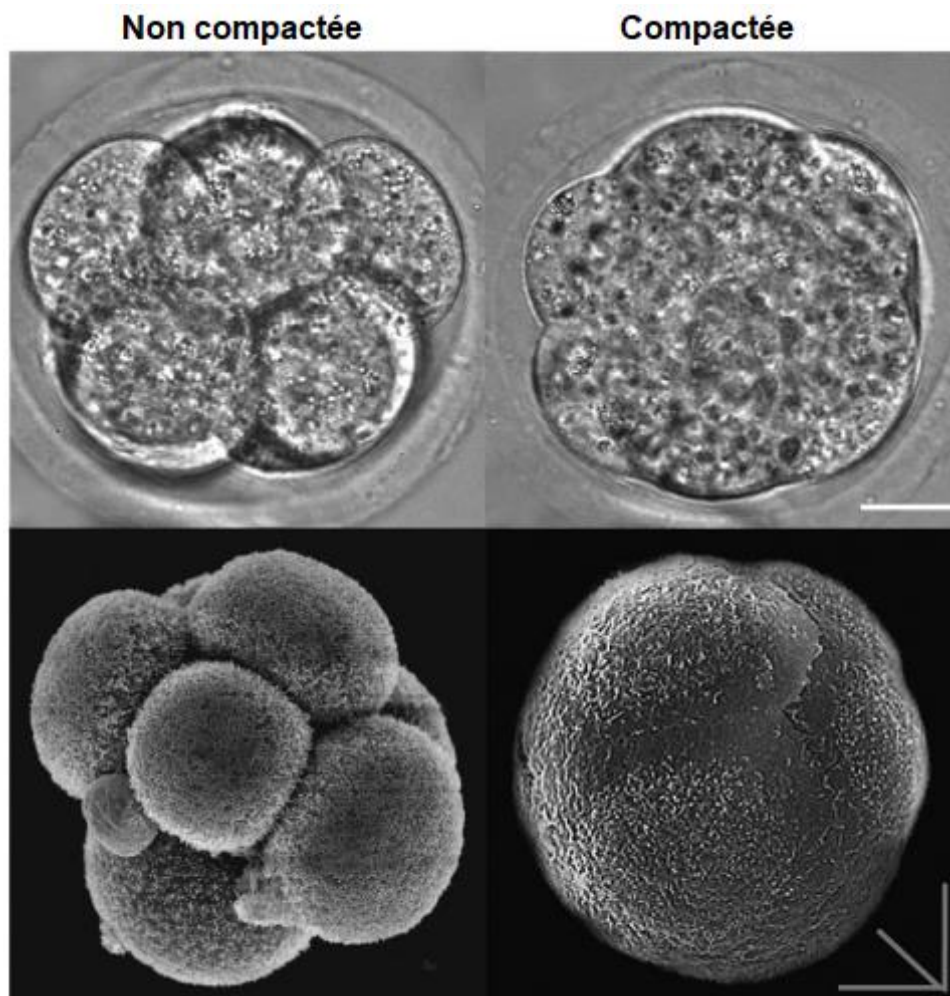
Deuxième partie : La formation de la morula

Dans cette partie, nous rentrerons plus en détail dans les phénomènes physiques, chimiques et moléculaires qui jalonnent la formation de la morula, en particulier la compaction et la première différenciation cellulaire.

1. La compaction

L'une des premières étapes morphogénétiques de l'embryon de mammifère est la compaction. Ce processus démarre dès le stade 8 cellules chez la souris (environ 2,5 jours après la fécondation, et dès le stade 16 cellules chez le bovin (environ 5 jours après la fécondation) et dure autour de 10 heures (Peippo *et al.*, 2011 ; White *et al.*, 2016). L'embryon, comme sur la Figure 8, a l'apparence d'une grappe de raisins, et adopte alors une forme plus compacte, plus sphérique (Peippo *et al.*, 2011 ; White *et al.*, 2016 ; Pedersen *et al.*, 2017).

Figure 8 : Modifications morphologiques chez l'embryon préimplantatoire de souris lors de la compaction, au microscope optique (haut) et électronique (bas) (White *et al.*, 2016).



Certaines cellules sont internalisées et perdent le contact avec le milieu extérieur, et il est plus difficile de distinguer les cellules les unes des autres (Peippo *et al.*, 2011 ; White *et al.*, 2016 ; Pedersen *et al.*, 2017). La compaction permet de juger de la qualité de l'embryon : l'exclusion d'une ou plusieurs cellules lors de ce processus serait associée à une qualité moindre, de même qu'une compaction précoce (chez l'humain) (Ebner *et al.*, 2009).

A. Mécanismes physico-chimiques

« La déformation de l'embryon se fait sous l'effet de forces, souvent générées par les cellules qui le composent » (Maître, 2017). Ainsi étudier les différentes forces qui interviennent sur l'embryon et ses cellules lors de la compaction permet de comprendre le déroulement de celle-ci. La compaction comprend deux phénomènes : la déformation des cellules qui arrondit la forme globale de l'embryon, et l'internalisation de certaines cellules.

D'un point de vue géométrique, si les cellules gardaient leur forme sphérique tout en restant en contact les unes avec les autres, une seule cellule pourrait être internalisée au stade 13 cellules, et au-delà les contacts cellulaires ne pourraient pas être maintenus (White *et al.*, 2017). Il s'agit d'un problème du type « nombre de Newton », problème du plus grand nombre de sphères pouvant coexister dans un espace sans se chevaucher, toutes en contact avec une sphère commune (Musin, 2006 ; White *et al.*, 2017). La compaction est la solution embryonnaire à ce problème, avec une déformation des cellules qui permet de produire de nouvelles cellules, d'en internaliser certaines et de maintenir les contacts entre les blastomères (White *et al.*, 2017).

a. Déformation des cellules et loi de Young-Dupré

Les modèles descriptifs du processus de compaction en termes de forces se rapprochent de ceux utilisés pour décrire les interactions entre des bulles de savon, les forces impliquées sont des tensions superficielles qui déforment les cellules (Maître, 2017 ; Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a).

Ainsi, dans le cas simplifié de deux blastomères de souris côte-à-côte sur une surface plane on peut définir une tension liée au contact avec le milieu extra-embryonnaire γ_{cm} , souvent dite tension corticale, ainsi qu'une tension liée au contact entre les deux cellules γ_{cc} . Enfin dans cet exemple on peut définir une tension liée au contact cellule-surface γ_{cs} . Ces forces définissent des angles de contact θ_{cm} et θ_{cs} tels que décrits dans la Figure 9 (Maître, 2017 ; Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a).

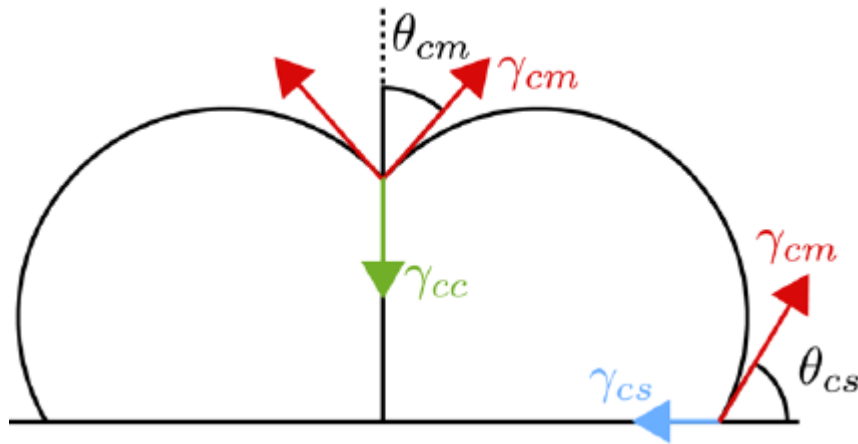
D'après la deuxième loi de Newton, à l'équilibre des forces on a, au niveau du contact cellulaire :

$$\frac{\gamma_{cc}}{2\gamma_{cm}} = \cos \theta_{cm}$$

Cette formule est la relation de Young-Dupré qui décrit notamment les angles des ménisques formés par les liquides (Maître, 2017 ; Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a). Elle permet de définir un paramètre de compaction α tel que :

$$\alpha = \frac{\gamma_{cc}}{2\gamma_{cm}} = \cos \theta_{cm}$$

Figure 9 : Adhésion de deux cellules reposant sur une surface et équilibre des forces (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021)



Le paramètre de compaction tend vers 0 lorsque les cellules sont compactées et vers 1 quand elles ne sont pas du tout déformées (Maître, 2017 ; Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a).

L'étude des tensions de surface et au contact cellule à cellule est rendue possible par l'utilisation d'une micropipette de rayon de courbure connu, en appliquant une pression connue également sur une cellule (Maître, 2017). En utilisant la relation de Young-Laplace qui lie la différence de pression et la courbure à la tension superficielle, et en effectuant les mesures de pression sur des cellules voisines, il est possible d'obtenir γ_{cm} et γ_{cs} grâce à la relation de Young-Dupré ci-dessus (Maître, 2017).

Dès lors, il est possible de constater qu'au cours de la compaction, les tensions entre cellule et environnement extérieur double (de 200 à 400 pN/ μm) tandis que les tensions entre cellules diminuent (de 300 à 200 pN/ μm) et que la modification des deux tensions est nécessaire à la compaction complète de l'embryon (Maître, 2017). L'augmentation de la tension aux contact avec l'extérieur est plus efficace, et permet une proportion plus importante de la compaction (trois quarts) que le relâchement aux contact cellulaires (un quart) (Maître, 2017). En ce qui concerne le bovin, les études sur les modifications de tensions cellulaires sont en cours.

b. Internalisation des cellules

Outre la déformation des cellules, certaines d'entre elles sont internalisées vers le milieu de l'embryon, et perdent le contact avec l'extérieur (White *et al.*, 2016).

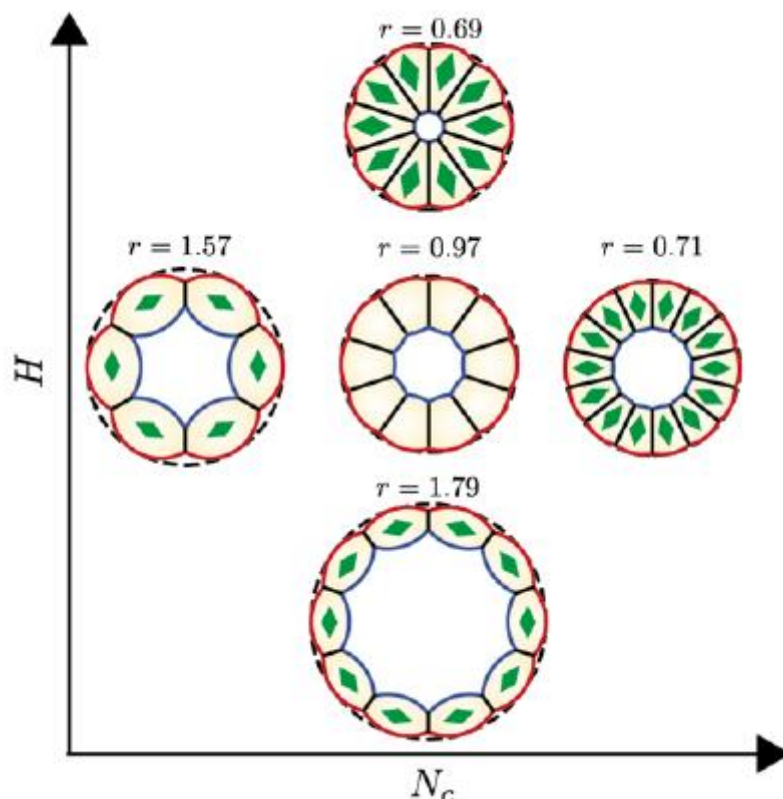
- *Production de cellules internes par divisions cellulaires*

L'internalisation des cellules a longtemps été attribuée à l'orientation du fuseau mitotique lors des divisions cellulaires (Zernicka-Goetz, 2005 ; Wennkamp *et al.*, 2013). Ainsi, pour une cellule externe, un fuseau « horizontal » donne deux cellules-filles externes (division symétrique), et un fuseau « vertical » donne une cellule externe et une interne (division asymétrique) (Watanabe *et al.*, 2014). Celui-ci suit le grand axe de la cellule et peut donc être modifié par différents phénomènes qui altèrent la forme de la cellule (Niwayama *et al.*, 2019 ; Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a). De la sorte, une déformation qui aplanit une cellule donne un fuseau plutôt

horizontal tandis qu'une cellule en colonne a un fuseau plutôt vertical (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a).

Le Verge-Serandour et Turlier (2021a) proposent ainsi d'étudier l'aspect de N_c cellules aux contacts cellulaires plats, de hauteur H et de longueur L qui définissent l'aspect des cellules $r = \frac{L}{H}$, où r vaut 1 pour une cellule ronde, est inférieur à 1 pour une cellule en colonne et supérieur à 1 pour une cellule plate (Figure 10). Ainsi, la déformation impliquée par la compaction des cellules peut modifier l'orientation du fuseau (Zernicka-Goetz, 2005 ; Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a). Plus le nombre de cellules augmente dans un espace constant (l'embryon ne croît pas à ce stade), plus les cellules se compactent, et sont susceptibles de prendre une forme de colonne et former un fuseau orienté vers le milieu de l'embryon, produisant ainsi une cellule

Figure 10 : Changement d'orientation du fuseau mitotique (losanges vert) selon le grand axe de la cellule en fonction de sa hauteur et du nombre de cellules à volume constant (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021).



interne (Zernicka-Goetz, 2005 ; Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a).

D'autre part, le domaine apical qui caractérise les cellules polarisées apparaissant en même temps que la compaction peut orienter le fuseau mitotique (Korotkevich *et al.*, 2017). En modifiant l'angle de division, le domaine apical assure son autoconservation dans l'une des deux cellules filles (Korotkevich *et al.*, 2017). Une division asymétrique permet de la sorte à la fois la distinction entre des populations de cellules internes et externes, mais aussi entre des cellules polarisées et non polarisées (Korotkevich *et al.*, 2017).

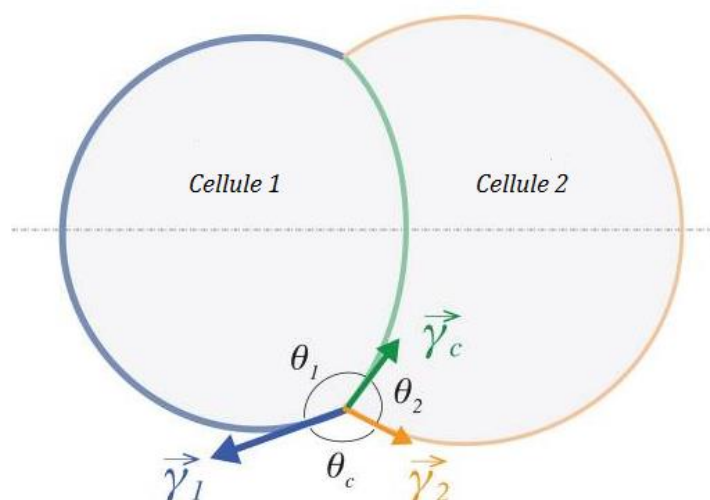
- *Internalisations de cellules par différences de contractilité*

Pourtant, en réalité (*in vitro*), lors du passage de 16 à 32 cellules, la majorité des divisions des cellules externes, qui sont plutôt planes, sont symétriques, (Watanabe *et al.*, 2014 ; Niwayama *et al.*, 2019). Dans l'embryon précoce, la forme de la cellule et sa polarité se « disputent » l'orientation du fuseau mitotique, et au stade 16 cellules, la géométrie plane l'emporte (Korotkevich *et al.*, 2017 ; Niwayama *et al.*, 2019). De plus, la proportion de cellules positionnées en interne par division cellulaire varie selon les observations, très fréquentes pour Watanabe *et al.* (2014), de l'ordre de deux tiers pour Maître (2017), mais dans tous les cas ce phénomène ne peut pas expliquer toutes les internalisations.

La contractilité supérieure de certaines cellules par rapport à d'autres pourrait en revanche expliquer les internalisations (Anani *et al.*, 2014 ; Samarage *et al.*, 2015 ; Maître *et al.*, 2016). Certaines des cellules de l'embryon précoce génèrent des ondes de contraction périodiques, à chaque pôle de l'embryon, d'une période de 80 secondes chez la souris (Maître *et al.*, 2015 ; Maître *et al.*, 2016). La présence d'un domaine apical semble par ailleurs inhiber la contractilité, car ce domaine est plus rigide et moins riche en éléments du cytosquelette qui produisent les contractions (Anani *et al.*, 2014 ; Maître *et al.*, 2016 ; Maître, 2017). Les cellules non polarisées produisent donc des contractions tandis que les cellules polarisées n'en produisent pas ou peu (Maître *et al.*, 2016). Or les tensions entre cellules sont générées en partie par la contractilité de celles-ci et une cellule moins contractile est plus déformable, génère moins de tension qu'une cellule très contractile (Anani *et al.*, 2014 ; Samarage *et al.*, 2015 ; Maître, 2017). Ces différences de tensions liées à la contractilité seraient à l'origine de l'internalisation des cellules contractiles (Anani *et al.*, 2014 ; Samarage *et al.*, 2015 ; Maître, 2017).

Maître *et al.* (2016) ont proposé de modéliser l'internalisation sous l'angle des tensions de surface subies par deux cellules côte-à-côte, avec γ_c la tension de surface au contact des deux cellules, γ_1 et γ_2 les tensions à l'interface du milieu extérieur avec la cellule 1 et la cellule 2 respectivement (Figure 11).

Figure 11 : Représentation schématique d'un doublet de cellules avec leurs angles de contact et leurs tensions superficielles (Maître *et al.*, 2016)



L'équation de Young-Dupré permet comme pour la déformation vue précédemment de définir les angles de contact internes θ_1 et θ_2 :

$$\gamma_c = \gamma_1 \cos \theta_1 + \gamma_2 \cos \theta_2$$

Ainsi qu'un paramètre δ qui décrit l'asymétrie de tensions et un paramètre de compaction α :

$$\delta = \frac{\gamma_1}{\gamma_2} \quad \alpha = \frac{\gamma_c}{2\gamma_1}$$

La cellule 1 est internalisée lorsque θ_1 vaut 0 et θ_2 vaut 180° (Maître *et al.*, 2016). Le seuil critique d'asymétrie δ_c obtenu par les chercheurs est tel que :

$$\delta_c = 1 + 2\alpha$$

Au-delà de ce seuil, la cellule 1 est internalisée (Maître *et al.*, 2016). Les mesures réalisées sur l'embryon de souris révèlent un seuil δ_c égal à 1,5 (Maître *et al.*, 2016).

De plus, les divisions symétriques donnent deux cellules filles de tensions proches tandis que les divisions asymétriques donnent des cellules filles aux tensions différentes, l'internalisation par les divisions et par les différences de contractilité sont donc liées (Maître *et al.*, 2016).

En résumé, ce sont les différences de tension générées par la contractilité de certaines cellules qui permettent la déformation de celles qui restent à l'extérieur, et l'internalisation des autres, le tout en association avec la polarisation de certaines cellules qui module cette contractilité.

Ces études sont toutes réalisées chez la souris, à l'heure actuelle la compaction de l'embryon de bovin reste un sujet plutôt délaissé, mais le phénomène de modification des tensions serait conservé chez le bovin.

Lors de la compaction, les tensions à la surface des cellules de l'embryon qui se compacte sont modifiées, permettant la déformation des cellules qui restent externes, et l'internalisation des autres cellules. Ces internalisations sont également permises par des divisions cellulaires orientées, et par des différences de contractilité à la surface des cellules. Il en résulte un embryon sphérique avec des cellules internes, et des cellules externes plus déformables.

B. Mécanismes biomoléculaires

Les phénomènes physiques décrits précédemment sont étroitement liés à des mécanismes moléculaires spécifiques. En particulier, la recherche des origines de la tension générée à la surface des cellules et de ses modifications a donné lieu à plusieurs hypothèses.

a. Cadhérine E

La protéine transmembranaire cadhérine E ou *cdh1* a longtemps été au cœur de l'hypothèse principale sur l'origine des modifications de tension (White *et al.*, 2016 ; Maître, 2017). *Cdh1* est un composant-clé des jonctions adhérentes et participe donc à la cohésion entre les cellules de l'embryon, tout en permettant des interactions avec le cytosquelette et des protéines du cytoplasme (White *et al.*, 2016). En effet, lorsque son activité est inhibée, l'embryon ne se compacte pas (Hyafil *et al.*, 1980). Les jonctions adhérentes et *cdh1* de manière plus générale ont

donc été ciblées par diverses études pour tenter d'expliquer ce phénomène (White *et al.*, 2016 ; Maître, 2017).

- *Adhésion cellulaire*

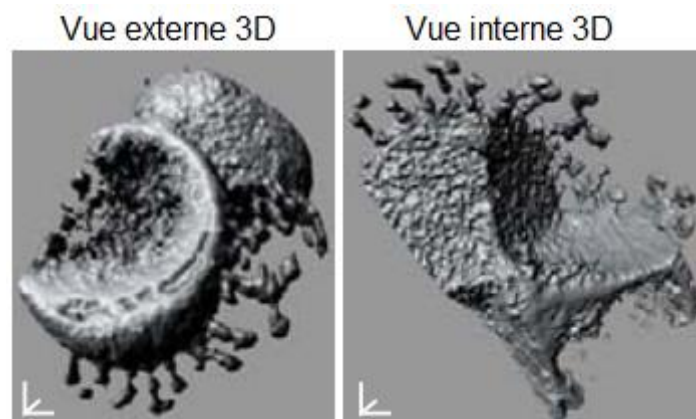
Ainsi, le phénomène d'adhésion médié par les jonctions adhérentes permettrait de diminuer les tensions aux contacts cellulaires et supposément aider à la déformation des cellules lors de la compaction (Steinberg et Takeichi, 1994). En la faveur de cette hypothèse, la redistribution de *cdh1* qui de cytoplasmique devient membranaire et s'accumule pour former les jonctions adhérentes justement au stade huit cellules (Vestweber *et al.*, 1987). De plus, l' α -caténine, un autre composant des jonctions adhérentes, qui lie *cdh1* et cytosquelette, semble également nécessaire : de la perte de sa fonction par mutation résulte un phénotype très similaire à celui des embryons mutés pour *cdh1* (Torres *et al.*, 1997).

Néanmoins, malgré de nombreux résultats en sa faveur, l'adhésion liée aux jonctions adhérentes ne peut à elle seule justifier de la compaction dans son ensemble. D'après Maître (2017), sans le relâchement de la tension aux contact cellulaire, que l'on peut attribuer aux jonctions adhérentes, l'embryon se compacte malgré tout aux trois quarts, et dans les embryons sans *cdh1* la tension augmente tout de même. Le rôle primordial de *cdh1* dans la compaction n'est pas donc pas lié qu'aux jonctions adhérentes.

- *Filopodes*

La cadhérine E est également retrouvée dans les filopodes, des excroissances cellulaires qui « s'accrochent » aux cellules voisines et génèrent une tension par traction (Figure 12) (Fierro-González *et al.*, 2013). Ceux-ci sont produits par 55 à 60% des blastomères uniquement lors du stade huit à 16 cellules, entre le domaine apical et les jonctions adhérentes (Fierro-González *et al.*, 2013). Lorsqu'une cellule projette des filopodes, longs de 10 à 12 μm , vers des cellules adjacentes, celles-ci n'en projettent pas réciproquement, et aucune division n'a lieu sur des cellules touchées par des filopodes ou qui en projettent, révélant une coordination entre cellules (Fierro-González *et al.*, 2013). La présence de *Cdh1* dans ces filopodes leur permet d'adhérer à la membrane sur laquelle ils sont projetés (White *et al.*, 2016).

Figure 12 : Modélisation tridimensionnelle de blastomères d'un embryon de souris projetant des filopodes (Fierro-González *et al.*, 2013).



La participation des filopodes à la compaction est variable selon les auteurs. S'ils ont probablement un rôle dans la déformation des cellules, leur participation significative à la genèse des tensions de surface n'est pas admise : le tension à la surface d'un blastomère seul augmente tout de même, donc l'augmentation de tension ne dépend pas des autres cellules (Maître, 2017 ; Coticchio *et al.*, 2019).

- *Signalisation*

Plutôt que comme molécule d'adhésion, le rôle principal de cdh1 dans la compaction pourrait être celui d'une molécule de signalisation (Maître, 2017 ; Plusa et Piliszek, 2020). Les embryons mutés pour le gène cdh1 voient de la myosine s'accumuler de manière anormale aux contacts cellulaires avec une augmentation de tension, qui retombe lorsque les embryons sont traités avec de la blebbistatine, qui inhibe la myosine (Maître *et al.*, 2015). Cdh1 pourrait redistribuer les tensions en réorganisant le cytosquelette d'actine-myosine, et ainsi agir en qualité de molécule de signalisation dans la compaction (Anani *et al.*, 2014 ; Yu *et al.*, 2016).

b. Cytosquelette

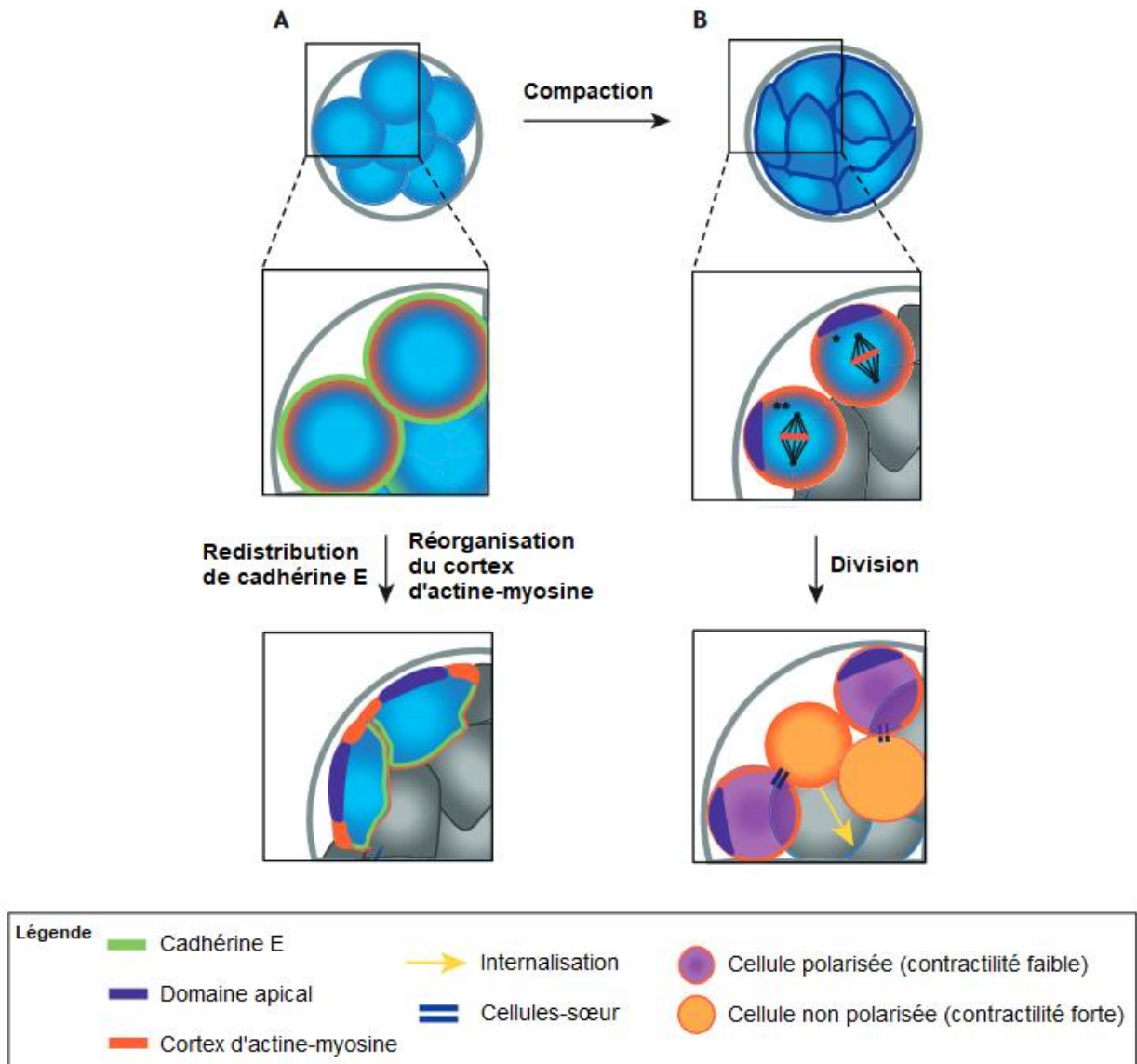
Comme mentionné précédemment, le cytosquelette participe activement à la compaction. Les ondes de contractilité cellulaires à l'origine de la tension de surface des cellules sont générées par le cortex d'actine-myosine sous la surface de la membrane cellulaire (Anani *et al.*, 2014 ; Maître *et al.*, 2015 ; Özgüç et Maître, 2020 ; Schliffka *et al.*, 2021). Celles-ci sont détectées dès le stade 8 cellules chez la souris, à une vitesse de 0,8 $\mu\text{m/s}$ qui est commune à d'autres espèces non mammifères, malgré des échelles de temps extrêmement différentes pour le développement embryonnaire (Maître, 2017 ; Özgüç et Maître, 2020). En particulier, les chaînes lourdes de myosine MYH9 et MYH10 semblent être primordiales pour la genèse de ces contractions avec une dépendance plus forte à MYH9 qu'à MYH10 (Schliffka *et al.*, 2021).

Ces ondes sont modulées notamment par le domaine apical des cellules polarisées, par sa rigidité liée à l'eitrine et par inhibition de la phosphorylation de la myosine par aPKC (Liu *et al.*, 2012 ; Maître *et al.*, 2016). Le domaine apical étant distribué différemment aux cellules via les divisions asymétriques, celles-ci expriment des contractilités différentes, ce qui permet l'internalisation des cellules les plus contractiles (Maître, 2017 ; Özgüç et Maître, 2020). Les contractions sont également invisibles aux contacts cellulaires, inhibées par Cdh1, ce qui permet un relâchement des tensions de contact cellulaire (Plusa et Piliszek, 2020 ; Özgüç et Maître, 2020).

Par ailleurs, la protéine kinase c (PKC) pourrait être à l'origine de l'activation des contractions d'actine-myosine, via la protéine Rho, d'une manière proche de l'activation de la polarisation (Özgüç et Maître, 2020 ; Plusa et Piliszek, 2020). Les voies effectrices de la protéine Rho restent cependant obscures dans ce contexte à l'heure actuelle (Özgüç et Maître, 2020 ; Plusa et Piliszek, 2020).

Ainsi, à l'échelle moléculaire le moteur principal de l'augmentation des tensions de surface qui permet la compaction est le cytosquelette d'actine-myosine, secondé par les cadhérines en tant que molécules de signalisation et d'adhésion comme résumé dans la Figure 13.

Figure 13 : La compaction de l'embryon de souris (Plusa et Piliszek, 2020) .



Note : **(A)** Le processus est dirigé par la réorganisation spatiale de la cadhérine E, qui en retour induit la réorganisation du cytosquelette d'actine-myosine et augmente la surface de contact cellulaire. Un domaine apical riche en ezrine se forme côté extérieur. **(B)** Durant les divisions qui suivent, les cellules internes se forment par divisions asymétriques lorsque le fuseau mitotique est perpendiculaire au domaine apical (*) ou par internalisation de cellules non polarisées (**) par différence de contractilité.

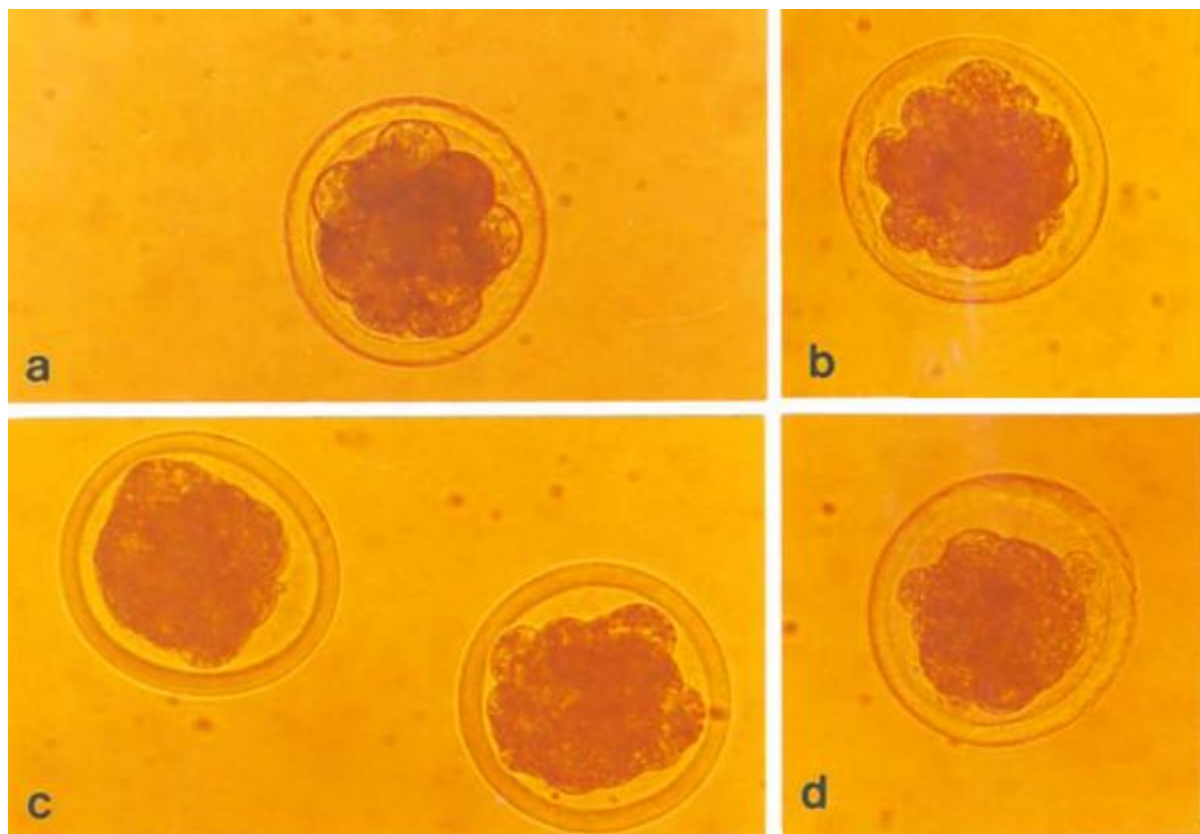
c. Chez le bovin

La compaction chez le bovin du point de vue moléculaire ne bénéficie pas de beaucoup plus d'attention que du point de vue physico-chimique. De la même manière, l'embryon se compacte, des cellules sont internalisées, les contacts cellulaires augmentent et la polarité de certaines d'entre elles est impliquée également (Sharma et Madan, 2022). De plus, la protéine Yap 1 (Yes associated protein 1) semble être impliquée dans la formation de la morula, son absence empêche la compaction (Sharma et Madan, 2022).

Pour l'instant, très peu d'informations sont disponibles et de nouvelles études devront venir explorer la compaction chez le bovin pour en apprendre davantage.

En conclusion, la compaction est la première modification morphogénétique de l'embryon de mammifère, mais elle ne semble pas nécessaire à sa survie. Des embryons de souris non compactés peuvent donner des blastulas normales, ainsi que des individus viables et fertiles (Maître, 2017). Cependant, bien que non essentielle, la compaction pourrait être associée à une correction d'anomalies chromosomiques, par l'exclusion des blastomères aneuploïdes de la compaction (phénomène de compaction partielle), notamment chez le bovin (Lagalla *et al.*, 2017 ; Nagai *et al.*, 2021). Certains embryons compactés partiellement ont ainsi un taux d'euploïdie supérieur à des embryons dont la compaction a été totale (Lagalla *et al.*, 2017 ; Nagai *et al.*, 2021). Le mécanisme par lequel les blastomères sont exclus n'est cependant pas élucidé à l'heure actuelle. La Figure 14 montre la compaction d'un embryon de bovin avec exclusion de certains blastomères.

Figure 14 : Photographies d'embryons de bovins au cours de la compaction (Van Soom *et al.*, 1997).



Note : (a) Stade 16 cellules, embryon non compacté. (b) Embryon juste avant la compaction. (c) Embryons en cours de compaction. (d) Embryon compacté avec 3 blastomères exclus.

Le cytosquelette des cellules embryonnaires produit des ondes de contractilité modulées par le domaine apical des cellules externes, créant des diversités de contractilité à l'origine des remaniements de la compaction. La cadhérine E, en tant que molécule d'adhésion et de signalisation, participe dans une moindre mesure à ce phénomène.

2. Différenciation en trophoblaste et en masse cellulaire interne

L'autre événement majeur qui accompagne la formation de la morula est le commencement de la toute première différenciation cellulaire. Celle-ci sépare d'une part le trophoctoderme, qui donnera les enveloppes fœtales, et la masse cellulaire interne qui formera le fœtus en lui-même. Chez la souris, le mécanisme qui permet cette différenciation est bien connu, tandis que chez le bovin il n'est pas encore complètement élucidé.

Les expérimentations qui ont permis d'élucider ces mécanismes sont basées sur le fait que la pluripotente, caractéristique des cellules de la MCI, se maintient, réprimant des gènes effecteurs de différenciation, on remarque donc l'absence de MCI lorsqu'une proportion inhabituellement grande de cellules se différencient en TE. A l'inverse, on remarque l'absence de différenciation en TE par l'absence de caractéristiques épithéliales sur ces cellules et en conséquence, par non-cavitation et donc absence de formation du blastocœle. La détection des marqueurs décrits dans la première partie est également primordiale pour détecter le sort d'une cellule.

A. Théories historiques sur l'origine de la différenciation

Plusieurs théories (Figure 15) quant à l'origine de l'affectation d'une cellule dans la MCI ou le trophoctoderme ont été envisagées sur les dernières décennies. Divers facteurs influençant la différenciation ont ainsi été découverts séparément avant qu'émerge l'idée de la multiplicité et de l'enchevêtrement de ces facteurs (Sharma *et al.*, 2021).

a. Théorie de la prédétermination

Tout d'abord, la théorie du « *pre-patterning* » ou prédétermination propose un lignage dépendant de déterminants moléculaires localisés de manière asymétrique dans l'ovocyte, et donc distribués inégalement dans les blastomères après les divisions, à l'origine de lignages différents, cependant aucune molécule pouvant jouer un tel rôle n'a été découverte lors des études historiques en faveur de cette théorie (Piotrowska *et al.*, 2001 ; Wennekamp *et al.*, 2013 ; Sharma *et al.*, 2021). De plus, étant donné qu'il est possible de dissocier les blastomères d'un embryon au stade de la segmentation puis de les rassembler sans conséquence sur le développement chez de nombreux mammifères, cette théorie est globalement considérée comme réfutée en faveur d'une plasticité et d'une autorégulation de l'embryon de mammifère (Plusa et Piliszek, 2020 ; Denker, 2020).

b. Théorie « *inside-outside* »

Ensuite, la position des cellules a été étudiée, et le modèle « *inside-outside* » (interne-externe) a été proposé (Tarkowski et Wróblewska, 1967). En effet, ce sont les cellules externes de l'embryon qui deviennent le trophoctoderme et les cellules internes qui deviennent la MCI. Les cellules internes n'ont aucun contact avec l'extérieur, et de nombreux contacts avec d'autres cellules, tandis que les cellules externes ont un contact avec le milieu extérieur et moins de contacts avec les autres cellules, d'où une signalisation différente qui expliquerait une différenciation ou non en trophoctoderme (Suwińska *et al.*, 2008 ; Hirate *et al.*, 2012 ; Cockburn *et al.*, 2013).

c. Théorie de la polarité

Un modèle mettant en avant la polarité des cellules a par la suite été mis en avant (Johnson *et al.*, 1981). Pour Johnson *et al.* (1981), la présence ou l'absence d'un domaine apical différent du domaine basolatéral sur les cellules est le facteur déterminant pour leur détermination, notamment

via son influence sur les divisions cellulaires. Ainsi, les cellules héritant du domaine apical feraient partie du trophoctoderme tandis que les cellules non polarisées produites par les divisions asymétriques feraient partie de la MCI (Hirate *et al.*, 2015 ; Sasaki, 2015). Cela rejoint par certains aspects la théorie *inside-outside*. En effet, l'influence sur l'orientation du fuseau mitotique par la polarité a aussi pour effet de participer à l'internalisation des cellules (Hirate *et al.*, 2015). Selon les partisans de la théorie de la polarité, celle-ci supplante la position dans la détermination, la précède, et suffit à permettre la détermination (Anani *et al.*, 2014 ; Korotkevich *et al.*, 2017).

d. Théorie de l'auto-organisation

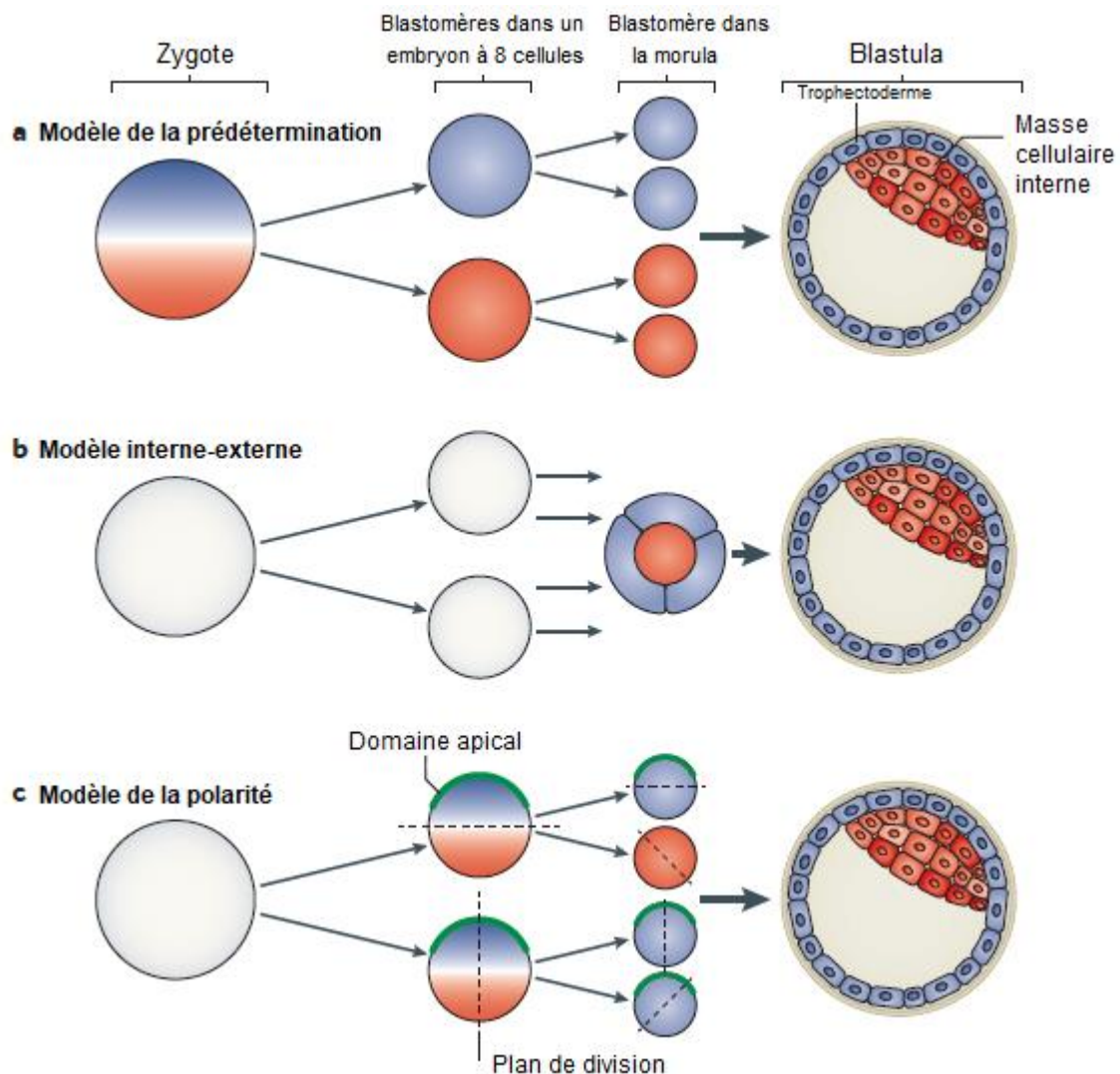
Plus récemment a émergé la « *self organization theory* » ou théorie de l'auto-organisation. L'auto-organisation correspond à « l'émergence spontanée d'un ordre spatio-temporel, durant lequel le schéma global d'un système est formé par les interactions locales de ses éléments » (Isaeva, 2012). Ici, cela signifie que les mécanismes à l'origine des différents lignages ne sont pas l'application d'un plan hérité et immuable mais sont multiples, adaptatifs, avec notamment le plan de division cellulaire et la polarité, la forme des cellules et l'adhésion entre cellules, la communication intercellulaire, l'expression génique, les forces mécaniques, dont la contractilité (Wennekamp *et al.*, 2013 ; Plusa et Piliszek, 2020). La différenciation est le résultat des influences multiples et inégales de facteurs très variés, enchevêtrés et dépendant de l'environnement (Wennekamp *et al.*, 2013 ; Plusa et Piliszek, 2020).

e. Remise en question récente

La plasticité et les capacités d'auto-régulation, d'adaptation à l'environnement des embryons de mammifères, de totipotence des blastomères au stade deux cellules chez la souris sont donc très généralement admis. Cependant, deux études menées par Casser *et al.* en 2017 et 2019 ont fait ressurgir l'idée d'une prédétermination (Casser *et al.*, 2017 ; Casser *et al.*, 2019). En effet, ceux-ci ont mis en évidence une inégalité des deux blastomères du stade deux-cellules chez la souris en termes de totipotence, ainsi qu'un ARNm d'origine maternelle distribué de manière différentielle entre les deux (Casser *et al.*, 2017 ; Casser *et al.*, 2019). L'ARNm en question, Cops3 (COP9 *signalosome complex subunit 3*), est associé à la prolifération cellulaire et au soutien de l'épiblaste (Yan *et al.*, 2003). Ces découvertes remettent en question des mécanismes établis de longue date et amorcent de nouvelles études nécessaires pour découvrir d'autres molécules potentiellement distribuées différemment dans les deux premiers blastomères.

Bien qu'un consensus semblât être atteint avec la théorie de l'auto-organisation, la réalité de la première différenciation paraît être toujours plus complexe.

Figure 15 : Modèles historiques décrivant la première différenciation dans l'embryon de souris (Wennekamp et al., 2013).



B. Mécanismes biomoléculaires

Aux mécanismes évoqués précédemment sont associées des voies de signalisation dont l'activation ou non influence la destinée des cellules, telles que les voies Hippo, Notch, Wnt (Sasaki, 2015 ; Sharma *et al.*, 2021 ; Li *et al.*, 2021).

a. La voie de signalisation Hippo

Cette voie a d'abord été étudiée chez la drosophile et doit son nom au gène « hpo », dont la mutation résulte en une hyper-croissance de divers tissus par absence de régulation de la prolifération et une apoptose diminuée (Meng *et al.*, 2016). Les composants de cette voie sont retrouvés également chez les mammifères, avec un rôle antitumoral mais également embryogénique (Saucedo et Edgar, 2007 ; Zhao *et al.*, 2010a ; Manzanares et Rodriguez, 2013). La voie Hippo (qui sera appelée « Hippo » dans ce texte) dépend à la fois de la position des cellules (interne ou externe), de l'adhésion cellulaire, et de la polarité cellulaire. L'adhésion par des

jonctions adhérentes permet l'activation et le bon fonctionnement de la cascade de Hippo, tandis que la présence d'un domaine apolaire l'inactive (Meng *et al.*, 2016). Enfin Hippo est aussi contrôlé par la densité et la contraction cellulaire (Ota et Sasaki, 2008 ; Wada *et al.*, 2011). Globalement, cette voie est régulée de manières très diverses, il s'agit d'un bon exemple d'une intrication forte entre force mécanique, mécanismes moléculaires et cellulaires.

Cette voie est bien décrite chez la souris chez qui elle sera explicitée avant d'en examiner les différences chez le bovin.

- *Dans les futures cellules de la MCI*

Ici seront détaillés les différents acteurs de Hippo et leurs rôles dans les cellules destinées à la masse cellulaire interne, de manière antichronologique afin de mettre en valeur les « objectifs » finaux de cette voie.

- Yap et Taz

L'effecteur final clef de Hippo est le coactivateur transcriptionnel Yap (*Yes-associated protein 1*). La phosphorylation de Yap au niveau du résidu S127 permet sa séquestration dans le cytoplasme via sa liaison avec une protéine 14-3-3 (Zhao *et al.*, 2007). 14-3-3 est une molécule capable de se lier à de très nombreux composants de voies de signalisation et aux rôles extrêmement divers de régulation, très conservée chez les eucaryotes (Fu *et al.*, 2000). Par ailleurs, la phosphorylation de Yap sur un second site, S381, permet aussi sa liaison avec la protéine kinase CK1 δ/ϵ , qui phosphoryle Yap au niveau d'un dégron. Un dégron (ou signal de dégradation) est généralement défini comme « un élément de petite taille dans une protéine qui permet sa reconnaissance et sa dégradation par un appareil protéolytique » (Ravid et Hochstrasser, 2008). Un phosphodégron est un dégron phosphorylé, c'est le cas de celui de Yap après l'intervention de CK1 δ/ϵ . Ceci entraîne le recrutement de la SCF β -TRCP E3 ubiquitine ligase qui mène à l'ubiquitination de Yap et à sa dégradation (Zhao *et al.*, 2010b). Taz, un autre coactivateur transcriptionnel (aussi appelé Wwtr1), joue un rôle très similaire à Yap (Nishioka *et al.*, 2009), et est stabilisé d'une manière équivalente (Zhao *et al.*, 2010a).

Ainsi, dans les cellules destinées à la MCI, Hippo est dite active, Yap et Taz sont phosphorylés et restent dans le cytoplasme, ne vont pas dans le noyau et ne déclenchent pas les gènes effecteurs du trophectoderme (Lorthongpanich *et al.*, 2012).

- Lats 1/2

Les protéines Lats 1/2 (*Large Tumor Suppressor 1 et 2*) sont des protéines kinases qui font partie des composants centraux de Hippo (Sharma et Madan, 2020). Une fois activée, elles permettent la phosphorylation de Yap (et de Taz) et préviennent ainsi leur translocation vers le noyau (Oka *et al.*, 2008 ; Hao *et al.*, 2008 ; Lorthongpanich *et al.*, 2013). Elles interagissent avec de multiples autres composants de Hippo qui permettent la régulation de cette phosphorylation.

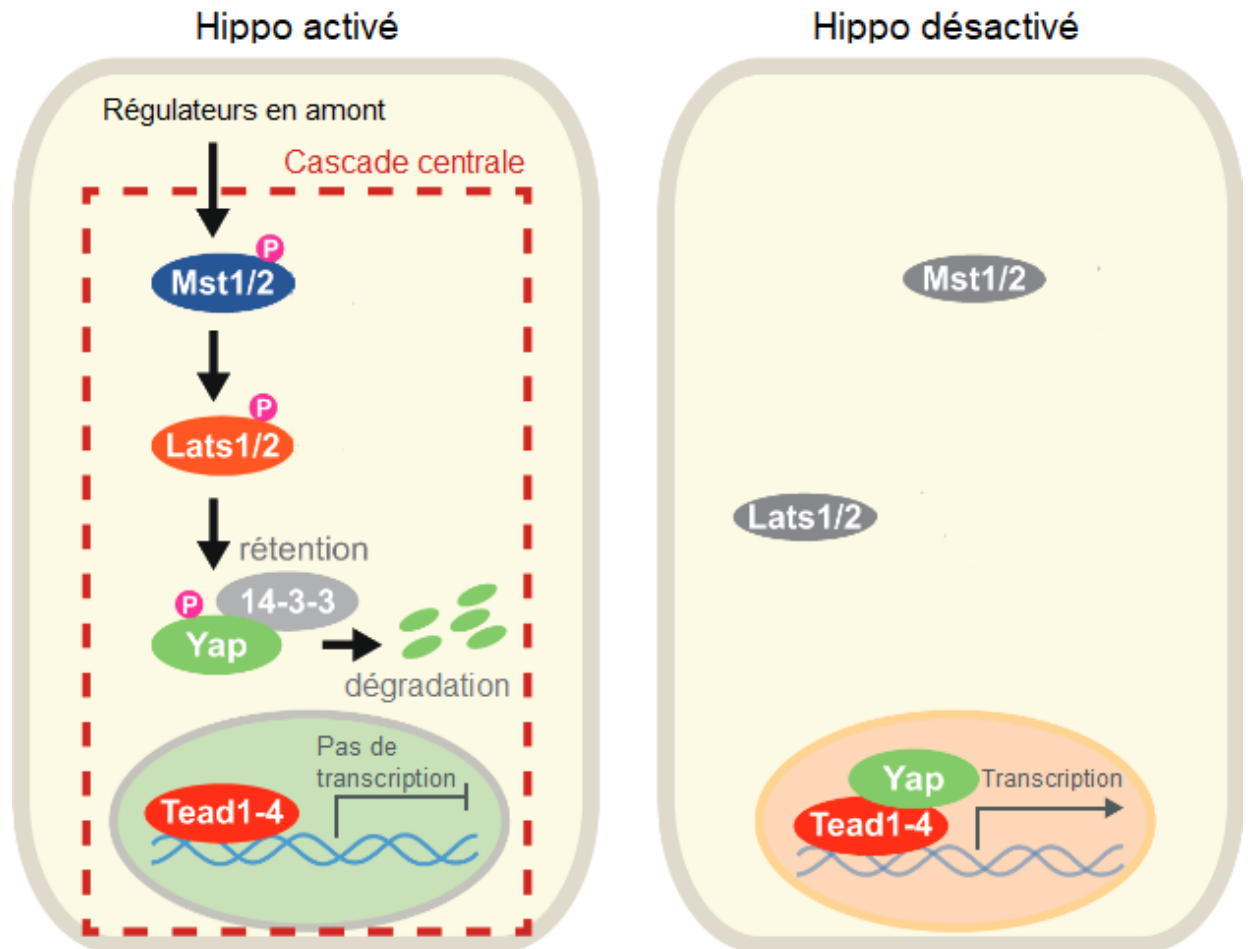
- Mst 1/2 ou Stk 4/3

Les protéines kinases Mst 1/2 (*Mammalian sterile twenty like 1 et 2*, également appelée Stk 4/3 pour sérine thréonine kinase 4/3) sont indispensables au développement embryonnaire de la souris (Oh *et al.*, 2009). Elles ont un effet pro-apoptotique et antiprolifératif chez la souris (O'Neill *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2013). Yap et Taz dans leurs formes non phosphorylées sont inhibés par Mst 1/2 (Zhao *et al.*, 2010b ; Lin *et al.*, 2015). Ainsi, effectrices centrales de Hippo, elles phosphorylent

les protéines Lats 1/2 (Xu *et al.*, 1995 ; Chan *et al.*, 2005 ; Romano *et al.*, 2014) qui elles-mêmes phosphorylent Yap. Mst 1 et 2 peuvent se compenser entre elles (Oh *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2013). Par ailleurs, une régulation de Nanog par Mst 1/2 a été mise en évidence (Li *et al.*, 2013).

Les rôles des composants de la cascade centrale de Hippo sont résumés de manière simplifiée dans la Figure 16.

Figure 16 : Schéma simplifié de la cascade centrale de la voie de signalisation Hippo chez la souris (Hirate et Sasaki, 2014).



Note : (Gauche) Quand Hippo est actif, les régulateurs en amont de la cascade principale activent Mst 1/2 par phosphorylation, qui elles-mêmes phosphorylent Lats 1/2, qui phosphorylent Yap. Ceci mène à la rétention cytoplasmique de Yap par 14-3-3 puis à sa dégradation. Les gènes cibles de Tead sont réprimés. (Droite) Quand Hippo est inactif, la cascade de phosphorylation n'a pas lieu, permettant la translocation nucléaire de Yap. Yap forme un complexe avec Tead, et active la transcription des gènes cibles pro-trophectoderme.

□ Kibra ou Wwc1

La famille des protéines Wwc (WW-and-C2-domain-containing) est aussi impliquée dans Hippo, notamment via une liaison avec les protéines Lats 1/2 qui favorise leur activité et donc la phosphorylation de Yap et Taz (Wennmann *et al.*, 2014). Le rôle des membres de cette famille,

Wwc1 ou Kibra, Wwc2 et Wwc3, en particulier Wwc2, est crucial pour le bon développement chez la souris, sans lesquels l'embryon n'est pas viable (Hermann *et al.*, 2021). Pour autant, ces protéines n'ont pas été la cible d'autant d'études que les autres membres de la cascade de Hippo.

□ Amot, Merlin, et jonctions adhérentes

L'angiomotine ou Amot est un autre régulateur important de Hippo, localisée différemment selon la polarité des cellules, et qui possède de nombreux sites de liaison, notamment aux protéines Lats, à Yap, à Kibra, aux filaments d'actine (Hirate *et al.*, 2013 ; Leung et Zernicka-Goetz, 2013 ; Dai *et al.*, 2013). Amot possède aussi un site de liaison dit « *coiled-coil* » à la protéine Merlin (pour *Moesin-Ezrin-Radixin-like Protein*, aussi appelée Nf2, pour neurofibromine 2), qui elle-même peut se lier à l' α -caténine des cadhérines des jonctions adhérentes (Hirate *et al.*, 2013 ; Leung et Zernicka-Goetz, 2013).

Dans les cellules internes, Amot est située sur toute la membrane au niveau des jonctions adhérentes, où elles sont liées aux cadhérines par la protéine Merlin. Le complexe formé par Amot, Merlin et les cadhérines 1 peut se lier aux Lats 1/2, qui peuvent phosphoryler Amot en retour, au niveau du site de liaison d'Amot aux microfilaments d'actine, ce qui stabilise la liaison entre Amot et Lats et inhibe la liaison possible d'Amot avec les microfilaments d'actine (Dai *et al.*, 2013 ; Hirate *et al.*, 2013). L'activation de Hippo par les Lats est alors stimulée par cet ensemble d'interactions (Hirate *et al.*, 2013).

L'activation de Hippo est ainsi très fortement dépendante de la localisation et de la phosphorylation d'Amot, qui sont corrélées à la polarité de la cellule et à l'adhésion de celles-ci à ses voisines par les jonctions adhérentes (Leung et Zernicka-Goetz, 2013 ; Hirate et Sasaki, 2014).

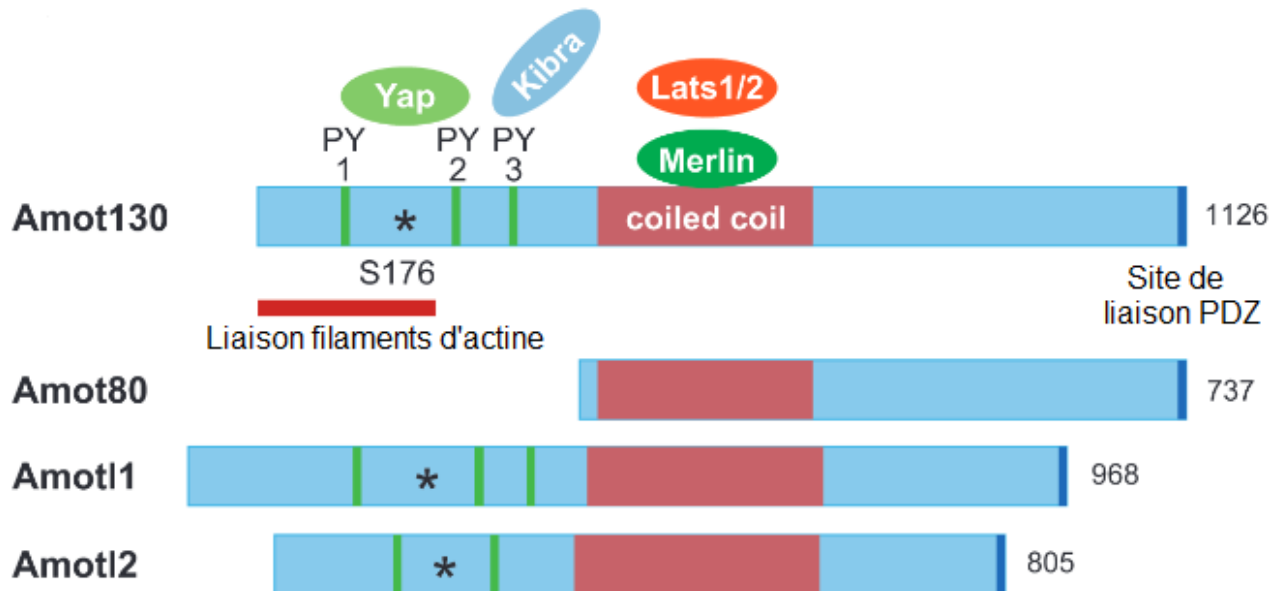
La famille des angiomotines compte plusieurs membres, AmotL1, AmotL2 et deux isoformes d'Amot, court (Amot80) et un long Amot130) (Figure 17) (Paramasivam *et al.*, 2011 ; Hirate et Sasaki, 2014). Leurs rôles sont partiellement similaires, avec notamment une redondance d'Amot130, AmotL1 et AmotL2 qui ont la même relation avec Lats2 (Paramasivam *et al.*, 2011 ; Hirate et Sasaki, 2014). Amot80 en revanche ne possède pas de domaine N-terminal, nécessaire à stabiliser les interactions avec Lats 2 et Merlin et ne joue pas le même rôle (Paramasivam *et al.*, 2011 ; Hirate *et al.*, 2013).

Paramasivam *et al.* (2011) ont par ailleurs montré qu'AmotL2 se lie également à Mst 1/2, formant un complexe triple avec Lats 1/2, ce qui permet de rapprocher les deux protéines et de favoriser leur interaction. Amot est ainsi souvent désignée comme protéine « échafaudage », de par ses nombreuses liaisons possibles et son action de rapprochement physiques des protéines avec lesquelles elle interagit (Hirate et Sasaki, 2014). De plus, Amot est capable de compenser une absence de Lats via un site qui lui permet de se lier directement à Yap et de le maintenir au niveau de la membrane plasmique indépendamment de la cascade de Hippo (Leung et Zernicka-Goetz, 2013). De même, Amot peut phosphoryler directement Yap (Negrón-Pérez et Hansen, 2017). Enfin Amot peut se lier avec Kibra ou Wwc1, une interaction qui a également pour effet globale de promouvoir la phosphorylation de Yap et Taz (Hirate *et al.*, 2013).

En somme, Amot est un régulateur clef de Hippo et un effecteur important de la différenciation en TE ou MCI. Amot peut stimuler l'activité des Lats et des Mst, mais également intervenir directement au niveau de Yap.

Amot est un agent de Hippo qui lui donne le qualificatif de « senseur » de l'environnement, dans le sens où cette protéine permet d'infléchir la cascade de phosphorylations en fonction du statut polaire ou apolaire de la cellule, mais aussi en fonction des contacts cellulaires, donc du statut interne ou externe. Amot fait partie des molécules qui font le lien crucial entre différenciation et position/polarité des cellules.

Figure 17 : La structure des domaines des protéines de la famille Amot et des protéines interagissant avec Amot (Hirate et Sasaki, 2014)



- Dans les futures cellules du TE

Il s'agit maintenant d'expliquer le fonctionnement des effecteurs de Hippo dans les cellules destinées au trophoctoderme et d'en préciser les différences avec leur action dans les cellules destinées à la masse cellulaire interne.

- Yap, Taz, et Tead4

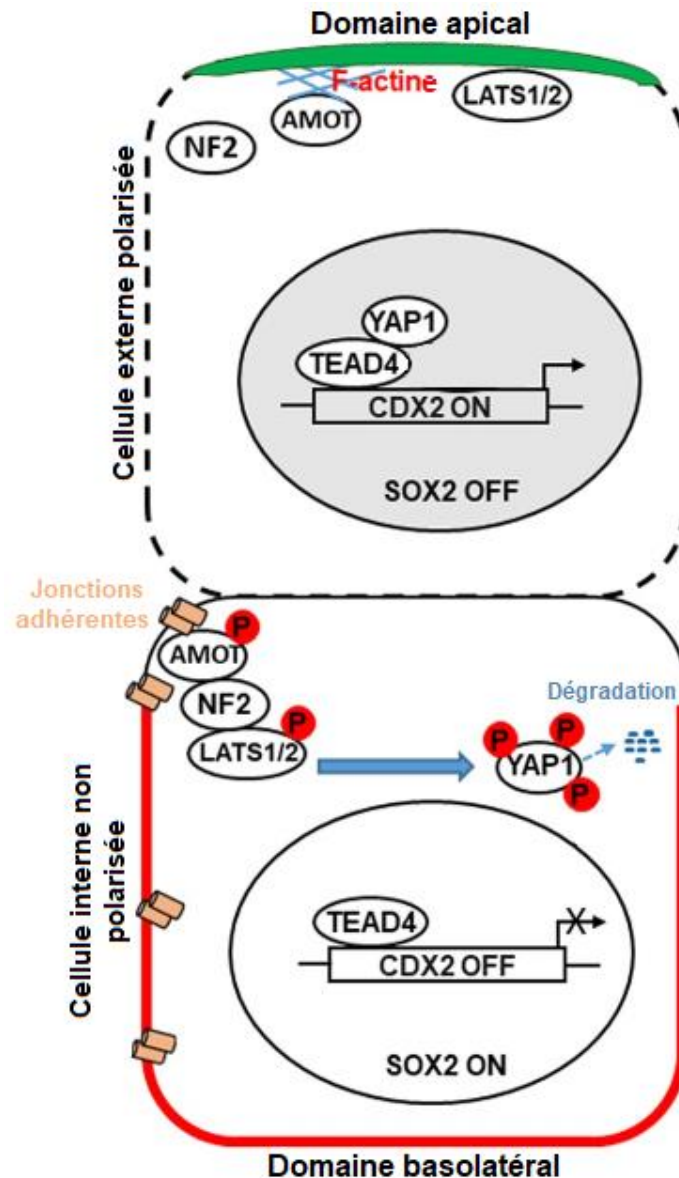
Dans les cellules qui deviendront le trophoctoderme, les effecteurs en amont de Hippo sont inactifs et Yap est transloqué vers le noyau, où il active le *TEA domain transcription factor 4* (Tead4). Le complexe Yap-Tead4 permet l'expression de gènes qui initieront la différenciation en TE (Nishioka *et al.*, 2009). Taz et est également transloqué vers le noyau pour activer Tead4 dans les mêmes circonstances (Manzanares et Rodriguez, 2013). Tead4 agit sur le TEE (pour *Trophoctoderm enhancer*) de Cdx2, et permet aussi l'expression de Gata3 (Rayon *et al.*, 2014 ; Coticchio *et al.*, 2019).

A l'inverse, la non-activation de Tead4 favorise l'expression de gènes de la pluripotence, Nanog et Oct4 (Nishioka *et al.*, 2008). Tead4 est exprimé dans toutes les cellules de l'embryon de souris, Les embryons mutés pour Tead4 présentent des anomalies spécifiques au TE, et sont incapables de produire le blastocœle (Nishioka *et al.*, 2008).

□ Amot et filaments d'actine

Amot permet l'inactivation de Hippo dans les cellules du TE en sa qualité de « senseur » de l'environnement. Ainsi, pour une cellule avec peu de contacts cellulaires, et possédant un domaine apical polarisé, Amot est séquestrée dans le domaine apical (Hirate *et al.*, 2013). Amot se lie beaucoup moins aux cadhérines des jonctions adhérentes, et beaucoup plus aux microfilaments d'actine, ce qui diminue son affinité pour les protéines Lats (Dai *et al.*, 2013 ; Hirate *et al.*, 2013). Amot n'est pas phosphorylée ce qui inactive globalement la cascade de Hippo et ne promeut pas la phosphorylation de Yap, favorisant donc sa translocation nucléaire, comme décrit dans la Figure 18 (Dai *et al.*, 2013 ; Hirate *et al.*, 2013 ; Hirate et Sasaki, 2014).

Figure 18 : Schéma simplifié de la signalisation de Hippo (Karasek et al., 2020).



Note : **(Haut)** Dans les cellules externes polarisées, Amot est séquestrée dans le domaine apical par l'actine (F-actine) et n'active pas les Lats. Yap entre donc dans le noyau et active l'expression de gènes pro-TE comme Cdx2 (« ON ») tandis que les gènes de la MCI comme Sox2 sont réprimés (« OFF »). **(Bas)** Dans les cellules internes non polarisées, Amot est phosphorylée et s'associe aux jonctions adhérentes où elle forme un complexe avec Nf2 et les Lats1/2. Les Lats1/2 activées phosphorylent Yap alors dégradé dans le cytoplasme. Les gènes pro-TE comme Cdx2 ne s'expriment pas, les gènes pro-MCI s'expriment.

□ Rho-ROCK et Par-aPKC

Rho-ROCK et le système Par-aPKC participent également à la genèse du trophoctoderme via la signalisation Hippo, chez la souris, l'inhibition de Rho-ROCK promeut Nanog et Sox2 et diminue

l'expression de Cdx2, tandis que l'absence de Par6db (du système Par-aPKC) diminue l'expression de Cdx2 et augmente celle de Nanog (Alarcon, 2010 ; Kono *et al.*, 2014 ; Frum *et al.*, 2018).

Le système Par-aPKC et Rho-ROCK, en permettant la polarisation correcte des cellules externes et l'établissement d'un domaine apical, favorisent la séquestration d'Amot, et les divisions asymétriques, donc l'inactivation des effecteurs principaux de Hippo, la nucléarisation de Yap et Taz et l'internalisation de cellules non polarisées (Kono *et al.*, 2014 ; Hirate *et al.*, 2015 ; Alarcon et Marikawa, 2018).

D'autre part, l'actomyosine étant un modulateur de l'activité de Hippo (Deng *et al.*, 2015 ; Dupont, 2016), Rho-ROCK pourrait agir sur la différenciation en TE médiée par Hippo via son activité régulatrice de l'actomyosine, bien que les mécanismes sous-jacents précis soient encore inconnus (Amano *et al.*, 2010 ; Alarcon et Marikawa, 2018).

Par ailleurs, Shi *et al.* (2017) ont montré des interactions plus directes. Rho (sans l'implication de ROCK) serait capable d'empêcher la phosphorylation d'Amot, stabilisant ainsi sa liaison avec les microfilaments d'actine, mais aussi de se lier au domaine « *coiled-coil* » d'Amot, prévenant ainsi sa liaison avec Merlin (Shi *et al.*, 2017). De plus ; en interférant avec la phosphorylation de Yap par les protéines Lats, elle promeut la translocation nucléaire de Yap (Kono *et al.*, 2014).

Rho-ROCK, Rho seule et le système Par-aPKC influencent donc Hippo, indirectement par établissement du domaine apical et modulation du cytosquelette, et directement en interagissant avec les effecteurs centraux de la voie.

- *La voie de signalisation Hippo chez le bovin*

Les composants de Hippo précédemment évoqués sont globalement retrouvés chez le bovin, mais diverses études laissent à penser que le scénario est partiellement différent de celui de la souris, et que d'autres éléments interviennent (Verónica M Negrón-Pérez et Hansen, 2017 ; Gerri *et al.*, 2020 ; Sharma *et al.*, 2021).

La présence d'un domaine apical est indispensable à la formation du trophoctoderme chez la souris, tandis que chez le bovin, cela ne semble pas nécessaire, suggérant que d'autres mécanismes sont à l'œuvre dans cette première différenciation (Dos Anjos *et al.*, 2021). Par ailleurs, nombre des composants de Hippo, Mst1, Lats1, Yap, Taz, Tead4, pourraient être d'origine maternelle chez le bovin (Sharma et Madan, 2022).

- Amot et NF2

D'après Sharma *et al.* (2021), Amot joue effectivement un rôle dans cette première différenciation chez le bovin, mais celui-ci n'est pas encore compris. Il n'y a pas d'effet du blocage d'Amot sur l'expression de Tead4 et de Yap avant le jour 8, contrairement à ce qui est observé chez la souris où la formation de cellules du trophoctoderme est accentuée (Negrón-Pérez et Hansen, 2017 ; Sharma *et al.*, 2021). De plus, les cadhérines sont bien présentes dans l'embryon de bovin, et y ont également un rôle dans l'adhésion cellulaire et la gestion des contacts entre cellules, mais l'implication de ceux-ci dans l'initiation de Hippo n'est pas encore explorée (Sharma *et al.*, 2021).

- Yap, Taz et Tead4

Une différence importante entre le bovin et la souris vient de la localisation de Yap lorsqu'il est phosphorylé (p-Yap), en effet chez la souris p-Yap n'est jamais localisé dans le noyau, la

phosphorylation l'en empêche, tandis que chez le bovin, p-Yap est présent dans le noyau comme le cytoplasme avant la compaction puis quasi uniquement nucléaire après la compaction, ce qui suggère une régulation différente (Sharma et Madan, 2020). Yap non phosphorylé se retrouve en revanche comme chez la souris dans le cytoplasme (Verónica M Negrón-Pérez et Hansen, 2017), et la présence de Yap dans le noyau a le même effet déclencheur de Tead4 puis Cdx2 (Kohri *et al.*, 2019). L'accumulation du facteur de transcription Cdx2 dans le noyau semble dépendre de Yap comme chez la souris (Verónica M Negrón-Pérez et Hansen, 2017). Un rétrocontrôle négatif sur Hippo effectué par la présence nucléaire de Yap pourrait de plus être à l'œuvre (Sharma et Madan, 2022). Des études sur la présence de p-Yap dans le noyau restent nécessaires pour comprendre le mécanisme dans ses détails.

En ce qui concerne Taz, son intervention est nécessaire chez le bovin également pour la formation du blastocyste et la différenciation du TE, et sa localisation est d'abord cytoplasmique, avant de progressivement devenir de plus en plus nucléaire chez certains blastomères (Sharma et Madan, 2020 ; Saito *et al.*, 2021). Son expression est corrélée à celle de plusieurs gènes liés au trophoctoderme tels que Cdx2 et Inft (Saito *et al.*, 2021).

Enfin contrairement à ce qui est observé chez la souris, la régulation négative de Tead4 n'empêche pas la formation du blastocœle (Verónica M Negrón-Pérez et Hansen, 2017).

□ Mst1/2 et Lats 1/2

Lats 1 aurait un rôle dans la signalisation Hippo, mais ne serait pas compensée par une autre molécule comme elle l'est par Lats 2 chez la souris (Sharma et Madan, 2022). Mst1/2 ont une localisation similaire chez le bovin par rapport à la souris (cytoplasmique), leur rôle pourrait donc être semblable mais il doit encore être étudié pour confirmer cette idée (Sharma *et al.*, 2021). Par ailleurs il pourrait y avoir une dépendance de Taz à Mst 1 (Sharma et Madan, 2022). Ces protéines restent très peu étudiées chez l'embryon de bovin.

□ aPKC

L'inhibition d'aPKC réduit à la fois l'expression de Gata3 et la présence nucléaire de Yap dans les cellules externes de la morula bovine, et empêche le développement par absence de cavitation, ce qui appuie son caractère pro-trophoctoderme (Gerri *et al.*, 2020). En revanche, l'inhibition d'aPKC n'a pas d'effet sur Cdx2; quant à son rôle de séquestration d'Amot au domaine apical, il reste encore à vérifier chez la vache (Gerri *et al.*, 2020).

□ Rho-ROCK

Les études sur l'activité de Rho-ROCK dans la détermination du lignage chez le bovin ne s'accordent pas sur son rôle (Negrón-Pérez *et al.*, 2018 ; Kohri *et al.*, 2020). Selon l'inhibiteur utilisé, l'inhibition de Rho-ROCK augmente le nombre de cellules du TE (avec l'inhibiteur Y-27632) (Negrón-Pérez *et al.*, 2018 ; Yamamura *et al.*, 2020), ou au contraire le diminue (avec l'inhibiteur C3 *transferase*), en diminuant l'expression de Cdx2 (Kohri *et al.*, 2020). La C3 *transferase* est spécifique de Rho, et aucune autre sous-famille de GTPases, tandis que Y-27632 est un inhibiteur de ROCK, ce qui peut expliquer ces variations (Davies *et al.*, 2000). Bien que l'implication de Rho-ROCK dans la nucléarisation de Yap ainsi que l'expression de Cdx2 et donc dans la formation du TE soit mise en évidence, d'autres études devront donc venir compléter ce schéma.

b. La voie de signalisation Notch

Plus récemment, la voie de signalisation Notch, déjà étudiée en profondeur pour son rôle dans l'organogenèse notamment, a été identifiée comme actrice de la différenciation en trophectoderme (Rayon *et al.*, 2014). En particulier, Notch agit en parallèle de Hippo et est nécessaire pour l'activation du gène pro-TE Cdx2, en agissant sur le site TEE (*Trophectoderm enhancer*) de Cdx2 via son effecteur transcriptionnel, la protéine RBPJ (Rayon *et al.*, 2014). A l'instar du complexe Yap-Tead4 de Hippo, NICD (*Intracellular domain of Notch receptor*) est transloqué vers le noyau où il se lie avec RBPJ pour cibler des gènes effecteurs du TE (Menchero *et al.*, 2019).

De plus, *Strawberry* Notch ou Sbno, un facteur nucléaire de type hélicase, a été identifié comme acteur d'une synergie entre RBPJ de Notch et Tead4 de Hippo en agissant au niveau du TEE de Cdx2 (Watanabe *et al.*, 2017).

Menchero *et al.* (2019) ont par ailleurs proposé un modèle où non seulement Notch et Hippo agissent en synergie, mais aussi de manières globalement indépendantes. Ils ont montré que Notch est déclenché avant Hippo (dès le stade 4 cellules), que ces deux voies ne sont pas redondantes et suggèrent que Notch enclenche la différenciation en TE tandis que Hippo la maintient, tout en freinant l'expression des gènes de la pluripotence (Menchero *et al.*, 2019).

Enfin Batista *et al.* (2021) ont étudié les acteurs possibles de cette voie, et ont mis en évidence une implication très probable de Notch1, Notch2, Jagged1 et Hes1, toutes des protéines connues pour leur activité dans la signalisation Notch étudiée précédemment.

Chez le bovin, Notch semble être également une voie cruciale au développement précoce, à la formation du blastocyste, notamment via sa participation à la formation du trophectoderme en favorisant l'expression de Cdx2, avec l'implication de RBPJ également (Li *et al.*, 2021). Comme pour les autres voies, d'autres études sont nécessaires pour mettre en lumière son rôle.

c. La voie de signalisation Wnt

Wnt est une voie de signalisation très conservée parmi les vertébrés comme les invertébrés, avec des rôles extrêmement variés dans l'embryogenèse, entre prolifération, mort cellulaire, polarité entre autres, mais aussi dans la première différenciation (Miller, 2001).

- *Chez la souris*

L'expression de gènes associés à Wnt, tels que Wnt3 ou Wnt4, dans l'embryon précoce de souris (dès le stade 2 cellules) a été établie il y a environ 20 ans (Lloyd *et al.*, 2003). Cependant, les études sur l'inhibition de cette voie n'ont pas permis de prouver un impact cohérent sur l'établissement du blastocyste (Xie *et al.*, 2008 ; Aparicio *et al.*, 2010), elle a donc été beaucoup moins étudiée que Hippo à travers le prisme des premières différenciation.

Pourtant, des chercheurs se sont penchés à nouveau sur la question plus récemment et leurs résultats suggèrent un rôle pour Wnt dans la première différenciation, en tant que régulateur du rythme de différenciation en coopération étroite avec Notch, où ce dernier serait « l'accélérateur » tandis que Wnt serait le « frein » (Batista *et al.*, 2021). Cependant l'élucidation complète du rôle de Wnt chez la souris est encore à découvrir.

- *Chez le bovin*

Un rôle de la voie de signalisation Wnt dans l'établissement des premières différenciations a été montré chez le bovin (Denicol *et al.*, 2013). La voie standard dite « canonique », impliquant les β -caténines des cadhérines 1, a pour effet la promotion de marqueurs de la pluripotente, tels qu'Oct4, Nanog, Sox2 et Klf4 (Madeja *et al.*, 2015).

Par la suite, Wang *et al.* (2019) ont précisé cette idée en étudiant le rôle de l'axe Wnt- Yap/Taz dans l'établissement du trophoblaste et de la MCI, notamment par la régulation de Cdx2 et avec la participation de l'effecteur-clé de Wnt, Wnt3a. En effet, en plus de l'axe canonique de Wnt, il existe d'autres voies du Wnt, dont l'une d'entre elles a pour effecteurs Yap et Taz (Park *et al.*, 2015). Wtna3 est capable de déphosphoryler Taz, le stabilisant dans le cytoplasme et prévenant sa translocation nucléaire, et régulant ainsi Hippo (Byun *et al.*, 2014). De la sorte, de manière analogue à son rôle chez la souris, Wnt serait un frein qui permet de réguler le rythme de différenciation, et intervient à la fois de manière dépendante et indépendante de Hippo. Néanmoins, ces études ne permettent pas d'apporter une preuve d'un tel rôle pour Wnt et demandent à être approfondies.

d. Cytosquelette d'actine myosine

Ici encore le cytosquelette d'actine-myosine se révèle être primordial dans la morphogénèse de l'embryon. Il a déjà été mentionné pour sa participation à la cascade de Hippo, via son interaction avec Amot qui favorise la translocation nucléaire de Yap et une détermination en cellule du trophoblaste (Dai *et al.*, 2013).

Par ailleurs, comme vu précédemment avec la compaction, le cytosquelette d'actine-myosine est à l'origine de la contractilité des cellules, qui permet entre autres leur internalisation (Maître *et al.*, 2015 ; Özgüç et Maître, 2020). Or, la position interne fait partie des facteurs déterminants dans le destin cellulaire, notamment par l'abondance de contacts avec les cellules voisines et de jonctions adhérentes (Hirate *et al.*, 2012 ; Cockburn *et al.*, 2013). De cette manière plus indirecte, le cytosquelette participe encore à la première différenciation.

C. Aspects mécaniques

Des forces mécaniques influencent la différenciation cellulaire tout au long de sa mise en place. Tout d'abord, il faut rappeler que la ségrégation entre cellules du TE et de la MCI est influencée indirectement par les tensions liées à la contractilité cellulaire qui participent à l'internalisation de certaines comme évoqué précédemment.

Des liens plus directs ont cependant été mis en évidence, révélant une mécano-sensibilité du système Yap-Taz (Aragona *et al.*, 2013 ; Benham-Pyle *et al.*, 2015 ; Dupont, 2016). L'étirement d'une cellule permet à lui-seul de déclencher la translocation de Yap vers le noyau (Dupont *et al.*, 2011 ; Benham-Pyle *et al.*, 2015). Ce système fonctionne en coopération avec le cytosquelette d'actine myosine et cdh1, plus précisément un de leurs composants, les β -caténines, et implique également Hippo de manière générale, ainsi que la voie Wnt (Aragona *et al.*, 2013 ; Benham-Pyle *et al.*, 2015). De plus, l'inhibition de la myosine par la blebbistatine sur des cellules en culture et sur des embryons de souris annule l'étirement des cellules externes (et la compaction de manière générale), et fait ressortir YAP du noyau vers le cytoplasme (Dupont *et al.*, 2011 ; Maître *et al.*, 2016).

La mécanique de la différenciation du trophoctoderme et du maintien de la pluripotence de la MCI est établie, mais de nouvelles études devront venir la compléter, en particulier chez le bovin.

La première différenciation embryonnaire a été longuement étudiée, et encore récemment de nouvelles données semblent interroger des théories pourtant bien ancrées. De nombreux facteurs influent sur la détermination cellulaire, en particulier la position et la polarité auxquelles est lié Hippo, la voie de signalisation majoritairement à l'œuvre dans la différenciation entre TE et MCI. Hippo est active dans les cellules internes non polarisée, où son effecteur clef Yap reste cytoplasmique, et inactive dans les cellules externes polarisées, où Yap est nucléaire et enclenche les gènes de différenciation en trophoctoderme. Les voies Notch et Wnt sont également actrices de cette ségrégation. Les caractéristiques morphologiques et mécaniques des cellules sont étroitement liées à leur différenciation en un type cellulaire ou l'autre.

3. Aspects métaboliques

Les événements morphogénétiques qui jalonnent la formation de la morula sont soutenus par un métabolisme spécifique à l'embryon précoce. Ce métabolisme a été classiquement très étudié chez la souris, mais également chez le bovin.

A. Besoins énergétiques

Au stade de la segmentation, dont les divisions sont lentes, avec un cycle cellulaire de 24h conservé, les besoins énergétiques de l'embryon sont peu importants, et un métabolisme relativement faible (en comparaison avec celui qui va suivre pour la blastula) centré sur l'oxydation du pyruvate, mais aussi du lactate, et des acides aminés présents abondamment dans l'environnement de l'embryon, parvient à y apporter une réponse suffisante (Leese, 2003 ; Smith et Sturmey, 2013). Les biosynthèses sont limitées aux membranes cellulaires, et les dépenses sont concentrées sur l'homéostasie (Coticchio *et al.*, 2019).

A partir du stade 8 à 16 cellules, les dépenses énergétiques deviennent plus importantes, la consommation de glucose et de dioxygène augmente, la production de CO₂ aussi (Thompson *et al.*, 1996 ; Khurana et Niemann, 2000). Cela coïncide notamment avec l'EGA et le début de la compaction, deux processus qui implique des dépenses énergétiques supérieures à celles de la segmentation.

B. Substrats

a. Pyruvate et lactate

Les premiers jours de la vie embryonnaires sont marqués par une dépendance au cycle de Krebs et une régulation négative de la glycolyse. En effet, les faibles besoins énergétiques créent un ratio ATP/ADP élevé, qui limite la consommation de glucose via la glycolyse, en régulant négativement l'étape de phosphorylation par la phosphofructokinase (Gardner *et al.*, 2015). C'est majoritairement le pyruvate présent dans l'environnement qui est consommé par l'embryon de bovin, du moins *in vitro* (Thompson *et al.*, 1996).

Le lactate présent également, plus qu'une source d'énergie primaire, joue un rôle de régulation redox, via la présence de la lactate déshydrogénase (LDH) qui catalyse dans les deux sens la réaction suivante : pyruvate + NADH = lactate + NAD⁺ (fermentation lactique).

b. Lipides

Des réserves énergétiques sont également présentes dans l'embryon sous forme de glycogène (Brinster, 1974), mais aussi de lipides avec des gouttelettes de triglycérides (Ferguson et Leese, 1999). L'utilisation des lipides a été mesurée avec la diminution des réserves et la diminution de la consommation d'oxygène lors d'inhibition de l'oxydation des acides gras, et ces expériences suggèrent que chez le bovin la maturation de l'ovocyte et éventuellement la nidation nécessitent des lipides comme source d'énergie (Ferguson et Leese, 2006). De manière générale, il ressort que l'embryon est avant tout un organisme capable de s'adapter à son environnement et aux substrats qui le composent, tout en ayant des réserves permettant de compléter les besoins énergétiques dans une certaine limite, si cet environnement est pauvre (Ferguson et Leese, 2006 ; Sturmey *et al.*, 2009). Cependant cette plasticité, si elle doit être utilisée, réduit la viabilité de l'embryon (Leese, 2003 ; Gardner *et al.*, 2015).

c. Glycogène

Le métabolisme du glycogène quant à lui semble également avoir une importance dans le développement de l'embryon de bovin, dans la mesure où l'inhibition de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) qui elle-même inhibe la synthèse du glycogène est significativement associée à un développement diminué (Aparicio *et al.*, 2010). Celui-ci prend son importance à partir du stade 16 cellule, au stade morula qui commence à se compacter et jusqu'à la blastula au moins, si l'on se fie à la présence de la protéine GSK3 tout au long de la croissance embryonnaire précoce (García-Herreros *et al.*, 2018). Cependant, il faut aussi noter que la forme phosphorylée et donc inactive des deux isozymes GSK3 α et β est aussi de plus en plus présente avec la progression du développement (García-Herreros *et al.*, 2018), et permettrait de plus en plus la synthèse de glycogène, nécessaire pour un développement normal de l'embryon de bovin (Harris *et al.*, 2013).

d. Acides aminés

Au-delà de leur caractère indispensable à la constitution des protéines, les acides aminés sont également nécessaires de bien d'autres manières à la croissance embryonnaire, leur absence dans le milieu de culture est visible en seulement 3 heures chez la souris, avec une perte de viabilité et une production de lactate fortement augmentée (Leese, 2002).

Tout d'abord, certains acides aminés sont très probablement utilisés comme carburants pour le cycle de Krebs, sous forme d'acétyl-coA (Partridge et Leese, 1996 ; Leese *et al.*, 2021). Ils participent également à l'osmorégulation et au contrôle volumique de l'embryon (Baltz, 2001).

Le *malate-aspartate-shuttle* (MAS) ou navette malate-aspartate est un mécanisme qui permet le transfert d'agents réducteurs NADH à travers la membrane mitochondriale, qui y est imperméable, et ainsi régénère le NAD⁺ cytosolique, permettant la poursuite de l'oxydation du glucose. Ce mécanisme ne peut pas fonctionner sans aspartate, un acide aminé (National Center for Biotechnology Information, 2021). Une hypothèse est que les symptômes induits par le milieu sans acides aminés sont en partie dus au non fonctionnement du MAS, appuyée par l'étude de son inhibition chez la souris qui donnent des symptômes très proches, avec notamment la production

exacerbée de lactate (Mitchell *et al.*, 2009). Ceci relie indirectement l'aspartate au métabolisme énergétique du glucose utilisé par l'embryon.

D'autre part, le glutathion ou GSH, un antioxydant crucial chez les mammifères, principale défense non enzymatique contre les radicaux libres notamment chez l'embryon (Guérin *et al.*, 2001), est constitué à partir de cystéine, glycine et glutamate. C'est également un agent de régulation du statut redox cellulaire (Deleuze et Goudet, 2010). La complémentation du milieu de culture avec ces trois acides aminés permet à l'embryon de produire du glutathion dès le stade zygote (Anchordoquy *et al.*, 2019).

Les profils de consommation/libération d'acides aminés diffèrent selon le stade de développement, le type de milieu (*in vivo* contre *in vitro*), et même le sexe. Ils peuvent également être indicateurs de la viabilité d'un embryon donné (Sturmeijer *et al.*, 2010).

Le métabolisme des acides aminés implique la gestion de l'azote, notamment sous la forme d'ammonium, toxique pour les cellules. Les mammifères convertissent l'ammoniac en urée, qu'ils peuvent stocker en quantités beaucoup plus grandes sans danger. Cependant l'étude de la production d'urée par les embryons de bovin a montré que celle-ci était indétectable, tandis que de l'ammonium est produit (Orsi et Leese, 2004). Ainsi, des ions ammonium seuls peuvent être libérés dans l'environnement, mais une implication éventuelle de la glutamine, de l'alanine, et moins probablement de l'arginine a été mise en évidence dans le métabolisme d'excrétion de l'azote chez le bovin, la fixation de cet ion toxique sous forme d'acide aminé empêchant son accumulation (Gopichandran et Leese, 2003 ; Orsi et Leese, 2004).

C. Viabilité et métabolisme

Deux théories s'opposent sur les conclusions en termes de viabilité à tirer de l'étude du métabolisme embryonnaire.

D'une part, la théorie du métabolisme quiescent ou « quiet métabolisme » selon laquelle moins l'embryon est métaboliquement actif, plus il est viable. En effet un embryon trop actif aurait subi de multiples stress dont découlent des dommages potentiels, notamment au niveau génomique, et sa réaction peut être une augmentation des voies métaboliques de réparation ou même une perte de contrôle métaboliques (Leese, 2002 ; Baumann *et al.*, 2007). Des études ont montré une meilleure viabilité chez les embryons de souris avec une activité glycolytique plus faible (Lane et Gardner, 1996), et une morphologie plus viable chez les embryons d'humain consommant moins de pyruvate (Turner *et al.*, 1994). Une analyse documentaire de Leese *et al.* (2007) suggère une hypothèse semblable chez les ruminants.

D'autre part, des études sur le bovin et l'humain avec les résultats inverses, où un métabolisme plus fort est associé à une meilleure viabilité (Donnay *et al.*, 2002 ; Tejera *et al.*, 2012), et ce même dans des études particulièrement récentes (Ferrick *et al.*, 2020). Gardner (2015) évoque la possibilité d'un biais lié aux milieux de culture différents selon les expériences, notamment en terme de concentration en dioxygène et dioxyde de carbone pour celles en faveur du métabolisme quiescent. Cependant, cela ne permet pas d'expliquer tous les résultats obtenus. Il est probable que plutôt qu'un métabolisme « actif » ou « inactif », il existe un métabolisme idéal « entre deux » qui optimise le développement et la viabilité (Leese *et al.*, 2022). Une étude dans laquelle les chercheurs ont trié les embryons en trois groupes suivant leur consommation de pyruvate (faible, modérée, élevée) avant d'étudier leur développement montre en effet que les embryons

intermédiaires ont le meilleur taux de développement au stade blastula et le plus grand nombre de cellules (Guerif *et al.*, 2013). Ainsi, à ce jour, l'option d'un métabolisme optimal intermédiaire entre quiescent et trop actif, capable de s'adapter aux divers événements facteurs de stress de manière efficace sans surconsommation, semble la plus probable.

Le métabolisme de la morula soutient des besoins croissants à mesure que le développement progresse, et est basé sur la consommation du pyruvate et des acides aminés présents dans l'environnement. Il possède également des réserves, sous forme de lipides ou de glycogène, qui lui permettent de s'adapter à son environnement. Le métabolisme peut être un indicateur de qualité embryonnaire, avec une viabilité moindre pour un métabolisme trop fort ou trop faible.

La compaction de l'embryon et la différenciation des blastomères en une couche unique d'épithélium polarisé et une masse de cellules pluripotentes principalement via la cascade de signalisation Hippo sont les événements morphogénétiques principaux intervenant dans la formation de la morula. Elles sont soutenues par un métabolisme croissant et plastique, adaptable à l'environnement de l'embryon.

Troisième partie : La formation de la blastula

La formation de la blastula est marquée principalement par l'établissement du blastocœle, cavité contenue dans l'embryon, et par la seconde différenciation cellulaire entre l'épiblaste pluripotent et l'endoderme primitif, tous deux issus de la masse cellulaire interne.

1. La formation du blastocœle

La cavitation ou blastulation désigne la formation du blastocœle, cavité remplie de fluide incluse dans l'embryon, dont la formation commence au moment du cinquième clivage (souris) et complètement formée entre le jour 5 et 7 selon les espèces de mammifères, plutôt aux jours 6 à 7 chez le bovin (stade 64-128 cellules) (Zernicka-Goetz, 2005 ; Marikawa et Alarcon, 2012 ; Reijo Pera et Prezzoto, 2016) . Les cellules de la MCI sont repoussées toutes ensemble à un pôle de l'embryon, et l'embryon développe alors son premier axe de symétrie, l'axe embryonnaire (avec la MCI)-abembryonnaire (Garbutt *et al.*, 1987 ; Dumortier *et al.*, 2019).

Il s'agit de la première cavité formée dans l'embryon, mais elle sera suivie de nombreuses autres, comme la cavité amniotique, et celles des organes creux par exemple.

A. Mécanismes physico-chimiques

Les études axées sur les mécanismes physiques et chimiques qui prennent place pendant la formation du blastocœle sont relativement récentes et encore peu nombreuses en comparaison avec celles qui se penchent sur les aspects moléculaires. Elles concernent avec une écrasante majorité la souris.

Les cavités formées du côté apical des cellules de l'épithélium sont fréquentes et décrites extensivement, tandis que les cavités formées du côté basolatéral comme le blastocœle sont plus rares, et les mécanismes de leur formation moins bien connus. A l'inverse de la plupart des cavités apicales, les cavités basolatérales ne sont pas scellées entre elles par des jonctions serrées, et peuvent communiquer via l'espace intercellulaire (Krug *et al.*, 2014 ; Le Verge-Serandour et Turlier, 2021b). Des jonctions serrées et gap séparent cependant les cavités du milieu extérieur ce qui permet la croissance du blastocœle en empêchant la fuite du liquide (Barcroft *et al.*, 1998). Dans cette partie, il s'agira de présenter les différents phénomènes qui mènent à la formation du blastocœle, et les modèles proposés pour les décrire.

a. Flux de liquide depuis le milieu extérieur

La formation du blastocœle est initiée par un flux de liquide dans l'espace intercellulaire. Ce flux est dépendant des pressions hydrostatiques dans les cavités qui contiennent le liquide, et, celui-ci étant majoritairement composé d'eau, le flux dépend aussi des différences de concentrations ioniques. Or, le liquide dans le blastocœle est concentré en Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} , et Ca^{2+} (Borland *et al.*, 1977a ; Watson et Barcroft, 2001). Un gradient osmotique existe donc avec une pression osmotique plus forte dans l'espace intercellulaire, ce qui entraîne un flux passif d'eau vers ce

milieu, notamment via les aquaporines (Biggers *et al.*, 1988 ; Verkman et Mitra, 2000). Des exocytoses de vacuoles liquidiennes participent aussi au remplissage de la cavité.

- *Différences de pression et flux de liquide*

Torres-Sánchez *et al.* (2021) ont proposé un modèle descriptif de la formation d'une cavité unique d'un point de vue thermodynamique, par traversée d'un flux d'eau passif à travers une couche épithéliale (ici le trophoctoderme). Ce flux est proportionnel aux différences de potentiels chimiques des solutés de part et d'autre de la couche épithéliale.

Ce modèle propose une solution dans laquelle sont présents N types d'ions différents, avec pour l'ion i une concentration c_i et une charge q_i . La différence de concentration de chaque côté de l'épithélium est notée $\Delta c_i = c_i^l - c_i^0$ où c_i^l est la concentration dans la lumière et c_i^0 dans le milieu extérieur, avec $\bar{c}_i = \frac{c_i^l + c_i^0}{2}$ la concentration moyenne. On a :

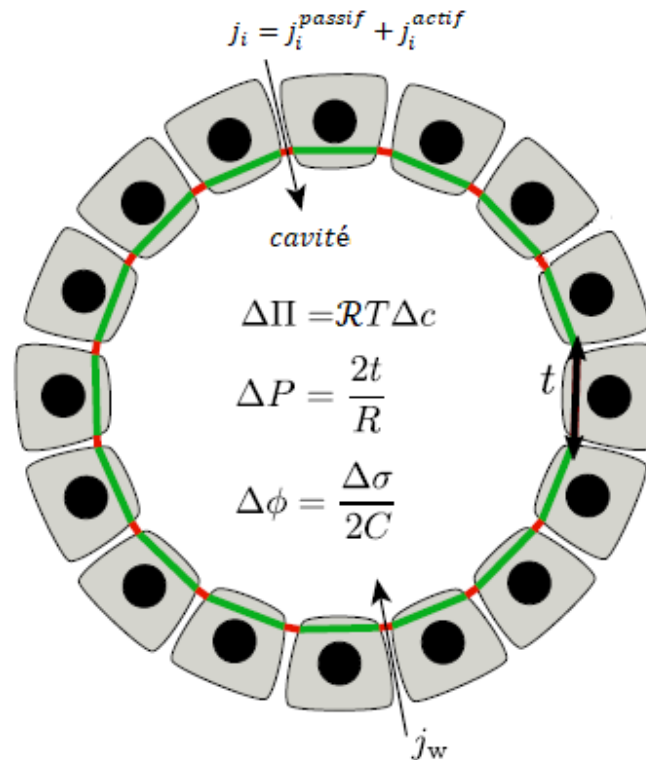
$$j_w = \lambda_w (\Delta\Pi - \Delta P) - \sum_{i=1}^N \lambda_{w,i} \left(\Delta c_i + \frac{q_i \bar{c}_i}{kT} \Delta\phi \right) + j_w^{actif}$$

Dans cette expression λ_w est la perméabilité de la couche épithéliale à l'eau, elle dépend de la densité des aquaporines, tandis que $\lambda_{w,i}$ est un coefficient caractérisant le flux d'eau dirigé par les différences de potentiels chimiques de chaque soluté. Le terme $\Delta\Pi - \Delta P$ tient compte de la compétition entre différence de pression hydrostatique ΔP et différence de pression osmotique $\Delta\Pi = kT \sum_{i=1}^N \Delta c_i$. La différence de potentiel électrique est notée $\Delta\phi$. Enfin j_w^{actif} est un terme représentant un éventuel flux d'eau actif, qui résulterait d'un pompage des molécules d'eau, *a priori* pas mis en évidence dans ce contexte bien que non écarté (Torres-Sánchez *et al.*, 2021). Les deux premiers termes du côté droit de l'équation décrivent à l'inverse les flux passifs.

La Figure 19 schématise le modèle proposé et rappelle les expressions des différents termes présents dans l'équation précédente. Ainsi :

- « L'eau afflue dans la cavité grâce à une différence de pressions osmotiques et de pressions hydrostatiques $\Delta\Pi - \Delta P$ et potentiellement par des effets électroosmotiques.
- La pression hydrostatique dans une cavité sphérique de rayon R est reliée à la tension t dans la couche épithéliale via la loi de Laplace.
- La différence de pression osmotique est maintenue par un transport ionique actif qui peut également mener à une différence de potentiel
- La différence de potentiel électrique $\Delta\phi$ est donnée par la différence de densité de charge $\Delta\sigma$ et la capacitance de l'épithélium C » (Torres-Sánchez *et al.*, 2021).
- La différence de pression osmotique est obtenue avec la différence de concentration ionique Δc , la température T et la constante des gaz parfaits \mathcal{R} par la loi de Van't Hoff.

Figure 19 : Modèle de formation d'une cavité unique (Torres-Sánchez *et al.*, 2021)



Pour estimer l'importance relative de $\Delta\Pi$ et ΔP , les chercheurs ont utilisé des vitesses de flux mesurées dans d'autres contextes, notamment lors de la croissance de l'oreille interne du poisson-zèbre, qui est un autre exemple de formation de cavité entourée par un épithélium avec du liquide (Mosaliganti *et al.*, 2019). Ils ont également utilisé les mesures de perméabilité membranaires mesurées dans des cellules MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), des cellules typiquement utilisées pour étudier les épithéliums et entre autres la formation des cavités au sein de ceux-ci (Timbs et Spring, 1996 ; Bryant *et al.*, 2010 ; Engelberg *et al.*, 2011).

Ainsi, avec des vitesses de flux j_w de l'ordre de 1 à 8 $\mu\text{m}/\text{h}$ (Mosaliganti *et al.*, 2019), et une perméabilité de la couche épithéliale λ_w de l'ordre de 0.1 à $1 \times 10^{-7} \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$ (Timbs et Spring, 1996), et en négligeant les coefficients $\lambda_{w,i}$, une valeur $\Delta\Pi - \Delta P \sim 3 - 200 \text{ kPa}$ a été obtenue (Torres-Sánchez *et al.*, 2021). Or, les mesures de pression hydrostatiques réalisées dans l'oreille interne de poisson-zèbre ($\Delta P \sim 100 - 300 \text{ Pa}$) (Mosaliganti *et al.*, 2019), dans les kystes de cellules MDCK ($\Delta P \sim 40 \text{ Pa}$), et dans le blastocœle lui-même ($\Delta P \sim 300 \text{ Pa}$) (Dumortier *et al.*, 2019), sont faibles en comparaison (Torres-Sánchez *et al.*, 2021). En revanche, en prenant l'exemple d'une différence de concentration entre 1 et 100 mM (donc pour un seul ion), la différence de pression osmotique, donnée par la loi de Van't Hoff, serait autour de $\Delta\Pi \sim 2,6 - 260 \text{ kPa}$ (Torres-Sánchez *et al.*, 2021). Cette fourchette de différence de concentration est large mais a priori cohérente, d'après les concentrations mesurées en ions notamment sodium dans le blastocœle (159-181 mM), dans le fluide utérin (108-120 mM) et dans les milieux de culture d'embryon *in vitro* classiques (85-118 mM) (Borland *et al.*, 1977a ; Borland *et al.*, 1977b ; Baltz, 2012).

Ces deux observations suggèrent que la croissance de la cavité blastocœlique est majoritairement liée à la pression osmotique plutôt qu'à la pression hydrostatique, d'échelle moins élevée (Torres-Sánchez *et al.*, 2021). Cette conclusion est partagée par d'autres auteurs s'étant penchés sur la physique de la formation du blastocœle (Chan *et al.*, 2019 ; Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a).

- *Exocytoses*

Le liquide s'accumulant dans le blastocœle serait également apporté par exocytose de vésicules vacuolaires par les blastomères (Marikawa et Alarcon, 2012 ; Ryan *et al.*, 2019). Les vacuoles s'élargissent à l'intérieur des blastomères avant de voir leur membrane fusionner avec celle du blastomère et leur contenu déversé dans l'espace intercellulaire (Aziz et Alexandre, 1991 ; Watson et Barcroft, 2001). Ces exocytoses sont visibles sur toutes les surfaces des cellules apolaires, internes, et sur la surface basolatérale des cellules polaires externes; il n'y a pas d'exocytose vers le milieu extérieur (Ryan *et al.*, 2019). Ces vésicules ne sont excrétées que dans les premiers temps de la formation du blastocœle, où elles ont cependant un impact fort sur le volume des microcavités (Ryan *et al.*, 2019). La manière dont la formation des vacuoles est gérée par la cellule et le minutage des exocytoses sont encore obscurs pour le moment.

b. Formation de microcavités

La blastulation est donc initiée par un flux de liquide qui mène à la formation de nombreuses microcavités dans l'espace intercellulaire. Pour permettre à ces microcavités de se former, les membranes adhésives des cellules de la blastula doivent être écartées. Deux mécanismes différents pourraient être à l'œuvre pour permettre ce décollement.

- *Interactions électrostatiques*

Torres-Sánchez *et al.* (2021) ont émis l'hypothèse que des interactions électrostatiques pouvaient participer à l'ouverture des microcavités à l'origine du blastocœle. En effet, pour l'ouverture d'autres cavités, comme des vaisseaux sanguins, une implication de ces interactions a été mise en évidence, avec la participation de protéines transmembranaires chargées comme la podocalyxine (Nielsen et McNagny, 2008 ; Strilić *et al.*, 2010). La podocalyxine fait partie du glycocalyx qui revêt la membrane plasmique et a des propriétés antiadhésives (Nielsen et McNagny, 2008). De même, ce type d'interactions, impliquant également la podocalyxine, permet aussi l'ouverture dans l'épiblaste de la cavité amniotique (Blasky *et al.*, 2015 ; Dumortier et Maître, 2018).

Torres-Sánchez *et al.* (2021) ont donc tenté de déterminer tout d'abord à quelle échelle cette répulsion électrostatique pourrait avoir lieu. Ils ont ainsi estimé la longueur d'écrantage de Debye-Hückel (ou longueur de Debye), qui correspond à la longueur d'influence des charges électriques dans un milieu conducteur, au-delà de laquelle le champ électrique formé n'interagit plus et ne peut donc plus agir en répulsif (Torres-Sánchez *et al.*, 2021 ; AL-Bazali, 2022). Cette longueur est donnée par la formule suivante :

$$l_{DH} = \sqrt{(\varepsilon_r \varepsilon_0 kT / (2\bar{c}z^2 e^2))}$$

En considérant une solution biologique simplifiée de NaCl de concentration $\bar{c} = 100$ mM et de valence $z = 1$, où ε_0 est la permittivité du vide et ε_r la permittivité relative de l'eau avec $\varepsilon_r \varepsilon_0 \approx 7 \times 10^{-10}$ F/m, k la constante de Boltzmann et T la température avec $kT = 10^{-21}$ J, et

$e = 1,6 \times 10^{-19}$ C la charge d'un électron, les chercheurs ont obtenu $l_{DH} \approx 1$ nm (Torres-Sánchez *et al.*, 2021).

Cette longueur leur a permis ensuite d'estimer la force répulsive à l'œuvre dans le cas de ces interactions, avec pour but de la comparer avec la force nécessaire pour rompre les jonctions cellulaires qui lient les blastomères. Ainsi, en considérant une interface cellule-cellule de $100 \mu\text{m}^2$, sur laquelle 400 dimères de cadhérine qui forment les jonctions adhérentes peuvent être présents, et sachant que défaire un lien de cadhérines nécessite 100 pN, il faut 400 Pa pour détacher deux cellules sur cette surface (Torres-Sánchez *et al.*, 2021).

Or, « la pression entre deux surfaces planes chargées séparées par une distance d et portant une charge n par unité de surface est, pour les potentiels électriques faibles, donnée par :

$$P = \frac{2e^2 n^2}{\epsilon_r \epsilon_0} \exp\left(-\frac{d}{l_{DH}}\right) \gg$$

Avec P la pression entre les deux surfaces chargées séparées par une distance d comprise entre 0 et 25 nm, ceci étant la taille moyenne d'une jonction adhérente (Perez et Nelson, 2004 ; Torres-Sánchez *et al.*, 2021).

Ainsi la densité de charge n nécessaire à la rupture des cadhérines entre 0 et 25 nm serait telle que : $2 \times 10^3 \mu\text{m}^2 < n < 6 \times 10^8 \mu\text{m}^2$.

En utilisant comme base la podocalyxine et en estimant sa densité de charge et sa présence au niveau des surfaces membranaires, les chercheurs en sont arrivés à la conclusion que les interactions électrostatiques pourraient potentiellement détacher les membranes, à distance très réduite uniquement (Torres-Sánchez *et al.*, 2021). Ainsi, il est possible de formuler l'hypothèse que les interactions électrostatiques interviennent au moment de l'initiation des microcavités.

Cependant, aucune preuve de leur participation à la formation du blastocœle n'a été apportée, et les simplifications utilisées pour effectuer ces estimations sont nombreuses. Par ailleurs, la longueur de Debye-Hückel est valable jusqu'à certaines concentrations ioniques, au-delà desquelles la formule utilisée par les auteurs pourrait être fautive, or des concentrations ioniques fortes permettent justement le flux de liquide dans la cavité blastocœlique (AL-Bazali, 2022). Cette concentration critique diffère pour chaque ion. Il est cependant à noter que si effectivement les concentrations ioniques concernées étaient trop élevées pour justifier l'usage de la formule telle qu'elle a été présentée, la longueur de Debye serait plus élevée, auquel cas les interactions seraient possibles sur de plus grandes distances, donc plus probablement impliquées (AL-Bazali, 2022).

- *Fracture hydraulique*

Si les interactions électrostatiques participent probablement à l'ouverture des cavités, celles-ci sont majoritairement permises par une « fracture hydraulique » des membranes cellulaires et la réorganisation des cadhérines qui les lient (Dumortier *et al.*, 2019).

En effet, Dumortier *et al.* (2019) ont observé une distribution des cadhérines modifiées lors de la formation des microcavités. Les cadhérines sont réparties de manière plus hétérogène et s'accumulent au bord des cavités. De plus, l'inhibition des mécanismes à l'origine du gradient qui permet le flux d'une manière ou d'une autre empêche la réorganisation des cadhérines. Que ce

soit l'inhibition des pompes Na⁺/K⁺ ATPases qui permettent le gradient, des kinases RHO qui permettent le transport épithélial polarisé, ou bien l'inversion du gradient par ajout de saccharose, toutes les méthodes inhibent la redistribution des molécules d'adhésion, par conséquent l'accumulation de fluide lui est nécessaire.

Les chercheurs ont alors émis l'hypothèse que la pression hydrostatique des microcavités puis du blastocœle pourrait être suffisante pour permettre un phénomène de fracture hydraulique. La mesure des pressions hydrostatiques dans les cavités, de l'ordre de 296 +/- 114 Pa, a révélé des pressions dix fois supérieures à celles mesurées pour les blastomères (Maître *et al.*, 2015 ; Dumortier *et al.*, 2019).

Dans les deux cas, des micropipettes sont utilisées pour l'obtention des pressions, de manière similaire aux expériences réalisées pour l'étude de la compaction vue précédemment. Les pressions sont calculées grâce aux lois de Young-Laplace et Young-Dupré (Maître *et al.*, 2015 ; Dumortier *et al.*, 2019). De plus, ces pressions hydrostatiques seraient suffisamment importantes pour pouvoir provoquer le phénomène de fracture hydraulique *in vitro*, d'après l'exemple d'un épithélium et de sa matrice (Casares *et al.*, 2015).

Ainsi, le flux d'eau sous pression mis en place par le gradient osmotique cause le déplacement des cadhérines ce qui permet d'écarter les membranes des cellules cohésives et l'initiation de formation des microcavités (Dumortier *et al.*, 2019).

c. Réunion en une cavité unique

Deux types de microcavités se distinguent. Certaines sont à l'interface de deux cellules, d'autres à l'interface de plus que deux cellules (Dumortier *et al.*, 2019). Les deux populations de microcavités se distinguent par la rapidité d'évolution de leur taille. Ainsi il a été envisagé qu'un phénomène de coalescence intervienne, et que les microcavités se rejoignent pour n'en former plus qu'une grande. Cependant, l'étude des tailles au cours du temps montre que toutes les microcavités suivent la même trajectoire, agrandissement puis rétrécissement à l'exception d'une qui devient la cavité principale (Dumortier *et al.*, 2019). De plus, la fusion de deux cavités est un phénomène peu observé, plutôt vers la fin de la cavitation, et aucun mouvement de microcavité n'a été mis en évidence, cette hypothèse a donc été considérée comme secondaire (Dumortier *et al.*, 2019).

Les microcavités multicellulaires atteignent des tailles beaucoup plus élevées (jusqu'à 10 fois plus importantes) et rétrécissent plus tardivement que les cavités bicellulaires, en lien avec les différences de pressions hydrostatiques existant entre les microcavités (Dumortier *et al.*, 2019). En effet ces microcavités sont connectées via des « tuyaux » formés par un faible espacement dans l'espace intercellulaire (Krug *et al.*, 2014). Ainsi, toute différence de pression entre deux cavités doit mener à un flux de liquide de la cavité à haute pression vers la cavité à faible pression.

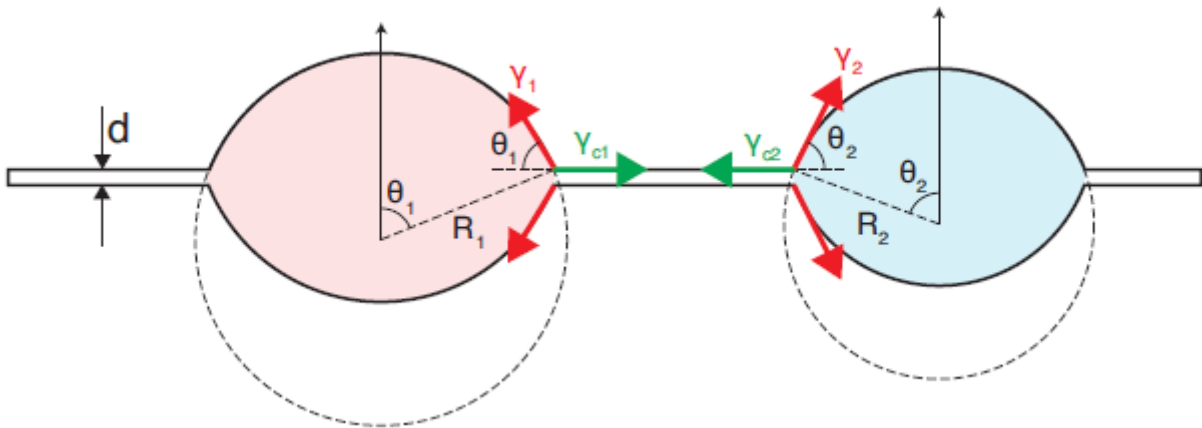
A partir de cette observation et de la loi de Laplace qui lie la pression dans les microcavités à leur tension de surface et à leur rayon, « à tensions égales, toute différence de pression est due à la taille des microcavités », ce qui explique que les petites cavités se déversent dans les grandes et donc rétrécissent plus vite (Dumortier *et al.*, 2019). Il faut cependant noter que les tensions ne sont pas forcément homogènes et peuvent inverser le flux, à tailles de cavités égales (Dumortier *et al.*, 2019).

- *Modélisation de deux cavités*

Un modèle des dynamiques entre deux cavités a été proposé par Dumortier *et al.* (2019) pour rendre compte des forces qui régissent les échanges de fluides entre les microcavités.

Ils proposent d'abord l'exemple de deux microcavités en deux dimensions, symétriques, reliées par un « tuyau » de diamètre d (espace intercellulaire entre les membranes, très faible par rapport aux rayons des cavités) représentées sur la Figure 20. Chaque microcavité i est caractérisée par un rayon de courbure R_i , une pression P_i , et une tension linéaire γ_i :

Figure 20 : Paramétrisation géométrique de deux cavités échangeant des fluides via un "tuyau". de diamètre (Dumortier *et al.*, 2019).



Note : Le tuyau est de diamètre d . Les cavités sont symétriques, de rayon R_i (où $i = 1$ ou 2), et d'angle de contact θ_i . Les tensions linéaires γ_i et tensions de contact γ_{ci} sont telles que l'équilibre des forces est respecté.

- D'après la loi de Laplace : $P_i = \frac{\gamma_i}{R_i}$
- D'après la deuxième loi de Newton, par équilibre des forces on a : $2\gamma_i \cos \theta = \gamma_{ci}$
- Pour obtenir une expression de R_i on utilise l'aire de la cavité A_i en négligeant l'aire du « tuyau » qui relie les cavités : $A_i \sim R_i^2 [2\theta_i - \sin 2\theta_i]$
- Finalement, on a :

$$P_i = \frac{\gamma_i \sqrt{2\theta_i - 2\sin \theta_i}}{\sqrt{A_i}} = \gamma_i \sqrt{\frac{2\theta_i - 2\sin \theta_i}{A_i}}$$

Ainsi, des cavités de courbures et tensions différentes ont des pressions différentes, à l'origine d'un gradient qui génère un flux de fluide de la cavité à la plus haute pression vers celle à la pression la plus basse à travers les tuyaux en respectant la conservation de la masse (Dumortier *et al.*, 2019). On a alors :

- $A_{tot} = A_1 + A_2$ où A_{tot} est constante, par conservation de la masse
- $\mathcal{R}_{12} = \frac{l_{12}}{k_v}$ où \mathcal{R}_{12} est la résistance hydraulique du tuyau reliant les deux cavités, proportionnelle à sa longueur l_{12} , avec k_v un coefficient de friction donnée par la loi de Poiseuille :
 - $k_v = \frac{d^3}{12\eta}$ où η est la viscosité du fluide
- L'évolution en fonction du temps des tailles des cavités est donnée par :

$$\frac{dA_1}{dt} = -\frac{dA_2}{dt} = I_{1,2} = (P_2 - P_1) / \mathcal{R}_{12}$$

Où $I_{1,2}$ est le flux de liquide de la cavité 2 vers la cavité 1, et le signe de $I_{1,2}$ donne le sens du flux (Dumortier *et al.*, 2019).

Les chercheurs ont également intégré le pompage du liquide à travers la surface de la cavité, en choisissant de ne pas définir ce flux \mathcal{L}_i en fonction des différences de pression osmotiques et hydrostatiques comme cela a été fait par d'autres (Chan *et al.*, 2019 ; Torres-Sánchez *et al.*, 2021) mais en le considérant comme proportionnel au périmètre de la cavité (Dumortier *et al.*, 2019) :

$$\mathcal{L}_i = 2 \times 2\theta_i \sqrt{\frac{A_i}{2\theta_i - 2\sin\theta_i}}$$

En négligeant le flux de pompage dans le tuyau, et en introduisant un débit de pompage par unité de longueur λ , pour une cavité i , on a :

$$\frac{dA_i}{dt} = I_p(\theta_i, A_i) = \lambda \mathcal{L}_i = 4\lambda\theta_i \sqrt{\frac{A_i}{2\theta_i - 2\sin\theta_i}}$$

Dès lors, pour le cas de deux cavités connectées dont le débit de pompage λ est similaire, l'évolution de leur taille en fonction du temps est donnée par le système d'équations suivant :

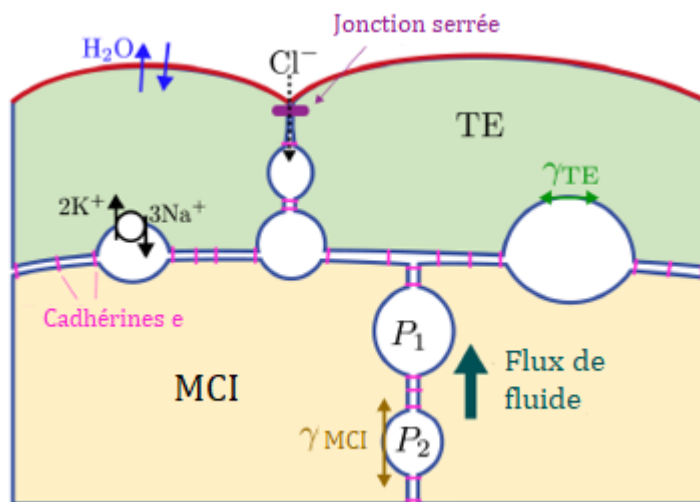
$$\begin{cases} \frac{dA_1}{dt} = I_{1,2} + I_p(\theta_1, A_1) \\ \frac{dA_2}{dt} = I_{2,1} + I_p(\theta_2, A_2) \end{cases}$$

- *Modélisation d'un réseau de cavités*

A partir du système précédent, Dumortier *et al.* (2019) proposent une généralisation de leur modèle à un réseau de cavités (Figure 21). Pour la cavité i , avec ∂_i des cavités voisines de i :

$$\frac{dA_i}{dt} = \sum_{j \in \partial_i} I_{i,j} + I_p(\theta_i, A_i)$$

Figure 21 : Contact cellulaire lors de la cavitation dans une blastula de souris, avec γ_{TE} et γ_{MCI} les tensions de surface des microcavités au contact respectif du TE et de la MCI et représentation de certains échanges ioniques (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021).



Ces mêmes chercheurs ont fait le lien entre la formation du blastocœle via de multiples microcavités et le phénomène de mûrissement d'Ostwald (Dumortier *et al.*, 2019) qui est décrit comme suit :

« L'énergie totale d'un système à deux phases (où la deuxième phase est dispersée dans une matrice) peut être diminuée via l'augmentation de l'échelle de taille de la deuxième phase et donc une diminution de la surface totale entre les deux interfaces » (Voorhees, 1985).

Ce phénomène étudié par Wilhelm Ostwald au début du XX^e siècle décrit l'évolution d'une multitude de gouttelettes d'une phase dispersée dans une autre vers un nombre moins grand de gouttelettes de plus grande taille, comme par exemple pour des gouttelettes d'huile dans de l'eau (Voorhees, 1985 ; McNaught et Wilkinson, 2019). La force motrice de ce phénomène est la différence de pressions suivant la loi de Laplace, d'où la proposition de modèle pour le réseau de cavités basé sur cette loi (Dumortier *et al.*, 2019). De la sorte, l'état de l'embryon contenant de multiples microcavités est instable, et son énergie peut être réduite par la formation d'une seule grande cavité, où les tensions sont moins fortes (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a).

- *Influence de la pression osmotique et de pompage ionique actif*

Dans le modèle précédemment présenté, l'hypothèse est faite que les différences de pression osmotiques sont négligeables dans le phénomène de mûrissement, et aucun soluté n'est pris en compte dans le fluide modélisé (Dumortier *et al.*, 2019). Or, il a été vu que lors de l'ouverture des cavités, la différence de pression osmotique est la force majoritaire qui permet le flux de fluide dans l'espace intercellulaire (Biggers *et al.*, 1988 ; Watson et Barcroft, 2001 ; Torres-Sánchez *et al.*, 2021).

Pour étudier la question, l'équipe de chercheurs à l'origine du modèle précédemment évoqué a réalisé dans des travaux plus récents de nombreuses simulations numériques dans un modèle proche, mais plus développé, en prenant en compte cette fois un soluté unique, non chargé (Le

Verge-Serandour et Turlier, 2021b). Les simulations suggèrent d'une part que le rôle de la différence de pressions osmotiques est négligeable par rapport aux différences de pressions hydrostatiques (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021b). D'autre part, elles montrent que si le mûrissement « inverse » (une grande cavité qui se vide dans une plus petite) lié à une hétérogénéité osmotique est théoriquement possible, notamment quand l'osmolyte est piégé dans une très petite cavité en fin de vidange, le scénario le plus probable est celui d'un ralentissement général des dynamiques hydrauliques si la concentration du soluté s'équilibre rapidement par rapport à la vitesse de rétrécissement de la cavité (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021b). Le mûrissement est ainsi quasi-indépendant des différences osmotiques passives (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021b).

En revanche, l'étude du pompage actif de soluté dans les cavités montre une influence primordiale de celui-ci dans la dynamique de deux cavités voisines (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021b). En effet, pour deux cavités de tailles différentes, l'introduction et la variation d'un débit de pompage actif dans la plus petite (avec un pompage nul dans la grande) fait apparaître quatre scénarios possibles pour les deux cavités. Ainsi, d'après Le Verge-Serandour et Turlier (2021b) :

- Si le débit de pompage actif est négligeable, et que les deux cavités sont « hydrauliquement découplées » autrement dit que les différences de pressions en jeu ne déclenchent pas de flux de fluide, l'effondrement des deux cavités est le plus probable.
- Si le débit de pompage actif est négligeable, mais que les deux cavités sont « hydrauliquement couplées » par des différences de pression, alors on observe le phénomène de mûrissement, et la petite cavité se vide dans la plus grande
- Si le débit de pompage actif est augmenté dans la petite cavité, alors son influence peut dépasser celle de la différence de pressions hydrostatiques et provoquer un mûrissement inverse
- Si le débit de pompage actif est augmenté dans la petite cavité, mais que la vitesse de vidange est telle que les deux cavités grandissent plus vite qu'elles n'échangent leur fluide, un quatrième régime apparaît, la coalescence. La croissance des deux cavités provoque la réduction de la longueur du tuyau qui les lie et finalement la fusion.

La coalescence avait été dans un premier temps mise de côté dans l'étude du rassemblement en une cavité unique (Dumortier *et al.*, 2019), mais l'étude du pompage actif semble lui redonner une place potentielle dans ce phénomène (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021b). L'étude d'une chaîne de microcavités unidimensionnelle soumise à un débit de pompage actif révèle la possibilité d'une cavitation en deux phases, d'abord un mûrissement puis une phase de coalescence majoritaire, qui pourrait correspondre avec l'observation tardive du phénomène de coalescence dans la cavitation (Dumortier *et al.*, 2019 ; Le Verge-Serandour et Turlier, 2021b). D'autres études devront cependant venir appuyer ou infirmer cette hypothèse.

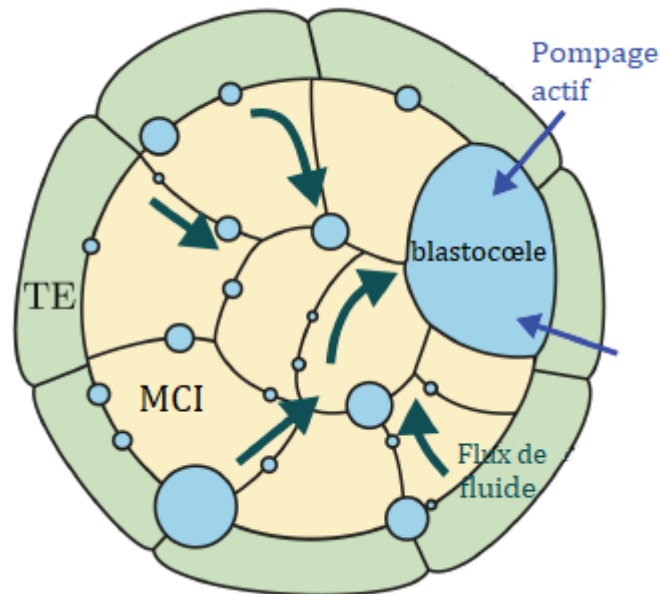
Ainsi, l'influence du pompage actif simulé sur deux cavités bidimensionnelles ou sur une chaîne de cavités unidimensionnelle est majeure, et permet de formuler l'hypothèse qu'*in vivo*, sur les microcavités tridimensionnelles de l'embryon, le pompage actif serait aussi d'influence majeure.

- *Positionnement de la cavité principale*

De même que les premières cavités se forment dans les zones de moins forte tension, en déplaçant les cadhérines, la cavité finale est dans une zone de tensions moindres, entourées de

cellules à basses tensions de surface, plus facilement déformable (Dumortier *et al.*, 2019 ; Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a ; Torres-Sánchez *et al.*, 2021). Ainsi, le blastocœle se forme à l'interface entre les cellules du TE et celles de la MCI, ces dernières ayant une contractilité plus forte, elles se déforment moins, contrairement aux cellules du TE comme illustré sur la Figure 22 (Maître, 2017 ; Dumortier *et al.*, 2019 ; Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a ; Torres-Sánchez *et al.*, 2021).

Figure 22 : Modèle d'une blastula de souris lors de la cavitation avec de multiples microcavités et flux de fluide (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021)



Pour corroborer cette idée, des expériences menées sur la cavitation d'embryons chimériques pour lesquels une partie des blastomères est mutée sur le gène MYH9 (gène de la chaîne lourde de la myosine, qui permet notamment la contractilité à la surface des cellules) montrent que le blastocœle se place préférentiellement du côté muté, contrairement aux souches sauvages où le blastocœle se place indifféremment d'un côté ou d'un autre (Dumortier *et al.*, 2019).

La localisation préférentielle du blastocœle, la zone de plus faible tension, serait ainsi potentiellement liée aux schémas de divisions cellulaires (Zernicka-Goetz, 2005). En effet, certaines cellules internes sont positionnées ainsi par division asymétrique d'une cellule externe, auquel cas des connexions résiduelles peuvent persister via les jonctions, tandis que d'autres sont issues de divisions de cellules internes ou sont internalisées par leur contractilité (Zernicka-Goetz, 2005 ; Samarage *et al.*, 2015 ; Maître, 2017). De la sorte, les cellules internes sont liées de manière variable aux cellules externe, créant des zones d'adhésion variable plus ou moins propice à l'émergence d'une cavité (Zernicka-Goetz, 2005).

Par ailleurs, l'étude du pompage actif par des simulations numériques par la même équipe a montré que ce dernier peut influencer la position finale du blastocœle (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021b). En effet, en supposant un pompage équivalent au niveau des interfaces avec le trophoblaste comme avec les cellules de la MCI, et sans tenir compte des tensions et déformations cellulaires, la cavité principale se retrouve simulée au centre de l'embryon, au cœur

de la MCI (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021b). A l'inverse, en supposant un pompage différentiel, plus efficace à l'interface avec le trophoctoderme, le blastocœle est situé physiologiquement en contact avec le TE (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021b). Or, la formation du blastocœle repose entre autres sur la polarisation du TE par rapport à la MCI, notamment par la présence de pompes ioniques (Biggers *et al.*, 1988 ; Kawagishi *et al.*, 2004), donc le pompage actif serait concentré à l'interface avec le TE, et la simulation de pompage différentiel serait donc plus proche de la réalité physiologique (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021b).

Le pompage ionique actif pourrait donc participer au positionnement du blastocœle, en synergie avec la répartition différentielle des tensions superficielles, pour assurer le placement correct de la cavité principale.

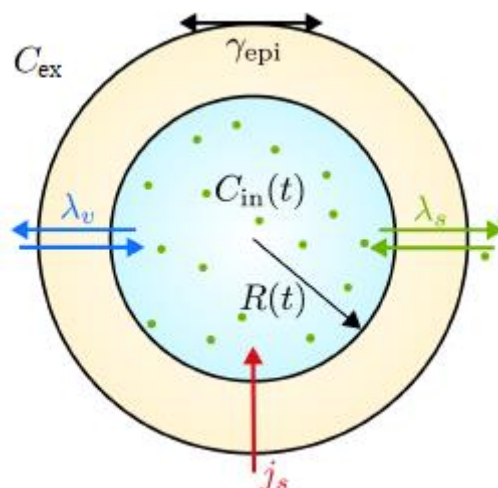
d. Régulation du volume du blastocœle

La formation d'une cavité par flux de liquide pose la question de la régulation de sa taille, autrement dit, il est intéressant de se pencher sur les mécanismes qui régissent le contrôle de la croissance de la cavité et de l'embryon en général.

- *Modèle de base : sphère et couche monocellulaire*

Pour décrire ces phénomènes, un modèle où le blastocœle est considéré comme une sphère entourée d'un compartiment cellulaire unique, qui représente la couche épithéliale, et où le fluide ne contient qu'un soluté unique a été proposé par Le Verge-Serandour et Turlier (2021a) (Figure 23). Le blastocœle est ainsi caractérisé par son rayon $R(t)$ et sa concentration $C_{in}(t)$, tandis que C_{ex} est la concentration du milieu extérieur, considérée constante. La couche cellulaire est décrite par une perméabilité à l'eau λ_v et aux solutés λ_s ainsi que par sa tension de surface γ_{epi} (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a).

Figure 23 : Modèle pour le contrôle volumique de la cavité dans une cellule (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021)



Selon Le Verge-Serandour et Turlier (2021a), le flux de fluide est responsable de la croissance, et comme vu précédemment celui-ci est proportionnel à la perméabilité à l'eau de la couche cellulaire

λ_v , et dépendant de la compétition entre différence de pressions osmotiques $\Delta\Pi = \mathcal{R}T(C_{in}(t) - C_{ex})$ (loi de Van't Hoff) et différence de pressions hydrostatiques $\Delta P = P_{in} - P_{ex}$ (où \mathcal{R} est la constante des gaz parfaits, T la température, P_{in} la pression dans la cavité et P_{ex} la pression extérieure). On a alors (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a) :

$$\frac{dR}{dt} = \lambda_v [\mathcal{R}T(C_{in} - C_{ex}) - (P_{in} - P_{ex})] = \lambda_v(\Delta\Pi - \Delta P)$$

Ainsi le volume se stabilise quand $\Delta\Pi \sim \Delta P$, avec un contrôle très majoritaire par la pression osmotique, qui est amenée à être modifiée puisqu'à mesure que le volume augmente, la concentration en solutés dans la cavité change. Cette concentration est contrôlée par la différence de potentiel chimique entre le milieu extérieur et la cavité, et est augmentée par le pompage ionique actif j_s .

Selon Le Verge-Serandour et Turlier (2021a), on a :

$$\frac{dC_{in}}{dt} = 4\pi R^2 \left[\lambda_s \mathcal{R}T \log \frac{C_{ex}}{C_{in}} + j_s \right]$$

Avec le pompage ionique actif :

$$j_s = \lambda_s \mathcal{R}T \log \frac{C_{in}}{C_{ex}} \sim \lambda_s \mathcal{R}T \frac{(C_{in} - C_{ex})}{C_{ex}}$$

Lorsque le volume se stabilise, on a $\Delta\Pi \sim \Delta P$, donc il existe un seuil de pompage j^* tel que :

$$j^* = \lambda_s \frac{(P_{in} - P_{ex})}{C_{ex}}$$

Lorsque ce seuil est dépassé, le volume ne peut plus augmenter, et en théorie la cavité se réduirait jusqu'à retourner en dessous du seuil (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a).

Ce modèle est proche de celui utilisé précédemment pour décrire les flux de fluides (Torres-Sánchez *et al.*, 2021), mais ne tient pas compte des différences de potentiels électriques de part et d'autre de la couche épithéliale.

- *Modèle de la zone pellucide*

Les mêmes chercheurs ont ensuite fait l'hypothèse que l'expansion de la cavité était plafonnée par la présence de la zone pellucide, génératrice d'une pression hydrostatique d'amplitude suffisante pour limiter la croissance (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a). La zone pellucide, si elle est considérée comme un matériau élastique, est caractérisée par son rayon R , son épaisseur h , et la contrainte tangentielle subie σ , et la tension de la zone pellucide T_{ZP} vaut alors :

$$T_{ZP}(R) = h(R)\sigma(R)$$

Avec, pour un matériau élastique simple, une relation linéaire entre la contrainte tangentielle et le rayon R avec R_0 le rayon au repos, et E le module de Young de la zone pellucide. Le module de Young ou module d'élasticité, est la contrainte mécanique qui engendrerait un doublement de la

longueur du matériau, il s'agit d'une notion qui décrit la rigidité d'un matériau (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a ; Cazin et Kotcharian.). On a :

$$\sigma(R) = E \frac{(R - R_0)}{R_0}$$

Le module de Young de la zone pellucide a été estimée notamment pour la souris (entre 30 et 40 kPa) (Sun *et al.*, 2003 ; Khalilian *et al.*, 2010) et le bovin (autour de 100 kPa) (Papi *et al.*, 2010 ; Boccaccio *et al.*, 2012). On peut alors se demander, face à une différence d'échelle comme celle-ci, si la zone pellucide pourrait jouer des rôles différents selon les espèces, ou participer plus ou moins aux contraintes mécaniques en jeu.

La tension corticale γ_{epi} s'ajoute alors à la tension de la zone pellucide, et selon Le Verge-Serandour et Turlier (2021a) on a d'après la loi de Laplace :

$$(P_{in} - P_{ex}) = \frac{2}{R} [\gamma_{epi} + T_{ZP}(R)]$$

De la sorte, la somme des deux tensions pourrait augmenter la différence de pression bien au-delà des quelques centaines de Pascals observées et égaliser la pression osmotique, permettant un volume stable (Le Verge-Serandour et Turlier, 2021a).

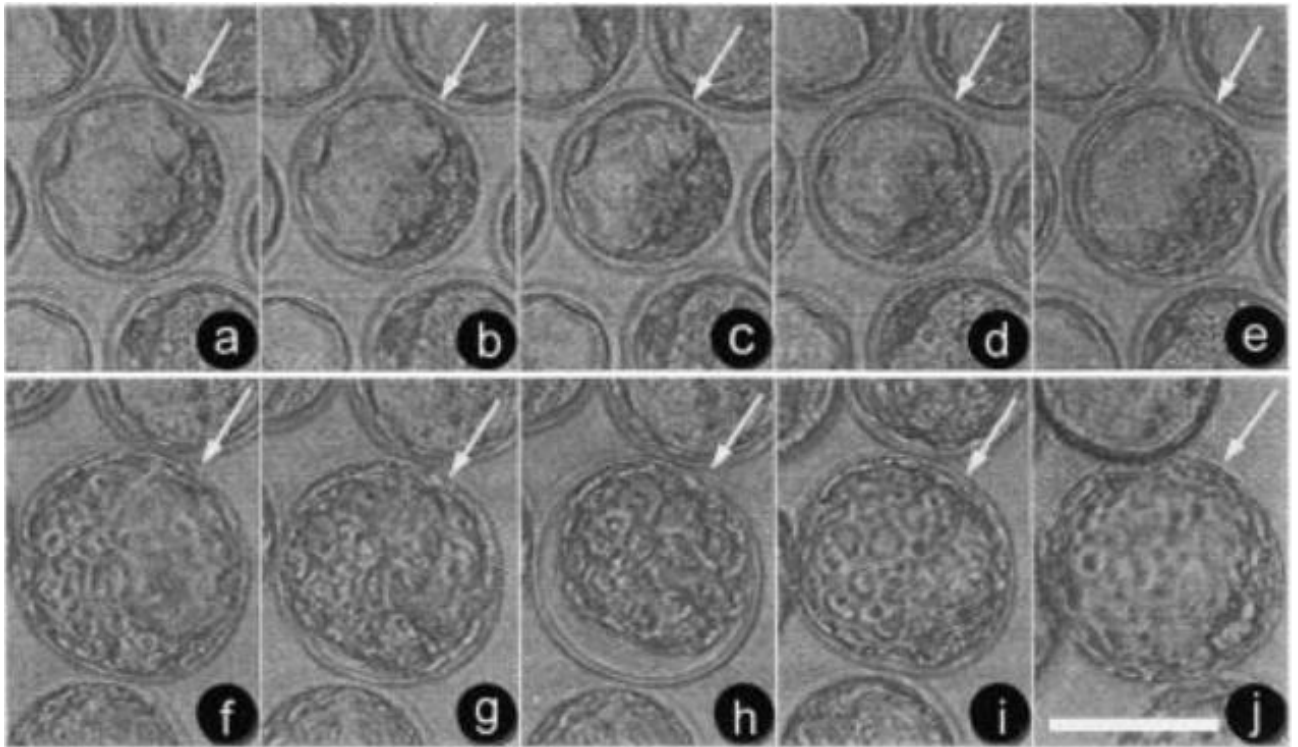
- *Contractions et modèle de la contrainte épithéliale*

L'idée que la zone pellucide puisse contraindre la croissance et que le volume de la cavité blastocœlique soit ainsi régulé par cette dernière et la pression qu'elle engendre est relativement instinctive, et elle a été envisagée également par d'autres chercheurs (Chan *et al.*, 2019).

Cependant, le modèle de Le Verge Serandour et Turlier (2021a) ne tient pas compte des chutes de pression et de volume intermittentes subies par l'embryon (Niimura, 2003 ; Chan *et al.*, 2019). En effet, après une période de croissance volumique stable, l'embryon subit régulièrement des effondrements brusques de son volume et de sa pression interne, un phénomène semblable à des contractions qui peuvent réduire la taille de blastocœle voire même le faire disparaître (Niimura, 2003 ; Chan *et al.*, 2019) (voir Figure 24). Ces contractions sont suivies d'une ré expansion, et comme pour l'expansion originel du blastocœle, la ré expansion qui suit une contraction semble dirigée par un gradient osmotique obtenu par pompe ionique actif (Niimura, 2003).

Peu de contractions surviennent avant l'éclosion, la plupart arrivent pendant et après (Niimura, 2003). Les contractions sont souvent catégorisées en deux types : les contractions faibles (moins de 20% de volume du blastocœle en moins) et les contractions fortes (plus de 20% du volume du blastocœle en moins) (Niimura, 2003). Si les contractions sont physiologiques, voire utiles à l'éclosion, les contractions fortes semblent l'inhiber, et être associées à des anomalies chromosomiques et une qualité embryonnaire moindre de manière générale (Niimura, 2003 ; Viñals Gonzalez *et al.*, 2018 ; Gazzo *et al.*, 2020). Les études sur les contractions de la blastula suggèrent qu'elles pourraient être utilisées comme moyen d'évaluation de la qualité embryonnaire (Niimura, 2003 ; Shimoda *et al.*, 2016 ; Viñals Gonzalez *et al.*, 2018 ; Gazzo *et al.*, 2020).

Figure 24 : Photographies d'une vidéo au microscope de blastula de souris (Niimura, 2003). (flèches) (Niimura, 2003)



Note : Une blastula de souris (flèches) au cours d'une contraction faible (a-e) et d'une contraction forte (f-j). L'échelle vaut 100 μ m. a, f : avant contraction ; b, g : pendant la contraction ; c, h : à l'apogée de la contraction; d, i : pendant la ré-expansion; e, j : volume initial retrouvé.

Les contractions existent chez plusieurs mammifères, comme la souris, le bovin, et l'humain, avec des caractéristiques variables, comme le nombre moyen, la durée des contractions et de la période de ré expansion (Niimura, 2003 ; Gazzo *et al.*, 2020).

La prise en compte des contractions dans la mise au point d'un modèle décrivant la régulation de la croissance du blastocœle est intéressante, puisqu'elles constituent des variations volumiques et permettent d'étudier celles-ci. Ainsi, Chan *et al.* (2019) ont observé que même en l'absence de zone pellucide, les contractions ont lieu, et à la même fréquence, suggérant une régulation au moins partiellement autonome. Ils ont alors proposé que la régulation du volume soit faite par la tension corticale de l'épithélium du trophoctoderme. Il est à noter que leurs expériences montre néanmoins une participation de la zone pellucide à la totalité de la pression subie par l'embryon (Chan *et al.*, 2019).

Tout d'abord, ils ont observé une relation linéaire entre la forme des cellules du trophoctoderme et la tension corticale, suggérant un comportement de matériau élastiquement linéaire, caractérisé comme pour la zone pellucide par un rayon, une épaisseur, et un module de Young (Chan *et al.*, 2019). De plus, la pression corticale (mesurée avec une micropipette) augmente au fur et à mesure de la croissance du blastocœle, et des mesures sur des fractions d'embryons (obtenues en séparant les blastomères) révèlent une tension corticale moins élevée que pour les embryons

totaux au début de la formation du blastocœle, puis finalement la convergence vers une valeur similaire pour les fractions comme les embryons totaux à l'atteinte d'un volume stable (Chan *et al.*, 2019). Enfin, les contractions sont souvent précédées de mitoses de cellules du trophoctoderme (pas tout le temps), qui peuvent expliquer par des fuites brutales de liquide les effondrements de pression et de volume (Chan *et al.*, 2019). Une mitose génère une fuite par l'épithélium, qui ensuite est comblée quand les jonctions cellulaires sont réparées (Ruiz-Herrero *et al.*, 2017). Dans l'ensemble, cela suggère « qu'une limite d'élasticité générée hydrauliquement puisse établir un seuil de taille pour la blastula mature » (Chan *et al.*, 2019).

Leur modèle est donc celui d'une « cavité sphérique sujette à un déséquilibre osmotique qui crée un flux de solvant vers l'intérieur. L'équilibre entre différence de pressions osmotiques et hydrostatiques détermine la fréquence des oscillations de taille et la taille moyenne comme fonction du module de Young de l'épithélium, du stress de rupture de l'épithélium, de la perméabilité du tissu et de la pression osmotique » (Chan *et al.*, 2019). Ainsi, une expression du rayon final R_{max} de l'embryon à partir de son rayon initial R_0 serait :

$$R_{max} \sim R_0 \times \left[1 + \frac{(\sigma_c - \sigma_0)}{E} \right]$$

Avec E le module de Young de l'épithélium, σ_c la contrainte de rupture de l'épithélium, σ_0 la contrainte avant cavitation (Chan *et al.*, 2019). La relation linéaire entre R_{max} et R_0 est montrée à l'aide de blastulas de tailles diverses (Chan *et al.*, 2019). Les diverses mesures réalisées (pression luminale, rayon de la cavité et épaisseur du tissu) permettent d'estimer E autour de 7 kPa, ce qui est proche des mesures effectives de cette valeur (Chan *et al.*, 2019). Ce modèle théorique est très proche d'un modèle préexistant décrivant la croissance oscillante des kystes en lien avec la pression générée par l'accumulation de liquides en leur sein (Ruiz-Herrero *et al.*, 2017). Cependant dans les deux cas, une approximation importante est celle de la rigidité de l'épithélium. Celle-ci n'est pas constante, elle augmente avec les pressions générées, par une probable maturation mécanique des jonctions serrées (Chan *et al.*, 2019). D'autre part, elle n'est pas non plus homogène, les jonctions serrées étant aussi des points de raideur plus importante que le reste de la surface épithéliale (Chan *et al.*, 2019). Enfin le trophoctoderme croît avec les mitoses, relâchant ainsi la pression et ne permettant en théorie pas une limite réelle de croissance de l'embryon.

En conclusion, si le modèle décrivant parfaitement la croissance volumique du blastocœle n'existe pas pour le moment, les modèles existants sont une bonne approximation de la situation, ce qui permet de rendre compte des éléments impliqués dans la régulation, comme la raideur de la zone pellucide, ou la croissance de la tension corticale de l'épithélium. Si quelques données chiffrées existent pour l'embryon de bovin, les études à l'origine des modèles mentionnés dans cette partie sont réalisées sur des embryon de souris, ou en prenant l'embryon de souris pour exemple. La similarité des phénomènes chez le bovin ne peut être que supposée.

La formation d'un gradient osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de l'embryon permet un flux de liquide qui sépare par fracture hydraulique et à l'aide d'interactions électrostatiques les adhésions entre membranes cellulaires, formant ainsi une myriade de microcavités. Celles-ci continuent de croître par pompage ionique actif et subissent des pressions différentielles qui dirigent des échanges liquidiens entre elles. Elles se vident ainsi les unes dans les autres et fusionnent pour n'en former plus qu'une, le blastocœle, dont la croissance est ralentie par la tension qu'il impose au trophoctoderme et par la zone pellucide.

B. Mécanismes biomoléculaires

Des phénomènes moléculaires, souvent étroitement liés à la mécanique de l'embryon elle-même, jouent aussi un rôle dans la régulation du volume, et de manière générale dans la formation du blastocœle.

a. Etablissement du gradient

Le gradient osmotique qui permet la croissance du blastocœle est permis par la collaboration des pompes ioniques, des aquaporines, des jonctions serrées, et de manière générale par la localisation précise de ces éléments par la polarité du trophoctoderme.

- *Nécessité d'une polarité du trophoctoderme*

La polarité des cellules du trophoctoderme, qui possèdent un domaine apical et un domaine basolatéral bien distincts a déjà été établie, ainsi que ses rôles divers dans la formation de la morula. Outre les caractéristiques vues précédemment, les membranes apicales et basolatérales des cellules du trophoctoderme possèdent des populations différentes de protéines nécessaires aux échanges membranaires ioniques et moléculaires (Biggers *et al.*, 1988).

De même que pour la première différenciation, la polarité des cellules externes est donc indispensable à la formation du blastocœle. Le bon fonctionnement des kinases Rho et du système PAR-aPKC évoqués plus haut, qui sont les acteurs majeurs de l'établissement de la polarité, est donc nécessaire (Goldstein et Macara, 2007 ; Dard *et al.*, 2009 ; Amano *et al.*, 2010 ; Bryant *et al.*, 2010 ; Alarcon, 2010). Ainsi la répression de Par6db entraîne la malformation de jonctions serrées qui scellent l'embryon (Alarcon, 2010). Le même type de défauts sur les jonctions serrées peut être induits par la répression d'aPKC, partenaire de Pard6b (Dard *et al.*, 2009).

L'établissement de la polarité est également permis par trafics de vésicules dans le domaine apical (Bryant *et al.*, 2010). En cas d'altération de celui-ci, des éléments apicaux fondamentaux pour la croissance des cavités comme les jonctions et les pompes ioniques peuvent être distribués anormalement, ou altérés, et empêcher le bon déroulement de la cavitation (Bryant *et al.*, 2010).

- *Pompes Na⁺/K⁺/ATPases, pompes à protons :*

Les protéines Na⁺/K⁺/ATPase (Na⁺/K⁺ adénosine triphosphatase), et en particulier Atp1, seraient des actrices majeures de l'accumulation de fluide, via l'établissement d'un gradient d'ions (Madan *et al.*, 2007). Cette pompe fonctionne en hydrolysant une molécule d'ATP, ce qui lui permet d'échanger activement donc contre leur gradient trois ions Na⁺ contre deux ions K⁺. Elle est formée au minimum d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité beta (Kaplan, 2002).

De multiples isoformes des sous-unités alpha et beta de Na⁺/K⁺/ATPase sont en effet exprimées dans les embryons de souris, notamment au niveau de la membrane basolatérale des cellules du trophoctoderme (Kidder, 2002). De plus, de nombreuses expériences d'inhibition (notamment avec l'ouabaïne, inhibiteur spécifique) et de mutation sur les gènes des sous-unités suggèrent la nécessité de ces pompes pour la genèse du blastocœle (Kidder et Watson, 2005 ; Madan *et al.*, 2007 ; Marikawa et Alarcon, 2012).

Le rôle a priori évident pour ces protéines est la formation du gradient ionique à l'origine du flux de fluide qui forme le blastocœle. Cependant, elles pourraient avoir un autre rôle, en effet l'absence de chaque sous-unité altère la distribution de certains composants des jonctions serrées (Madan *et al.*, 2007 ; Rajasekaran et Rajasekaran, 2009). Or les jonctions serrées permettent, comme cela sera détaillé plus loin, l'étanchéité de l'embryon, et rendent possible l'accumulation d'eau en scellant l'embryon.

Le lien entre Atp1 et le mécanisme d'exocytose des vésicules a également été testé, suggérant que « l'exocytose des vésicules en tant que mécanisme d'accumulation de fluide est indépendante d'Atp1 » (Ryan *et al.*, 2019).

- *Echangeurs* :

Des échangeurs Na⁺/H⁺ (NHE) sont également impliqués dans les échanges ioniques du trophoctoderme. En particulier, l'isoforme NHE-3, localisée sur la membrane apicale des cellules du TE (Barr *et al.*, 1998), est importante pour la cavitation, en favorisant l'établissement du gradient ionique en faisant rentrer du sodium en échange d'un proton (Kawagishi *et al.*, 2004). Cependant d'autres échangeurs pourraient permettre une redondance de son rôle, car si l'inhibition de NHE-3 altère la cavitation, la double mutation de NHE-3 donne un embryon normal, suggérant d'autres échangeurs cibles du même inhibiteur (ou alors, une origine maternelle des échangeurs actifs lors de la cavitation) (Kawagishi *et al.*, 2004 ; Marikawa et Alarcon, 2012).

- *Aquaporines* :

La localisation de plusieurs isoformes d'aquaporines, canaux permettant le passage des molécules d'eau, a été mise en évidence dans le trophoctoderme (Barcroft *et al.*, 2003). En effet le gradient de pressions est trop faible pour permettre le passage des molécules d'eau directement à travers la membrane plasmique (Biggers *et al.*, 1988 ; Verkman et Mitra, 2000). L'aquaporine 3 est localisée dans le domaine apical des cellules du TE, l'aquaporine 9 et l'aquaporine 8 dans leur domaine basolatéral (Barcroft *et al.*, 2003). Ainsi, avec des aquaporines côté apical et côté basolatéral, le trophoctoderme permet un passage d'eau du milieu extérieur vers l'embryon, permettant l'accumulation de fluide qui constitue le blastocœle.

b. Importance des jonctions serrées

Les jonctions serrées, caractéristiques du trophoctoderme, scellent celui-ci et empêche la fuite liquidienne par les espaces paracellulaires, permettant ainsi l'accumulation de liquide et la hausse des pression hydrostatiques à l'intérieur des cavités (Eckert et Fleming, 2008). Elles jouent également le rôle de barrières entre les deux domaines (apical et basolatéral) en maintenant leur intégrité en empêchant leur mélange par fluidité membranaire (Gupta et Ryan, 2010).

- *Les composants des jonctions serrées*

Les jonctions serrées sont composées notamment d'occludines, de claudines, et de protéines zonula occludens (ZO), dites ZO1, ZO2 et ZO3 (Balda et Matter, 2008). Les différents composants s'assemblent au fur et à mesure du développement de la blastula, et les jonctions ne sont imperméables qu'à la toute fin de l'assemblage, qui a lieu au stade 32 cellules, quand la cavitation commence (Eckert et Fleming, 2008).

La détermination de l'utilité respective des différents composants n'est pas totalement déterminée, les mutations individuelles des composants n'empêchant le plus souvent pas la formation de la cavité, suggérant une redondance fonctionnelle entre certains de ces éléments (Marikawa et Alarcon, 2012 ; Baumholtz *et al.*, 2017).

L'absence de ZO2 retarde la formation du blastocœle, mais n'empêche pas la poursuite du développement, et ZO1 semble compenser ce manque, tandis qu'à l'inverse, l'absence de ZO1 induit un phénotype plus sévère avec impossibilité de poursuivre le développement, suggérant d'autres rôles non compensés par ZO2, notamment pour le développement des tissus extra-embryonnaires (Wang *et al.*, 2008 ; Sheth *et al.*, 2008 ; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2012).

Des expériences avec la CPE, l'entérotoxine de *Clostridium perfringens*, qui se lie aux claudines et augmente ainsi la perméabilité intercellulaire révèlent une cavitation altérée chez les embryons traités, suggérant un rôle important des claudines. Parmi les isoformes 3, 4, 6, 7, et 8 visées par la CPE, les claudines 4, et 6 sont retrouvées chez la souris (Moriwaki *et al.*, 2007).

- *Implications d'autres gènes*

Plus récemment, des études se penchent sur l'implication d'autres gènes que ceux codant pour les protéines des jonctions serrées elles-mêmes (J. Lee et Choi, 2021 ; S. Lee et Choi, 2021). Ainsi, le gène SPECC1 (*Sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1*), impliqué dans de nombreux processus biologiques (mitose, croissance cellulaire, transcription...) et le gène TRAF4 (*Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 4*) semblent tous deux impliqués dans la maturation des jonctions serrées (J. Lee et Choi, 2021 ; S. Lee et Choi, 2021).

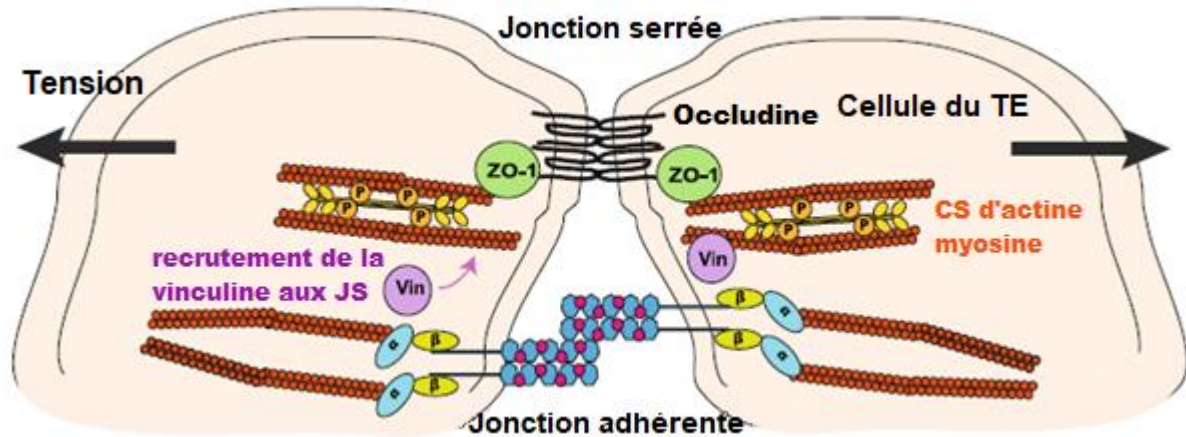
c. Place du cytosquelette

Le cytosquelette est fondamental dans la formation du blastocœle, notamment le cytosquelette d'actine-myosine (Chan *et al.*, 2019 ; Coticchio *et al.*, 2019).

D'une part les jonctions serrées sont étroitement liées avec le cytosquelette d'actine-myosine, et participent réciproquement à leur régulation (Balda et Matter, 2008). Lors de l'extension de la cavité blastocœlique, des remodellements des jonctions et du cytosquelette ont lieu (Chan *et al.*, 2019). Une relocalisation de l'occludine du cytoplasme vers les jonctions serrées, ainsi qu'une continuité dans les chaînes légères diphosphorylées régulatrice de myosine, qui auparavant étaient ponctuelles, également au niveau des jonctions serrées (Chan *et al.*, 2019). La vinculine, un senseur de tension, s'accumule au même endroit pendant l'extension cavitaire, et s'en désassemble si la cavité s'effondre, suggérant un rôle « mécano sensitif à la croissance de la cavité » (Chan *et al.*, 2019). Enfin, la réduction de la tension épithéliale altère la qualité du scellement par les jonctions serrées, suggérant un rétrocontrôle positif entre mécanique et molécularité. La tension exercée contre le TE permettrait la maturation des jonctions serrées,

possiblement via le cytosquelette d'actine-myosine et la vinculine (cf. Figure 25) (Chan *et al.*, 2019).

Figure 25 : Schéma du recrutement tension-dépendant de la vinculine aux jonctions serrées (JS), potentiellement via une liaison au cytosquelette (CS) d'actine-myosine, alors que l'étirement des cellules du TE augmente pendant l'extension cavitaire (Chan *et al.*, 2019)



Cette hypothèse est en accord avec les travaux d'autres chercheurs sur l'activité des anneaux d'actine lors du commencement de la cavitation (Zenker *et al.*, 2018). Ceux-ci sont souvent associés à un phénomène de contraction, cependant dans le cas de la blastula, où ils sont localisés au niveau du domaine apical des blastomères externes, les anneaux d'actine ne se contractent pas mais s'étendent (Zenker *et al.*, 2018). Ils établissent des points de contact avec les anneaux des cellules voisines au niveau des jonctions cellulaires, et s'étendent à partir de là le long de la jonction à la manière d'une « fermeture éclair », créant un lien linéaire entre les cellules, et augmentant la tension au point de contact (Zenker *et al.*, 2018). Suite à cette association, l'actine interagit avec différents composants des jonctions présentes (cadhérines E pour les jonctions adhérentes, ZO1 pour les jonctions serrées), et ces interactions semblent promouvoir le recrutement des composants des jonctions (Zenker *et al.*, 2018). De la sorte, le cytosquelette d'actine-myosine serait un lien entre tension de l'épithélium et maturation des jonctions cellulaires, notamment des jonctions serrées, ainsi qu'un acteur de la régulation du volume du blastocœle (Zenker *et al.*, 2018 ; Chan *et al.*, 2019).

Par ailleurs le cytosquelette, ainsi que la protéine Rho impliquée notamment dans l'établissement de la polarité cellulaire, seraient aussi acteurs de la réparation des fuites liées à la croissance du blastocœle (Stephenson *et al.*, 2019). Lorsque sous la pression de l'expansion du blastocœle, ou suite à des divisions, des fuites apparaissent dans le trophoctoderme, elles peuvent être réparées par l'intervention de la protéine Rho, avec en soutien une contraction du cytosquelette d'actine-myosine pour rapprocher les bords de la « plaie » (Stephenson *et al.*, 2019). L'étude en question est réalisée sur des blastula de xénope, mais ouvre des perspectives intéressantes.

d. Chez le bovin

Au niveau moléculaire, le processus de cavitation semble se dérouler de manière similaire chez le bovin et la souris. La consommation d'ATP par les Na⁺/K⁺-ATPases augmente ainsi drastiquement

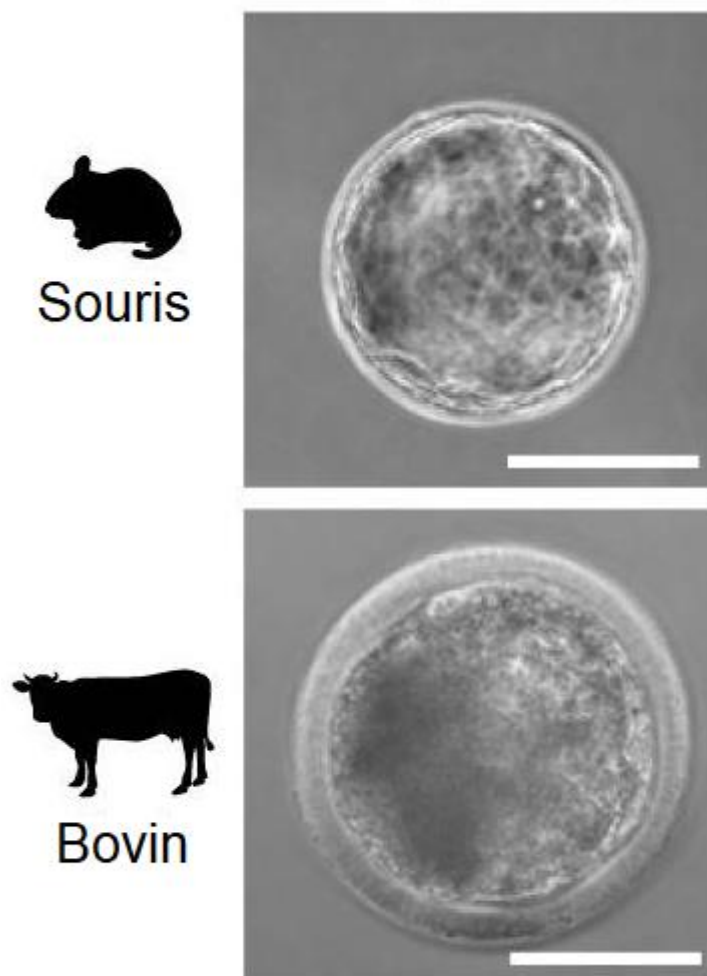
à cette période, suggérant le même mécanisme de formation de gradient ionique (Houghton *et al.*, 2003).

Le bovin exprime certaines différences par rapport à la souris, notamment au niveau des sous-unités de la protéine Na⁺/K⁺-ATPase. Le bovin posséderait ainsi une population, un peu différente en sous-unités, avec notamment une quantité accrue de l'isoforme alpha3, plus sensible à l'ouabaïne (Watson *et al.*, 2004).

Le processus d'assemblage des jonctions serrées semble être similaire chez le bovin, de même que le processus de polarisation, avec une disposition des composants des jonctions très similaire (Barcroft *et al.*, 1998 ; Eckert et Fleming, 2008).

A nouveau, les informations sur le bovin sont beaucoup plus parcellaires que celle concernant la souris, même si fondamentalement les mécanismes semblent identiques (Houghton *et al.*, 2003 ; Plusa et Piliszek, 2020). Dans les deux cas, l'action des pompes ioniques et des jonctions serrées semblent être au cœur de la cavitation, avec un soutien permanent du cytosquelette du début de l'arrivée du flux liquidien à la régulation de la croissance. Pour les deux espèces, la blastulation permet l'émergence visuelle de l'axe abembryonnaire-embryonnaire. La Figure 26 montre une blastula de chacune des deux espèces pour la comparaison.

Figure 26 : Photographies d'un embryon de souris et d'un embryon de bovin au stade blastula, échelle 50 µm (Kohri *et al.*, 2019).



Le gradient osmotique qui permet la croissance du blastocœle est généré par la coopération entre pompes à protons, échangeurs Na^+/H^+ et aquaporines, dont la localisation différentielle permet l'accumulation de sodium dans le blastocœle. Les jonctions serrées, dont le recrutement et la maturation sont permis par le cytosquelette, scellent l'embryon et empêchent la fuite du liquide du blastocœle. Le cytosquelette permet également d'effectuer des « réparations » quand des brèches épithéliales surviennent.

C. L'axe abembryonnaire-embryonnaire

L'axe abembryonnaire-embryonnaire est le précurseur de l'axe dorso-ventral (Garbutt *et al.*, 1987). Si l'axe A-E apparaît visuellement après la formation du blastocœle, sa détermination par la blastulation en elle-même ou par d'autres éléments est un sujet très controversé (Denker, 2020). Divers mécanismes ont été mis en avant comme déterminants pour la formation de l'axe A-E.

Il a été envisagé une influence du point d'entrée du spermatozoïde sur la détermination de la symétrie chez le mammifère, comme c'est le cas chez de nombreux animaux non-mammifères (Piotrowska et Zernicka-Goetz, 2001). L'axe A-E serait alors prédéterminé. A l'inverse, pour Motosugi *et al.*, (2005), l'axe n'est pas prédéterminé. D'après leurs études, les contraintes mécaniques liées à la zone pellucide et à la formation du blastocœle seraient principalement à l'origine de la symétrie embryonnaire, et le point d'entrée du spermatozoïde n'aurait pas d'influence (Motosugi *et al.*, 2005).

Plus tard, deux études publiées la même année se prononcent chacune en faveur (Gardner, 2007) ou en défaveur (Kurotaki *et al.*, 2007) de la prédétermination. Ainsi ces derniers corroborent l'action de la zone pellucide (Kurotaki *et al.*, 2007). A l'inverse pour Gardner (2007), qui se prononce spécifiquement contre le discours de Motosugi *et al.* (2005), la détermination de l'axe est indépendante de la zone pellucide. Ses expériences sur l'ablation ou l'amollissement de la zone pellucide montrent un axe qui n'est toujours pas positionné aléatoirement, indiquant une détermination autre (Gardner, 2007). Une autre étude apportent des éléments en faveur de la prédétermination, en mettant en évidence la première division cellulaire comme le moment-clef de cette détermination (Z. Liu *et al.*, 2012).

Si moins de chercheurs se sont penchés sur ce sujet ces dernières années, une étude très récente souligne l'influence probable du second globule polaire (Jin *et al.*, 2022). Son implication avait déjà été évoquée et rejetée plusieurs fois auparavant (Denker, 2020). Les globules polaires sont les cellules de taille réduite produites lors des mitoses successives de l'ovocyte. Le second, formé après la deuxième partie de la méiose de l'ovocyte, uniquement si celui-ci est fécondé, contient une chromatide de chaque chromosome de l'ovocyte. Une corrélation a été trouvée entre son positionnement et celui de l'axe A-E (Jin *et al.*, 2022). En revanche, son rôle exact dans l'établissement de la symétrie reste à investiguer.

La formation du blastocœle, est permise par un gradient ionique lié à la distribution polaire des pompes et canaux ioniques du trophoctoderme et au scellement de celui-ci par les jonctions serrées et le cytosquelette. De multiples microcavités fracturent l'espace intercellulaire et se vident les unes dans les autres pour n'en former qu'une. Ces événements font apparaître l'axe abembryonnaire-embryonnaire, dont l'origine exacte est méconnue.

2. Différenciation en épiblaste et endoderme

Lors de la deuxième différenciation, dans la MCI, l'épiblaste reste pluripotent, tandis que l'endoderme primitif se différencie en une monocouche épithéliale polarisée à la surface de la MCI, en contact avec le blastocœle.

A. Mécanismes biomoléculaires

Au cœur de cette seconde différenciation, on retrouve une cascade d'expression de gènes marqueurs de chacun des deux destins possibles, épiblaste ou endoderme primitif, une induction paracrine de cellules de l'EPr par celles de l'Epi, puis un positionnement et une différenciation des cellules de l'endoderme à la surface du blastocœle.

a. Organisation des précurseurs des deux lignages dans la MCI

Au départ (stade 16-32 cellules) les cellules de la MCI expriment toutes Nanog et Gata6, certaines sont plus engagées dans une voie que l'autre (cellules précurseurs), d'autres ne sont engagées ni dans une voie ni dans l'autre (Grabarek *et al.*, 2012 ; Krawchuk *et al.*, 2013 ; Saiz *et al.*, 2020). Les deux gènes Nanog et Gata6 vont progressivement s'exclure mutuellement dans chacun des deux types cellulaires (Chazaud *et al.*, 2006 ; Plusa *et al.*, 2008).

Il y a passage d'une hétérogénéité dite primaire des cellules de la MCI (stade 16 cellules, où quelques cellules expriment déjà Fgf4, mais de manière non corrélée à l'expression d'autres gènes marqueurs), à une hétérogénéité dite « poivre et sel », d'aspect aléatoire, coordonnée, où les cellules exprimant Fgf4 sont très clairement corrélées positivement à l'expression de gènes marqueurs de l'Epi et négativement aux gènes marqueurs de l'EPr (Chazaud *et al.*, 2006 ; Ohnishi *et al.*, 2014 ; Allègre *et al.*, 2022). L'émergence de l'épiblaste se fait ainsi par la transition d'une expression aléatoire de ses marqueurs vers une expression organisée.

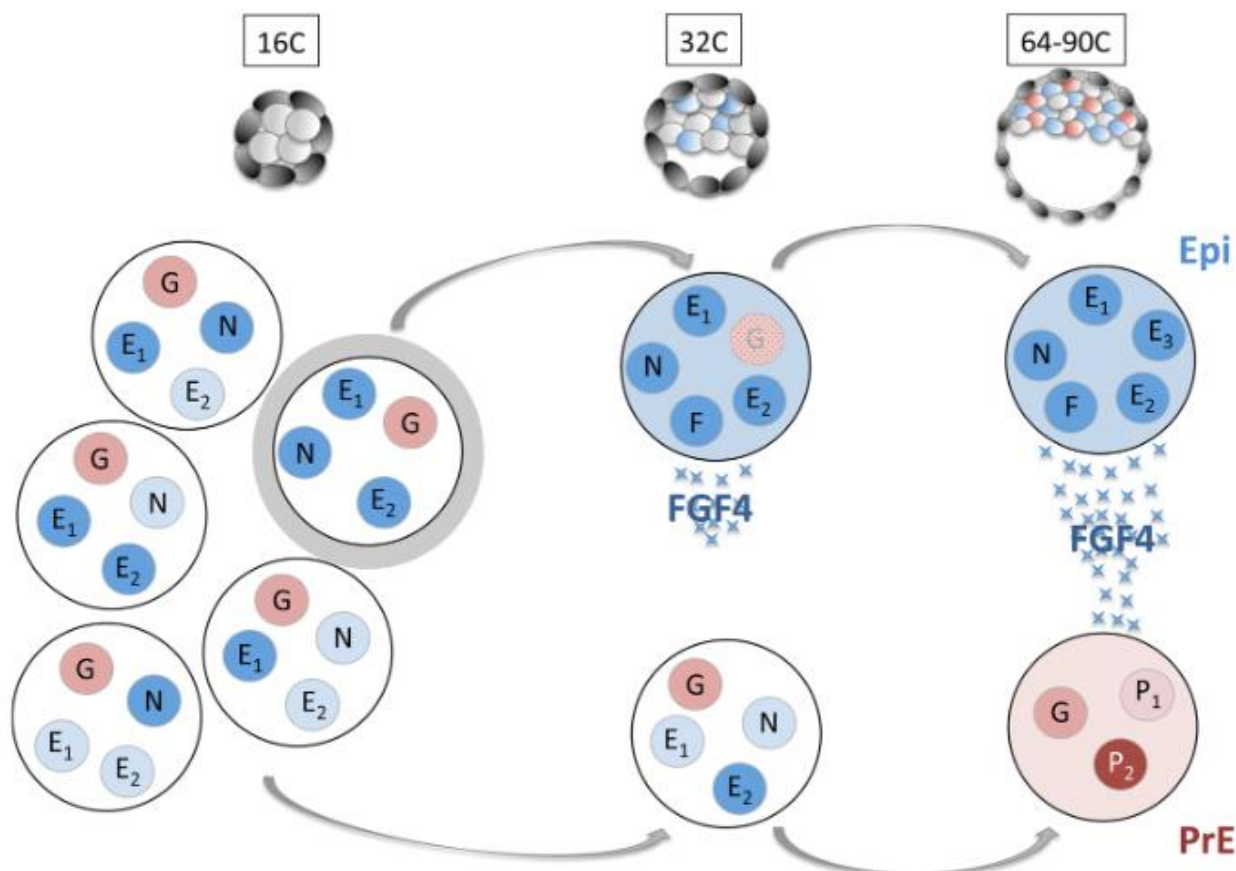
b. Induction de l'endoderme par l'épiblaste

La spécification en Epi et l'engagement des cellules dans la voie Epi précède celles des cellules en voie EPr (Bessonard *et al.*, 2014). Ceci est dû au fait que l'induction des cellules en EPr dépend de l'induction des cellules en Epi et de leur production de Fgf4 qui découle de cet engagement (Grabarek *et al.*, 2012 ; Kang *et al.*, 2013 ; Krawchuk *et al.*, 2013 ; Saiz *et al.*, 2016).

- *Signalisation Fgf4 -Fgfr2*

Une cellule exprimant aléatoirement plutôt Nanog avec d'autres facteurs épiblastiques peut alors exprimer Fgf4 de manière intense, jusqu'à des niveaux qui lui permettent de sécréter fortement la protéine Fgf4, qui induit alors la différenciation en endoderme primitif chez les cellules voisines (Figure 27) (Grabarek *et al.*, 2012 ; Kang *et al.*, 2013 ; Krawchuk *et al.*, 2013 ; Saiz *et al.*, 2016).

Figure 27 : Modèle schématique de l'expression génétique des cellules de la MCI au cours de la deuxième différenciation. (Allègre et al., 2022).



Note : Au stade 16 cellules (16C), toutes les cellules de la MCI expriment des gènes pro-Epi variés (en bleu, E1, E2...) dont Nanog (N), à différents niveaux (degrés de coloration) sans corrélation. Gata6 est exprimé à des niveaux similaires dans toutes les cellules. Certaines cellules (entourées de gris) coexpriment aléatoirement Nanog avec d'autres facteurs Epi de manière intense. Dans ces cellules uniquement, la co-expression susdite promeut l'expression coordonnée de facteurs épiblastiques qui induisent le statut Epi au stade 32 cellules (32C) et favorise l'expression de Fgf4 (F). Après le stade 32 cellules (64-90C), Fgf4 est fortement sécrété par les cellules de l'Epi, permettant à leurs voisines indifférenciées de se différencier en cellules de l'endoderme qui expriment des marqueurs spécifiques de l'endoderme (en rouge, P1, P2).

La capacité à adopter une spécification par influence de Fgf4 exogène est progressivement perdue avec le temps, Fgf4 n'influence que les cellules précurseurs d'Epi ou d'EPr, pas les cellules engagées dans une voie permettant une régulation et une stabilisation des deux populations de cellules (Ohnishi et al., 2014 ; Xenopoulos et al., 2015 ; Saiz et al., 2016). Fgf4 permet en revanche d'affiner et d'appuyer l'expression des marqueurs de chaque lignée sans modifier leur engagement, favorisant l'expression de Gata6, Sox17, Gata4 notamment (Frankenberg et al., 2011 ; Schrode et al., 2014 ; Saiz et al., 2016 ; Bessonard et al., 2016). La signalisation Fgf4 est modulée notamment par le facteur Klf5, qui empêche donc l'induction de l'endoderme dans les cellules qui l'expriment (Soszyńska et al., 2019)

Le signal Fgf4 est réceptionné par des récepteurs de la famille Fgfr, en particulier Fgfr2, le plus abondant chez l'embryon de souris, et Fgfr1, qui semblerait agir en amont (Ohnishi *et al.*, 2014 ; Soszyńska *et al.*, 2019). En effet, Fgfr2 a longtemps été considéré comme le récepteur principal à Fgf4 lors de la deuxième différenciation (Ohnishi *et al.*, 2014 ; Soszyńska *et al.*, 2019). Des études récentes sur des doubles mutants Fgfr1^{-/-}, Fgfr2^{-/-}, ou les deux combinés, auxquels était appliqué un traitement Fgf4, montrent que les seuls mutants capables de convertir la MCI en endoderme sont les mutants Fgfr2^{-/-}, suggérant ainsi un rôle supérieur de Fgfr1 par rapport à Fgfr2 au moment de l'attribution identitaire en endoderme (Molotkov *et al.*, 2017 ; Kang *et al.*, 2017). Ainsi, Fgfr1, exprimé dès le stade de blastula précoce, serait plutôt lié à l'induction de l'endoderme, tandis que Fgfr2, qui est exprimé un peu plus tard (mi-blastula), pourrait intervenir dans le positionnement des cellules de l'endoderme et leur survie (Kang *et al.*, 2017 ; Molotkov *et al.*, 2017 ; Soszyńska *et al.*, 2019).

Les récepteurs de la famille Fgfr sont des protéines transmembranaires, avec des domaines intracellulaires et extracellulaires qui permettent la réception du signal et la transmission à d'autres voies de signalisation intracellulaires, notamment la voie MAPK (Soszyńska *et al.*, 2019).

- *Signalisation MAPK*

La réception de Fgf4 sur un récepteur Fgfr2 dans une cellule active la voie de signalisation MAPK (*mitogen activated protein kinases*) également dite ERK (*extracellular signal regulated kinases*) qui permet la transmission d'un signal reçu à la surface d'une cellule vers son noyau, ce qui permet par exemple d'activer ou d'inactiver l'expression de certains gènes (Lanner et Rossant, 2010). Ainsi le niveau de signalisation MAPK dans une cellule dépend de la concentration de Fgf4 reçue par la cellule et de la concentration du récepteur Fgfr2 (Bessonard *et al.*, 2014).

L'inactivation de la voie MAPK par l'inhibition d'un ou plusieurs de ses composants se traduit par une augmentation de la population épiblastique, tandis que l'activation de ce signal induit la différenciation en cellule de l'endoderme (Nichols *et al.*, 2009 ; Yamanaka *et al.*, 2010 ; Soszyńska *et al.*, 2019). Le signal exogène apporté par Fgf4 permet donc l'activation de MAPK et l'expression de gènes spécifiques de l'endoderme (Gata6, Sox17, Gata4, Sox7, PDGFR α) (Nichols *et al.*, 2009 ; Yamanaka *et al.*, 2010 ; Soszyńska *et al.*, 2019).

Par ailleurs, si une augmentation de l'activité MAPK est nécessaire à l'adoption des caractéristiques de l'endoderme dans une cellule précurseur, une activité MAPK faible est nécessaire entre autres pour permettre à une cellule de devenir épiblastique (Bessonard *et al.*, 2014).

c. Positionnement des cellules EPr et prolifération de l'Epi

La détermination de l'identité des cellules de l'endoderme précède leur positionnement correct. Ainsi dans un second temps, chez l'embryon de souris de 100 cellules environ, il y a un repositionnement des cellules de sorte que les cellules de l'EPr se retrouvent à l'interface MCI-cavité, notamment via les divisions cellulaires (Plusa *et al.*, 2008 ; Meilhac *et al.*, 2009 ; Yamanaka *et al.*, 2010).

De plus, les cellules échouant à se positionner correctement subissent une apoptose (Plusa *et al.*, 2008 ; Saiz *et al.*, 2013 ; Xenopoulos *et al.*, 2015). En effet, le rythme d'apoptose augmente significativement dans l'embryon de souris au stade 64-128 cellules, et diminue à nouveau après, correspondant à la période de spécification et de positionnement, et concerne les cellules

d'identité EPr mais non accolées au blastocœle (Plusa *et al.*, 2008 ; Xenopoulos *et al.*, 2015). De la sorte, l'apoptose sélective des cellules non positionnées participe à la distribution correcte des deux types de cellules.

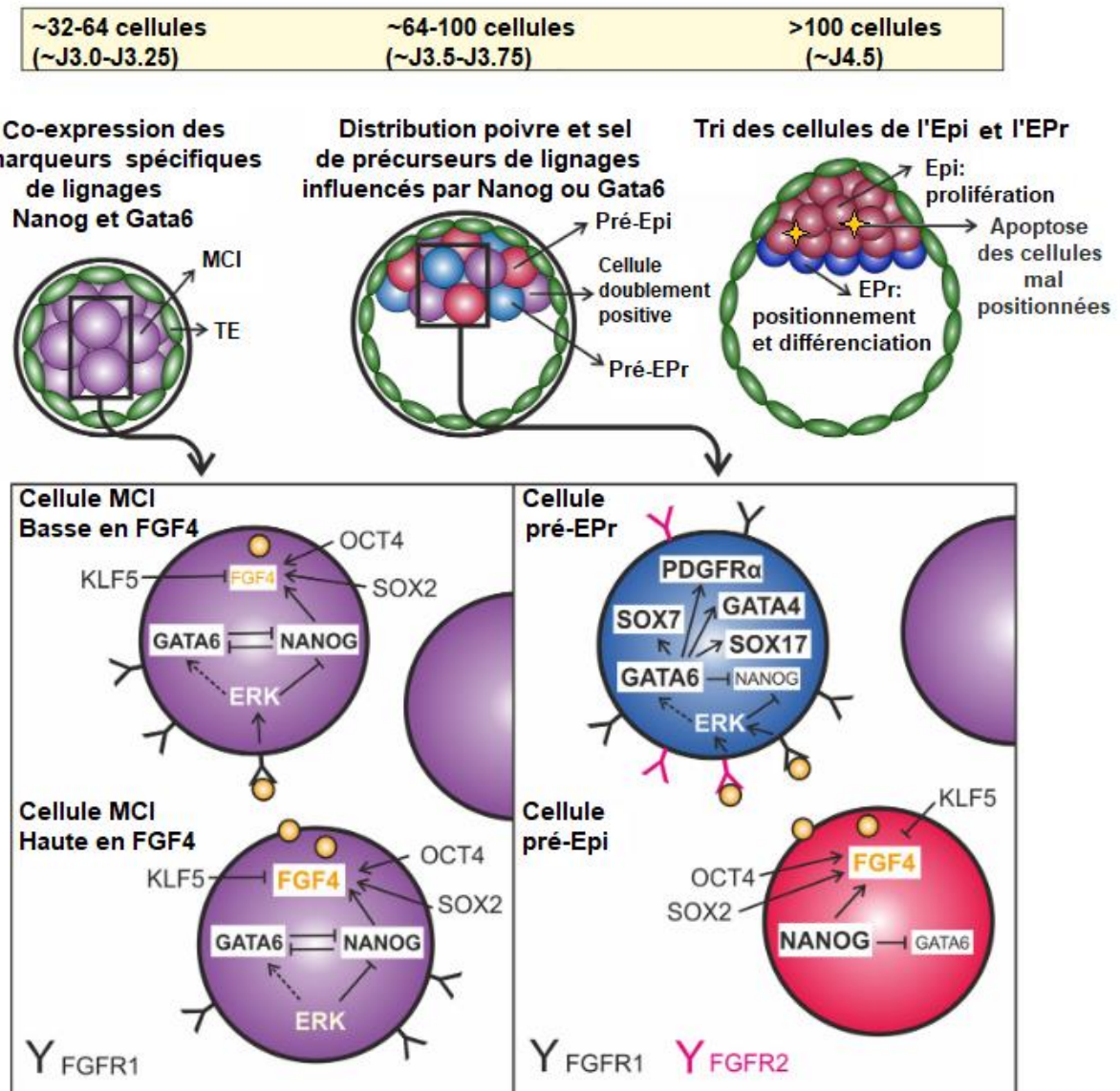
Par ailleurs, ce positionnement cellulaire accompagné d'apoptose sélective est presque immédiatement suivi d'une prolifération forte des cellules de l'épiblaste (Xenopoulos *et al.*, 2015). Hippo pourrait être impliquée à cette période, en permettant l'élimination de cellule à faible pluripotence (Hashimoto et Sasaki, 2019). Une faible activité du facteur de transcription Tead serait ainsi corrélée à une faible expression des marqueurs de la pluripotence, donc une identité épiblastique moins marquée (Hashimoto et Sasaki, 2019). Dans ce cas la cellule concernée peut exprimer des gènes de l'endoderme, et devenir une cellule de l'endoderme, ou bien ne pas exprimer non plus de manière marquée les gènes de l'endoderme, et être éliminée (Hashimoto et Sasaki, 2019).

d. Polarisation cellules EPr

Une fois positionnées à la surface de la MCI, et pas avant, les cellules de l'endoderme subissent une polarisation (Gerbe *et al.*, 2008 ; Bassalart *et al.*, 2018). La protéine aPKC, déjà évoquée pour son rôle dans la polarisation des cellules du trophoctoderme, semble également primordiale pour cette seconde différenciation (Saiz *et al.*, 2013).

Au stade blastula précoce (32 cellules), aPKC est présente de manière homogène dans les cellules de la MCI de souris. Au fur et à mesure de l'organisation « poivre et sel » et de l'initiation de l'expression de gènes spécifiques à chaque lignée, aPKC s'accumule dans les cellules qui expriment Gata4, qui feront donc partie de l'endoderme (Saiz *et al.*, 2013). Sa localisation est d'abord cytoplasmique, puis au niveau de la membrane apicale des cellules de l'endoderme lorsque celles-ci sont engagées dans un processus de différenciations, positionnées près du blastocœle et qu'elles forment un épithélium (Gerbe *et al.*, 2008 ; Saiz *et al.*, 2013). De plus, lorsque l'aPKC est inhibée, les cellules de l'EPr ne s'organisent pas en monocouche épithéliale, ne rejoignent pas toute la surface de la MCI et ne se polarisent pas (Saiz *et al.*, 2013 ; Bassalart *et al.*, 2018). Ceci suggère un rôle crucial d'aPKC dans la maturation des cellules de l'EPr et dans le maintien de leur identité et de leur position, un ancrage auprès du blastocœle, qui permet d'esquiver l'apoptose que subissent les cellules mal positionnées (Saiz *et al.*, 2013 ; Bassalart *et al.*, 2018). La Figure 28 résume les étapes de la différenciation de la MCI jusqu'au positionnement des cellules de l'endoderme.

Figure 28 : Aspects moléculaires de la différenciation en épiblaste et endoderme chez la souris. (Soszyńska et al., 2019).



Note : Au stade précoce (**32-64 cellules**), les cellules de la MCI expriment des marqueurs de l'Epi (Nanog) et de l'EPr (Gata6) ainsi que le récepteur Fgfr1. Les cellules exprimant plutôt les marqueurs Epi sécrètent Fgf4, qui réprime Nanog et promeut Gata6 dans les cellules voisines en se couplant à Fgfr1. Klf5 module l'activité de Fgf4. Au jour 3,5 (**64-100 cellules**), certaines cellules expriment Fgfr2. Dans ces cellules, Fgf4 couplé à Fgfr1 et Fgfr2 maintient l'expression de Gata6, diminue celle de Nanog, autrement dit il active le programme de détermination en EPr. Ce programme induit ensuite l'expression de plusieurs marqueurs tardifs de l'EPr, comme Sox17, Pdgfra, Gata4, Sox7. Au jour 4,5 (**>100 cellules**), les cellules de l'épiblaste prolifèrent tandis que les cellules de l'endoderme sont repositionnées à la surface de la MCI et subissent une différenciation pour former un tissu épithélial. Les cellules de l'EPr mal positionnées subissent une apoptose.

e. Chez le bovin

Chez le bovin, la succession d'étapes qui définissent la différenciation en épiblaste et endoderme primitif (présence de précurseurs, induction de l'endoderme par l'épiblaste, positionnement de ce dernier autour de la MCI) semble être relativement similaires, même si des différences émergent (Kuijk *et al.*, 2012 ; Khan *et al.*, 2012 ; Plusa et Piliszek, 2020 ; Artus *et al.*, 2020). Elle a lieu autour du jour 8, où l'embryon de bovin *in vivo* possède en moyenne 300 cellules (Ushijima *et al.*, 2008).

Des niveaux élevés de protéines de la famille Fgf permettent comme chez la souris le développement de l'endoderme primitif au détriment de l'épiblaste (Kuijk *et al.*, 2012). Cependant l'inhibition des récepteurs de la famille Fgf n'a pas d'effet sur la différenciation des lignages chez le bovin, ce qui laisse supposer que la voie de signalisation est composée un peu différemment (Kuijk *et al.*, 2012 ; Plusa et Piliszek, 2020).

Par ailleurs l'inhibition de la signalisation MAPK chez le bovin n'interfère pas avec l'expression de Gata6 ou Gata4 contrairement à la souris, mais augmente cependant la proportion de cellules positives à Nanog, suggérant un rôle de la signalisation MAPK dans la différenciation des lignages chez le bovin (Kuijk *et al.*, 2012).

De la sorte, les mêmes voies de signalisation sont retrouvées chez le bovin, avec des composants et des actions qui diffèrent de ce que l'on observe chez l'embryon de souris, ouvrant ainsi le champ des études possibles pour élucider plus précisément le déroulé moléculaire de la seconde différenciation.

Lors du commencement de la seconde différenciation, une population de cellules précurseurs des deux lignées est présente, et les précurseurs de l'épiblaste expriment Fgf4 qu'elles sécrètent, ce qui permet l'induction des cellules voisines via les récepteurs Fgfr2, qui activent la voie de signalisation MAPK à l'origine d'une cascade de gènes de l'endoderme. Les cellules destinées à l'endoderme migrent alors vers la surface de la MCI, et subissent une apoptose en cas d'échec. Les cellules en position correcte développent une polarité et s'organisent en couche épithéliale.

B. Mécanismes physico-chimiques

Comme pour la première différenciation, il est nécessaire de s'intéresser à la séparation des lignées épiblastique et endodermale d'un point de vue physico-chimique. Ces aspects de la deuxième différenciation ont cependant bénéficié de moins d'attention que les voies de signalisation présentées précédemment. Elles n'ont concerné que les embryons de souris.

a. Intervention mécanique du blastocœle

L'inhibition mécanique comme pharmacologique de l'expansion du blastocœle modifie profondément l'attribution des cellules à l'épiblaste ou l'endoderme, et le nombre de cellules appartenant à l'EPr est significativement réduit (Ryan *et al.*, 2019). De plus, il existe une synchronisation temporelle entre le début de la formation de la cavité principale et le repositionnement des cellules de l'endoderme primitif (Ryan *et al.*, 2019). Ces éléments suggèrent en plus du rôle biochimique vu précédemment un rôle mécanique pour l'expansion du blastocœle dans la différenciation épiblaste / endoderme primitif.

b. Rôle des microcavités comme microenvironnement

Une localisation significative de Fgf4 sur la membrane de microcavités pendant la cavitation a été découverte récemment chez la souris. (Ryan *et al.*, 2019). Dans la même étude, les chercheurs ont également mis en évidence l'importance de la disponibilité locale de Fgf4 à la surface des microcavités pour l'attribution des blastomères de la MCI à l'Epi ou à l'EPr (Ryan *et al.*, 2019). L'idée que les microcavités puissent servir de lieux de concentration privilégiés des composants de la famille Fgf avait déjà été émise chez le poisson-zèbre, où les microcavités permettent la diffusion de Fgf et la coordination locale des comportements cellulaires (Durdu *et al.*, 2014). Dans les deux cas, la présence d'une cavité comme microenvironnement partagé par les cellules qui l'entourent permet la concentration et la diffusion de molécules de la famille Fgf, et serait nécessaire pour la poursuite correcte des différenciations cellulaires (Durdu *et al.*, 2014 ; Ryan *et al.*, 2019).

c. Positionnement des cellules de l'endoderme

La question du moteur du positionnement des cellules de l'EPr, qui a lieu au jour 3,75 chez la souris est restée longuement obscure, et n'est toujours pas complètement établie, malgré des hypothèses robustes (Yanagida *et al.*, 2022).

Un modèle positionnel a été proposé pour cette étape, comme pour la première différenciation, suggérant que les cellules en contact avec le blastocœle reçoivent des signaux inducteurs pour se différencier en cellules de l'endoderme (Meilhac *et al.*, 2009). Cette théorie n'a pas été favorisée, puisque les précurseurs de chaque lignée sont mélangés aléatoirement dans la MCI avant leur tri (Chazaud *et al.*, 2006 ; Plusa *et al.*, 2008 ; Meilhac *et al.*, 2009). La question n'est pas complètement résolue, pour certains auteurs l'exclusion mutuelle de Nanog et Gata6 est réalisée d'une manière complètement indépendante de la position, pour d'autres la proximité avec le blastocœle a tout de même une influence, ce qui serait cohérent avec les observations faites sur les microcavités (Chazaud *et al.*, 2006 ; Meilhac *et al.*, 2009 ; Ohnishi *et al.*, 2014 ; Chan *et al.*, 2019).

Par ailleurs, l'implication de cdh1 et de l'adhésion cellulaire comme responsable de la discrimination Epi / EPr a aussi été mise en avant (Chazaud *et al.*, 2006 ; Plusa *et al.*, 2008). La cadhérine E n'est cependant pas distribuée de manière différente entre les cellules Epi et les cellules EPr, et ne semble pas nécessaire à leur différenciation, suggérant un rôle mineur si l'adhésion en a effectivement un (Filimonow *et al.*, 2019 ; Yanagida *et al.*, 2022).

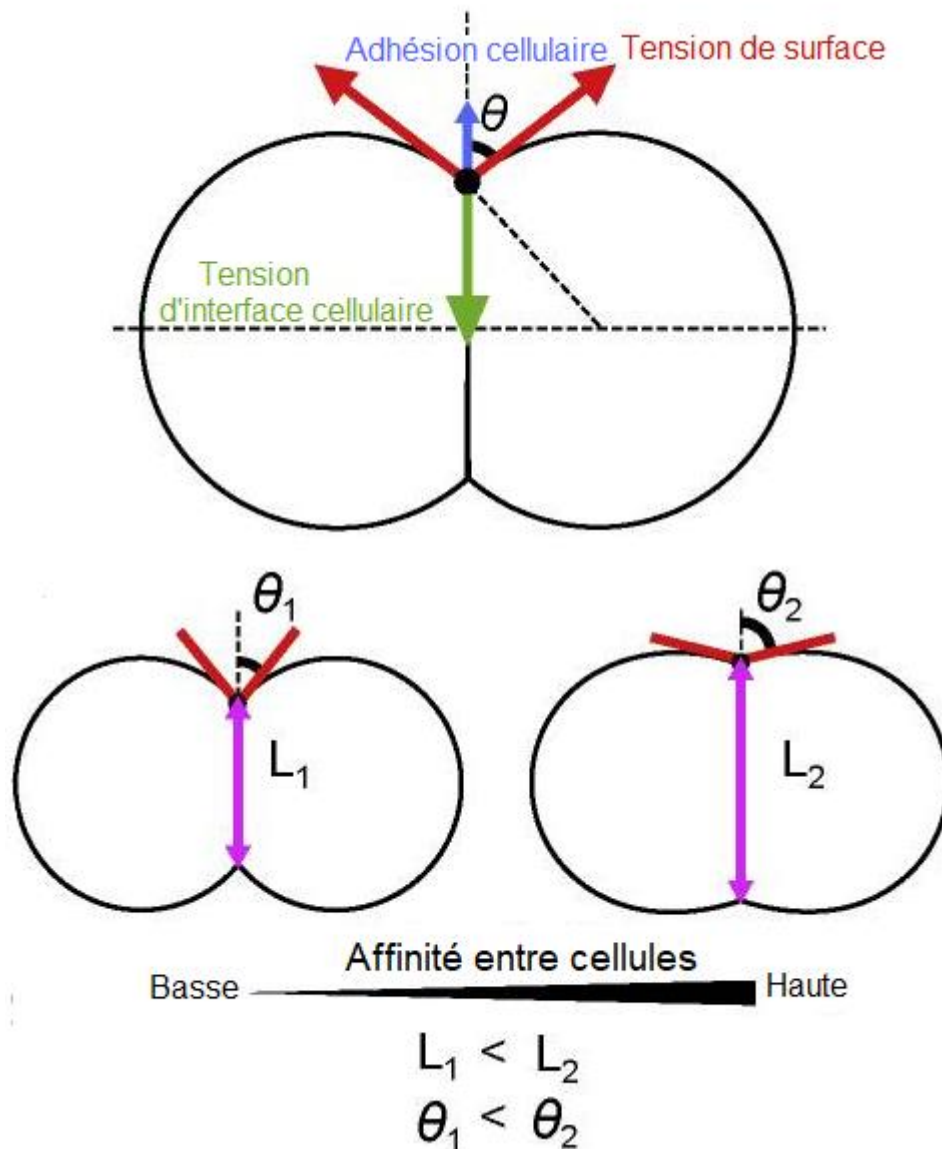
Dernièrement Yanagida *et al.* (2022) se sont intéressés au rôle de l'affinité cellulaire, qui regroupe les forces d'adhésion cellulaires, les tensions aux interfaces entre cellules et les tensions de surface (Revell, 2018). Dans leur modèle, deux grandeurs permettent de décrire l'adhésion entre deux cellules, la taille de la zone de contact L , ainsi que l'angle de contact θ comme décrit dans la Figure 29 (Yanagida *et al.*, 2022).

Les chercheurs ont ensuite mesuré les angles de contact sur des doublets de cellules Epi (notés Epi::Epi) et sur des doublets de cellules EPr (notés EPr::EPr), et les angles de contact étaient significativement plus grands pour les doublets Epi::Epi (Yanagida *et al.*, 2022). Un paramètre d'affinité β reflétant les différences d'affinité entre deux types de doublets est alors calculé :

$$\beta = \frac{\cos \theta_{Epi::Epi}}{\cos \theta_{EPr::EPr}} = 0,79 \pm 0,04$$

Des angles de contact plus grands correspondent donc à une affinité plus forte, donc à des cellules plus étroitement en contact, et dans ce cas-ci on observe deux populations de cellules d'affinités différentes, les cellules de l'Epi étant d'affinité plus forte entre elles (Yanagida *et al.*, 2022).

Figure 29 : Affinité cellulaire entre deux cellules. (Yanagida *et al.*, 2022).

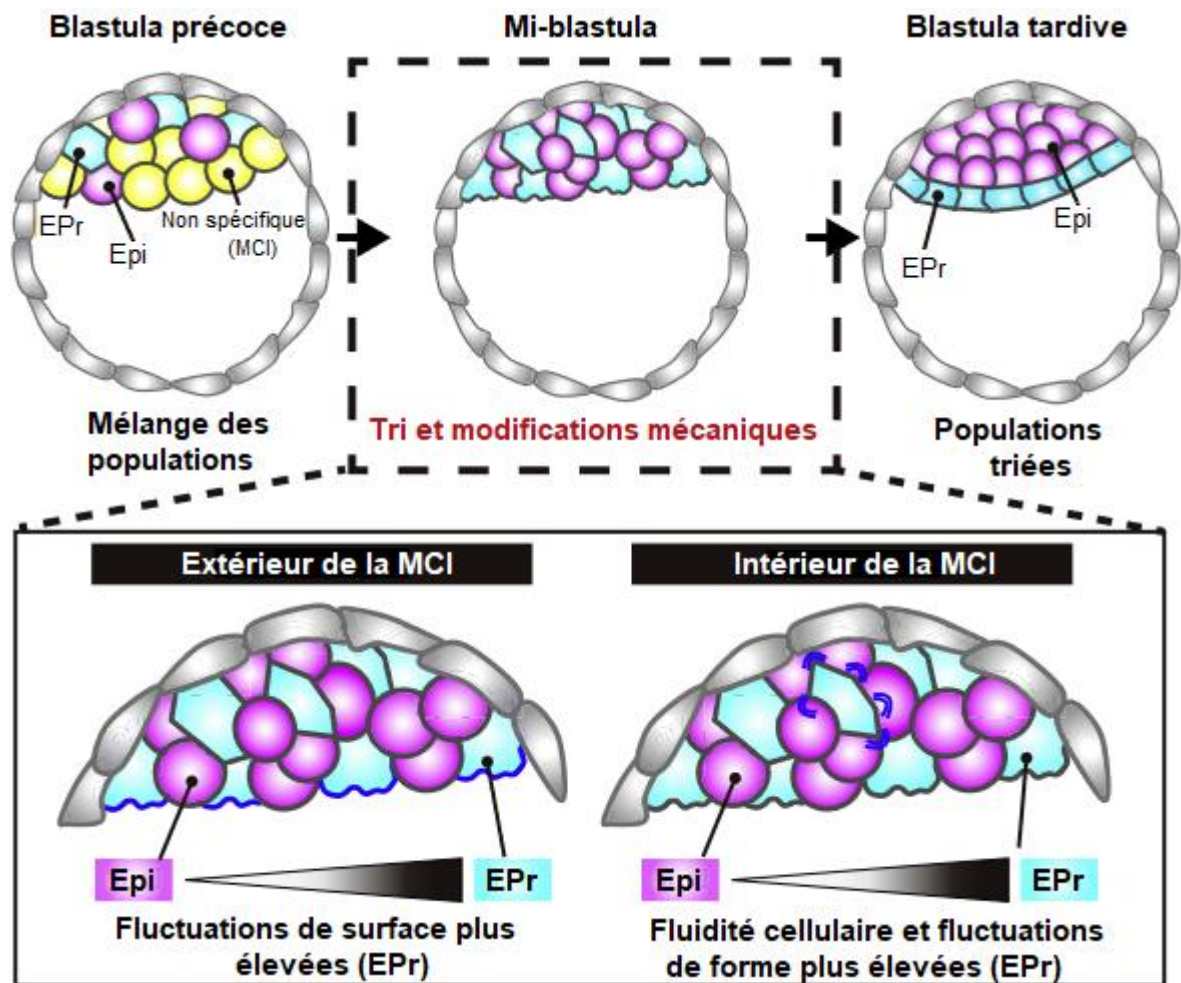


Note : La forme du doublet de cellules est déterminée par l'équilibre entre les tensions de surface entre les deux cellules, entre les cellules et le milieu, et la force d'adhésion cellulaire. Les forces d'adhésion sont faibles en comparaison des autres forces impliquées et peuvent généralement être négligées.

Or une affinité différente entre deux types de cellules exclut les cellules d'affinité plus faibles du centre, il pourrait donc s'agir d'un mécanisme qui participe au positionnement des cellules de l'EPr (Revell, 2018). D'après les simulations numériques réalisées par l'équipe de chercheurs, le paramètre d'affinité mesuré est insuffisant pour expliquer le tri cellulaire opérant entre épiblaste et endoderme, un paramètre de valeur $\beta = 0,5$ serait le minimum suffisant pour justifier du positionnement observé (Yanagida *et al.*, 2022). Une participation de cette différence d'affinité au phénomène de positionnement de l'endoderme est probable, mais elle ne suffit pas (Yanagida *et al.*, 2022).

Enfin la même équipe s'est penchée sur la fluctuation de la surface des cellules, plus importante chez les cellules de l'endoderme que celles de l'épiblaste, et liée positivement à la signalisation Fgf (Yanagida *et al.*, 2022). De plus, une fluctuation de surface plus importante serait aussi corrélée à une fluidité des cellules plus importantes (Yanagida *et al.*, 2022). Une cellule plus fluide est capable de « changer de forme plus facilement et de diffuser dans le tissu avec plus de facilité » qu'une cellule plus « solide ». Des différences de fluidité dans un groupe de cellules peuvent entraîner la formation de deux populations séparées différentes en fluidité (Yanagida *et al.*, 2022). Les simulations numériques effectuées en intégrant ces paramètres suggèrent que les fluctuations de surface, associées à la fluidité cellulaire, permettent la séparation entre les cellules de l'endoderme plus fluides que les cellules de l'épiblaste (Figure 30) (Yanagida *et al.*, 2022).

Figure 30 : Schéma montrant comment les fluctuations de surface et la fluidité cellulaire régulent le tri cellulaire dans la MCI de l'embryon précoce de souris (Yanagida *et al.*, 2022).



Ainsi, d'un point de vue mécanique, à l'heure actuelle l'hypothèse d'une différence de fluidité entre les deux populations de cellules, assistée par une différence d'affinité à l'origine du positionnement des cellules de l'endoderme autour de la MCI semble la plus probable. D'autres études sur des embryons réels devront venir appuyer ces idées.

Par ailleurs, les études réalisées sont une fois de plus concentrées sur les embryons de souris, *in vitro*, laissant encore de nombreuses interrogations planer sur la mécanique de l'embryon de bovin et sur l'embryon *in vivo* de manière générale.

Les microcavités comme le blastocœle lui-même participent à la différenciation en épiblaste et endoderme, notamment en formant des sources de diffusion de Fgf4 qui induisent les cellules précurseurs de l'endoderme en cellules de l'endoderme par activation de gènes cibles. Les cavités interviennent également dans le positionnement des cellules de l'endoderme. Cette migration serait liée à des différences de fluidité et d'affinité entre les deux types de cellules obtenues après la différenciation.

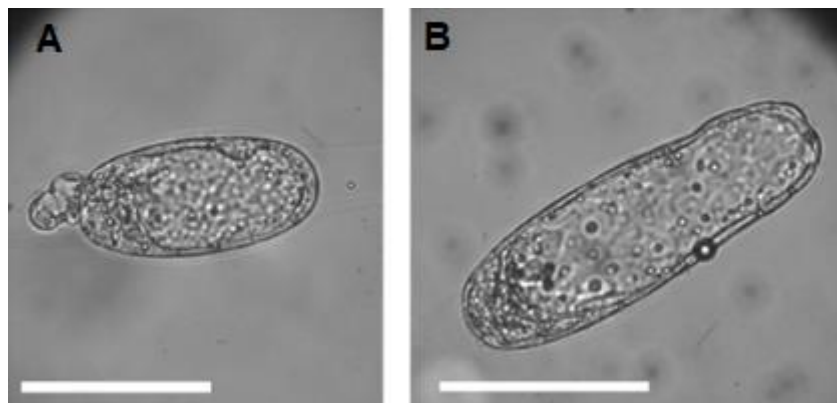
3. Eclosion

L'extraction de l'embryon hors de la zone pellucide glycoprotéique, ou éclosion, se produit vers le jour 8 post-fécondation pour le bovin et autour du jour 4 pour la souris (Artus *et al.*, 2020). Cette étape est cruciale pour permettre à l'embryon d'interagir directement avec l'endomètre utérin et ainsi procéder correctement à l'implantation (Martin et Sutherland, 2001). Elle est initiée par l'affinement de la zone pellucide lié à l'expansion volumique de l'embryon et par une digestion enzymatique locale (Seshagiri *et al.*, 2009 ; Leonavicius *et al.*, 2018).

A. Aspects mécaniques

Chez le bovin comme chez la souris, *in vivo* et *in vitro*, l'éclosion peut avoir lieu par échappement de l'embryon par une petite protrusion en « trou d'épingle » ou par une rupture plus large, les deux étant parfois combinés (Figure 31) (Niimura *et al.*, 2010 ; Leonavicius *et al.*, 2018). Chez la souris le premier type d'éclosion peut se produire alors que l'épaisseur de la zone pellucide est encore élevée, dès 3 μm d'épaisseur, tandis que le second type ne se produit pas au-dessus de 2,5 μm d'épaisseur (Leonavicius *et al.*, 2018). Chez le bovin, une entaille large semble être nécessaire, avec plus d'échecs d'éclosion dans le cas des trous d'épingle seuls (Massip *et al.*, 1982)

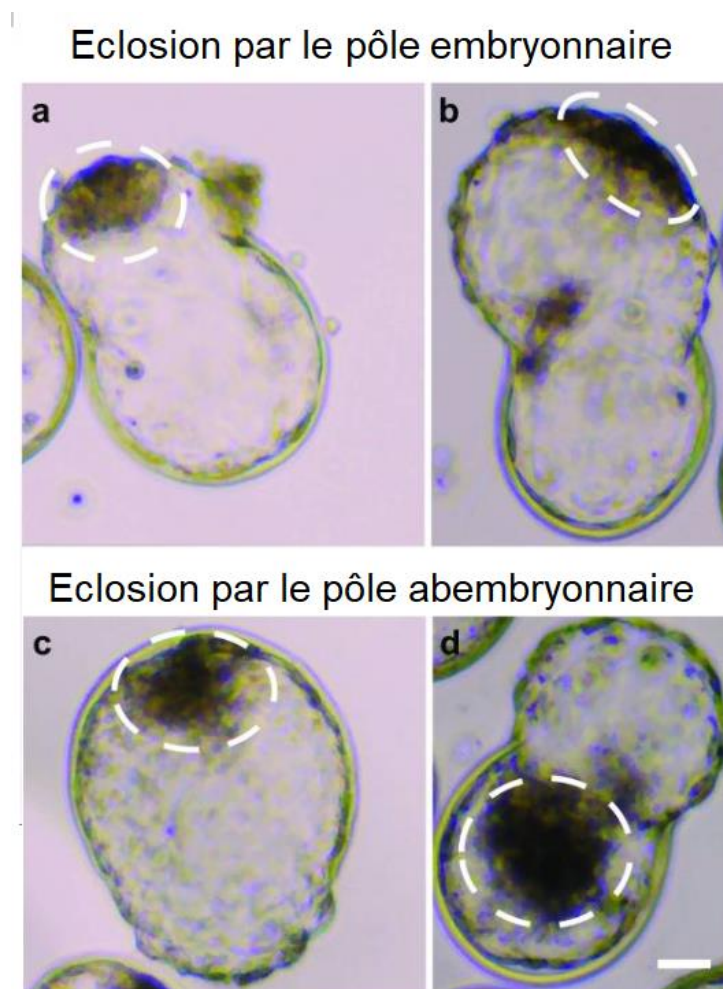
Figure 31 : Eclosion d'un embryon de souris par un "trou d'épingle » (A) ou par une rupture (B) (échelle : 100 μm) (Leonavicius *et al.*, 2018)



a. Site d'éclosion

Le site d'éclosion est chez la souris dans la grande majorité des cas à proximité du pôle embryonnaire où se trouve la MCI (Liu *et al.*, 2020 ; An *et al.*, 2021). Le lien entre localisation du site d'éclosion et qualité de l'embryon est un sujet qui divise. Chez l'homme comme chez la souris, l'éloignement du site d'éclosion du pôle embryonnaire est suspecté d'être un indice de qualité moindre, tandis que pour d'autres il 'n'y a aucune corrélation (Ebner *et al.*, 2009 ; Miyata *et al.*, 2010 ; Sanmee *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2020 ; An *et al.*, 2021). Quant à l'embryon de bovin, son site d'éclosion et sa qualité ne semblent pas être corrélés, *in vitro* comme *in vivo* (Figure 32) (Niimura *et al.*, 2010 ; Negrón-Pérez et Hansen, 2017). Chez les espèces à localisation spécifique, le site d'éclosion est une zone où les projections du trophoctoderme (décrites ultérieurement) sont plus nombreux et où l'activité des protéinases qui digèrent la zone pellucide est plus intense, chez le bovin ces deux caractéristiques pourraient être distribués de manière plus uniforme (Verónica M Negrón-Pérez et Hansen, 2017).

Figure 32 : Eclosion d'embryons de bovins par l'un ou l'autre des pôles de l'axe embryonnaire-abembryonnaire (Negrón-Pérez et Hansen, 2017).



Note : La zone entourée par des tirets blancs correspond à la MCI. L'échelle vaut 50 μ m.

b. Contractions de la blastula

Les contractions de la blastula évoquées précédemment semblent être corrélées à l'éclosion (Niimura, 2003 ; Pribenszky *et al.*, 2011). Elles sont plus nombreuses pendant et après l'éclosion, et un rythme particulier de contractions est détectable juste avant l'éclosion (Niimura, 2003 ; Pribenszky *et al.*, 2011). Les contractions fortes (plus de 20% du volume en moins) sont par ailleurs plus nombreuses chez les embryons qui échouent à éclore, tandis que les contractions faibles pourraient être physiologiques et jouer des rôles pour l'instant non élucidés dans l'éclosion chez la souris (Niimura, 2003 ; Pribenszky *et al.*, 2011).

c. Projections du trophoderme

Les TEPs (*trophodermal projections*) participent également à l'éclosion. Originellement étudiées chez le hamster doré, il s'agit d'extensions membranaires du trophoderme motorisées par l'actine qui viennent percer la zone pellucide, et faciliter le passage de la blastula hors de la zone pellucide par des mouvements ondulatoires (Perona et Wassarman, 1986 ; Gonzales *et al.*, 1996). Ces projections seraient quasi-indispensable pour l'éclosion de l'embryon de bovin *in vitro* (Gonzales *et al.*, 1996). Un rôle de « livraison » de molécules de lyse pour les TEPs a par ailleurs été proposé chez le hamster doré (Sireesha *et al.*, 2008).

Cependant, les études concernant ce phénomène sont relativement anciennes, et le sujet n'a pas été soulevé plus récemment à la lumière des nouvelles techniques d'investigation embryonnaires.

d. Approche mécanique des forces qui permettent l'éclosion

L'éclosion est initiée par une entaille dans la zone pellucide causée par la pression hydrostatique croissante issue de la formation du blastocœle et de l'expansion de la blastula (Seshagiri *et al.*, 2009 ; Leonavicius *et al.*, 2018). La zone pellucide reste quasi entièrement intacte

Une étude menée par Leonavicius *et al.* (2018) propose une approche physique de l'éclosion, aspect peu développé jusqu'ici, en considérant l'embryon et sa zone pellucide comme un ballon de baudruche (paroi très fine par rapport au rayon de la sphère qui permet l'augmentation de pression interne).

D'après ce modèle, l'éclosion et donc la rupture de la zone pellucide dépendrait de l'expansion volumique de l'embryon en plus de l'augmentation de pression en elle-même : un pic de pression peut ainsi être atteint sans éclosion, tant que la zone pellucide n'est pas amincie par l'expansion embryonnaire, ce qui est observé pour les embryons de souris *in vitro* (Leonavicius *et al.*, 2018). Le modèle du ballon de baudruche permet d'estimer la rigidité de la zone pellucide par son module de Young E , lorsqu'elle subit une pression P , en fonction de son rayon R , son rayon initial R_0 , et de l'épaisseur initiale de la zone pellucide t_0 :

$$E = \frac{3PR^7}{2t_0(R^6 - R_0^6)}$$

Grâce à des mesures effectuées sur des embryons de souris, les chercheurs ont ainsi obtenu une valeur de E à 31 kPa, qui s'approche des autres mesures mentionnées dans la littérature comme évoqué précédemment dans la partie sur la régulation du volume du blastocœle (Leonavicius *et al.*, 2018). L'épaisseur de départ est quant à elle mesurée à 3,25 jours post-fécondation, au début

de la formation du blastocœle, et se situerait autour de 4,3 μm (Leonavicius *et al.*, 2018). Ce modèle permet de plus d'estimer que :

« Pour une augmentation volumique moyenne de 22 $\mu\text{m}^3/\text{s}$, il faudrait 16,4 h pour un embryon de 40 μm de rayon initial d'augmenter son rayon jusqu'à 72 μm , où l'épaisseur de la zone pellucide serait réduite à un tiers de l'épaisseur initiale, ce qui permettrait l'éclosion » or ce minutage correspond à l'échelle de temps observée chez les embryons de souris *in vitro* (Leonavicius *et al.*, 2018). Ainsi, plus l'épaisseur de la zone pellucide diminue, plus la probabilité d'éclosion s'approche de 1, cependant une pression minimale de 0,5 kPa semble nécessaire pour permettre l'éclosion (Leonavicius *et al.*, 2018). L'éclosion est ainsi dépendante de la pression embryonnaire et de l'épaisseur de la zone pellucide (Leonavicius *et al.*, 2018). Ceci est vrai de manière simplifiée, en réalité l'éclosion dépend aussi de paramètres moléculaires, avec notamment la digestion focale de la zone pellucide par des enzymes

B. Aspects biomoléculaires

La blastula comme l'endomètre produisent à cette période des molécules responsables de la lyse de la zone pellucide. La digestion enzymatique de tout ou partie de la zone pellucide selon les espèces facilite ainsi l'extraction de l'embryon (Seshagiri *et al.*, 2009).

a. Digestion enzymatique de la zone pellucide

Plusieurs familles de protéinases participent à la digestion de la zone pellucide chez les mammifères. Chez la souris, les plus étudiées sont les protéinases à sérine d'abord connues pour leur implication dans l'implantation (*implantation serine proteinase 1 et 2* – ISP1 et ISP2), qui participent en réalité également à l'éclosion (O'Sullivan *et al.*, 2004 ; Sharma *et al.*, 2006). Les protéines forment un hétérodimère, la strypsin, proche de la trypsin digestive, qui est la forme active de l'enzyme, donc celle qui digère la zone pellucide (Perona et Wassarman, 1986 ; O'Sullivan *et al.*, 2004 ; Tang et Rancourt, 2005 ; Sharma *et al.*, 2006). Ces protéinases sont produites à la fois par l'utérus et par l'embryon, permettant une attaque de la zone pellucide par ses deux interfaces (Sharma *et al.*, 2006).

Ainsi, les enzymes permettant la lyse de la zone pellucide ne proviennent pas uniquement de l'embryon, la zone pellucide vide étant dégradée progressivement dans l'utérus malgré l'éloignement de l'embryon (Lin *et al.*, 2001). La présence de la zone pellucide seule dans l'utérus de souris bien avant l'implantation a permis par ailleurs de montrer que le processus d'éclosion n'est pas un artefact des embryons *in vitro* qui compenseraient l'absence des enzymes utérines de l'implantation par leur propre sécrétion (Lin *et al.*, 2001).

Une enzyme du type trypsin qui pourrait jouer un rôle similaire a été mise en évidence chez le bovin également (Seshagiri *et al.*, 2009).

b. Régulation de l'éclosion

En plus des enzymes de digestion, un système de régulation de l'éclosion vient compléter le schéma de ce phénomène. Les rôles et signaux précis des régulateurs sont cependant encore obscurs, et n'ont pas été fortement investigués en comparaison avec les régulateurs de l'implantation qui se produit à la suite. Ces études concernent de plus des embryons cultivés *in vitro* et ne rendent pas forcément exactement compte de la réalité d'une éclosion intra utérine.

Les cytokines, qu'elles soient pro ou anti inflammatoires, sont soupçonnées de jouer un rôle de régulatrices : elles régulent les protéases dans d'autres contextes, et des ARN messagers de certaines d'entre elles (interleukine 1 β , interleukine 5, *leukemia inhibition factor* – LIF) sont présents durant l'éclosion (Seshagiri *et al.*, 2016). De plus, d'après des travaux sur des doubles mutants ainsi que sur des embryons *in vitro*, certaines cytokines auraient pour effet d'accélérer le processus d'éclosion (interleukine 1, interleukine 6, facteur de croissance transformant – TGF β) (Seshagiri *et al.*, 2016). Les cytokines seraient également régulatrices d'éclosion chez le bovin (Seshagiri *et al.*, 2009).

Certaines prostaglandines, PGI₂ et PGF_{2 α} chez la souris, et plutôt PGF_{2 α} et PGE₂ chez le bovin, participent également à l'éclosion, d'une manière pour l'instant non complètement élucidée (Lewis, 1989 ; Huang *et al.*, 2004). D'autres molécules, très diverses, des facteurs de transcription, des facteurs de croissance, font partie de la régulation de l'éclosion, sans que le mécanisme de cette régulation ne soit connu (Sireesha *et al.*, 2008 ; Seshagiri *et al.*, 2009 ; Massimiani *et al.*, 2019).

La voie de signalisation Notch semble aussi être impliquée dans le processus d'éclosion (Batista *et al.*, 2020). En effet, le blocage de la voie Notch ou bien la supplémentation en certains de ses composants provoque des retards dans l'éclosion (Batista *et al.*, 2020). En particulier, les gènes Hes1, Jagged 1 et Jagged 2 semblent être liés à la régulation du processus d'éclosion, d'une manière qui pour l'instant reste à décrire (Batista *et al.*, 2020).

Si les composants moléculaires qui participent à l'éclosion sont bien connus, les interactions entre eux et les mécanismes précis en jeu sont encore à explorer, chez le bovin comme chez la souris et les mammifères de manière générale. Le processus est une étape charnière, sans laquelle l'implantation ne peut avoir lieu et la gestation ne peut être menée à terme.

L'éclosion est l'extraction de l'embryon hors de la zone pellucide. Selon l'espèce, le site préférentiel de sortie varie en localisation et en importance pour la qualité embryonnaire. L'éclosion est permise par la synergie entre la croissance de l'embryon qui applique une pression à la zone pellucide, et la digestion enzymatique de celle-ci sur chaque face. Diverses molécules et voies de signalisation seraient impliquées dans la régulation de l'éclosion, mais ses mécanismes sont méconnus.

4. Aspects métaboliques

Comme pour la morula, et de manière plus intense encore, la blastula bénéficie d'un métabolisme spécifique, qui permet d'adapter l'apport énergétique et les synthèses à la demande croissante de l'embryon en plein développement.

A. Augmentation de la demande énergétique

La blastulation nécessite un apport énergétique considérablement plus élevé que les étapes précédentes. Le rythme des divisions cellulaires augmente fortement, et à ce stade la masse totale de l'embryon aussi. La formation du blastocœle est également gourmande en énergie, via les enzymes Na⁺/K⁺ ATPase qui consomment une quantité colossale d'ATP pour produire le gradient osmotique qui permet l'accumulation de liquide nécessaire. Les biosynthèses sont multiples et plus diversifiées qu'auparavant. Enfin la dégradation enzymatique de la zone pellucide lors de l'éclosion est un pôle de consommation énergétique important.

B. Adaptations du métabolisme embryonnaire

a. Les carburants de la blastula

En réponse à cette demande énergétique, le métabolisme embryonnaire s'adapte. La consommation d'oxygène, de glucose, de pyruvate mais aussi d'autres métabolites comme les acides gras et divers acides aminés sont augmentées. (Thompson *et al.*, 1996 ; Houghton *et al.*, 1996 ; Sturmey et Leese, 2003 ; Smith et Sturmey, 2013).

- *Lipides endogènes*

De la même manière que la morula, la blastula semble capable d'utiliser les acides gras, qu'ils proviennent de réserves endogènes ou qu'ils soient présents dans le milieu extérieur comme source d'énergie. Les substrats endogènes chez l'embryon de bovin restent cependant faiblement utilisés lorsque le milieu est suffisamment supplémenté (Thompson *et al.*, 1996).

- *Acides aminés*

Les acides aminés continuent d'avoir les rôles précédemment évoqués pour la morula, mais servent également dans les voies de signalisation indispensables aux processus d'éclosion et d'implantation (Gwatkin, 1966). L'accroissement de leur synthèse est notamment permis par le phénomène de glycolyse aérobie qui prend place dans la blastula.

b. La glycolyse aérobie

Cette élévation du métabolisme énergétique est ainsi également marquée par la glycolyse aérobie, c'est-à-dire d'une part que la voie de la glycolyse connaît un flux de glucose beaucoup plus important, et que malgré la disponibilité de l'oxygène, le pyruvate qui en est issu est converti en majorité en lactate via la fermentation lactique, bien que celle-ci soit beaucoup moins efficace que le cycle de Krebs pour produire de l'ATP (Gardner et Leese, 1990 ; Krisher et Prather, 2012). Il s'agit d'un phénomène originellement observé dans les cellules cancéreuses (Warburg, 1956), appelé Effet Warburg, mais aussi dans d'autres types de cellules prolifératives, comme les lymphocytes (Lunt et Vander Heiden, 2011). Le fonctionnement de la glycolyse dans le contexte de la blastula est résumé dans la Figure 33.

- *Source d'énergie*

Bien que la majorité du glucose soit consommé par la glycolyse aérobie, la voie oxydative du cycle de Krebs dans les mitochondries est suffisamment efficace pour produire plus de 80% de l'ATP consommé pendant la blastulation (Donnay et Leese, 1999 ; Wilding *et al.*, 2009). Cependant, quand l'embryon approche de l'endomètre pour l'implantation, l'oxygène environnant est très limité (Fischer et Bavister, 1993), et l'endomètre dans la zone dans laquelle s'implante l'embryon est lui-même moins vascularisé (Rogers *et al.*, 1982). Il est également intéressant de noter que l'inhibition modérée de la voie oxydative n'empêche pas la formation du blastocœle chez des blastula où celle-ci a été empêchée par traitement (Donnay et Leese, 1999). Ainsi, la blastula est capable d'adaptation à l'hypoxie, notamment grâce à son utilisation du métabolisme anaérobie (de Souza *et al.*, 2015). Pour aller plus loin, il semble que les conditions hypoxiques soient même nécessaire à la formation d'embryon de bonne qualité (Kumar *et al.*, 2015).

En effet, si les milieux de développement embryonnaire *in vitro* ont longtemps présenté des concentrations atmosphériques en O₂ (20%), de nombreuses études montrent que cette

concentration seraient en réalité délétère pour l'embryon. Une concentration atmosphérique en O₂ produit moins de divisions et un développement globalement moindre au stade segmentation chez la souris (Wale et Gardner, 2010) et l'humain (Kirkegaard *et al.*, 2013). Une telle concentration pourrait même induire des effets néfastes à long-terme chez le bovin (foetus avec une ossature plus petite, augmentation de la taille des cotylédons avec un nombre moyen plus faible, indicateur d'une connexion de qualité plus faible avec la mère) (Fischer-Brown *et al.*, 2005). Par ailleurs, la concentration en dioxygène dans les oviductes et l'utérus est elle-même bien plus faible que la concentration atmosphérique dans de nombreuses espèces (Fischer et Bavister, 1993), et la concentration idéale serait autour de 5% (Batt *et al.*, 1991 ; He *et al.*, 2020). He *et al.* (2020) ont montré que chez le yack, en comparaison de milieu à 1%, 10% et 20% de dioxygène, les embryons cultivés dans des milieux à 5% ont la maturation de l'ovocyte améliorée, ainsi que le développement de la blastula avec un nombre de cellules plus importants et moins de cellules apoptotiques.

- *Source de carbone pour les biosynthèses*

On attribue également à la glycolyse l'intérêt de soutenir les voies anaboliques majeures. L'augmentation de la glycolyse a notamment pour effet de produire une plus grande quantité des sous-produits et produits intermédiaires de ces réactions. Ainsi le glucose-6-phosphate et le glycéraldéhyde-3-phosphate sont utilisés dans la voie des pentoses phosphate qui permet la synthèse des riboses, précurseurs des nucléotides, indispensable pour la production d'ARN et d'ADN (Vander Heiden *et al.*, 2009 ; Lunt et Vander Heiden, 2011). Le glycéraldéhyde -3-phosphate et le 3-phosphoglycérate sont précurseurs d'éléments utiles à la synthèse des lipides (Lunt et Vander Heiden, 2011). La glycolyse produit également du NADH, agent réducteur et cofacteur dans la synthèse lipidique. Le NADH participe aussi au maintien du statut redox des cellules, en permettant la réduction du GSSH en glutathion ainsi que sa synthèse (Guérin *et al.*, 2001). L'utilisation du carbone issu du glucose pour les synthèses est corroborée par l'incorporation de carbone 14 issu de molécules de glucose, qui augmente 6 fois entre le stade 12 cellules et le stade blastula chez le bovin (Khurana et Niemann, 2000). De la sorte, la glycolyse aérobie permettrait de diriger la consommation de glucose vers les voies de biosynthèses, particulièrement actives chez l'embryon.

- *Rôles du lactate*

La glycolyse aérobie a pour conséquence la production d'une quantité importante de lactate, qui joue plusieurs rôles dans le développement embryonnaire.

La fermentation lactique est le résultat de la réduction du pyruvate en lactate, catalysée par l'enzyme LDH ou lactate déshydrogénase, capable également de catalyser la réaction inverse. Cette réaction permet concomitamment l'oxydation de NADH en NAD⁺. Or, le NADH est un produit de la glycolyse, sa réoxydation en NAD⁺ permet donc tout d'abord d'alimenter la glycolyse.

Au stade de la blastula tardive, prête à s'implanter, il y a un changement de l'isoforme majoritaire de la LDH. Jusqu'ici, il s'agissait de la LDHB qui favorise la formation de pyruvate, qui est alors peu à peu remplacée par la LDHA qui favorise la formation de lactate. Ceci est vrai chez la souris (Auerbach et Brinster, 1967) et les cellules tumorales (manifestation de l'effet Warburg) (Lee *et al.*, 2022), mais n'est *a priori* pas documenté pour le bovin.

□ Faciliter l'implantation

Les embryons de mammifères possèdent des transporteurs du lactate, membre de la famille des transporteurs monocarboxylates (MCT), capables d'exporter le lactate de la cellule vers le milieu extra-cellulaire, en co-transportant un proton (Hérubel *et al.*, 2002 ; Halestrap et Wilson, 2012). De cette manœuvre résulte à la fois une acidification du milieu et une hyper concentration en lactate (Gardner, 2015). Or, pour s'implanter l'embryon doit désagréger la matrice extra-cellulaire (MEC) de l'endomètre, ce qui pourrait être facilité par l'acidification du milieu comme cela a déjà été montré chez la souris (Xiao *et al.*, 2017), ainsi que chez les cellules tumorales (Gatenby et Gillies, 2004) qui ont un nombre considérable de points communs métaboliques avec l'embryon (Smith et Sturme, 2013). Cette théorie est soutenue également par l'existence d'une redistribution de la V-ATPase, sous-unité indispensable de la pompe à protons, dans l'endomètre des vaches gestantes au moment de la nidation (Skinner *et al.*, 1999), qui suggère qu'une acidification est aussi à l'œuvre chez le bovin à cette étape.

Cependant, si la présence des MCT a été vérifiée chez l'humain et la souris, elle a été peu étudiée chez le bovin. MCT4 est celui dont le substrat préféré est le lactate, et est adapté à son export dans les cellules à fort flux glycolytique (Dimmer *et al.*, 2000). Sa présence a été détectée *in vitro* dans les ovocytes bovins dénudés de leur granulosa (Lopes *et al.*, 2015), ce qui permet d'émettre l'hypothèse d'un rôle similaire à celui évoqué précédemment pour la souris ou l'homme, mais cela ne permet cependant pas de conclure de manière certaine.

A noter que l'acidification pourrait être aussi liée au rejet de CO₂ par le cycle de Krebs mais aussi par la PPP évoquée plus haut. En effet, le CO₂ est hydraté par l'anhydrase carbonique et donne un H⁺ et un HCO₃⁻, alors que les H⁺ sont exportés avec le lactate et que la voie PPP est favorisée dans le cas de la blastula (Marchiq et Pouysségur, 2016). L'anhydrase carbonique est retrouvée dans les cellules trophoblastiques des placentas de vaches entre 80 et 270 jours de gestation (Nishita *et al.*, 1990), cependant, l'activité de l'anhydrase carbonique chez l'embryon précoce n'est que peu documentée, il n'est pas possible de conclure à l'heure actuelle sur la véracité de cette hypothèse.

□ Promouvoir l'angiogenèse

La nidation de l'embryon doit absolument être associée à une angiogenèse au niveau de l'endomètre pour permettre la formation du lien mère-embryon (Gardner, 2015). Or, le lactate pourrait permettre en tant que molécule de signalisation l'angiogenèse en agissant notamment sur VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) qui la stimule (Kumar *et al.*, 2008). D'une part, il a été montré que l'acidose induite par le lactate promeut l'expression de VEGF dans les cellules tumorales (Shi *et al.*, 2001), ce qui permet de faire l'hypothèse d'une réaction similaire pour l'embryon et l'endomètre maternel (Ma *et al.*, 2020).

D'autre part, VEGF existe sous forme libre fortement angiogénique et sous forme poly-ADP-ribosylée (PAR VEGF) qui inhibe sa capacité d'angiogenèse (Xiong *et al.*, 1998). Or, dans les tissus environnant la blastula, les cellules de la mère n'ont pas effectué de changement de LDH et disposent plutôt de LDHB, donc la forte concentration en lactate pousse la réaction des LDH dans le sens de la production du pyruvate et de la réduction du NAD⁺ en NADH. Le NAD⁺ est le substrat nécessaire à la poly-ADP-ribosylation de VEGF, sa moindre disponibilité fait donc pencher l'équilibre en faveur de la forme active de VEGF (Gardner, 2015). Gardner (2015) fait donc ici l'hypothèse que non seulement le lactate fourni par la blastula permettrait d'augmenter

l'expression de VEGF mais aussi de favoriser sa forme active, et ainsi de promouvoir l'angiogenèse dans l'endomètre recevant la nidation de l'embryon.

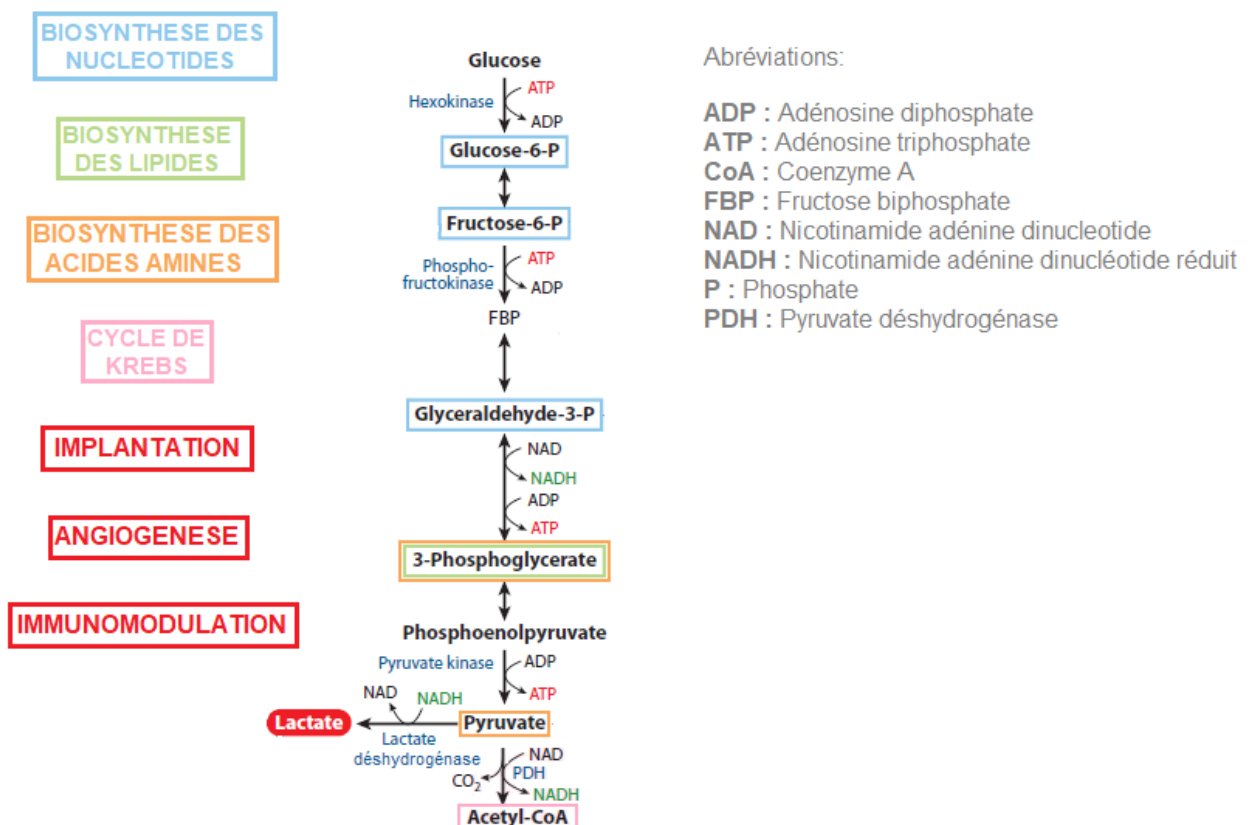
□ Immunomodulation

En se basant à nouveau sur les similarités entre embryon et tumeur, il est possible de supposer une activité immunomodulatrice du lactate pour permettre d'éviter le rejet de l'embryon par la mère lors de la nidation. L'altération de la différenciation et du fonctionnement des macrophages (Gao *et al.*, 2022), mais aussi des lymphocytes T et des cellules dendritiques pourraient faire partie des rôles du lactate pour favoriser l'immunotolérance maternelle (Gardner, 2015 ; Ma *et al.*, 2020).

□ EGA

Enfin, il a été montré que le lactate active certains gènes impliqués dans l'EGA chez la souris (Tian et Zhou, 2022). Une activité similaire n'est pour l'instant pas documentée chez le bovin, et l'EGA est un phénomène a priori antérieur au métabolisme pro-lactate de la blastula, mais celui-ci se produit en plusieurs vagues, et l'ensemble permet néanmoins de formuler une hypothèse intéressante à explorer.

Figure 33 : Fonctionnement résumé de la glycolyse dans le contexte de l'embryon pré et péri-implantatoire (Lunt et Vander Heiden, 2011).



Note : Les couleurs indiquent l'implication des molécules de la glycolyse dans les diverses voies métaboliques.

c. PKM2, une enzyme embryonnaire

La dernière étape de la glycolyse embryonnaire, la déphosphorylation du phosphoénolpyruvate (PEP) pour produire une molécule d'ATP et du pyruvate, est réalisée dans les cellules matures par la phosphokinase PKM1 (Redel *et al.*, 2012). Dans l'embryon, son isoforme PKM2 est fortement présente, et son expression augmente au stade blastula (Redel *et al.*, 2012). Or celle-ci a entre autres pour effet de catalyser la phosphorylation de la phosphoglycérate mutase 1 (PGAM1) à partir du PEP, produisant ainsi du pyruvate sans produire d'ATP, ce qui a pour conséquence d'augmenter encore la consommation de glucose par la voie de la glycolyse (Vander Heiden *et al.*, 2010 ; Redel *et al.*, 2012 ; Smith et Sturmey, 2013 ; Lee *et al.*, 2022). De plus PKM2 induit l'expression de la LDHA, et donc participe à la formation du lactate (Lee *et al.*, 2022).

Par ailleurs, il est intéressant de constater que PKM2 est capable de translocation nucléaire et donc d'interaction avec des facteurs de transcription et ainsi influencer l'expression de gènes clés pour le développement embryonnaire. Cette protéine peut ainsi interagir avec STAT3, impliqué dans la pluripotence (Luo et Semenza, 2012), mais aussi avec Oct4 (Yang *et al.*, 2018). En outre elle peut avoir une influence sur les gènes codant pour la cadhérine E et pour la β -caténine (Luo et Semenza, 2012).

En somme, l'expression de l'isoforme PKM2 dans les cellules embryonnaires en particulier au stade blastula permet de soutenir son métabolisme spécifique de diverses manières mais également d'agir sur l'expression de gènes impliqués dans le développement embryonnaire.

Le métabolisme de la blastula est adapté à ses besoins importants et spécifiques. La consommation des carburants est augmentée, et le déploiement de la glycolyse anaérobie, adaptée à l'environnement hypoxique de l'embryon, fournit de l'énergie mais surtout le carbone nécessaire aux biosynthèses massives. Elle permet également la production de lactate, dont les rôles dans le développement embryonnaire sont nombreux. Ceci est favorisé par la présence d'une variété d'enzymes spécifique de l'embryon, comme la LDHB ou PKM2, signe d'une congruence encore plus fine entre les besoins de l'embryon et son métabolisme.

L'embryon au stade blastula est le théâtre d'événements morphogénétiques cruciaux. Tout d'abord la formation du blastocœle, cavité liquidienne permettant l'apparition visuelle de l'axe embryonnaire-abembryonnaire. D'autre part, la seconde différenciation cellulaire, concernant la masse cellulaire interne, en une lignée pluripotente qu'est l'épiblaste et une lignée épithéliale qu'est l'endoderme primitif. Enfin, l'éclosion de l'embryon hors de la zone pellucide marque la fin du développement embryonnaire préimplantatoire, et prépare l'embryon à son implantation dans l'endomètre. Ces événements sont permis par une adaptation du métabolisme qui soutient à la fois les dépenses énergétiques conséquentes, les nombreuses biosynthèses et la préparation à l'implantation.

Discussion

A présent, il s'agit de revenir sur les informations présentées et en faire émerger les éléments saillants, en particulier pour le bovin.

Le constat a pu être fait d'une similarité des étapes principales du développement embryonnaire entre la souris, beaucoup plus facile à étudier, et le bovin : activation du génome embryonnaire, compaction, polarisation et différenciation des cellules en masse cellulaire interne et trophoctoderme sont les événements qui accompagnent la formation de la morula. Blastulation, différenciation de la masse cellulaire interne en épiblaste et endoderme, et finalement éclosion aboutissent à la formation de la blastula. En revanche, la temporalité diffère, et avec elle le stade cellulaire. Chez le bovin, et chez les espèces plus massives en général, le développement est plus lent, avec une compaction au stade 16 cellules contre huit pour la souris, une éclosion autour du huitième jour, contre le quatrième jour pour la souris. L'embryon lui-même est plus grand chez le bovin dès les premiers jours de développement.

Au niveau moléculaire, des divergences apparaissent également. Les marqueurs de la masse cellulaire interne de la souris, Oct4, Sox2 et Nanog, le sont aussi chez le bovin, avec cependant une localisation qui diffère modérément pour Oct4, et un rôle moins prononcé pour ce marqueur dans la gestion de la pluripotente. Gata3 est nécessaire au trophoctoderme de souris et de bovin, mais le rôle établi de Cdx2 chez la souris ne l'est pas autant chez le bovin, qui dispose par ailleurs d'un marqueur spécifique, l'interféron τ .

Autour de la compaction, il a été vu que le cytosquelette, appuyé par l'adhésion et la signalisation de la cadhérine E sont à l'origine des modifications de tensions de surface et de la contractilité qui aplanissent les cellules externes polarisées et internalisent les cellules non polarisées, créées par divisions orientées. Ces éléments obtenus chez la souris, semblent être retrouvés chez le bovin, mais des études manquent pour affirmer avec confiance l'identité des processus, en particulier du point de vue mécanique. De plus, chez le bovin, le facteur de transcription Yap, qui appartient à Hippo, serait impliqué dans la compaction, et cet événement permettrait de favoriser l'euploïdie en éliminant les blastomères anormaux.

D'autre part, les éléments qui participent à la première différenciation semblent être similaires entre la souris et le bovin, notamment Hippo et ses composants, mais aussi les voies Notch et Wnt. En revanche, les interactions entre les composants en question, et le scénario dans le détail diffère, avec en particulier l'exemple de Yap dont la localisation et la phosphorylation varient entre les deux espèces, alors même que ces deux éléments sont décisifs dans la détermination cellulaire. Ainsi, cette différenciation est bien élucidée chez la souris, mais il manque des informations pour comprendre complètement son déroulement chez le bovin.

Comme pour la compaction, la partie physique et chimique du processus de cavitation est bien connue et bien modélisée chez la souris, bien qu'incomplète pour le moment, en particulier autour de la limite de croissance du blastocœle. En revanche, chez le bovin, malgré l'existence de certaines données chiffrées, le déroulement de la cavitation est supposé similaire mais n'a pas été vérifié. Du point de vue moléculaire, les études montrent une forte similarité entre les deux

espèces, tant pour l'établissement du gradient avec les pompes et échangeurs ioniques que pour les rôles du cytosquelette et des jonctions serrées.

Pour la deuxième différenciation, à nouveau les éléments physiques et chimiques du processus ont été explorés chez la souris, et doivent être confirmés, mais pas chez le bovin. En particulier, les théories impliquant l'affinité et la fluidité cellulaires comme moteurs du bon positionnement des cellules de l'endoderme n'ont été étudiées que chez la souris. Pour la ségrégation en deux lignées en elle-même, les molécules impliquées sont les mêmes, avec comme vu précédemment des rôles et interactions légèrement différents. En particulier, les récepteurs aux membres de la famille Fgf et la voie MAPK sont utiles à la différenciation, mais le détail de leur rôle n'est pas connu.

Le bovin comme la souris réalisent une éclosion, dont le site est important pour la souris et moins chez le bovin, entre autres par digestion enzymatique avec l'implication de contractions embryonnaires pour les deux espèces. Des projections du trophoctoderme seraient nécessaires chez le bovin. La régulation du phénomène implique des cytokines et des prostaglandines pour les deux espèces, mais son fonctionnement est méconnu.

Enfin, d'un point de vue métabolique, l'embryon de bovin a bénéficié de plus d'intérêt, notamment afin de développer le meilleur environnement de culture possible pour les embryons cultivés *in vitro*. Ainsi, les substrats utilisés (pyruvate, acides aminés, lipides, glycogènes), les voies métaboliques favorisées (voies de biosynthèse et glycolyse) et leurs rôles fortement diversifiés, ainsi que la collection enzymatique spécifique à l'embryon sont bien connus chez le bovin. Cependant la grande partie de ces études sont réalisées *in vitro*, suggérant un fossé possible entre ces données et celles des embryons *in vivo*.

Ainsi, il apparaît que l'ossature du développement embryonnaire précoce et ses acteurs soient similaires chez la souris et le bovin, mais que ce dernier nécessite encore qu'on lui consacre des études, en particulier sur les mécanismes physiques et chimiques, qui sont pour l'instant très peu connus.

Conclusion

Au bilan, ce document propose un état des lieux des connaissances sur les mécanismes qui permettent le développement de l'embryon de mammifère en morula puis en blastula, en rassemblant en particulier les éléments qui concernent le bovin.

Il en ressort que les événements qui agitent l'embryon précoce sont complexes, étroitement liés, et que leur bon déroulement découle d'une coopération fine entre de multiples voies de signalisation, un métabolisme spécifique, et des phénomènes physiques et chimiques variés. L'interdépendance forte des étapes morphogénétiques est compensée par une capacité d'adaptation remarquable, tant pour la pluripotence et les différenciations, que pour le métabolisme et ses substrats, ou le succès des modifications morphologiques. Cette plasticité a un prix, et toute adaptation réduit de manière plus ou moins importante la qualité de l'embryon et sa probabilité de survie.

D'un point de vue spécifique, l'étendue des connaissances est bien plus vaste chez la souris, même si des zones d'ombre persistent encore, par exemple sur l'établissement de l'axe abembryonnaire-embryonnaire, ou encore sur l'exacte origine de la première différenciation. En revanche, les informations concernant le bovin sont moins nombreuses et moins précises. Les étapes sont semblables, mais le détail des interactions et des scénarios diffère. Certains aspects en particulier, comme le métabolisme ou l'éclosion, sont toutefois relativement bien documentés chez le bovin, par leur lien fort avec les techniques de fécondation et culture d'embryons *in vitro* déjà bien développées chez le bovin avec un intérêt autant économique que scientifique. Ces techniques sont cependant imparfaites et la récolte de nouvelles informations sur le développement embryonnaire est donc cruciale pour améliorer les résultats.

Ainsi, de futurs travaux pourraient se concentrer sur la mécanique de la morula et de la blastula de bovin, afin de confronter ces futurs résultats aux connaissances acquises chez la souris. Des études ayant pour objectif d'étudier les tensions de surface des blastomères de la morula de bovin comme cela a été fait sur la souris sont notamment en cours, et ceux-ci vont permettre de mieux connaître la physique du phénomène de compaction chez le bovin. La blastulation mériterait également d'être mieux connue sur l'aspect physique, et tenter de confronter à la réalité les modèles existants chez la souris pourrait être un point de départ intéressant. Enfin le scénario moléculaire de la différenciation en trophoctoderme et masse cellulaire interne, modérément différent de celui de la souris, est en bonne voie d'élucidation complète, et il serait intéressant d'en avoir finalement une vision claire. L'observation de chaque étape du développement met en évidence des indices qui lui sont propres de qualité ou au contraire de difficulté de survie d'un embryon. La qualité des embryons pourrait être alors mesurée de plus en plus précisément, de plus en plus tôt, vers une maîtrise pointue de la reproduction bovine, à la condition de développer des méthodes d'analyse moins invasives et compatibles avec la survie.

Liste des références bibliographiques

- ALARCON V.B. (2010) Cell polarity regulator PARD6B is essential for trophectoderm formation in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 83(3), 347-358
- ALARCON V.B., MARIKAWA Y. (2018) ROCK and RHO Playlist for Preimplantation Development: Streaming to HIPPO Pathway and Apicobasal Polarity in the First Cell Differentiation. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 229, 47-68
- AL-BAZALI T. (2022) Insight into Debye Hückel length (κ^{-1}): smart gravimetric and swelling techniques reveals discrepancy of diffuse double layer theory at high ionic concentrations. *J Petrol Explor Prod Technol* 12(2), 461-471
- ALLÈGRE N., CHAUVEAU S., DENNIS C., *et al.* (2022) NANOG initiates epiblast fate through the coordination of pluripotency genes expression. *Nat Commun* 13, 3550
- AMANO M., NAKAYAMA M., KAIBUCHI K. (2010) Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67(9), 545-554
- AN L., LIU Y., LI M., *et al.* (2021) Site specificity of blastocyst hatching significantly influences pregnancy outcomes in mice. *FASEB J* 35(9), e21812
- ANANI S., BHAT S., HONMA-YAMANAKA N., KRAWCHUK D., YAMANAKA Y. (2014) Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. *Development* 141(14), 2813-2824
- ANCHORDOQUY J.P., LIZARRAGA R.M., ANCHORDOQUY J.M., *et al.* (2019) Effect of cysteine, glutamate and glycine supplementation to in vitro fertilization medium during bovine early embryo development. *Reprod. Biol.* 19(4), 349-355
- APARICIO I.M., GARCIA-HERREROS M., FAIR T., LONERGAN P. (2010) Identification and regulation of glycogen synthase kinase-3 during bovine embryo development. *Reproduction* 140(1), 83-92
- ARAGONA M., PANCIERA T., MANFRIN A., *et al.* (2013) A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* 154(5), 1047-1059
- ARTUS J., PANTHIER J.-J., HADJANTONAKIS A.-K. (2010) A role for PDGF signaling in expansion of the extra-embryonic endoderm lineage of the mouse blastocyst. *Development* 137(20), 3361-3372
- ARTUS J., PILISZEK A., HADJANTONAKIS A.-K. (2011) The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: Sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Dev. Biol.* 350(2), 393-404
- ARTUS J., HUE I., ACLOQUE H. (2020) Preimplantation development in ungulates: a 'ménage à quatre' scenario. *Reproduction* 159(3), R151-R172

- AUERBACH S., BRINSTER R.L. (1967) Lactate dehydrogenase isozymes in the early mouse embryo. *Exp Cell Res* 46(1), 89-92
- AVILION A.A., NICOLIS S.K., PEVNY L.H., *et al.* (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17(1), 126-140
- AZIZ M., ALEXANDRE H. (1991) The origin of the nascent blastocoele in preimplantation mouse embryos ultrastructural cytochemistry and effect of chloroquine. *Roux Arch Dev Biol* 200(2), 77-85
- BALDA M.S., MATTER K. (2008) Tight junctions at a glance. *J Cell Sci* 121(Pt 22), 3677-3682
- BALTZ J.M. (2001) Osmoregulation and cell volume regulation in the preimplantation embryo. *In Current Topics in Developmental Biology*. San Diego, Academic Press, pp 55-106
- BALTZ J.M. (2012) Media Composition: Salts and Osmolality. *In Embryo Culture*. Totowa, NJ, Humana Press, pp 61-80
- BARCROFT L.C., HAY-SCHMIDT A., CAVENEY A., *et al.* (1998) Trophectoderm differentiation in the bovine embryo: characterization of a polarized epithelium. *Reproduction* 114(2), 327-339
- BARCROFT L.C., OFFENBERG H., THOMSEN P., WATSON A.J. (2003) Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. *Dev. Biol.* 256(2), 342-354
- BARR K.J., GARRILL A., JONES D.H., ORLOWSKI J., KIDDER G.M. (1998) Contributions of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms to preimplantation development of the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 50(2), 146-153
- BASSALERT C., VALVERDE-ESTRELLA L., CHAZAUD C. (2018) Primitive Endoderm Differentiation: From Specification to Epithelialization. *Curr Top Dev Biol* 128, 81-104
- BATISTA M.R., DINIZ P., TORRES A., *et al.* (2020) Notch signaling in mouse blastocyst development and hatching. *BMC Dev Biol* 20, 1-16
- BATISTA M.R., DINIZ P., MURTA D., *et al.* (2021) Balanced Notch-Wnt signaling interplay is required for mouse embryo and fetal development. *Reproduction* 161(4), 385-398
- BATT P.A., GARDNER D.K., CAMERON A.W. (1991) Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod Fertil Dev* 3(5), 601-607
- BAUMANN C.G., MORRIS D.G., SREENAN J.M., LEESE H.J. (2007) The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Mol Reprod Dev* 74(10), 1345-1353
- BAUMHOLTZ A.I., GUPTA I.R., RYAN A.K. (2017) Claudins in morphogenesis: Forming an epithelial tube. *Tissue Barriers* 5(4), e1361899
- BENHAM-PYLE B.W., PRUITT B.L., NELSON W.J. (2015) Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and β -catenin activation to drive cell cycle entry. *Science* 348(6238), 1024-1027
- BERG D.K., SMITH C.S., PEARTON D.J., *et al.* (2011) Trophectoderm lineage determination in cattle. *Dev Cell* 20(2), 244-255

- BESSONNARD S., DE MOT L., GONZE D., *et al.* (2014) Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network. *Development* 141(19), 3637-3648
- BESSONNARD S., GONZE D., DUPONT G. (2016) Spécification de l'épiblaste et de l'endoderme primitif lors du développement embryonnaire préimplantatoire chez la souris - Une combinaison entre biologie et modélisation mathématique. *Med Sci (Paris)* 32(2), 192-197
- BIGGERS J.D., BELL J.E., BENOS D.J. (1988) Mammalian blastocyst: transport functions in a developing epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 255(4), C419-C432
- BLASKY A.J., MANGAN A., PREKERIS R. (2015) Polarized protein transport and lumen formation during epithelial tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 31, 575-591
- BOCCACCIO A., FRASSANITO M.C., LAMBERTI L., *et al.* (2012) Nanoscale characterization of the biomechanical hardening of bovine zona pellucida. *J R Soc Interface* 9(76), 2871-2882
- BORLAND R.M., BIGGERS J.D., LECHENE C.P. (1977a) Studies on the composition and formation of mouse blastocoele fluid using electron probe microanalysis. *Dev. Biol.* 55(1), 1-8
- BORLAND R.M., HAZRA S., BIGGERS J.D., LECHENE C.P. (1977b) The elemental composition of the environments of the gametes and preimplantation embryo during the initiation of pregnancy. *Biol Reprod* 16(2), 147-157
- BRINSTER R.L. (1974) Embryo development. *J Anim Sci* 38(5), 1003-1012
- BRYANT D.M., DATTA A., RODRIGUEZ-FRATICELLI A.E., *et al.* (2010) A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen. *Nat Cell Biol* 12(11), 1035-1045
- BYUN M.R., HWANG J.-H., KIM A.R., *et al.* (2014) Canonical Wnt signalling activates TAZ through PP1A during osteogenic differentiation. *Cell Death Differ* 21(6), 854-863
- CAI K.Q., CAPO-CHICHI C.D., RULA M.E., YANG D.-H., XU X.-X. (2008) Dynamic GATA6 Expression in Primitive Endoderm Formation and Maturation in Early Mouse Embryogenesis. *Dev Dyn* 237(10), 2820-2829
- CASARES L., VINCENT R., ZALVIDEA D., *et al.* (2015) Hydraulic fracture during epithelial stretching. *Nat Mater* 14(3), 343-351
- CASSER E., ISRAEL S., WITTEN A., *et al.* (2017) Totipotency segregates between the sister blastomeres of two-cell stage mouse embryos. *Sci Rep* 7(1), 8299
- CASSER E., WDOVIK S., ISRAEL S., *et al.* (2019) Differences in blastomere totipotency in 2-cell mouse embryos are a maternal trait mediated by asymmetric mRNA distribution. *Mol. Hum. Reprod.* 25(11), 729-744
- CAZIN M., KOTCHARIAN M. (s. d.) ÉLASTICITÉ, Relations entre les contraintes et les déformations. In *Encyclopædia Universalis*. [<https://www.universalis.fr/encyclopedie/elasticite/3-relations-entre-les-contraintes-et-les-deformations/>] (consulté le 07/09/2022).
- CHAMBERS I., COLBY D., ROBERTSON M., *et al.* (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113(5), 643-655

- CHAN E.H.Y., NOUSIAINEN M., CHALAMALASETTY R.B., *et al.* (2005) The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* 24(12), 2076-2086
- CHAN C.J., COSTANZO M., RUIZ-HERRERO T., *et al.* (2019) Hydraulic control of mammalian embryo size and cell fate. *Nature* 571(7763), 112-116
- CHAVATTE-PALMER P., GUILLOMOT M. (2007) Comparative Implantation and Placentation. *Gynecol. Obstet. Invest.* 64(3), 166-174
- CHAZAUD C., YAMANAKA Y., PAWSON T., ROSSANT J. (2006) Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Dev. Cell.* 10(5), 615-624
- CHAZAUD C. (2008) L'embryogenèse précoce des mammifères - Premières différenciations cellulaires et cellules souches. *Med Sci (Paris)* 24(12), 1043-1048
- COCKBURN K., BIECHELE S., GARNER J., ROSSANT J. (2013) The Hippo Pathway Member Nf2 Is Required for Inner Cell Mass Specification. *Curr. Biol.* 23(13), 1195-1201
- COTICCHIO G., LAGALLA C., STURMEY R., PENNETTA F., BORINI A. (2019) The enigmatic morula: mechanisms of development, cell fate determination, self-correction and implications for ART. *Hum. Reprod. Update* 25(4), 422-438
- DAI X., SHE P., CHI F., *et al.* (2013) Phosphorylation of Angiomotin by Lats1/2 Kinases Inhibits F-actin Binding, Cell Migration, and Angiogenesis. *J Biol Chem* 288(47), 34041-34051
- DARD N., LE T., MARO B., LOUVET-VALLÉE S. (2009) Inactivation of aPKC λ reveals a context dependent allocation of cell lineages in preimplantation mouse embryos. *PLoS One* 4(9), e7117
- DAVIES S.P., REDDY H., CAIVANO M., COHEN P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351(Pt 1), 95-105
- DELEUZE S., GOUDET G. (2010) Cysteamine Supplementation of In vitro Maturation Media: A Review. *Reprod. Domest. Anim.* 45(6), e476-e482
- DENG H., WANG W., YU J., *et al.* (2015) Spectrin regulates Hippo signaling by modulating cortical actomyosin activity. *Elife* 4, e06567
- DENICOL A.C., DOBBS K.B., MCLEAN K.M., *et al.* (2013) Canonical WNT signaling regulates development of bovine embryos to the blastocyst stage. *Sci Rep* 3, 1266
- DENKER H.-W. (2020) Recent embryo twinning data prompt reconsideration of theories on a crucial role of segregation of oocyte cytoplasmic constituents in mammals. *Mol. Hum. Reprod.* 26(3), 193-198
- DE SOUZA D.K., SALLES L.P., ROSA E SILVA A. a. M. (2015) Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos. *Braz J Med Biol Res* 48(3), 191-197
- DIMMER K.S., FRIEDRICH B., LANG F., DEITMER J.W., BRÖER S. (2000) The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* 350 (Pt 1), 219-227

- DONNAY I., FEUGANG J.M., BERNARD S., *et al.* (2002) Impact of adding 5.5 mM glucose to SOF medium on the development, metabolism and quality of *in vitro* produced bovine embryos from the morula to the blastocyst stage. *Zygote* 10(3), 189-199
- DONNAY I., LEESE H. j. (1999) Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Mol. Reprod. Dev.* 53(2), 171-178
- DOS ANJOS S. a. A., DA COSTA C.P., ASSUMPÇÃO M.E.O.A., VISINTIN J.A., GOISSIS M.D. (2021) Inhibition of apical domain formation does not block blastocyst development in bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 33, 665-673
- DUMORTIER J.G., LE VERGE-SERANDOUR M., TORTORELLI A.F., *et al.* (2019) Hydraulic fracturing and active coarsening position the lumen of the mouse blastocyst. *Science* 365(6452), 465-468
- DUMORTIER J.G., MAÎTRE J.-L. (2018) Un point de contrôle développemental synchronise la morphogenèse et la différenciation cellulaire dans l'embryon de mammifère. *Med Sci (Paris)* 34(3), 205-207
- DUPONT S., MORSUT L., ARAGONA M., *et al.* (2011) Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474(7350), 179-183
- DUPONT S. (2016) Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction. *Exp. Cell Res.* 343(1), 42-53
- DURDU S., ISKAR M., REVENU C., *et al.* (2014) Luminal signalling links cell communication to tissue architecture during organogenesis. *Nature* 515(7525), 120-124
- EBNER T., MOSER M., SHEBL O., *et al.* (2009) Morphological analysis at compacting stage is a valuable prognostic tool for ICSI patients. *Reprod Biomed Online* 18(1), 61-66
- ECKERT J.J., FLEMING T.P. (2008) Tight junction biogenesis during early development. *Biochim. Biophys. Acta, Apical Junctional Complexes Part I* 1778(3), 717-728
- ENGELBERG J.A., DATTA A., MOSTOV K.E., HUNT C.A. (2011) MDCK cystogenesis driven by cell stabilization within computational analogues. *PLoS Comput Biol* 7(4), e1002030
- FERGUSON E.M., LEESE H.J. (1999) Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Reproduction* 116(2), 373-378
- FERGUSON E.M., LEESE H.J. (2006) A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 73(9), 1195-1201
- FERRICK L., LEE Y.S.L., GARDNER D.K. (2020) Metabolic activity of human blastocysts correlates with their morphokinetics, morphological grade, KIDScore and artificial intelligence ranking. *Hum Reprod* 35(9), 2004-2016
- FIERRO-GONZÁLEZ J.C., WHITE M.D., SILVA J.C., PLACHTA N. (2013) Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction. *Nat Cell Biol* 15(12), 1424-1433

- FILIMONOW K., SAIZ N., SUWIŃSKA A., *et al.* (2019) No evidence of involvement of E-cadherin in cell fate specification or the segregation of Epi and PrE in mouse blastocysts. *PLoS One* 14(2), e0212109
- FISCHER B., BAVISTER B.D. (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 99(2), 673-679
- FISCHER-BROWN A., CROOKS A., LEONARD S., *et al.* (2005) Parturition following transfer of embryos produced in two media under two oxygen concentrations. *Anim. Reprod. Sci.* 87(3), 215-228
- FRANKENBERG S., GERBE F., BESSONNARD S., *et al.* (2011) Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. *Dev Cell* 21(6), 1005-1013
- FRUM T., HALBISEN M.A., WANG C., *et al.* (2013) Oct4 cell-autonomously promotes primitive endoderm development in the mouse blastocyst. *Dev Cell* 25(6), 610-622
- FRUM T., MURPHY T.M., RALSTON A. (2018) HIPPO signaling resolves embryonic cell fate conflicts during establishment of pluripotency in vivo. *eLife* 7, e42298
- FU H., SUBRAMANIAN R.R., MASTERS S.C. (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 617-647
- GAO L., XU Q.-H., MA L.-N., *et al.* (2022) Trophoblast-derived Lactic Acid Orchestrates Decidual Macrophage Differentiation via SRC/LDHA Signaling in Early Pregnancy. *Int J Biol Sci* 18(2), 599-616
- GARBUTT C.L., CHISHOLM J.C., JOHNSON M.H. (1987) The establishment of the embryonic-abembryonic axis in the mouse embryo. *Development* 100, 125-134
- GARCÍA-HERREROS M., SIMINTIRAS C.A., LONERGAN P. (2018) Temporally differential protein expression of glycolytic and glycogenic enzymes during in vitro preimplantation bovine embryo development. *Reprod. Fertil. Dev.* 30(9), 1245
- GARDNER R.L. (2007) The axis of polarity of the mouse blastocyst is specified before blastulation and independently of the zona pellucida. *Hum. Reprod.* 22(3), 798-806
- GARDNER D.K., HARVEY A.J., GARDNER D.K., HARVEY A.J. (2015) Blastocyst metabolism. *Reprod. Fertil. Dev.* 27(4), 638-654
- GARDNER D.K. (2015) Lactate production by the mammalian blastocyst: manipulating the microenvironment for uterine implantation and invasion? *Bioessays* 37(4), 364-371
- GARDNER D.K., LEESE H.J. (1990) Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fertil* 88(1), 361-368
- GATENBY R.A., GILLIES R.J. (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4(11), 891-899
- GAZZO E., PEÑA F., VALDÉZ F., *et al.* (2020) Blastocyst contractions are strongly related with aneuploidy, lower implantation rates, and slow-cleaving embryos: a time lapse study. *JBRA Assist Reprod* 24(1), 77-81

- GERBE F., COX B., ROSSANT J., CHAZAUD C. (2008) Dynamic expression of Lrp2 pathway members reveals progressive epithelial differentiation of primitive endoderm in mouse blastocyst. *Dev. Biol.* 313(2), 594-602
- GERRI C., MCCARTHY A., ALANIS-LOBATO G., *et al.* (2020) Initiation of a conserved trophectoderm program in human, cow and mouse embryos. *Nature* 587(7834), 443-447
- GOISSIS M.D., CIBELLI J.B. (2014) Functional Characterization of SOX2 in Bovine Preimplantation Embryos. *Biol. Reprod.* 90(2), 30, 1-10
- GOLDSTEIN B., MACARA I.G. (2007) The PAR Proteins: Fundamental Players in Animal Cell Polarization. *Dev Cell* 13(5), 609-622
- GONZALES D.S., JONES J.M., PINYOPUMMINTR T., *et al.* (1996) Trophectoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts. *Hum Reprod* 11(12), 2739-2745
- GONZALEZ-MARISCAL L., BAUTISTA P., LECHUGA S., QUIROS M. (2012) ZO-2, a tight junction scaffold protein involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1257(1), 133-141
- GOPICHANDRAN N., LEESE H.J. (2003) Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. *Reproduction* 126(3), 299-308
- GRABAREK J.B., ŻYŻYŃSKA K., SAIZ N., *et al.* (2012) Differential plasticity of epiblast and primitive endoderm precursors within the ICM of the early mouse embryo. *Development* 139(1), 129-139
- GUERIF F., MCKEEGAN P., LEESE H.J., STURMEY R.G. (2013) A Simple Approach for Consumption and Release (CORE) Analysis of Metabolic Activity in Single Mammalian Embryos. *PLoS One* 8(8), e67834
- GUÉRIN P., EL MOUATASSIM S., MÉNÉZO Y. (2001) Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 7(2), 175-189
- GUO G., HUSS M., TONG G.Q., *et al.* (2010) Resolution of Cell Fate Decisions Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst. *Dev. Cell.* 18(4), 675-685
- GUPTA I.R., RYAN A.K. (2010) Claudins: unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. *Clin Genet* 77(4), 314-325
- GWATKIN R.B.L. (1966) Amino acid requirements for attachment and outgrowth of the mouse blastocyst in vitro. *J. Cell. Physiol.* 68(3), 335-343
- HALESTRAP A.P., WILSON M.C. (2012) The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life* 64(2), 109-119
- HAO Y., CHUN A., CHEUNG K., RASHIDI B., YANG X. (2008) Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *J Biol Chem* 283(9), 5496-5509

- HARRIS D., HUANG B., OBACK B. (2013) Inhibition of MAP2K and GSK3 signaling promotes bovine blastocyst development and epiblast-associated expression of pluripotency factors. *Biol Reprod* 88(3), 74
- HASHIMOTO M., SASAKI H. (2019) Epiblast Formation by TEAD-YAP-Dependent Expression of Pluripotency Factors and Competitive Elimination of Unspecified Cells. *Dev. Cell.* 50(2), 139-154.e5
- HASLEY A., CHAVEZ S., DANILCHIK M., WÜHR M., PELEGRI F. (2017) Vertebrate Embryonic Cleavage Pattern Determination. *Adv Exp Med Biol* 953, 117-171
- HE H., ZHANG H., LI Q., *et al.* (2020) Low oxygen concentrations improve yak oocyte maturation and enhance the developmental competence of preimplantation embryos. *Theriogenology* 156, 46-58
- HERMANN A., WU G., NEDVETSKY P.I., *et al.* (2021) The Hippo pathway component Wwc2 is a key regulator of embryonic development and angiogenesis in mice. *Cell Death Dis.* 12, 117
- HÉRUBEL F., EL MOUATASSIM S., GUÉRIN P., FRYDMAN R., MÉNÉZO Y. (2002) Genetic expression of monocarboxylate transporters during human and murine oocyte maturation and early embryonic development. *Zygote* 10(2), 175-181
- HIRATE Y., COCKBURN K., ROSSANT J., SASAKI H. (2012) Tead4 is constitutively nuclear, while nuclear vs. cytoplasmic Yap distribution is regulated in preimplantation mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(50), E3389-E3390
- HIRATE Y., HIRAHARA S., INOUE K.-I., *et al.* (2013) Polarity-dependent distribution of angiominin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr Biol* 23(13), 1181-1194
- HIRATE Y., HIRAHARA S., INOUE K.-I., *et al.* (2015) Par-aPKC-dependent and -independent mechanisms cooperatively control cell polarity, Hippo signaling, and cell positioning in 16-cell stage mouse embryos. *Dev Growth Differ* 57(8), 544-556
- HIRATE Y., SASAKI H. (2014) The role of angiominin phosphorylation in the Hippo pathway during preimplantation mouse development. *Tissue Barriers* 2, e28127
- HOME P., RAY S., DUTTA D., *et al.* (2009) GATA3 Is Selectively Expressed in the Trophectoderm of Peri-implantation Embryo and Directly Regulates Cdx2 Gene Expression. *J Biol Chem* 284(42), 28729-28737
- HONG Y. (2018) aPKC: the Kinase that Phosphorylates Cell Polarity. *F1000Res* 7, F1000 Faculty Rev-903 [10.12688/f1000research.14427.1]
- HOUGHTON F.D., THOMPSON J.G., KENNEDY C.J., LEESE H.J. (1996) Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 44(4), 476-485
- HOUGHTON F.D., HUMPHERSON P.G., HAWKHEAD J.A., HALL C.J., LEESE H.J. (2003) Na⁺, K⁺, ATPase activity in the human and bovine preimplantation embryo. *Dev Biol* 263(2), 360-366
- HUANG J.-C., WUN W.-S.A., GOLDSBY J.S., MATIJEVIC-ALEKSIC N., WU K.K. (2004) Cyclooxygenase-2-derived endogenous prostacyclin enhances mouse embryo hatching. *Hum. Reprod.* 19(12), 2900-2906

- HYAFIL F., MORELLO D., BABINET C., JACOB F. (1980) A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* 21(3), 927-934
- ISAEVA V.V. (2012) Self-organization in biological systems. *Biol Bull Russ Acad Sci* 39(2), 110-118
- JIN H., HAN Y., WANG H., *et al.* (2022) The second polar body contributes to the fate asymmetry in the mouse embryo. *Natl. Sci.* 9(7), nwac003 [10.1093/nsr/nwac003]
- JOHNSON M.H., PRATT H.P.M., HANDYSIDE A.H. (1981) The Generation and Recognition of Positional Information in the Preimplantation Mouse Embryo. *In Cellular and Molecular Aspects of Implantation*. Boston, MA, Springer US, pp 55-74
- KANG M., PILISZEK A., ARTUS J., HADJANTONAKIS A.-K. (2013) FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Development* 140(2), 267-279
- KANG M., GARG V., HADJANTONAKIS A.-K. (2017) Lineage establishment and progression within the inner cell mass of the mouse blastocyst requires FGFR1 and FGFR2. *Dev Cell* 41(5), 496-510.e5
- KAPLAN J.H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71, 511-535
- KARASEK C., ASHRY M., DRISCOLL C.S., KNOTT J.G. (2020) A tale of two cell-fates: role of the Hippo signaling pathway and transcription factors in early lineage formation in mouse preimplantation embryos. *Mol. Hum. Reprod.* 26(9), 653-664
- KAWAGISHI R., TAHARA M., SAWADA K., *et al.* (2004) Na⁺ / H⁺ exchanger-3 is involved in mouse blastocyst formation. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 301(9), 767-775
- KERAMARI M., RAZAVI J., INGMAN K.A., *et al.* (2010) Sox2 Is Essential for Formation of Trophectoderm in the Preimplantation Embryo. *PLoS One* 5(11), e13952
- KHALILIAN M., NAVIDBAKHS M., VALOJERDI M.R., CHIZARI M., YAZDI P.E. (2010) Estimating Young's modulus of zona pellucida by micropipette aspiration in combination with theoretical models of ovum. *J R Soc Interface* 7(45), 687-694
- KHAN D.R., DUBÉ D., GALL L., *et al.* (2012) Expression of Pluripotency Master Regulators during Two Key Developmental Transitions: EGA and Early Lineage Specification in the Bovine Embryo. *PLoS One* 7(3), e34110
- KHURANA N.K., NIEMANN H. (2000) Energy Metabolism in Preimplantation Bovine Embryos Derived In Vitro or In Vivo¹. *Biol. Reprod.* 62(4), 847-856
- KIDDER G.M. (2002) Trophectoderm development and function: the roles of Na⁺/K⁺-ATPase subunit isoforms. *Can J Physiol Pharmacol* 80(2), 110-115
- KIDDER G.M., WATSON A.J. (2005) Roles of Na,K-ATPase in Early Development and Trophectoderm Differentiation. *Semin. Nephrol.* 25(5), 352-355
- KINISU M., CHOI Y.J., CATTOGLIO C., *et al.* (2021) Klf5 establishes bi-potential cell fate by dual regulation of ICM and TE specification genes. *Cell Rep* 37(6), 109982

- KIRKEGAARD K., HINDKJAER J.J., INGERSLEV H.J. (2013) Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril* 99(3), 738-744.e4
- KLIMCZEWSKA K., KASPERCZUK A., SUWIŃSKA A. (2018) The Regulative Nature of Mammalian Embryos. In *Current Topics in Developmental Biology*. Cambridge, Elsevier, pp 105-149
- KOHRI N., AKIZAWA H., IISAKA S., *et al.* (2019) Trophectoderm regeneration to support full-term development in the inner cell mass isolated from bovine blastocyst. *J Biol Chem* 294(50), 19209-19223
- KOHRI N., AKIZAWA H., IISAKA S., *et al.* (2020) The role of RHOA signaling in trophectoderm cell-fate decision in cattle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 528(4), 713-718
- KONO K., TAMASHIRO D.A.A., ALARCON V.B. (2014) Inhibition of RHO-ROCK signaling enhances ICM and suppresses TE characteristics through activation of Hippo signaling in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 394(1), 142-155
- KOROTKEVICH E., NIWAYAMA R., COURTOIS A., *et al.* (2017) The Apical Domain Is Required and Sufficient for the First Lineage Segregation in the Mouse Embryo. *Dev Cell* 40(3), 235-247.e7
- KRAWCHUK D., HONMA-YAMANAKA N., ANANI S., YAMANAKA Y. (2013) FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* 384(1), 65-71
- KRISHER R.L., PRATHER R.S. (2012) A Role for the Warburg Effect in Preimplantation Embryo Development: Metabolic Modification to Support Rapid Cell Proliferation. *Mol Reprod Dev* 79(5), 311-320
- KRUG S.M., SCHULZKE J.D., FROMM M. (2014) Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol* 36, 166-176
- KUIJK E.W., VAN TOL L.T.A., VAN DE VELDE H., *et al.* (2012) The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development* 139(5), 871-882
- KUMAR V.B.S., VIJI R.I., KIRAN M.S., SUDHAKARAN P.R. (2008) Modulation of expression of LDH isoenzymes in endothelial cells by laminin: implications for angiogenesis. *J Cell Biochem* 103(6), 1808-1825
- KUMAR P., VERMA A., KUMAR M., *et al.* (2015) Expression pattern of glucose metabolism genes correlate with development rate of buffalo oocytes and embryos in vitro under low oxygen condition. *J Assist Reprod Genet* 32(3), 471-478
- KUROTAKI Y., HATTA K., NAKAO K., NABESHIMA Y., FUJIMORI T. (2007) Blastocyst Axis Is Specified Independently of Early Cell Lineage But Aligns with the ZP Shape. *Science* 316(5825), 719-723
- LAGALLA C., TAROZZI N., SCIAJNO R., *et al.* (2017) Embryos with morphokinetic abnormalities may develop into euploid blastocysts. *Reprod. Biomed* 34(2), 137-146

- LANE M., GARDNER D.K. (1996) Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Hum Reprod* 11(9), 1975-1978
- LANNER F., ROSSANT J. (2010) The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* 137(20), 3351-3360
- LAURINCÍK J., HYTTEL P., BARAN V., *et al.* (1998) A detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes in vitro: cell-cycle chronology and ultrastructure. *Mol Reprod Dev* 50(2), 192-199
- LE VERGE-SERANDOUR M., TURLIER H. (2021a) Blastocoel morphogenesis: A biophysics perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 130, 12-23
- LE VERGE-SERANDOUR M., TURLIER H. (2021b) A hydro-osmotic coarsening theory of biological cavity formation. *PLoS Comput Biol* 17(9), e1009333
- LEE Y.-B., MIN J.K., KIM J.-G., *et al.* (2022) Multiple functions of pyruvate kinase M2 in various cell types. *J Cell Physiol* 237(1), 128-148
- LEE J., CHOI I. (2021) Traf4 is required for tight junction complex during mouse blastocyst formation. *J Anim Reprod Biotechnol* 36(4), 307-313
- LEE S., CHOI I. (2021) Expression patterns and biological function of Specc1 during mouse preimplantation development. *Gene Expr Patterns* 41, 119196
- LEESE H.J. (2002) Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays* 24(9), 845-849
- LEESE H.J. (2003) What does an embryo need? *Hum Fertil (Camb)* 6(4), 180-185
- LEESE H.J., STURMEY R.G., BAUMANN C.G., MCEVOY T.G. (2007) Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Hum Reprod* 22(12), 3047-3050
- LEESE H.J., MCKEEGAN P.J., STURMEY R.G. (2021) Amino Acids and the Early Mammalian Embryo: Origin, Fate, Function and Life-Long Legacy. *Int J Environ Res Public Health* 18(18), 9874
- LEESE H.J., BRISON D.R., STURMEY R.G. (2022) The Quiet Embryo Hypothesis: 20 years on. *Front Physiol* 13, 899485
- LEONAVICIUS K., ROYER C., PREECE C., *et al.* (2018) Mechanics of mouse blastocyst hatching revealed by a hydrogel-based microdeformation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115(41), 10375-10380
- LEUNG C.Y., ZERNICKA-GOETZ M. (2013) Angiotensin prevents pluripotent lineage differentiation in mouse embryos via Hippo pathway-dependent and -independent mechanisms. *Nat Commun* 4(1), 1-11
- LEWIS G.S. (1989) Prostaglandin secretion by the blastocyst. *J Reprod Fertil Suppl* 37, 261-267
- LI P., CHEN Y., MAK K.K., *et al.* (2013) Functional Role of Mst1/Mst2 in Embryonic Stem Cell Differentiation. *PLoS One* 8(11), e79867

- LI S., SHI Y., DANG Y., *et al.* (2021) NOTCH signaling pathway is required for bovine early embryonic development. *Biol. Reprod.* 105(2), 332-344
- LIN S.P., LEE R.K., TSAI Y.J. (2001) In vivo hatching phenomenon of mouse blastocysts during implantation. *J Assist Reprod Genet* 18(6), 341-345
- LIN S.-C.J., WANI M.A., WHITSETT J.A., WELLS J.M. (2010) Klf5 regulates lineage formation in the pre-implantation mouse embryo. *Development* 137(23), 3953-3963
- LIN C., YAO E., CHUANG P.-T. (2015) A conserved MST1/2–YAP axis mediates Hippo signaling during lung growth. *Dev. Biol.* 403(1), 101-113
- LIN J., KHAN M., ZAPIEC B., MOMBAERTS P. (2017) PDGFRA Is Not Essential for the Derivation and Maintenance of Mouse Extraembryonic Endoderm Stem Cell Lines. *Stem Cell Reports* 9(4), 1062-1070
- LIU Y., BELKINA N.V., PARK C., *et al.* (2012) Constitutively active ezrin increases membrane tension, slows migration, and impedes endothelial transmigration of lymphocytes in vivo in mice. *Blood* 119(2), 445-453
- LIU Z., HAI T., DAI X., *et al.* (2012) Early patterning of cloned mouse embryos contributes to post-implantation development. *Dev. Biol.* 368(2), 304-311
- LIU S.-J., SUN J.-B., HAO X., *et al.* (2020) Blastocyst hatching site is regularly distributed and does not influence foetal development in mice. *Sci Rep* 10, 2475
- LLOYD S., FLEMING T.P., COLLINS J.E. (2003) Expression of Wnt genes during mouse preimplantation development. *Gene Expr Patterns* 3(3), 309-312
- LOPES E.F., MARQUES L.S., DURANTI R.G., *et al.* (2015) Gene Expression of Monocarboxylate Transporters and Oocyte-secreted Factors in Bovine Cumulus-oocyte Complexes Selected by Brilliant Cresyl Blue. *Reprod Domest Anim* 50(5), 763-770
- LORTHONGPANICH C., DORIS T.P.Y., LIMVIPHUVADH V., KNOWLES B.B., SOLTER D. (2012) Developmental fate and lineage commitment of singled mouse blastomeres. *Development* 139(20), 3722-3731
- LORTHONGPANICH C., MESSERSCHMIDT D.M., CHAN S.W., *et al.* (2013) Temporal reduction of LATS kinases in the early preimplantation embryo prevents ICM lineage differentiation. *Genes Dev* 27(13), 1441-1446
- LOUVET-VALLÉE S., DARD N., SANTA-MARIA A., AGHION J., MARO B. (2001) A major posttranslational modification of ezrin takes place during epithelial differentiation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 231(1), 190-200
- LUNT S.Y., VANDER HEIDEN M.G. (2011) Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27(1), 441-464
- LUO W., SEMENZA G.L. (2012) Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. *Trends Endocrinol Metab* 23(11), 560-566

- MA L.-N., HUANG X.-B., MUYAYALO K.P., MOR G., LIAO A.-H. (2020) Lactic Acid: A Novel Signaling Molecule in Early Pregnancy? *Front Immunol* 11, 279
- MADAN P., ROSE K., WATSON A.J. (2007) Na/K-ATPase beta1 subunit expression is required for blastocyst formation and normal assembly of trophectoderm tight junction-associated proteins. *J Biol Chem* 282(16), 12127-12134
- MADEJA Z.E., HRYNIEWICZ K., ORSZTYNOWICZ M., PAWLAK P., PERKOWSKA A. (2015) WNT/ β -Catenin Signaling Affects Cell Lineage and Pluripotency-Specific Gene Expression in Bovine Blastocysts: Prospects for Bovine Embryonic Stem Cell Derivation. *Stem Cells and Development* 24(20), 2437-2454
- MAÎTRE J.-L., NIWAYAMA R., TURLIÈRE H., NÉDÉLEC F., HIIRAGI T. (2015) Pulsatile cell-autonomous contractility drives compaction in the mouse embryo. *Nat Cell Biol* 17(7), 849-855
- MAÎTRE J.-L., TURLIÈRE H., ILLUKKUMBURA R., *et al.* (2016) Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification. *Nature* 536(7616), 344-348
- MAÎTRE J.-L. (2017) Mécanique de la formation de la masse cellulaire interne chez la souris. *Biologie Aujourd'hui* 211(2), 137-148
- MANZANARES M., RODRIGUEZ T.A. (2013) Development: Hippo Signalling Turns the Embryo Inside Out. *Curr. Biol.* 23(13), R559-R561
- MARCHIQ I., POUYSSÉGUR J. (2016) Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H⁺ symporters. *J Mol Med (Berl)* 94, 155-171
- MARIKAWA Y., ALARCON V.B. (2012) Creation of Trophectoderm, the First Epithelium, in Mouse Preimplantation Development. In *Mouse Development: From Oocyte to Stem Cells, Results and Problems in Cell Differentiation*. Berlin, Heidelberg, Springer, pp 165-184
- MARTIN P.M., SUTHERLAND A.E. (2001) Exogenous Amino Acids Regulate Trophectoderm Differentiation in the Mouse Blastocyst through an mTOR-Dependent Pathway. *Dev. Biol.* 240(1), 182-193
- MASSIMIANI M., LACCONI V., LA CIVITA F., *et al.* (2019) Molecular Signaling Regulating Endometrium–Blastocyst Crosstalk. *Int J Mol Sci* 21(1), 23
- MASSIP A., MULNARD J., VANDERZWALMEN P., HANZEN C., ECTORS F. (1982) The behaviour of cow blastocyst in vitro: cinematographic and morphometric analysis. *J Anat* 134(Pt 2), 399-405
- MASUDA Y., HASEBE R., KUROMI Y., *et al.* (2021) Three-dimensional live imaging of bovine embryos by optical coherence tomography. *J Reprod Dev* 67(2), 149-154
- MASUI S., NAKATAKE Y., TOYOOKA Y., *et al.* (2007) Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9(6), 625-635
- MCNAUGHT A.D., WILKINSON A. (2019) Ostwald ripening. In *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. [<https://goldbook.iupac.org/terms/view/O04348>] (consulté le 30/11/2022).

- MEILHAC S.M., ADAMS R.J., MORRIS S.A., *et al.* (2009) Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 331(2), 210-221
- MENCHERO S., ROLLAN I., LOPEZ-IZQUIERDO A., *et al.* (2019) Transitions in cell potency during early mouse development are driven by Notch. *eLife* 8, e42930
- MENG Z., MOROISHI T., GUAN K.-L. (2016) Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev* 30(1), 1-17
- MIHAJLOVIĆ A.I., BRUCE A.W. (2017) The first cell-fate decision of mouse preimplantation embryo development: integrating cell position and polarity. *Open Biology* 7(11), 170210
- MILLER J.R. (2001) The Wnts. *Genome Biology* 3(1), reviews3001.1
- MITCHELL M., CASHMAN K.S., GARDNER D.K., THOMPSON J.G., LANE M. (2009) Disruption of Mitochondrial Malate-Aspartate Shuttle Activity in Mouse Blastocysts Impairs Viability and Fetal Growth. *Biol Reprod* 80(2), 295-301
- MITSUI K., TOKUZAWA Y., ITOH H., *et al.* (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113(5), 631-642
- MIYATA H., MATSUBAYASHI H., FUKUTOMI N., *et al.* (2010) Relevance of the site of assisted hatching in thawed human blastocysts: a preliminary report. *Fertil Steril* 94(6), 2444-2447
- MOLOTKOV A., MAZOT P., BREWER J.R., CINALLI R.M., SORIANO P. (2017) Distinct Requirements for Fgfr1 and Fgfr2 in Primitive Endoderm Development and Exit from Pluripotency. *Dev Cell* 41(5), 511-526.e4
- MORIWAKI K., TSUKITA S., FURUSE M. (2007) Tight junctions containing claudin 4 and 6 are essential for blastocyst formation in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 312(2), 509-522
- MOSALIGANTI K.R., SWINBURNE I.A., CHAN C.U., *et al.* (2019) Size control of the inner ear via hydraulic feedback. *Elife* 8, e39596
- MOTOSUGI N., BAUER T., POLANSKI Z., SOLTER D., HIRAGI T. (2005) Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes Dev* 19(9), 1081-1092
- MULAS C., CHIA G., JONES K.A., *et al.* (2018) Oct4 regulates the embryonic axis and coordinates exit from pluripotency and germ layer specification in the mouse embryo. *Development* 145(12), dev159103
- MUSIN O.R. (2006) The Kissing Problem in Three Dimensions. *Discrete Comput Geom* 35(3), 375-384
- NAGAI H., OKADA M., NAGAI Y., *et al.* (2021) Abnormal cleavage is involved in the self-correction of bovine preimplantation embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 562, 76-82
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2021) Malate-Aspartate Shuttle Pathway. *In National Library of Medicine*. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen/273544>] (consulté le 08/07/2024 apr. J.-C.).

- NEGRÓN-PÉREZ V.M., RODRIGUES L.T., MINGOTI G.Z., HANSEN P.J. (2018) Role of ROCK signaling in formation of the trophectoderm of the bovine preimplantation embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 85(5), 374-375
- NEGRÓN-PÉREZ Verónica M, HANSEN P.J. (2017) Role of yes-associated protein 1, angiomin, and mitogen-activated kinase kinase 1/2 in development of the bovine blastocyst. *Biol Reprod* 98(2), 170-183
- NEGRÓN-PÉREZ Verónica M., HANSEN P.J. (2017) The bovine embryo hatches from the zona pellucida through either the embryonic or abembryonic pole. *J Assist Reprod Genet* 34(6), 725-731
- NICHOLS J., ZEVNIK B., ANASTASSIADIS K., *et al.* (1998) Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* 95(3), 379-391
- NICHOLS J., SILVA J., ROODE M., SMITH A. (2009) Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development* 136(19), 3215-3222
- NIELSEN J.S., MCNAGNY K.M. (2008) Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 121(Pt 22), 3683-3692
- NIIMURA S. (2003) Time-Lapse Videomicrographic Analyses of Contractions in Mouse Blastocysts. *J. Reprod. Dev.* 49(6), 413-423
- NIIMURA S., OGATA T., OKIMURA A., *et al.* (2010) Time-Lapse Videomicrographic Observations of Blastocyst Hatching in Cattle. *J. Reprod. Dev.* 55(6), 649-54
- NISHIOKA N., YAMAMOTO S., KIYONARI H., *et al.* (2008) Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev* 125(3-4), 270-283
- NISHIOKA N., INOUE K., ADACHI K., *et al.* (2009) The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell* 16(3), 398-410
- NISHITA T., KINOSHITA C., MAEGAKI M., ASARI M. (1990) Immunohistochemical studies of the carbonic anhydrase isozymes in the bovine placenta. *Placenta* 11(4), 329-336
- NIWA H., TOYOOKA Y., SHIMOSATO D., *et al.* (2005) Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophectoderm Differentiation. *Cell* 123(5), 917-929
- NIWAYAMA R., MOGHE P., LIU Y.-J., *et al.* (2019) A Tug-of-War between Cell Shape and Polarity Controls Division Orientation to Ensure Robust Patterning in the Mouse Blastocyst. *Dev. Cell.* 51(5), 564-574.e6
- OH S., LEE D., KIM T., *et al.* (2009) Crucial role for Mst1 and Mst2 kinases in early embryonic development of the mouse. *Mol Cell Biol* 29(23), 6309-6320
- OHNISHI Y., HUBER W., TSUMURA A., *et al.* (2014) Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages. *Nat Cell Biol* 16(1), 27-37
- OKA T., MAZACK V., SUDOL M. (2008) Mst2 and Lats kinases regulate apoptotic function of Yes kinase-associated protein (YAP). *J Biol Chem* 283(41), 27534-27546

- OKUMURA-NAKANISHI S., SAITO M., NIWA H., ISHIKAWA F. (2005) Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 280(7), 5307-5317
- O'NEILL E., RUSHWORTH L., BACCARINI M., KOLCH W. (2004) Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science* 306(5705), 2267-2270
- ORSI N.M., LEESE H.J. (2004) Ammonium exposure and pyruvate affect the amino acid metabolism of bovine blastocysts in vitro. *Reproduction* 127(1), 131-140
- ORTEGA M.S., KELLEHER A.M., O'NEIL E., *et al.* (2020) NANOG is required to form the epiblast and maintain pluripotency in the bovine embryo. *Mol Reprod Dev* 87(1), 152-160
- O'SULLIVAN C.M., TANG L., XU H., LIU S., RANCOURT D.E. (2004) Origin of the murine implantation serine proteinase subfamily. *Mol. Reprod. Dev.* 69(2), 126-136
- OTA M., SASAKI H. (2008) Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development* 135(24), 4059-4069
- ÖZGÜÇ Ö., MAÎTRE J.-L. (2020) Multiscale morphogenesis of the mouse blastocyst by actomyosin contractility. *Curr Opin Cell Biol* 66, 123-129
- PALMIERI S.L., PETER W., HESS H., SCHÖLER H.R. (1994) Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol* 166(1), 259-267
- PAPI M., BRUNELLI R., SYLLA L., *et al.* (2010) Mechanical properties of zona pellucida hardening. *Eur Biophys J* 39(6), 987-992
- PARAMASIVAM M., SARKESHIK A., YATES J.R., FERNANDES M.J.G., MCCOLLUM D. (2011) Angiotensin family proteins are novel activators of the LATS2 kinase tumor suppressor. *MBoC* 22(19), 3725-3733
- PARK H.W., KIM Y.C., YU B., *et al.* (2015) Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell* 162(4), 780-794
- PARTRIDGE R.J., LEESE H.J. (1996) Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev* 8(6), 945-950
- PEDERSEN H.S., MAZZONI G., STROEBECH L., *et al.* (2017) Basic and practical aspects of pregnancy establishment in cattle. *Anim Reprod* 14(3), 581-588
- PEIPPO J., MACHATY Z., PETER A. (2011) Terminologies for the pre-attachment bovine embryo. *Theriogenology* 76(8), 1373-1379
- PEREZ T.D., NELSON W.J. (2004) Cadherin Adhesion: Mechanisms and Molecular Interactions. *Handb Exp Pharmacol* n°165, 3-21
- PERONA R.M., WASSARMAN P.M. (1986) Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophectoderm. *Dev. Biol.* 114(1), 42-52

- PIOTROWSKA K., WIANNY F., PEDERSEN R.A., ZERNICKA-GOETZ M. (2001) Blastomeres arising from the first cleavage division have distinguishable fates in normal mouse development. *Development* 128(19), 3739-3748
- PIOTROWSKA K., ZERNICKA-GOETZ M. (2001) Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature* 409(6819), 517-521
- PLUSA B., PILISZEK A., FRANKENBERG S., ARTUS J., HADJANTONAKIS A.-K. (2008) Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* 135(18), 3081-3091
- PLUSA B., PILISZEK A. (2020) Common principles of early mammalian embryo self-organisation. *Development* 147(14), dev183079
- PRIBENSZKY C., CORNEA M., JANDO T., LOSONCZI E., LANG Z. (2011) The dynamics of contractions of mouse blastocysts in vitro is typical for embryo quality and may predict hatching-a time-lapse-based analysis. *Reprod Fertil Dev* 24, 162-3
- RAJASEKARAN S.A., RAJASEKARAN A.K. (2009) Na,K-ATPase and epithelial tight junctions. *Front. Biosci.* 14(6), 2130-2148
- RALSTON A., COX B.J., NISHIOKA N., *et al.* (2010) Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development* 137(3), 395-403
- RALSTON A., ROSSANT J. (2008) Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 313(2), 614-629
- RAVID T., HOCHSTRASSER M. (2008) Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(9), 679-689
- RAYON T., MENCHERO S., NIETO A., *et al.* (2014) Notch and Hippo converge on Cdx2 to specify the trophectoderm lineage in the mouse blastocyst. *Dev Cell* 30(4), 410-422
- REDEL B.K., BROWN A.N., SPATE L.D., *et al.* (2012) Glycolysis in preimplantation development is partially controlled by the Warburg Effect. *Mol. Reprod. Dev.* 79(4), 262-271
- REIJO PERA R.A., PREZZOTO L. (2016) Chapter Eleven - Species-Specific Variation Among Mammals. *In Current Topics in Developmental Biology, Mammalian Preimplantation Development.* Academic Press, pp 401-420
- REVELL C. (2018) Modelling Physical Mechanisms Driving Tissue Self-Organisation in the Early Mammalian Embryo. Thesis. University of Cambridge, n°Accepted: 2018-06-11T09:32:28Z
- RODDA D.J., CHEW J.-L., LIM L.-H., *et al.* (2005) Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* 280(26), 24731-24737
- ROGERS P.A.W., MURPHY C.R., GANNON B.J. (1982) Absence of capillaries in the endometrium surrounding the implanting rat blastocyst. *Micron* (1969) 13(3), 373-374
- ROMANO D., NGUYEN L.K., MATAILLANAS D., *et al.* (2014) Protein interaction switches coordinate Raf-1 and MST2/Hippo signalling. *Nat Cell Biol* 16(7), 673-684

- RUIZ-HERRERO T., ALESSANDRI K., GURCHENKOV B.V., NASSOY P., MAHADEVAN L. (2017) Organ size control via hydraulically gated oscillations. *Development* 144(23), 4422-4427
- RYAN A.Q., CHAN C.J., GRANER F., HIIRAGI T. (2019) Lumen Expansion Facilitates Epiblast-Primitive Endoderm Fate Specification during Mouse Blastocyst Formation. *Dev. Cell.* 51(6), 684-697.e4
- SAAEELDIN I.M., TUKUR H.A., ALJUMAAH R.S., SINDI R.A. (2021) Rocking the Boat: The Decisive Roles of Rho Kinases During Oocyte, Blastocyst, and Stem Cell Development. *Front Cell Dev Biol* 8, 616762
- SAITO S., YAMAMURA S., KOHRI N., *et al.* (2021) Requirement for expression of WW domain containing transcription regulator 1 in bovine trophectoderm development. *Biochem Biophys Res Commun* 555, 140-146
- SAIZ N., GRABAREK J.B., SABHERWAL N., PAPALOPULU N., PLUSA B. (2013) Atypical protein kinase C couples cell sorting with primitive endoderm maturation in the mouse blastocyst. *Development* 140(21), 4311-4322
- SAIZ N., WILLIAMS K.M., SESHAN V.E., HADJANTONAKIS A.-K. (2016) Asynchronous fate decisions by single cells collectively ensure consistent lineage composition in the mouse blastocyst. *Nat Commun* 7(1), 13463
- SAIZ N., MORA-BITRIA L., RAHMAN S., *et al.* (2020) Growth-factor-mediated coupling between lineage size and cell fate choice underlies robustness of mammalian development. *eLife* 9, e56079
- SAKURAI T., SAKAMOTO A., MUROI Y., *et al.* (2009) Induction of endogenous interferon tau gene transcription by CDX2 and high acetylation in bovine nontrophoblast cells. *Biol Reprod* 80(6), 1223-1231
- SAKURAI N., TAKAHASHI K., EMURA N., *et al.* (2016) The Necessity of OCT-4 and CDX2 for Early Development and Gene Expression Involved in Differentiation of Inner Cell Mass and Trophectoderm Lineages in Bovine Embryos. *Cell Reprogram* 18(5), 309-318
- SAMARAGE C.R., WHITE M.D., ÁLVAREZ Y.D., *et al.* (2015) Cortical Tension Allocates the First Inner Cells of the Mammalian Embryo. *Dev. Cell.* 34(4), 435-447
- SANMEE U., PIROMLERTAMORN W., VUTYAVANICH T. (2016) The effect of the site of laser zona opening on the complete hatching of mouse blastocysts and their cell numbers. *Clin Exp Reprod Med* 43(3), 152
- SASAKI H. (2015) Position- and polarity-dependent Hippo signaling regulates cell fates in preimplantation mouse embryos. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 47, 80-87
- SAUCEDO L.J., EDGAR B.A. (2007) Filling out the Hippo pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(8), 613-621
- SCHLIFFKA M.F., TORTORELLI A.F., ÖZGÜÇ Ö., *et al.* (2021) Multiscale analysis of single and double maternal-zygotic Myh9 and Myh10 mutants during mouse preimplantation development. *eLife* 10, e68536

- SCHRODE N., SAIZ N., DI TALIA S., HADJANTONAKIS A.-K. (2014) GATA6 Levels Modulate Primitive Endoderm Cell Fate Choice and Timing in the Mouse Blastocyst. *Dev Cell* 29(4), 454-467
- SESHAGIRI P.B., SEN ROY S., SIREESHA G., RAO R.P. (2009) Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *J. Reprod. Immunol.* 83(1-2), 79-84
- SESHAGIRI P.B., VANI V., MADHULIKA P. (2016) Cytokines and Blastocyst Hatching. *J. Reprod. Immunol.* 75(3), 208-217
- SHARMA N., LIU S., TANG L., *et al.* (2006) Implantation Serine Proteinases heterodimerize and are critical in hatching and implantation. *BMC Dev Biol* 6(1), 61
- SHARMA J., ANTENOS M., MADAN P. (2021) A Comparative Analysis of Hippo Signaling Pathway Components during Murine and Bovine Early Mammalian Embryogenesis. *Genes (Basel)* 12(2), 281
- SHARMA J., MADAN P. (2020) Characterisation of the Hippo signalling pathway during bovine preimplantation embryo development. *Reprod Fertil Dev* 32(4), 392-401
- SHARMA J., MADAN P. (2022) Differential regulation of Hippo signaling pathway components between 8-cell and blastocyst stages of bovine preimplantation embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 89(3), 146-161
- SHETH B., NOWAK R.L., ANDERSON R., *et al.* (2008) Tight junction protein ZO-2 expression and relative function of ZO-1 and ZO-2 during mouse blastocyst formation. *Exp Cell Res* 314(18), 3356-3368
- SHI Q., LE X., WANG B., *et al.* (2001) Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells. *Oncogene* 20(28), 3751-3756
- SHI X., YIN Z., LING B., *et al.* (2017) Rho differentially regulates the Hippo pathway by modulating the interaction between Amot and Nf2 in the blastocyst. *Development* 144(21), 3957-3967
- SHIMODA Y., KUMAGAI J., ANZAI M., *et al.* (2016) Time-lapse monitoring reveals that vitrification increases the frequency of contraction during the pre-hatching stage in mouse embryos. *J Reprod Dev* 62(2), 187-193
- SILVA J., NICHOLS J., THEUNISSEN T.W., *et al.* (2009) Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell* 138(4), 722-737
- SIMMET K., ZAKHARTCHENKO V., PHILIPPOU-MASSIER J., *et al.* (2018) OCT4/POU5F1 is required for NANOG expression in bovine blastocysts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(11), 2770-2775
- SIREESHA G.V., MASON R.W., HASSANEIN M., *et al.* (2008) Role of cathepsins in blastocyst hatching in the golden hamster. *Mol. Hum. Reprod.* 14(6), 337-346
- SKINNER M.A., MACLAREN L.A., WILDEMAN A.G. (1999) Stage-dependent Redistribution of the V-ATPase During Bovine Implantation. *J Histochem Cytochem.* 47(10), 1247-1254
- SMITH D.G., STURMEY R. (2013) Parallels between embryo and cancer cell metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 664-669

- SOSZYŃSKA A., KLIMCZEWSKA K., SUWIŃSKA A. (2019) FGF/ERK signaling pathway: how it operates in mammalian preimplantation embryos and embryo-derived stem cells. *Int J Dev Biol* 63(3-4-5), 171-186
- SPRINGER C., ZAKHARTCHENKO V., WOLF E., SIMMET K. (2021) Hypoblast Formation in Bovine Embryos Does Not Depend on NANOG. *Cells* 10(9), 2232
- STEINBERG M.S., TAKEICHI M. (1994) Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(1), 206-209
- STEPHENSON R.E., HIGASHI T., EROFEEV I.S., *et al.* (2019) Rho Flares Repair Local Tight Junction Leaks. *Dev. Cell.* 48(4), 445-459.e5
- STRILIĆ B., EGLINGER J., KRIEG M., *et al.* (2010) Electrostatic Cell-Surface Repulsion Initiates Lumen Formation in Developing Blood Vessels. *Curr. Biol.* 20(22), 2003-2009
- STRUMPF D., MAO C.-A., YAMANAKA Y., *et al.* (2005) Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 132(9), 2093-2102
- STURMEY R., REIS A., LEESE H., MCEVOY T. (2009) Role of Fatty Acids in Energy Provision During Oocyte Maturation and Early Embryo Development. *Reprod Domest Anim* 44(s3), 50-58
- STURMEY R.G., BERMEJO-ALVAREZ P., GUTIERREZ-ADAN A., *et al.* (2010) Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability. *Mol Reprod Dev* 77(3), 285-296
- STURMEY R.G., LEESE H.J. (2003) Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* 126(2), 197-204
- SUN Y., WAN K.-T., ROBERTS K.P., BISCHOF J.C., NELSON B.J. (2003) Mechanical property characterization of mouse zona pellucida. *IEEE Trans Nanobioscience* 2(4), 279-286
- SUWIŃSKA A., CZOŁOWSKA R., OŹDŹEŃSKI W., TARKOWSKI A.K. (2008) Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: Expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev. Biol.* 322(1), 133-144
- TADROS W., LIPSHITZ H.D. (2009) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 136(18), 3033-3042
- TANG L., RANCOURT D.E. (2005) Murine implantation serine proteinases 1 and 2: Structure, function and evolution. *Gene* 364, 30-36
- TARKOWSKI A.K., WRÓBLEWSKA J. (1967) Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol* 18(1), 155-180
- TEJERA A., HERRERO J., VILORIA T., *et al.* (2012) Time-dependent O₂ consumption patterns determined optimal time ranges for selecting viable human embryos. *Fertil. Steril.* 98(4), 849-857.e3

- THOMPSON J.G., PARTRIDGE R.J., HOUGHTON F.D., COX C.I., LEESE H.J. (1996) Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fertil* 106(2), 299-306
- TIAN Q., ZHOU L.-Q. (2022) Lactate Activates Germline and Cleavage Embryo Genes in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cells* 11(3), 548
- TIMBS M.M., SPRING K.R. (1996) Hydraulic Properties of MDCK Cell Epithelium. *J. Membr. Biol.* 153(1), 1-11
- TORRES M., STOYKOVA A., HUBER O., *et al.* (1997) An alpha-E-catenin gene trap mutation defines its function in preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(3), 901-906
- TORRES-SÁNCHEZ A., KERR WINTER M., SALBREUX G. (2021) Tissue hydraulics: Physics of lumen formation and interaction. *Cell Dev* 168, 203724
- TURNER K., MARTIN K.L., WOODWARD B.J., LENTON E.A., LEESE H.J. (1994) Comparison of pyruvate uptake by embryos derived from conception and non-conception natural cycles. *Hum Reprod* 9(12), 2362-2366
- USHIJIMA H., AKIYAMA K., TAJIMA T. (2008) Transition of Cell Numbers in Bovine Preimplantation Embryos: In Vivo Collected and In Vitro Produced Embryos. *J. Reprod. Dev.* 54(4), 239-243
- VANDER HEIDEN M.G., CANTLEY L.C., THOMPSON C.B. (2009) Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324(5930), 1029-1033
- VANDER HEIDEN M.G., LOCASALE J.W., SWANSON K.D., *et al.* (2010) Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science* 329(5998), 1492-1499
- VERKMAN A.S., MITRA A.K. (2000) Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278(1), F13-F28
- VESTWEBER D., GOSSLER A., BOLLER K., KEMLER R. (1987) Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev. Biol.* 124(2), 451-456
- VIÑALS GONZALEZ X., ODIA R., CAWOOD S., *et al.* (2018) Contraction behaviour reduces embryo competence in high-quality euploid blastocysts. *J Assist Reprod Genet* 35(8), 1509-1517
- VINOT S., LE T., OHNO S., *et al.* (2005) Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Dev. Biol.* 282(2), 307-319
- VOORHEES P.W. (1985) The theory of Ostwald ripening. *J Stat Phys* 38(1-2), 231-252
- WADA K.-I., ITOGA K., OKANO T., YONEMURA S., SASAKI H. (2011) Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* 138(18), 3907-3914
- WALE P.L., GARDNER D.K. (2010) Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. *Reprod Biomed Online* 21(3), 402-410
- WANG H., DING T., BROWN N., *et al.* (2008) Zonula occludens-1 (ZO-1) is involved in morula to blastocyst transformation in the mouse. *Dev. Biol.* 318(1), 112-125

- WANG C., HAN X., ZHOU Z., *et al.* (2019) Wnt3a Activates the WNT-YAP/TAZ Pathway to Sustain CDX2 Expression in Bovine Trophoblast Stem Cells. *DNA Cell Biol* 38(5), 410-422
- WARBURG O. (1956) On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124(3215), 269-270
- WATANABE T., BIGGINS J.S., TANNAN N.B., SRINIVAS S. (2014) Limited predictive value of blastomere angle of division in trophectoderm and inner cell mass specification. *Development* 141(11), 2279-2288
- WATANABE Y., MIYASAKA K.Y., KUBO A., *et al.* (2017) Notch and Hippo signaling converge on Strawberry Notch 1 (Sbno1) to synergistically activate Cdx2 during specification of the trophectoderm. *Sci Rep* 7, 46135
- WATSON A.J., NATALE D.R., BARCROFT L.C. (2004) Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci* 82-83, 583-592
- WATSON A.J., BARCROFT L.C. (2001) Regulation of blastocyst formation. *Front Biosci* 6, D708-730
- WENNEKAMP S., MESECKE S., NÉDÉLEC F., HIIRAGI T. (2013) A self-organization framework for symmetry breaking in the mammalian embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(7), 452-459
- WENNMANN D.O., SCHMITZ J., WEHR M.C., *et al.* (2014) Evolutionary and Molecular Facts Link the WWC Protein Family to Hippo Signaling. *Mol. Biol. Evol.* 31(7), 1710-1723
- WHITE M.D., BISSIERE S., ALVAREZ Y.D., PLACHTA N. (2016) Mouse Embryo Compaction. *Curr Top Dev Biol* 120, 235-258
- WHITE M.D., ZENKER J., BISSIERE S., PLACHTA N. (2017) How cells change shape and position in the early mammalian embryo. *Curr Opin Cell Biol* 44, 7-13
- WILDING M., COPPOLA G., DALE B., MATTEO L.D. (2009) Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction* 137(4), 619-624
- WU G., SCHÖLER H.R. (2014) Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regen* 3(1), 7
- 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 Reports* 10(9), 1508-1520
- XIAO S., LI R., EL ZOWALATY A.E., *et al.* (2017) Acidification of uterine epithelium during embryo implantation in mice. *Biol Reprod* 96(1), 232-243
- XIE H., TRANGUCH S., JIA X., *et al.* (2008) Inactivation of Nuclear Wnt- β -Catenin Signaling Limits Blastocyst Competency for Implantation. *Development* 135(4), 717-727
- XIONG M., ELSON G., LEGARDA D., LEIBOVICH S.J. (1998) Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Pathol* 153(2), 587-598

XU T., WANG W., ZHANG S., STEWART R.A., YU W. (1995) Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development* 121(4), 1053-1063

YAMAMURA S., GODA N., AKIZAWA H., *et al.* (2020) Yes-associated protein 1 translocation through actin cytoskeleton organization in trophectoderm cells. *Dev. Biol.* 468(1-2), 14-25

YAMANAKA Y., LANNER F., ROSSANT J. (2010) FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development* 137(5), 715-724

YAN J., WALZ K., NAKAMURA H., *et al.* (2003) COP9 signalosome subunit 3 is essential for maintenance of cell proliferation in the mouse embryonic epiblast. *Mol Cell Biol* 23(19), 6798-6808

YANAGIDA A., CORUJO-SIMON E., REVELL C.K., *et al.* (2022) Cell surface fluctuations regulate early embryonic lineage sorting. *Cell* 185(5), 777-793.e20

YANG Y.-C., CHIEN M.-H., LIU H.-Y., *et al.* (2018) Nuclear translocation of PKM2/AMPK complex sustains cancer stem cell populations under glucose restriction stress. *Cancer Letters* 421, 28-40

YU H.H., DOHN M.R., MARKHAM N.O., COFFEY R.J., REYNOLDS A.B. (2016) p120-catenin controls contractility along the vertical axis of epithelial lateral membranes. *J Cell Sci* 129(1), 80-94

ZENKER J., WHITE M.D., GASNIER M., *et al.* (2018) Expanding Actin Rings Zipper the Mouse Embryo for Blastocyst Formation. *Cell* 173(3), 776-791.e17

ZERNICKA-GOETZ M. (2005) Cleavage pattern and emerging asymmetry of the mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(12), 919-928

ZHANG S., LIN H., KONG S., *et al.* (2013) Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol. Aspects Med.* 34(5), 939

ZHAO B., WEI X., LI W., *et al.* (2007) Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 21(21), 2747-2761

ZHAO B., LI L., LEI Q., GUAN K.-L. (2010a) The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev* 24(9), 862-874

ZHAO B., LI L., TUMANENG K., WANG C.-Y., GUAN K.-L. (2010b) A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF β -TRCP. *Genes Dev* 24(1), 72-85

ZHU M., LEUNG C.Y., SHAHBAZI M.N., ZERNICKA-GOETZ M. (2017) Actomyosin polarisation through PLC-PKC triggers symmetry breaking of the mouse embryo. *Nat Commun* 8(1), 921

ZHU M., CORNWALL-SCOONES J., WANG P., *et al.* (2020) Developmental clock and mechanism of de novo polarization of the mouse embryo. *Science* 370(6522), eabd2703

ÉTAT DES LIEUX DES CONNAISSANCES SUR LES MÉCANISMES AUTOUR DU DÉVELOPPEMENT DE L'EMBRYON DE MAMMIFÈRE ENTRE MORULA ET BLASTULA

AUTEUR : Emma NEST

RÉSUMÉ :

Le développement embryonnaire précoce du mammifère est marqué par la formation de la morula puis de la blastula. Les événements morphogénétiques qui y mènent sont plutôt bien connus chez la souris, beaucoup moins chez le bovin pour la plupart d'entre eux. Or, connaître le développement permet de juger de la qualité embryonnaire toujours plus précisément, et d'améliorer sans cesse les techniques de culture d'embryon et de fécondation *in vitro*, et ainsi faire progresser leur intérêt économique auprès des éleveurs.

Il s'agit dans ce document de fournir un état des lieux des connaissances sur les mécanismes du développement embryonnaire précoce du mammifère. Le processus est d'abord décrit chez la souris avant d'être comparé à celui du bovin, en proposant une vision intégrative qui souligne les liens étroits entre les divers événements qui se produisent. Les aspects cellulaires, moléculaires, métaboliques, et physico-chimiques des étapes du développement embryonnaire de mammifère sont analysés et leurs nombreuses interdépendances révélées, de la morula à la blastula. Les zones d'ombre qui méritent d'être explorées plus longuement sont ensuite mises en évidence pour fournir des pistes quant à la suite des recherches sur le développement embryonnaire du mammifère, en particulier du bovin.

MOTS CLÉS : MORULA, BLASTULA, EMBRYOLOGIE, DEVELOPPEMENT, BOVIN

JURY :

Président : Pr Yves MILLEMANN

Directrice de thèse : Dr Alline DE PAULA REIS

Examineur : Pr Laurent TIRET

CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE ON THE MECHANISMS OF THE MAMMALIAN EMBRYONIC DEVELOPMENT BETWEEN MORULA AND BLASTULA

AUTHOR: Emma NEST

SUMMARY:

Early embryonic development in mammals is characterized by the formation of the morula followed by the blastula. The morphogenetic events leading to these transformations are well-known in mouse, far less in cattle. Though, understanding the embryonic development is a prerequisite for assessing more precisely the embryo quality, and improving continuously *in vitro* fertilization and embryo culture, which could allow farmers to find a better economic interest in these techniques.

This document sums up the current knowledge about the early mammalian embryonic development mechanisms. First the process is detailed in the mouse, then compared to that of cattle, presenting an integrative view that highlights the tight connections between the different events. Cellular, molecular, metabolic, physical, and chemical aspects of embryonic development are analyzed and their strong interdependency is revealed, from morula to blastula. Finally, the remaining grey areas are presented, suggesting directions for further research about bovine embryonic development.

KEYWORDS: MORULA, BLASTULA, EMBRYOLOGY, DEVELOPMENT, BOVINE

JURY:

Chairperson: Pr Yves MILLEMANN

Thesis Director: Dr Aline DE PAULA REIS

Reviewer: Pr Laurent TIRET