

ÉCOLE DOCTORALE 414_ Sciences de la Vie et de la Santé

IGBMC – CRNS UMR 7104 - Inserm U 1258 – Université de Strasbourg

THÈSE présentée par :

Emmanuel GARCÍA SÁNCHEZ

soutenue le : 10 Décembre 2024

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**De l'initiation de la transcription à la
stabilisation de l'ARN messager.**

**Etude du phénotype *Tbpl2*^{-/-} : de l'ovaire à
l'échelle subcellulaire lors de la croissance
ovocytaire chez la souris.**

THÈSE dirigée par :

M. Stéphane D. VINCENT

Chargé de recherche, HDR, INSERM, IGBMC, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. Soazik JAMIN

Chargée de recherche, HDR, INSERM, IRSET, Université de Rennes

M. Laurent DELPY

Directeur de recherche, HDR, CNRS, CBRS, Université de Limoges

PRÉSIDENT DU JURY :

M. Marius TELETIN

Professeur, PU-PH, CECOS, IGBMC, Université de Strasbourg

MEMBRES INVITÉS :

Mme. Fabienne MAUXION

Chargée de recherche, HDR, CNRS, IGBMC, Université de Strasbourg

Mme. Maria ALMONACID

Chargée de recherche, CNRS, CIRB Collège de France, Université de Paris

Remerciements

Cette thèse de doctorat s'est déroulée dans l'équipe de László Tora, sous la direction de Stéphane D.Vincent à l'Institut de Génétique Biologie Moléculaire et Cellulaire (I.G.B.M.C) à Illkirch-Graffenstaden, Strasbourg, France. Merci à Ferenc MUELLER et Bertrand SERAPHIN pour tous les conseils et pour avoir fait partie de mon comité de thèse chaque année.

Certainement, je n'aurais jamais les mots pour exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué à ce projet. Cette thèse de doctorat a été l'opportunité de rencontrer des personnes formidables et passionnées sur des thèmes divers et variés de la biologie. Merci à László Tora, Stéphane D.Vincent, Didier DEVYS, Elisabeth SCHEER, Matthieu STIERLE, Céline ZIEGLER-BIRLING de m'avoir si bien accueilli dans votre laboratoire, de l'opportunité, et de votre partage constant. Merci à Bertrand SERAPHIN, Fabienne MAUXION, Pascal JANSEN, Michiel VERMEULEN et Stéphane VIVILLE pour les collaborations. Un merci spécial à Bertrand SERAPHIN et Fabienne MAUXION pour les discussions, votre soutien, votre disponibilité et aide constante. Merci à Andrea BERNARDINI, Attila ORAVECZ, Gizem CALISKAN, Dylane DETILLEUX, Kenny SCHUMACHER, Pooja MUKHERJEE, Vincent HISLER, Claire RICHARD, Mylène DAMILOT, Emese GAZDAG et Camille SPICHER. Merci pour tous les échanges scientifiques, nos discussions et travail en équipe. Merci à l'IGBMC pour cet environnement de recherche riche et propice à la découverte de soi, des autres et de leur travail. Merci aux plateformes de microscopie photonique et électronique : Bertrand VERNAY, Yves LUTZ, Erwan GRANDGIRARD, Erwan GANDON, Elvire GUIOT, Nadia MESSADEQ, Chadia NAHY. Merci à la plateforme d'histopathologie et embryologie, Bruno WEBER, Olivia WENDLING, Leila EL FERTAK et Patrice GOETZ-REINER. Un grand merci pour votre professionnalisme et votre expertise. Merci à tous les membres de l'animalerie et spécialement à Elisabeth METZGER, Silvie FALCONE, Alexandre VINCENT, William MAGNANT, Michael GENDRON et Sabine. Merci à la plateforme de protéomique, Luc NEGRONI et Bastien MORLET. Un merci spécial à Caroline, Isabelle, Sehrish et Nassim pour votre amitié et votre soutien. Merci aux membres du jury qui liront cette thèse et aux examinateurs.

Stéphane, merci pour l'opportunité d'avoir caractérisé un modèle d'étude passionnant (**figure 1**) : TBPL2 est exprimé dans le noyau de l'ovocyte en croissance (tête de flèche blanches/ chromatine décondensée) et sa déplétion en fin de croissance de l'ovocyte coïncide avec un contexte de chromatine dense (tête de flèche jaune).

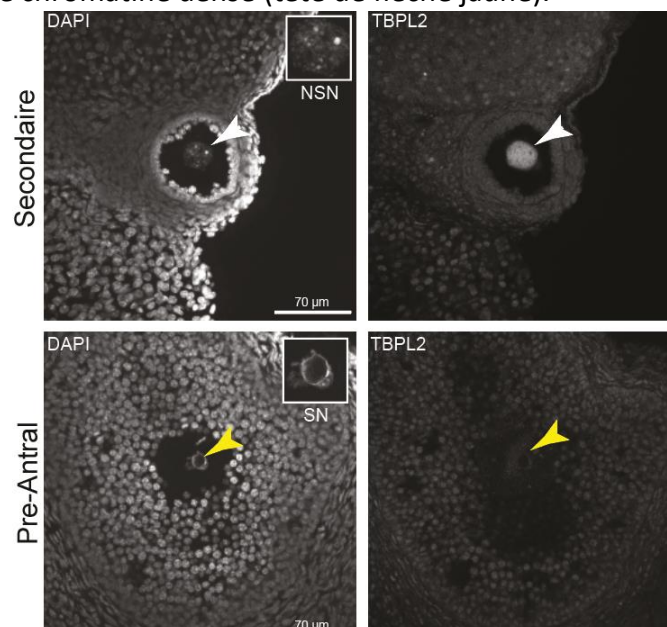


Figure 1 : Immunohistologie ciblant TBPL2 (anticorps 3024 purifié par Elisabeth SCHEER) à deux stades de croissance différents.

En encadré, les états de la chromatine de l'ovocyte : TBPL2 (tête de flèche blanche) n'est plus exprimé dans le noyau d'un ovocyte tardif (tête de flèche jaune) : *Non Surrounded Nucleoli*; SN: *Surrounded Nucleoli*. Barre d'échelle : 70 µm

Merci à ma famille pour m'avoir transmis les valeurs du travail, la constance et la persévérance. Un merci spécial à mes parents, mes oncles/tantes, cousins/cousines, mes grands-parents, *my love* et ma sœur que j'aime, merci pour avoir toujours été là, de m'avoir toujours motivé à aller de l'avant et de m'avoir montré que tout est possible quand on s'en donne les moyens. Merci à mes deux chères amies Inès JMEL BOYER et Jessica MEDINA SANCHEZ et aux membres de la promo de master BDCS. Merci à tous ceux qui ont été à mes côtés durant cette thèse. Enfin, merci à l'école doctorale ED414, à la fondation Recherche Médicale (FRM). Merci à mes professeurs de l'université pour m'avoir transmis la passion pour le monde du vivant, la photographie, la botanique, l'embryogenèse/ biologie du développement et la microscopie. Je pense spécialement à Manuel MARK, Jacky DE MONTIGNY, François GAUER, Silvie FOURNEL, Carine MEIGNIN, Samuel LIEGEOIS, Petra TOTH, Bertrand SERAPHIN, Christelle GALLY, Sophie JARRIAULT, Nicolas MATT, Vincent LECLERC et Stéphane D. VINCENT.

Resumé en anglais

Active transcription initiation depends on multisubunit complexes that assemble and disassemble on core promoter sequences in proximity (50 bp around) of Transcription Start Sites (TSS). These dynamics allow the recruitment and positioning of the mRNA Polymerases. In eukaryotic cells, mRNA polymerase II (RNA Pol II) synthesizes long non-coding RNAs (lncRNAs), small noncoding RNAs and messenger RNAs (mRNAs).

The traditional model of transcription initiation relies on the Pre-Initiation Complex (PIC) formation. PIC is composed of General Transcription Factors (GTFs) and by the RNA Pol II. Structurally and mechanistically, the TFIID complex is the first GTF that binds to the core promoter, therefore nucleating the assembly of the PIC that is essential for RNA Pol II activity and functionality. The TFIID complex is composed by the TATA-Binding Protein (TBP) and 13 TBP-Associated Factors (TAFs) (For reviews, Sainsbury *et al.*, 2015 and Gupta *et al.*, 2016).

In the last 20 years, transcription initiation process has been challenged since the discovery of TBP and TAFs paralogs which open new paradigms in the field. In eukaryotes, TBP has three paralogs that were discovered by high homology in their DNA-binding saddle-like core-domains. The TBP-Related Factor (TRF) is only found in insects. The TBP-Like protein 1 (TBPL1) is present in all metazoans and TBPL2 is restricted to vertebrate organisms (Muller & Tora 2004; Akhtar *et al.*, 2011). While, TBP is ubiquitously expressed, paralogs show non-exclusive and lineage specific patterns (Müller *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2013 eLIFE; Zhou *et al.*, 2013 PNAS; Grive *et al.*, 2016; Müller et Tora, 2009). Particularly, TBPL2 is exclusively expressed during oocyte growth phase (OGP) and *Tbpl2* deficient mice are sterile (Gazdag *et al.*, 2007; Gazdag *et al.*, 2009). In humans, *TBPL2*-null mutation leads to women infertility (He *et al.* 2020; Okutman *et al.* 2024; Y. Wang *et al.* 2021; Yang *et al.* 2021)).

Mammalian oogenesis begins during embryonic life when Primordial Germ Cells (PGCs) colonize the genital ridges, proliferate, enter meiosis and become arrested into the meiotic prophase I (diplotene stage). Females are born with a limited oocyte pool that will support their entire reproductive life (Sánchez and Smits 2012). Just before birth, and regularly during life, selected pools of oocytes will enter a growth phase. At this time oocytes undergo a huge increase of their size characterized by a period of active transcription where transcripts are

directly translated and degraded, or stably stored in a dormant form which constitutes the maternal transcriptome. After growth, oocytes become transcriptionally silent. From this moment, post-transcriptional regulation of the maternal transcriptome will govern during the meiotic maturation and early embryogenesis (Kageyama et al. 2007; Knowland and Graham 1972), pour revue (Tora and Vincent 2021). Poly(A) tail lengthening and shortening are the major mechanisms by which the maternal transcriptome can be stabilized or destabilized. Actually, long poly(A) tail is associated with active translation followed by degradation while, in contrast, short poly(A) tail means storage. Our lab discovered that TBPL2 replaces TBP at the very beginning of folliculogenesis when Oocyte Growth Phase (OGP) just starts. During all OGP, only the paralog TBPL2 is expressed (Gazdag *et al.* 2009). A recent study shows that, in contrast to TBP, TBPL2 does not assemble into a TFIID-like complex (Yu *et al.*, 2020). Nevertheless, TBPL2 interacts strongly with another GTF: TFIIA. TBPL2/TFIIA complex regulates the synthesis of all RNA Pol II-associated transcripts during OGP including those coding for RNA-stability control members such as subunits of the major deadenylase complex CCR4-NOT and those from the decapping complex DCP1a/DCP2 (Yu *et al.*, 2020).

Prior to oocyte meiotic maturation, little is known about mRNA degradation. Nevertheless, in *Tbpl2*^{-/-} mutant growing oocytes, the stabilization of many transcripts is observed when active transcription is blocked. This observation suggests that RNA decay pathways are active during OGP. Moreover, a recent study shows that the 3' UTR uridylation controls turn-over of about 700 mRNAs with very short poly(A) tails and that this mechanism is controlled by the terminal 3' uridylyl transferases, TUT4 and TUT7. Blockage of RNA-degradation during OGP leads to meiotic maturation and early embryogenesis defects (Morgan M *et al.*, 2017). On the other hand, the functionality of EXOSC10, the enzymatic subunit of the exosome, is responsible of 3' to 5' mRNA degradation and essential during the transition from growth to oocyte maturation (Demini et al. 2023; Wu and Dean 2020).

Recent studies suggest that the major localization of mRNA stability control takes place in membrane-less structures associated with the cytoskeleton termed *Cytoplasmic Lattices* (CPLs) (Cheng et al. 2022, Wan et al. 2023). CPLs correspond to dispersed and well organized cytoplasmic and subcortical structures where fine-tune time specific-mRNA dormancy, activation, readenylation and translation occur through development. Especially, events of oocyte maturation, and early embryogenesis have been confirmed to be regulated in this post-

transcriptionally manner and the blockage of these events lead to developmental failure. Here, we bring exclusive evidence showing that mRNA stability control is also important even when the oocyte is still growing, and that these key events are correlating on the cytoplasmic differentiation of the growing oocyte including CPLs-formation which are absent in *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes. Therefore, the project focuses on the characterization of TBPL2 function during folliculogenesis and oocyte growth. Our research shows that mRNA-stability protein subunits are already expressed during oocyte growth and that their expression and localization are altered in the *Tbpl2*^{-/-} mutant. Histological and further subcellular analysis shows cytoplasmic anomalies and expanded nuclear foci where poly(A) accumulates. Electron microscopy highlights the non-differentiation/ structuration of the *Tbpl2*^{-/-} cytoplasm which is characterized by mitochondrial and Golgi stack clustering near to the nucleus. These findings emphasize the critical role of oocyte growth in regulating the maternal transcriptome stability.

Resumé en français

CONTEXTUALISATION

L'initiation de la transcription par l'ARN pol II dépend de la formation du complexe de pré-initiation (PIC) composé de six Facteurs Généraux de la transcription (GTF : *General Transcription Factors*, TFIID-A, B, D, E, F, H). Le complexe TFIID est le premier GTF qui interagit avec le promoteur et initie l'assemblage du PIC. Le complexe TFIID est composé de la protéine TBP (*TATA-Binding Protein*) et de ses 13 facteurs associés (*TAFs*, *TBP-associated Factors*), (pour revue, Sainsbury *et al.*, 2015). Dans les 20 dernières années, le processus d'initiation de la transcription a été revisité. L'identification des paralogues de TBP et de certains TAFs a ouvert la voie à la découverte d'une variabilité dans les complexes protéiques contrôlant l'initiation de la transcription. Chez les vertébrés, deux paralogues de TBP ont été découverts : TBPL1 et TBPL2 (Muller & Tora 2004). Tandis que TBP est exprimé de manière ubiquitaire, l'expression des paralogues est associée à la gamétogenèse (Müller et Tora, 2009). Particulièrement, TBPL2 n'est exprimé que dans l'ovocyte en croissance (Gazdag *et al.*, 2007). Les femelles déficientes pour *Tbpl2* sont stériles dû à l'arrêt de croissance de l'ovocyte entre les stades follicules primaire et secondaire (Gazdag *et al.*, 2009). Chez l'humain, des mutations perte de fonction de TBPL2 sont associées à la stérilité des femmes (He *et al.* 2020; Yang *et al.* 2021, Wang *et al.* 2021, Okutman *et al.* 2024).

FOLLICULOGENESE ET CONTROLE DE LA STABILITE DES TRANSCRITS

Les femelles naissent avec un nombre limité d'ovocytes (pour revue : Sánchez *et al.*, 2012). Régulièrement durant la vie, certains follicules sont sélectionnés pour entrer dans une phase de développement en deux étapes : la croissance ovocytaire et la maturation ovocytaire. La croissance de l'ovocyte coïncide avec une période de transcription intense durant laquelle les transcrits sont accumulés et stockés ce qui établit le transcriptome maternel. Les ARNs stockés se nomment ARNs dormants. Après la croissance, l'ovocyte devient transcriptionnellement inactif. Dès lors, la régulation post-transcriptionnelle du transcriptome maternel est cruciale à la reprise de la méiose et au développement embryonnaire précoce durant lesquels a lieu

un contrôle précis de la stabilité des transcrits et de leur traductibilité (pour revue, Schulz *et al.* 2019). Le raccourcissement et la réadénylation cytoplasmique de la queue poly(A) est le mécanisme majeur par lequel le transcriptome maternel est régulé. Dans le cytoplasme de l'ovocyte, un rallongement de queue poly(A) est associé avec la traduction de l'ARN messager (ARNm), tandis qu'une queue poly(A) raccourcie est associée au stockage et à la dégradation (pour revue, Tora et Vincent 2021).

Au cours de la transcription, les ARNm sont modifiés par l'ajout d'un groupement 7-méthylguanosine (7mG) nommée coiffe en 5' et d'une queue poly(A) en 3'. La coiffe et la queue poly(A) confèrent une protection contre les exonucléases et favorisent la traduction. Notamment, la queue poly(A) est protégée par les PABPs (*PABP : Poly(A)-Binding Proteins*). Le raccourcissement de la queue poly(A) a lieu par l'action des déadénylases comme le complexe CCR4-NOT composé des sous unités CNOT (Yi *et al.*, 2018). L'ARNm peut être soit dégradé soit stocké. Si, après raccourcissement, l'ARNm a une queue poly(A) d'une taille de 40 à 50 nucléotides, l'ARNm est stocké. Sinon, le raccourcissement extrême (taille < 20 A) ne permet plus l'interaction des PABPs et mène à la perte de la coiffe par le complexe de décapping DCP1A/ DCP2 (Ma *et al.* 2013, Mehlmann 2013). L'ARNm est alors dégradé par les exonucléases de type 5'→3'(XRN1/2) ou 3'→5' (exosome) (Demini *et al.* 2023, Wu *et al.*, 2020).

Les ARNs dormants sont stockés dans des structures cytoplasmiques ribonucléoprotéiques associées au cytosquelette. Une protéine essentielle au stockage est la protéine de liaison à l'ARNm : YBX2 (Medvedev *et al.*, 2011). La réadénylation cytoplasmique des ARNs dépend, chez la souris, de la polymérase PAPOLA (Jiang *et al.*, 2021). La remobilisation, par rallongement de la queue poly(A) d'ARNm spécifiques et dormants (Jiang and Fan 2022; Rong *et al.* 2019; Sha *et al.* 2018) contrôle leur traductibilité. L'altération du système de régulation de la stabilité, de la traductibilité et de la dégradation mène au blocage de la maturation de l'ovocyte et à des défauts du redémarrage de la méiose.

PROJET DE RECHERCHE

Notre laboratoire a découvert que TBP est remplacé par son paralogue TBPL2 au cours de la folliculogénèse, au début de la croissance de l'ovocyte (Gazdag *et al.* 2007). TBPL2 ne s'assemble pas dans un complexe de type TFIID mais interagit directement et stablement avec TFIIA (Yu *et al.*, 2020). Le complexe TBPL2/TFIIA régule l'expression des ARNm transcrits par l'ARN Pol II durant la croissance de l'ovocyte. En particulier, l'analyse des transcrits présents dans l'ovocyte avait déjà permis la mise en évidence de nombreux ARNs régulés à la baisse codant pour des sous-unités contrôlant la stabilité de l'ARNm. Ces sous-unités sont présentes dans le complexe majeur de déadénylation CCR4-NOT et le complexe de décapping DCP1A/DCP2 (Yu *et al.*, 2020). Durant la croissance de l'ovocyte, les mécanismes de contrôle de la stabilité et de dégradation du transcriptome maternel sont peu connus. Cependant, la régulation à la hausse d'un grand nombre de transcrits dans les ovocytes *Tbpl2*^{-/-} en croissance suggère que ces mécanismes sont actifs durant la croissance ovocytaire.

Est-ce que l'arrêt de croissance de l'ovocyte est associée à un défaut du contrôle de stabilité des transcrits ?

Mon projet de thèse a pour but d'évaluer l'importance fonctionnelle du contrôle de la stabilité des transcrits dans l'ovocyte en croissance suivant quatre objectifs :

- I. Etude de l'implication du cytosquelette et de la distribution des organelles pour la croissance ovocytaire
- II. Analyse temporelle de la folliculogénèse et étude du devenir des ovocytes *Tbpl2*^{-/-}
- III. Evaluation de l'expression de sous unités protéiques impliquées dans la stabilité et la traductibilité des ARNm
- IV. Etude de la transcription naissante, de localisation subcellulaire d'ARNm et analyse de la longueur des queues poly(A)

I. Etude de l'implication du cytosquelette et de la distribution des organelles pour la croissance ovocytaire

En lien avec le blocage de croissance des ovocytes *Tbpl2*^{-/-}, j'ai étudié trois temps différents de la folliculogenèse (stades follicule primordial, primaire et secondaire). Les ovocytes contrôles au stade follicule primordial et primaire présentent des accumulations cytoplasmiques de l'appareil de Golgi, de mitochondries et du filament intermédiaire desmine. Au stade follicule secondaire, suivant le cours de la croissance, les organelles et le cytosquelette se structurent en se distribuant, progressivement, en foci dans le cytoplasme. En contraste, l'accumulation cytoplasmique persiste dans les cytoplasmes des ovocytes *Tbpl2*^{-/-} ce qui est en faveur d'une absence de structuration subcellulaire et suggère une absence développement.

II. Analyse temporelle de la folliculogenèse et étude du devenir des ovocytes *Tbpl2*^{-/-}

L'étude histologique à quatre temps différents (14 jours après la naissance, 6 semaines, 8 semaines, 32 semaines) confirme que la réduction en taille des ovaires *Tbpl2*^{-/-} est la conséquence d'un arrêt du développement folliculaire. Le détachement de l'ovocyte de ces cellules folliculaires voisines et de la perte de cohésion du follicule a lieu dans la transition follicule primaire vers secondaire (types 3b→4, Pedersen et al., 1968). Durant cette transition, les défauts cytoplasmiques sont bien visibles et s'accompagnent de défauts dans le noyau. Dans les ovocytes *Tbpl2*^{-/-}, les noyaux sont plus grands et la chromatine est décondensée. Suivant les vagues de folliculogenèse, les ovocytes *Tbpl2*^{-/-} bloqués en croissance finissent par dégénérer progressivement comme le prouvent les nombreux follicules sans ovocytes, la fragmentation de la chromatine et l'apparition de vésicules cytoplasmiques. De même, l'étude ultra-structurale par microscopie électronique, des ovocytes contrôles et mutants *Tbpl2*^{-/-} a démontré qu'il n'y a pas de différences de distribution des organelles au stade follicule primordial. Cependant, dès l'engagement en croissance, l'organisation cytoplasmique des ovocytes *Tbpl2*^{-/-} est impactée et présente des hétérogénéités : des corps multivésiculaires, des amas de mitochondries et de l'appareil de Golgi « agglutiné » qui pourraient être associés avec des altérations du contrôle de la stabilité des transcrits.

III. Evaluation de l'expression de sous unités protéiques impliquées dans la stabilité et la traductibilité des ARNm

En collaboration avec le laboratoire de Bertrand Séraphin (IGBMC), j'ai évalué les profils d'expression de différentes protéines associées au contrôle de la stabilité de l'ARNm. J'ai confirmé que dans les ovocytes contrôles, au stade follicule secondaire, DCP1A, DCP2 sont présents dans des foci distribués dans tout le cytoplasme. De plus, le profil d'expression de la PABPC1 est homogène dans le cytoplasme. En contraste, dans le mutant *Tbpl2*^{-/-}, DCP1A et DCP2 se rassemblent à proximité du noyau. D'autre part, les niveaux et profils d'expression de PABPC1, YBX2 et PAPOLA diffèrent dans l'ovocyte mutant (respectivement régulé à la hausse, agrégé et réorganisé). Ensemble, ces résultats suggèrent que les acteurs protéiques associés au contrôle de la stabilisation de l'ARNm et de sa dégradation sont déjà présents dans l'ovocyte en croissance mais que leurs profils d'expression sont altérés dans les ovocytes mutants ce qui peut expliquer la régulation à la hausse des nombreux transcrits chez le mutant.

IV. Etude de la transcription naissante, de localisation subcellulaire d'ARNm et analyse de la longueur des queues poly(A)

Afin de comprendre si les défauts cytoplasmiques et nucléaires pouvaient mener à la dérégulation du contrôle de la transcription et de la stabilité de l'ARNm, j'ai évalué l'état de transcription des ovocytes en croissance, puis étudié la distribution subcellulaire des ARNm poly-adénylés et de transcrits spécifiques régulés à la hausse dans le mutant comparé au contrôle. Les ovocytes en croissance *Tbpl2*^{-/-} incorporent des niveaux fluctuants d'Ethynyl Uridine (EU), un analogue d'uridine, ce qui est surprenant compte tenu du rôle de TBPL2 dans l'initiation de la transcription. La détection de plusieurs candidats ARNm régulés à la hausse chez le mutant par smiFISH ne permet pas de visualiser d'accumulation cytoplasmique ni nucléaire. D'autre part, les études préliminaires de la taille des queues poly(A) n'a pas permis de mettre en évidence des changements de longueur de queue poly(A) ce qui est très probablement dû à l'expression faible des candidats régulés à la hausse chez le mutant. En revanche, j'ai montré que les ovocytes en croissance WT, du primaire et secondaire présentent un signal poly(A) cytoplasmique homogène et une détection nucléaire en foci. Le

signal poly(A), au stade follicule primaire, est équivalent dans l'ovocyte mutant. En revanche, au stade follicule secondaire, la détection du signal cytoplasmique est plus élevée et le noyau présente de grandes accumulations en foci.

Ensemble, même si certains des derniers résultats restent inexpliqués, ces données suggèrent que la régulation à la hausse des nombreux transcrits chez le mutant est la conséquence de l'altération du système de contrôle de stabilité de l'ARNm durant la croissance ovocytaire.

Publications :

- Le développement embryonnaire pré-gastrulatoire humain : modèles d'avenir et enjeux sociétaux
Paris_Biologie Aujourd'hui 214 (3-4), 109-113 (2020)
© Société de Biologie, 2020
<https://doi.org/10.1051/jbio/2020012>
Inès Jmel Boyer et Emmanuel García Sánchez.
- Extensive NEUROG3 occupancy in the human pancreatic endocrine gene regulatory network
Molecular Metabolism Nov:53:101313 Epub 2021 Aug 3
<https://doi.org/10.1101/2021.04.14.439685>
Valérie Schreiber, Reuben Mercier, Sara Jiménez, Tao Ye, Emmanuel GarcíaSánchez,
Annabelle Klein, Aline Meunier,
Sabitri Ghimire, Catherine Birck, Bernard Jost, KristianHonnens deLichtenberg, Christ
ian Honoré, Palle Serup, Gérard Gradwohl.
- RNA polymerase II transcription in holo TFIID depleted mouse embryonic stem cells
Cell reports Volume 43, Issue 10, 22 October 2024
- <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114791>
Vincent Hisler, Paul Bardot, Dylane Detilleux, Andrea Bernardini,
Matthieu Stierle, EmmanuelGarcia Sanchez, Claire Richard, LyndaHadj Arab,
Cynthia Ehrhard, Bastien Morlet, Yavor Hadzhiev, Matthieu Jung, Stéphanie LeGras, L
uc Négroni, Ferenc Müller, László Tora, Stéphane D. Vincent.

En cours de préparation :

During oocyte growth TBPL2-mediated RNA polymerase II transcription initiation is required for RNA stability and for cellular organization

Emmanuel García Sánchez, Dylane Détilleux, Claire Richard, Céline Ziegler-Birling,

Nadia Messaddeq, Fabienne Mauxion, Bertrand Séraphin, Laszlo Tora, Stéphane D.

Vincent.

Gazdag, E., Rajkovic, A., Torres-Padilla, M.E., and Tora, L. (2007). Analysis of TATA-binding protein 2 (TBP2) and TBP expression suggests different roles for the two proteins in regulation of gene expression during oogenesis and early mouse development. *Reproduction* 134, 51–62.

Gazdag, E., Santenard, A., Ziegler-Birling, C., Altobelli, G., Poch, O., Tora, L., and Torres-Padilla, M.-E. (2009). TBP2 is essential for germ cell development by regulating transcription and chromatin condensation in the oocyte. *Genes & Development* 23, 2210–2223.

He, Wen-Bin, et al. “A Recurrent Mutation in TBPL2 Causes Diminished Ovarian Reserve and Female Infertility.” *Journal of Genetics and Genomics*, vol. 47, no. 12, Dec. 2020, pp. 785–88.

Herzog, Veronika A., et al. « Thiol-Linked Alkylation of RNA to Assess Expression Dynamics ». *Nature Methods*, vol. 14, n° 12, décembre 2017, p. 1198-204.

Jiang, J.-C., Zhang, H., Cao, L.-R., Dai, X.-X., Zhao, L.-W., Liu, H.-B., and Fan, H.-Y. (2021). Oocyte meiosis-coupled poly(A) polymerase α phosphorylation and activation trigger maternal mRNA translation in mice. *Nucleic Acids Research* 49, 5867–5880.

Jiang, Z.-Y., and Fan, H.-Y. (2022). Five questions toward mRNA degradation in oocytes and preimplantation embryos: when, who, to whom, how, and why? *Biology of Reproduction* 107, 62–75.

Ma, J., Flemr, M., Strnad, H., Svoboda, P., and Schultz, R.M. (2013). Maternally Recruited DCP1A and DCP2 Contribute to Messenger RNA Degradation During Oocyte Maturation and Genome Activation in Mouse1. *Biology of Reproduction* 88.

Medvedev, S., Pan, H., and Schultz, R.M. (2011). Absence of MSY2 in Mouse Oocytes Perturbs Oocyte Growth and Maturation, RNA Stability, and the Transcriptome. *Biology of Reproduction* 85, 575–583.

Mehlmann, L.M. (2013). Losing Mom’s Message: Requirement for DCP1A and DCP2 in the Degradation of Maternal Transcripts During Oocyte Maturation1. *Biology of Reproduction* 88.

Morgan M, Much C, DiGiacomo M, Azzi C, Ivanova I, Vitsios DM, et al. (2017) mRNA 3’ uridylation and poly(A) tail length sculpt the mammalian maternal transcriptome. *Nature*. 548, 347–351.

Müller, F., and Tora, L. (2009). TBP2 is a general transcription factor specialized for female germ cells. *J Biol* 8, 97.

Okutman, Ö., Gürbüz, A.S., Salvarci, A., Büyüç, U., Ruso, H., Gürkan, T., Tarabeux, J., Leuvre, A.-S., Nourisson, E., Lang, C., et al. (2024). Evaluation of an Updated Gene Panel as a Diagnostic Tool for Both Male and Female Infertility. *Reprod. Sci.* 31, 2309–2317.

Sainsbury, S., Bernecky, C., and Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 129–143.

Pedersen, T., and Peters, H. (1968). PROPOSAL FOR A CLASSIFICATION OF OOCYTES AND FOLLICLES IN THE MOUSE OVARY. *Reproduction* 17, 555–557.

Pepling, M.E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis* 44, 622–632.

Rong, Y., Ji, S.-Y., Zhu, Y.-Z., Wu, Y.-W., Shen, L., and Fan, H.-Y. (2019). ZAR1 and ZAR2 are required for oocyte meiotic maturation by regulating the maternal transcriptome and mRNA translational activation. *Nucleic Acids Research* 47, 11387–11402.

Sánchez, F., and Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822, 1896–1912.

Sha, Q., Yu, J., Guo, J., Dai, X., Jiang, J., Zhang, Y., Yu, C., Ji, S., Jiang, Y., Zhang, S., et al. (2018). CNOT 6L couples the selective degradation of maternal transcripts to meiotic cell cycle progression in mouse oocyte. *The EMBO Journal* 37, e99333.

Schulz, K.N., and Harrison, M.M. (2019). Mechanisms regulating zygotic genome activation. *Nat Rev Genet* 20, 221–234.

Tora, L., and Vincent, S.D. (2021). What defines the maternal transcriptome? *Biochemical Society Transactions* 49, 2051–2062.

Wang, Yu, et al. « A Homozygous Missense Mutation in TBPL2 Is Associated with Oocyte Maturation Arrest and Degeneration ». *Clinical Genetics*, mai 2021, p. cge.13993.

Wu, Di, and Jurrien Dean. “EXOSC10 Sculpts the Transcriptome during the Growth to-Maturation Transition in Mouse Oocytes.” *Nucleic Acids Research*, vol. 48, no. 10, June 2020, pp. 5349–65.

Yang, Ping, et al. “A Homozygous Variant in TBPL2 Was Identified in Women with Oocyte Maturation Defects and Infertility.” *Human Reproduction*, Apr. 2021, p. deab094.

Yi, H., Park, J., Ha, M., Lim, J., Chang, H., and Kim, V.N. (2018). PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay. *Molecular Cell* 70, 1081-1088.e5.

Yu, C., Cveticic, N., Hisler, V., Gupta, K., Ye, T., Gazdag, E., Negroni, L., Hajkova, P., Berger, I., Lenhard, B., et al. (2020). TBPL2/TFIIA complex establishes the maternal transcriptome through oocyte-specific promoter usage. *Nat Commun* 11, 6439..

Communications scientifiques:

- Présentation longue (25 min) « *Tbpl2*^{-/-} growing oocytes progressive subcellular disruption impacts mRNA-stability »/ Conférence inter-équipes Timmers et Tora à Zentrale Klinische Forschung, Freiburg, Allemagne.
- Poster et présentation courte « TBPL2-mediated transcription controls global mRNA stability during oocyte growth »/ Conférence Paris-Munich Epigenetics Workshop & Symposium, 14 au 16 juin 2023 à l’institut Max Planck de Biochimie à Martinsried,

Munich en Allemagne + présentation workshop en présence de Kikuë Tachibana directrice de l'institut.

- Poster et présentation courte « TBPL2-mediated transcription controls global mRNA stability during oocyte growth »/ Conférence internationale « RNA meets protein decay » du 23 au 26 Mai 2023, dans la salle des conférences de l'hôtel « Croatia » à Cavtat.
- Poster au centenaire de la Société de Biologie de Strasbourg (SBS): « Histoire de la biologie de développement et ses perspectives d'avenir. », école doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé.

Table des matières

Remerciements	2
Resumé en anglais	4
Resumé en français.....	7
Table des matières	15
Liste des abréviations	20
Liste des tableaux	29
Liste des figures	30
Liste des annexes.....	33
Introduction	34
Chapitre 1 La lignée germinale, détermination du sexe, ovogenèse et identité de l’ovocyte .	35
Lignée germinale et détermination du sexe.....	35
1.1 Caractéristiques et migration des cellules primordiales germinales (<i>PGCs</i>)	35
1.2 Description de la gonade bipotente	37
1.2.1 Contrôle génétique XY	37
1.2.2 Contrôle génétique XX.....	38
1.3. Ovogenèse	39
1.3.1 Cystes et contrôle méiotique	39
1.3.1.1 Formation des cystes	39
1.3.1.2 Apport des cystes à l’ovocyte.....	40
1.3.1.3 Entrée et blocage méiotique de l’ovocyte	41
1.3.1.4 Reprise méiotique.....	43
1.3.2 Folliculogenèse.....	43
1.3.2.1 Du follicule primordial à l’ovulation.....	43
1.3.2.2 Les deux vagues de folliculogenèse	46
1.3.2.2a Première vague de folliculogenèse	47
1.3.2.2b Deuxième vague de folliculogenèse.....	47
1.3.3 Croissance et identité de l’ovocyte.....	48
1.3.3.1 Croissance de l’ovocyte et zone pellucide	48
1.3.3.2 Activation de la croissance de l’ovocyte.....	51
1.3.3.3 Facteurs d’identité de l’ovocyte	53
	15

1.3.3.4 Structuration cytoplasmique de l'ovocyte	55
1.4 Variations de l'état chromatinien et transcriptionnel	59
1.4.1 Variations de l'état de compaction de la chromatine	60
1.4.2 Variations de l'activité de transcription	62
1.4.3 Modifications post-traductionnelles des histones et autres hypothèses de l'arrêt de la transcription.....	63
1.4.4 Méthylation de l'ADN	63
Chapitre 2 Régulation de la chromatine et Transcription.....	66
2. Ouverture de la chromatine et stabilisation du Complexe de Pré-Initiation (PIC)	66
2.1 Facteur pionnier.....	66
2.2 Remodeleur de la chromatine.....	67
2.3 Nucléosomes, modificateurs d'histones et transcription	69
2.3.1 Code histone et découverte de la première enzyme histone acétyl transférase (HAT)	71
2.3.2 SAGA, un complexe modificateur d'histones à plusieurs facettes	71
2.3.2.1 Découverte de SAGA.....	71
2.3.2.2 Composition et caractéristiques fonctionnelles.....	71
2.4 Polymérases d'ARN	74
2.4.1 ARN Polymérases (ARN Pols) nucléaires : composition et fonction.....	74
2.4.2 Focus sur l'ARN Pol II et ses Facteurs Généraux de la transcription (GTFs)	75
2.5 Transcription ARN Pol II.....	76
2.5.1 Promoteur basal et initiation de la transcription.....	76
2.5.1.1 Etat de pause de l'ARN Pol II	77
2.5.1.2 Levée de l'état de pause et élongation	78
2.5.1.3 Epissage de l'ARNm.....	79
2.5.1.4 Terminaison de la transcription.....	80
2.5.2 Facteurs Généraux de la Transcription.....	80
2.5.2.1 TFIID, composition et structuration.....	81
2.5.2.2 TFIIA.....	82
2.5.2.3 TFIIB	83
2.5.2.4 TFIIF et l'ARN Pol II.....	83
2.5.2.5 TFIIE	84
2.5.2.6 TFIIH.....	84

2.6 Variabilité de l'initiation de la transcription	84
2.6.1 Phénotypes suggérant une variabilité de TFIID lors du développement.....	84
2.6.2 Paralogues	85
2.6.2.1 Paralogues des TAFs et incorporation dans TFIID	86
2.6.2.1a Fonction de TAF4B dans la différenciation cellulaire	88
2.6.1.2 Paralogues de TBP	89
2.6.1.2a TBPL1 chez le poisson zèbre	90
2.6.1.2b TBPL1 chez le xénope	90
2.6.1.2c TBPL1 chez la souris.....	90
2.6.1.2d TBPL2 chez le poisson zèbre	92
2.6.1.2e TBPL2 chez le xénope.....	92
2.6.1.2f TBPL2 chez la souris	92
Chapitre 3 Stabilité et dégradation du transcriptome	96
3.1 Régulation co-transcriptionnelle de la stabilité de l'ARNm	97
3.1.1 La coiffe	97
3.1.2 La queue poly(A)	97
3.1.3 Poly(A) Binding Proteins (PABPs).....	97
3.2 Stabilisation à long terme et traductibilité de l'ARNm dans l'ovocyte	98
3.2.1 Modification de la longueur de la poly(A) et impact sur la stabilité de l'ARNm ...	99
3.2.1.1 Rallongement de la queue poly(A), export nucléaire et dégradation	99
3.2.1.2 Raccourcissement de la queue poly(A), déstabilisation et dégradation	100
3.2.1.3 Le complexe CCR4-NOT et adressage à dégradation de l'ARNm.....	102
3.2.2 CPEB : traduire ou pas traduire ?.....	103
3.2.3 Code combinatoire PAS et CPE dépendant	105
3.2.4 PUMILIO et traductibilité	106
3.2.5 DAZL et traductibilité.....	107
3.2.6 MUSASHI et traductibilité.....	107
3.3 De la stabilité du transcriptome maternel à sa dégradation.....	108
3.3.1 YBX2 : de la stabilité à l'instabilité du transcriptome maternel	108
3.3.2 Régulateurs de la dégradation du transcriptome maternel	109
3.3.2.1 CNOT6L et ZFP36L2	110
3.3.2.2 CNOT7/8 et BTG4.....	111
3.3.2.3 TUT, l'exosome et la PABPN1.....	112

3.3.2.4 YTHDF2.....	115
3.3.2.5 Le complexe de decapping DCP1A DCP2	116
3.3.2.6 ZAR.....	117
Objectifs du projet de recherche.....	124
Matériel et Méthodes.....	126
1. Lignées murines	126
2. Géotypage.....	126
3. Collecte d'ovocytes en croissance : jours 5, 7 et 14 après la naissance (PN5, PN7, PN14)	128
4. Immunofluorescence : ovocytes en croissance, zygotes et embryons 2 cellules	128
5. Immunohistofluorescence	134
6. smiFISH adapté pour cellules non adhérentes	135
7. Oligod(T) <i>FISH</i>	145
8. Incorporation métabolique d'éthynyl uridine (EU) adaptée pour cellules non adhérentes	146
9. Incorporation métabolique de L-Homopropargylglycine (L-HPG) adaptée pour cellules non adhérentes.....	147
10. Microscopie confocale	147
11. Microscopie électronique	147
12. Microscopie épiscopique à haute résolution (HREM)	148
13. Extraction d'ARN (adaptation pour ovocytes en croissance)	148
14. Synthèse de l'ADN complémentaire (cDNA).....	148
15. qPCR	149
16. ePAT (<i>extended Poly(A) Tail assay</i>) (adapté pour ovocytes en croissance).....	150
17. HA-PAT (<i>Hairpin Adaptor Poly(A) Tail assay</i>) (adapté pour ovocytes en croissance) 150	
18. Spectrométrie de masse	152
19. Culture cellulaire de 293T/HEK, transfection et immunofluorescence	153
Résultats	154
Résultats non publiés.....	193
I. Analyse de la longueur de la queue poly(A) en approche transcrit spécifique.....	193
I.a) ePAT, extended Poly(A) Tail assay.....	193
I.b) HA-PAT, Hairpin Adaptor Poly(A) Tail assay	197
II. Analyse de la localisation subcellulaire d'ARNm spécifiques.....	203

LISTE DES CONTENUS

III. Analyses préliminaires de l'activation en croissance, caractérisation du phénotype nucléaire et analyse de la transcription naissante	209
IV. Est-ce que les TAFs ont un rôle lors de la croissance de l'ovocyte ?	214
IV.a) Etudes des profils d'expression des TAFs	214
IV.b) Délétions conditionnelles pendant la croissance de l'ovocyte.....	216
V. Autres mises et points et résultats	217
V.a) Etude préliminaire du protéome	217
V.b) Validation d'anticorps ciblant TBPL2 humain	219
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	221
I. Le blocage de la folliculogenèse : une absence ou un retard d'activation de la croissance de l'ovocyte ?	221
II. Perte de cohésion des follicules : un effet cellulaire autonome ?	223
III. Comment expliquer le phénotype nucléaire ?	226
IV. Comment expliquer le signal de transcription en absence de TBPL2 ?.....	228
Conclusion.....	229
Références bibliographiques	230
ANNEXES	289
Publications	291

Liste des abréviations

A

ADN: Acide désoxyribonucléique

APA: *Alternative PolyAdenylation*

APC: *Anaphase-Promoting Factor*, facteur de progression en anaphase

ARE: *AU-Rich Element*

ARN: Acide ribonucléique

ART: *Assisted Reproductive Technology*

B

BB: *Balbani-body*

BRD: Bromodomaine

BTG4: *BTG anti-proliferation factor 4*

C

cAMP: Adénosine monophosphate cyclique

CCR4–NOT: *carbon catabolite repression 4 (CCR4)–negative on TATA-less (NOT) deadenylase complex*

CDK: *Cyclin-dependent kinase*, Kinase dépendante de cycline

cDNA: ADN complémentaire

CHD: Chromodomaine

CPE: *Cytoplasmic Polyadenylation Element, element de polyadénylation cytoplasmique*

CPEB: *Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein*

CPSF: *Cleavage and Polyadenylation Specificity factor*

CSF: *Cytostatic factor*, Facteur cytostatique

C-ter: extrémité carboxy terminale

D

DAZL: *Deleted in azoospermia-like*

DBE: *DAZL Binding Element*

DCE: *Downstream Core Element.*

DDX-4: *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4*

DH: Domaine Hélicase

DIOLs: *Directly Induced Oocyte Like cells*

DNMT: *DNA Methyl Transferase*

dNTPs: désoxyribonucléotides

DPE: *Downstream core Promoter Element*

DSIF: *5,6-Dichloro-1-β-d-Ribofuranosylbenzimidazole*

E

EGI: Ebauche Gonadique Indifférenciée

eIF4E: *eukaryotic translation initiation factor 4E*

EMI2: *Endogenous Meiotic Inhibitor 2*

ePAB: *embryonic Poly(A)-Binding Protein*

ePAT: *extended Poly(A) Tail Assay*

EPB: Element de promoteur basal

EU: Ethynyl Uridine

F

FRGY2: *FRoG Y-box 2*

FRM: Fondation Recherche Médicale

FSH: Follicle Stimulating *hormone*, hormone folliculostimulante

G

GMPc: Guanosine monophosphate cyclique

GO: *Gene Ontology*

GTF: *General Transcription Factor*, facteur général de la transcription

GV: *Germinal Vesicle*, Vésicule germinale, fait initialement référence au noyau de l'ovocyte et par extension à l'ovocyte en croissance ou en fin de croissance

GVBD: *Germinal Vesicle Break Down*

H

HA-PAT: *Hairpin Adaptor Poly(A) Tail assay*

HAT: Acétylase d'histones

HDAC: Désacétylase d'histones

HFD: *Histone Fold Domain*

HFD: Histone Fold Domain, Domaine Histone Fold

hiPSC: *human induced Pluripotent Stem Cell*

HPG: L-Homopropargylglycine

IDR: *Intrinsically Disordered Region*

I

IF: Immunofluorescence

Inr: *Initiator*

J

jpc: *jour post coïtum*

K

KL: *Kit ligand*, Ligand kit

L

LH: *Luteinizing hormone*, hormone lutéinisante

lncRNA: *long non coding RNA*, long ARN non codant

M

m⁵C: 5-méthylcytosine

m⁷G: 7-méthylguanosine, 7mG

m⁶A: N6-méthyladénosine

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MARDO: *Mitochondrial-Associated RiboNucleo protein DObain*

MBE: *Musashi Binding Element*

mESC: *mouse Embryonic Stem Cells*

miRNA: micro RNA : micro ARN

MPF: *Maturation Promoting Factor*, facteur de promotion de la mitose

MTE: *Motif Ten Element*

mTOR: *mammalian Target Of Rapamycin*

MTREX: *Mtr4 Exosome RNA Helicase*

MZT: *Materno-to Zygotic Transition*

N

NELF: *Negative Elongation Factor*

Nobox: *Newborn Ovary Homeobox Gene*

NPAD: *Nuclear Poly(A) Domain*

NSN: *Non Surrounded Nucleoli*

N-ter: extrémité amino terminale

P

PN5: 5^{ième} jour après la naissance

PN7: 7^{ième} jour après la naissance

PN14: 14^{ième} jour après la naissance

PABP: *Poly(A) Binding Protein*

PADI6: *PeptidylArginine Deliminase 6*

PAP: *Poly(A) Polymerase*

PARN: Poly(A) RiboNuclease, ribonuclease de poly(A)

PAS: *Poly Adenylation Sequence, séquence de polyadénylation*

PAXT: *Poly(A) tail eXosome Targeting connexion*

PBE: *PUMILIO Binding Element*

P-body: *Processing body*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PGC: *Primordial Germ Cells*, Cellules Germinales Primordiales

PHD: *Plant Homeo Domain*

POI: *Premature Ovarian Failure*, insuffisance ovarienne prématurée

poly(A): polyadénine

PPRE: *PPAR γ Response Element*

R

RAR: Récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque

RNAseq: Séquençage d'ARNs

RNP: RiboNucléoprotéine

RRM: *RNA Recognition Motif*, motif de reconnaissance de l'ARN

rRNA: *ribosomal RNA*, ARN ribosomique

RXR: *Rexinoids receptor*EPB

S

SCA: *SubCortical Aggregate*

SCMC: *SubCortical Maternal Complex*

smiFISH: *single molecule inexpensive Fluorescent In Situ Hybridization*

SN: *Surrounded Nucleoli*

snRNA: *small non coding RNA*, petit ARN non codant

SRY: *Sex-determining region Y*

SU: *Sous-Unité*

T

TBPL1: *TATA-Binding Protein-like 1*

TBPL2: *TATA-Binding Protein-like 2*

TET: *Ten-Eleven Translocation*

TF: *Transcription Factor*, Facteur de transcription

TFTC: *TATA-binding protein-Free TAF_{II} Complex*

TLF: *TBP-like Factor*

TRF: *TATA-Related Factor*

tRNA: *transfer RNA*, ARN de transfert

TSS: *Transcription Start Site*, site d'initiation de la transcription

TZP: *TransZonal Projection*

X

XCPE: *X-gene Core Promoter Element 1*

Y

YBX2: *Y-BoX Protein 2*, MSY2

Z

ZAR: *Zygotic ARrest 1*

ZFP: *Zinc Finger Protein*

ZGA: *Zygotic Genome Activation*, Activation du Génome Zygotique

ZP: Zone Pellucide

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : PARALOGUES DES TAFs ET DE TBP	94
TABLEAU 2 : PRINCIPALES SOUS UNITES DU CONTROLE DE LA STABILITE DU TRANSCRIPTOME MATERNEL, ADAPTE DE (Y. JIANG ET AL. 2023).	120
TABLEAU 3 : MIX POUR GENOTYPAGE.....	127
TABLEAU 4 : PROGRAMME POUR PCR GENOMIQUE.....	127
TABLEAU 5 : TABLE DES ANTICORPS UTILISES EN IMMUNOFLUORESCENCE	129
TABLEAU 6 : PRODUITS NECESSAIRES POUR LE SMIFISH	135
TABLEAU 7 : ETAPE D'ANNEALING SMIFISH	136
TABLEAU 8 : COMPOSITION DES MIX 1 ET MIX 2 POUR SMIFISH	137
TABLEAU 9 : LISTE DES SONDAS PRIMAIRES SMIFISH	138
TABLEAU 10 : TABLE DES PRIMERS.....	142
TABLEAU 11 : PROGRAMME QPCR.....	149
TABLEAU 12 : ETAPES HA-PAT	151
TABLEAU 13 : EXPRESSION RNASEQ DES ARNm TESTES EN EPAT	197
TABLEAU 14 : EXPRESSION RNASEQ DES ARNm TESTES EN HA-PAT	200
TABLEAU 15 : EXPRESSION RNASEQ DES ARNm TESTES EN SMIFISH	205

Liste des figures

FIGURE 1 : IMMUNOHISTOLOGIE CIBLANT TBPL2 (ANTICORPS 3024 PURIFIE PAR ELISABETH SCHEER) A DEUX STADES DE CROISSANCE DIFFERENTS.	3
FIGURE 2 : ORIGINE, SPECIFICATION ET MIGRATION DES CELLULES GERMINALES PRIMORDIALES (PGCs). (SAITOU, KAGIWADA, AND KURIMOTO 2011).	36
FIGURE 3 : PRINCIPAUX ACTEURS CONTROLANT LA DIFFERENTIATION DES GONADES MALE ET FEMELLE A PARTIR D'UNE GONADE BIPOTENTE INDIFFERENCIEE. (GRINSPON AND REY 2019)	38
FIGURE 4 : RUPTURE, DEGENERATION DES CYSTES ET FORMATION DES PREMIERS OVOCYTES EN PERIODE PERINATALE. (ADAPTE DE SPRADLING ET AL. 2022).	40
FIGURE 5 : LA POPULATION INITIALE DE CELLULES GERMINALES DECLINE RAPIDEMENT. (SPRADLING ET AL. 2022).	41
FIGURE 6 : BLOCAGE MEIOTIQUE PAR L'INTERACTION DES CELLULES FOLLICULAIRES ET L'OVOCYTE DE PREMIER ORDRE.	42
FIGURE 7 : CLASSIFICATION DES FOLLICULES PAR PEDERSEN AND PETERS 1968	45
FIGURE 8 : LA FOLLICULOGENESE SOUS LE CONTROLE PARTIEL DES HORMONES. (LEE ET AL. 2021).	46
FIGURE 9 : LES DEUX VAGUES DE LA FOLLICULOGENESE	47
FIGURE 10 : CROISSANCE OVOCYTAIRE CHEZ LES VERTEBRES, COMPARATIF ENTRE LE XENOPE, LA SOURIS ET L'HUMAIN. (ADAPTE DE BAHETY, BÖKE, AND RODRIGUEZ-NUENO 2024).	50
FIGURE 11 : LA VOIE DE SIGNALISATION PI3K/ AKT CONTROLE LA SURVENUE DE LA CROISSANCE OVOCYTAIRE. (ADAPTE DE JOHN ET AL. 2008).	52
FIGURE 12 : FACTEURS IMPLIQUES DANS LA PROGRESSION DE L'OVOGENESE. (ADAPTE DE JAGARLAMUDI ET AL. 2010).	54
FIGURE 13 : STRUCTURATION DE L'APPAREIL DE GOLGI LORS DE LA CROISSANCE DE L'OVOCYTE	56
FIGURE 14 : STRUCTURATION DU CYTOSQUELETTE LORS DE LA CROISSANCE OVOCYTAIRE. (MODIFIE DE SATHANANTHAN 2013).	57
FIGURE 15 : STRUCTURE PERIODIQUE DES LATTICES	58
FIGURE 16 : CHANGEMENTS DE LA CONFIGURATION DE LA CHROMATINE DE <i>NON SURROUNDED NUCLEOLI</i> (NSN) A <i>SURROUNDED NUCLEOLI</i> (SN) LORS DE LA CROISSANCE OVOCYTAIRE.....	61
FIGURE 17 : VARIATIONS DE L'ACTIVITE DE TRANSCRIPTION ; DE LA FOLLICULOGENESE AU DEBUT DE LA VIE EMBRYONNAIRE CHEZ LA SOURIS. (ADAPTE DE ZUCCOTTI ET AL. 2012).	62
FIGURE 18 : VAGUES DE METHYLATION/ DEMETHYLATION DES OVOCYTES. (ADAPTE DE CLER ET AL. 2009).	64
FIGURE 19 : CARACTERISTIQUES DES SOUS-UNITES CATALYTIQUES ATP-DEPENDANTES DES QUATRES CLASSES DE REMODELEURS. (BRACKEN ET AL.2019.)	68
FIGURE 20: CODE HISTONE ET SES PRINCIPALES FONCTIONS CELLULAIRES ASSOCIEES. (LIU ET AL. 2023).	70
FIGURE 21 : SOUS-FONCTIONNALISATION DES SOUS-UNITES DES MODIFICATEURS D'HISTONES. (HELMLINGER, TORA 2017).	73
FIGURE 22 : CONSERVATION DES SOUS UNITES ENTRE LESS ARN POLS I II ET III. (ABEL ET AL. 2018).	75
FIGURE 23 : ELEMENTS DE PROMOTEUR BASAL. (JUVEN-GERSHON ET KADONAGA, 2010).	76
FIGURE 24 : ETAPES DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION (ADAPTE DE GIRBIG ET AL. 2022).	77

LISTE DES CONTENUS

FIGURE 25 : PAUSING, COMPLEXE ENGAGE ET D'ÉLONGATION (ADAPTE DE LEVINE ET AL. 2011).	79
FIGURE 26 : LE COMPLEXE TFIID ET LA COMPOSITION DES TROIS LOBES. (SCHEER ET AL. 2021).	81
FIGURE 27 : TFIIB S'INSERE EN MIROIR DE TFIIA SUR TBP ET EXPOSE SON RUBAN B. (HAHN 2004).	83
FIGURE 28 : PARALOGUES DES TAFs POTENTIELLEMENT CAPABLES DE S'INCORPORER DANS TFIID (MÜLLER, ZAUCKER, AND TORA 2010).	87
FIGURE 29 : TAF7L ET ADIPOGENESE. (LEVINE ET AL. 2014).	88
FIGURE 30 : PARALOGUES DE TBP CHEZ LES VERTEBRES. (AKHTAR, VEENSTRA, 2011).	89
FIGURE 31 : TBPL1 EN ASSOCIATION AVEC TFIIA ET SON PARALOGUE ALF REGULENT LA TRANSCRIPTION DES GENES DURANT LA SPERMATOGENESE. (MARTIANOV ET AL. 2016).	91
FIGURE 32: TBPL2 CONTROLE LA CROISSANCE DE L'OVOCYTE	93
FIGURE 33 : COMPARAISON DE LA REGULATION DE LA STABILITE DE L'ARN MESSAGER DANS UNE CELLULE SOMATIQUE ET DANS L'OVOCYTE. (LORENZO-ORTS AND PAULI 2024).	99
FIGURE 34 : LA DEADENYLATION EST L'ETAPE LIMITANTE POUR LA DEGRADATION DE L'ARNM	100
FIGURE 35 : LE COMPLEXE LSM RECONNAIT LA QUEUE POLY(A) RACCOURCIE ET ENTRAINE LA PERTE DE LA COIFFE PAR LE RECRUTEMENT DU COMPLEXE DE DECAPPING	101
FIGURE 36 : LE COMPLEXE CCR4-NOT ET SES SOUS UNITES ENZYMATIQUES. (SHIRAI ET AL. 2014).	102
FIGURE 37 : REGULATION DE LA DORMANCE DE L'ARNM VIA CPEB ADAPTE DE (Y. JIANG ET AL. 2023).	105
FIGURE 38 : LA TRANSITION MATERNELLE-ZYGOTIQUE IMPLIQUE LA DEGRADATION PROGRESSIVE DU TRANSCRIPTOME MATERNEL PAR VAGUES. (SVOBODA, FULKA, AND MALIK 2017).	109
FIGURE 39 : CONTROLE DE LA READENYLATION CYTOPLASMIQUE ET DE LA DEGRADATION SELECTIVE D'ARNs MATERNELS PAR L'ACTIVATION DE LA VOIE ERK (JIANG ET AL. 2021).	112
FIGURE 40 : VOIES DE DEGRADATION DE L'ARNM APRES DEADENYLATION ET URIDYLATION.(LIM ET AL. 2014)	113
FIGURE 41 : LSM14B PROMEUT L'ASSEMBLAGE DU MARDO DURANT LA CROISSANCE DE L'OVOCYTE (LIM ET AL. 2014)	118
FIGURE 42 : LA DISSOLUTION DU MARDO DURANT LA MATURATION DE L'OVOCYTE RELACHE DES ARNm DORMANTS PRETS A ETRE TRADUITS ET DEGRADES APRES USAGE. (ERMISCH AND WOOD 2024).	119
FIGURE 43 : ETAPE D'HYBRIDATION DES SONDAS FLUORESCENTES EN SMIFISH	136
FIGURE 44: APPROCHE EXPERIMENTALE ePAT. (JÄNICKE ET AL. 2012)	194
FIGURE 45: DEVELOPPEMENT DE L'APPROCHE ePAT POUR DES OVOCYTES EN CROISSANCE	195
FIGURE 46 : APPROCHE EXPERIMENTALE HA-PAT	198
FIGURE 47: DEVELOPPEMENT DE L'APPROCHE HA-PAT POUR DES OVOCYTES EN CROISSANCE_ PARTIE 1	199
FIGURE 48 : DEVELOPPEMENT DE L'APPROCHE HA-PAT POUR DES OVOCYTES EN CROISSANCE_ PARTIE 2	201
FIGURE 49 : DEVELOPPEMENT DE L'APPROCHE HA-PAT POUR DES OVOCYTES EN CROISSANCE_ PARTIE 3	202
FIGURE 50 : VALIDATION DE L'APPROCHE <i>smiFISH</i>	204
FIGURE 51 : DEVELOPPEMENT DE L'APPROCHE <i>smiFISH</i> SUR OVOCYTES EN CROISSANCE	206
FIGURE 52 : SMIFISH CIBLANT <i>TYSND1</i>	208
FIGURE 53: ETUDE DE L'ACTIVATION DE CROISSANCE DES OVOCYTES PAR IMMUNOHISTOLOGIE CIBLANT FOXO3A DURANT LA PERIODE DE REPRODUCTION.	209
FIGURE 54: IMMUNOLocalISATION DE RPB1 DURANT LA CROISSANCE DE L'OVOCYTE	210

LISTE DES CONTENUS

FIGURE 55 : ANALYSE COMPLEMENTAIRE DE L'APPARITION ET L'ELARGISSEMENT DES FOCI NUCLEAIRES CHEZ LE MUTANT	211
FIGURE 56: VALIDATION DU TEST D'INCORPORATION D'ETHYNYL URIDINE (EU)	212
FIGURE 57: ETUDE DE LA TRANSCRIPTION NAISSANTE DES OVOCYTES EN CROISSANCE DEPLETES POUR <i>TBPL2</i>	213
FIGURE 58 : SCREENING DE L'EXPRESSION DES TAFs : DE LA CROISSANCE DE L'OVOCYTE A L'EMBRYON DE DEUX CELLULES.....	215
FIGURE 59 : ANALYSE PRELIMINAIRE DES DELETIONS CONDITIONNELLES DES <i>TAFs</i> PENDANT LA CROISSANCE DE L'OVOCYTE	216
FIGURE 60 : ETUDE PRELIMINAIRE DE LA TRADUCTION NAISSANTE DE L'OVOCYTE EN CROISSANCE PN14	217
FIGURE 61 : VOLCANOPlot METTANT EN EVIDENCE LES PROTEINES DONT LEUR EXPRESSION CHANGE DANS LE MUTANT <i>TBPL2</i> ^{-/-} PAR RAPPORT AU WT (ANALYSE DE PROTEOME)	218
FIGURE 62 : VALIDATION D'ANTICORPS CIBLANT <i>TBPL2</i> HUMAIN PAR SCREENING PAR IMMUNOFLOUORESCENCE DE CELLULES 293T/HEK EXPRIMANT TRANSITOIREMENT LA PROTEINE.	220
FIGURE 63 : IMMUNOFLOUORESCENCE DE L'APPAREIL DE GOLGI LORS DE LA CROISSANCE DE L'OVOCYTE	224
FIGURE 64: ETUDE PRELIMINAIRE DE L'ORIGINE DES <i>LATTICES</i> PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION	225
FIGURE 65: SCREENING ADDITIONNEL DE SOUS-UNITES DE SAGA, ATAC DURANT LA CROISSANCE DE L'OVOCYTE	289
FIGURE 66 : : ETUDE COMPLEMENTAIRE DES OVAIRES A PN14 PAR L'APPROCHE DE MICROSCOPIE EPISCOPIQUE A HAUTE RESOLUTION (HREM)	290

Liste des annexes

SOUS UNITES DE SAGA ET D'ATAC DURANT LA CROISSANCE DE L'OVOCYTE	289
MICROSCOPIE EPISCOPIQUE A HAUTE RESOLUTION (HREM)	290
ARTICLE 1. LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRE-GASTRULATOIRE HUMAIN : MODELES D'AVENIR ET ENJEUX SOCIETAUX	291
ARTICLE 2. EXTENSIVE NEUROG3 OCCUPANCY IN THE HUMAN PANCREATIC ENDOCRINE GENE REGULATORY NETWORK	297
ARTICLE 3. RNA POLYMERASE II TRANSCRIPTION INITIATION IN HOLO-TFIID-DEPLETED MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS	313

Introduction

La diversité et la complexité du monde vivant et des processus biologiques qui le régissent est une source d'admiration perpétuelle et de questionnements sans fin. L'étude de la cellule, unité du vivant, simplifie notre quête de savoir. En particulier, la génétique moléculaire du développement a pour but la compréhension des mécanismes permettant la mise en place d'un organisme complet et fonctionnel à partir d'une cellule œuf. Cette dernière est le résultat de la rencontre d'un spermatozoïde et d'un ovocyte qui, lors du processus de fécondation, fusionnent. Le cytoplasme ovocytaire apporte la grande majorité des facteurs nécessaires au soutien du développement précoce de l'embryon avant que celui-ci ne prenne le relai à la synthèse et remodelage de ses propres ressources (ARNs et protéines).

Dans les années 1960, lorsque John Gurdon tente de déchiffrer les caractéristiques des cellules eucaryotes, il fait une expérience surprenante : le transfert d'un noyau d'une cellule somatique dans un ovocyte énucléé est suffisant à la reprogrammation nucléaire et résulte au développement viable de l'embryon (Gurdon, Laskey, and Reeves 1975 ; King 2 Steinbach et al. 1951). Cette fameuse expérience consolide au moins deux éléments : 1) le noyau de n'importe quelle cellule contient l'information nécessaire au développement d'un embryon, 2) le cytoplasme de l'ovocyte contient les éléments essentiels au remodelage, par inhibition de la restriction de l'exploitation de l'information génétique, du noyau de la cellule somatique transférée (livre (Daniel Boujard, 2016)).

Dans cette thèse de doctorat, je vous propose de découvrir en quoi l'ovocyte murin est un modèle unique à la compréhension de l'expression génique. Je focaliserai mon attention sur la synthèse de l'ARN messager et sur le contrôle de sa stabilité. Le manuscrit de thèse est subdivisé en 3 chapitres qui recueillent et synthétisent les connaissances actuelles en biologie moléculaire chez les vertébrés. Allant de la description de l'ovogenèse et de la folliculogenèse durant lesquels l'ovocyte acquiert et maintient son identité au cours du processus de différenciation ; Du processus d'initiation de la transcription retrouvée dans la majorité des cellules eucaryotes (processus canonique) à ses variantes; Puis, j'aborderai les régulations mécanistiques du contrôle de la stabilité des transcrits qui se démarquent dans l'ovocyte.

Chapitre 1

La lignée germinale, détermination du sexe, ovogenèse et identité de l'ovocyte

Ce chapitre est dédié à la description des processus développementaux depuis la mise en place de la lignée germinale à la production des gamètes femelles. Les particularités développementales y seront explicitées ainsi que les événements clés pour l'acquisition et le maintien de l'identité de l'ovocyte.

Lignée germinale et détermination du sexe

1.1 Caractéristiques et migration des cellules primordiales germinales (PGCs)

Au cours du développement embryonnaire chez les mammifères, les PGCs, fondatrices de la lignée germinale, se détachent des tissus embryonnaires, et migrent par des mouvements amiboïdes en direction de l'épithélium allantoïdien dans lequel elles vont se transloquer puis se détacher en direction du mésentère postérieur (Chiquoine 1954). Leur trajectoire dans l'embryon est décrite en trois phases : le détachement, la migration et la colonisation des crêtes génitales (Pereda, Zorn, and Soto-Suazo 2006). Les PGCs sont caractérisées par la présence d'un cytoplasme irrégulier, d'un haut rapport noyau/cytoplasme et d'un nucléole proéminent. Lors de leur spécification, qui est la première étape de la détermination d'identité cellulaire, les précurseurs et PGCs expriment successivement BLIMP1 (PRDM1), PRDM14 et STELLA (**figure 2**) (Saitou, Kagiwada, and Kurimoto 2011; Vincent et al. 2005). Chez les mammifères, au niveau de l'allantoïde, les PGCs sont regroupées et expriment déjà un niveau élevé de phosphatase alcaline ce qui permet de les suivre dans l'embryon avec les colorations adéquates (Ginsburg, Snow, and McLaren 1990). Les PGCs se multiplient

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

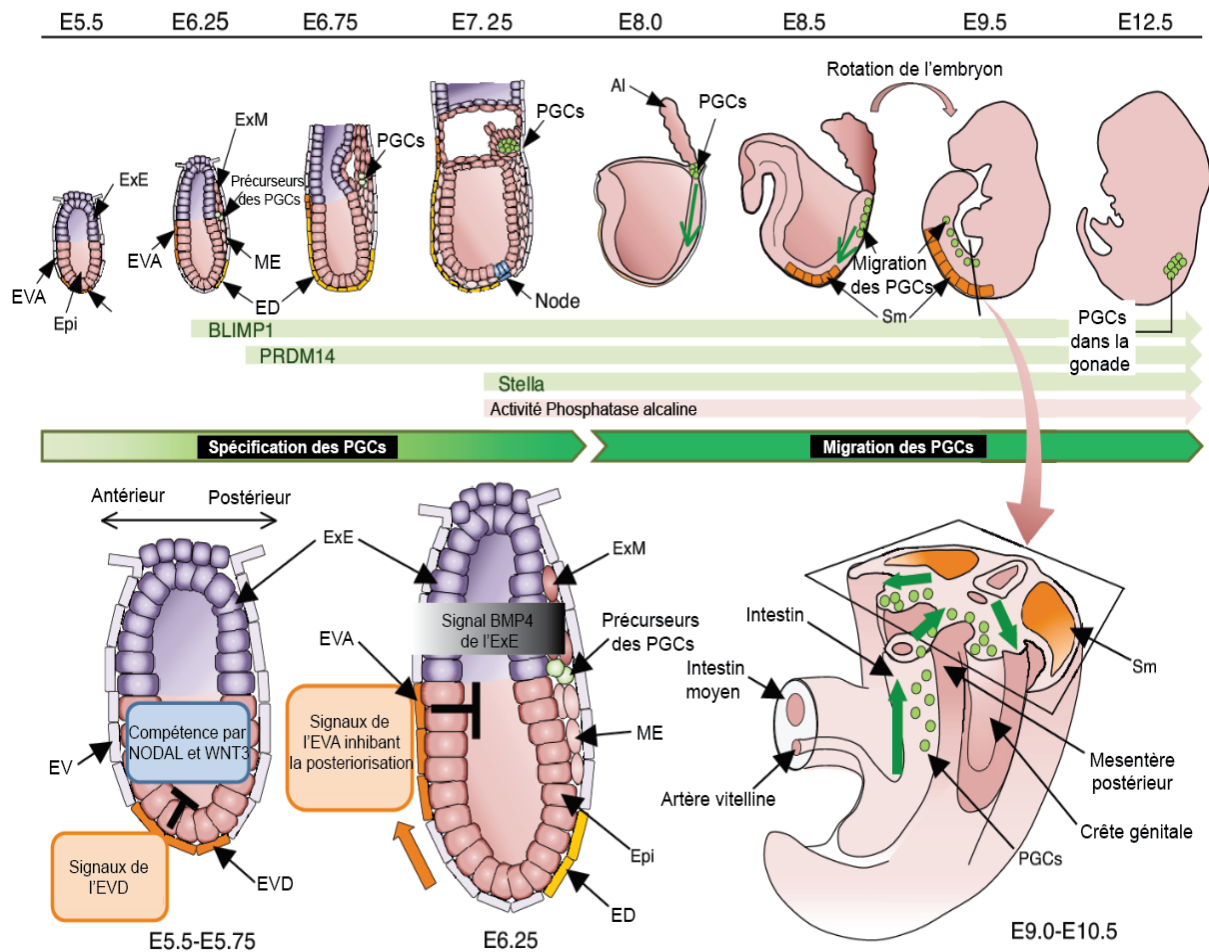


Figure 2 : Origine, spécification et migration des cellules germinales primordiales (PGCs) (Saitou, Kagiwada, and Kurimoto 2011).

Les précurseurs des PGCs se détachent de l'épiblaste, rejoignent l'allantoïde puis migrent dans l'intestin en direction du mésentère postérieur et finissent par rejoindre la gonade bipotente au niveau des crêtes génitales. AI: Allantoïde; Epi: Épiblaste; ED: Endoderme définitif; ExE: Ectoderme Extra-embryonnaire; EV: Endoderme viscéral; EVA: Endoderme viscéral antérieur; EVD: Endoderme viscéral distal; ExM: Mésoderme extra embryonnaire; ME: Mésoderme embryonnaire; PGCs: Cellules primordiales germinales; Sm: Somite.

pendant leur « voyage » lors duquel elles expriment des intégrines et protéoglycane différents selon la position et l'environnement dans lequel elles se trouvent (Anderson et al. 1999; Soto-Suazo et al. 2002). Les interactions avec la matrice extra-cellulaire et entre cellules

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

homotypiques PGC-PGC leur permettent de progresser efficacement le long des tissus par lesquels elles se déplacent (García-Castro et al. 1997; Hen and Sela-Donenfeld 2019). Chez la souris, au début de leur trajectoire, on compte environ 40 cellules à la base de l'allantoïde (Lawson et al. 1999; Lawson and Hage 1994; Nikolic et al. 2016). Environ 1000 PGCs rentrent en contact avec les crêtes génitales, pour revue (Saitou et al. 2011), contribuant à la formation de l'ébauche gonadique indifférenciée (EGI) (Molyneaux et al. 2001).

1.2 Description de la gonade bipotente

Chaque EGI est une gonade bipotente ayant la capacité de donner un organe femelle ou mâle selon les régulations qui prennent place lors de la détermination du sexe. Les progéniteurs somatiques des crêtes génitales commencent à se différencier, selon le sexe génétique (**figure 3**)(Grinspon and Rey 2019), aux alentours de la période embryonnaire 10.5 jours *post coïtum* (*jpc*).

1.2.1 Contrôle génétique XY

Dans la crête génitale XY, les précurseurs somatiques deviendront des cellules de Sertoli sous l'action conjointe de l'expression de SRY (Sex-determining region Y) et de NR5A1 (SF1), un récepteur nucléaire orphelin, qui augmentent l'expression de *Sox-9* (Sry-Box 9) (Sekido and Lovell-Badge 2008). Dans les cellules de Sertoli en cours de différenciation, SOX9 et NR5A1 activent l'expression des séquences codantes pour l'hormone anti-Müllérienne (AMH : *Antimullerian hormone*, autrefois appelée Substance d'Inhibition Müllérienne, *MIS : Mullerian Inhibiting Substance*). Au stade 13.5 *jpc*, au cours de la différenciation de la cellule de Sertoli, le maintien de l'expression d'AMH induit la régression des canaux Müller et la formation des cordons séminifères (Gao et al. 2006).

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

1.2.2 Contrôle génétique XX

Dans la crête génitale XX, l'absence d'expression de *Sry* engendre la régression des canaux de Wolff et permet le maintien de la signalisation WNT4/CTNNB1 (Liu et al. 2009) ce qui stabilise l'expression de FOXL2 dans les précurseurs somatiques (Lamothe, Bernard, and Christin-Maitre 2020). Dans ce cas de figure, les précurseurs somatiques deviendront des

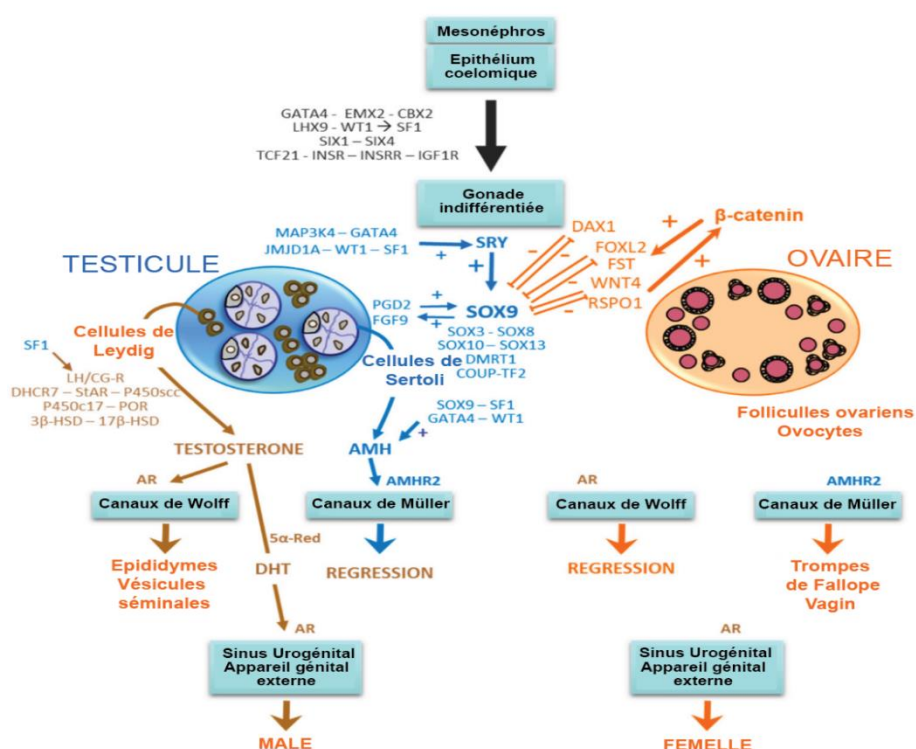


Figure 3 : Principaux acteurs contrôlant la différenciation des gonades mâle et femelle à partir d'une gonade bipotente indifférenciée (Grinspon and Rey 2019).

Chez le mâle, l'expression de *SRY* NR5A1 (*SF1*) et *SOX9* dans les précurseurs somatiques de la gonade indifférenciée stabilisent la différenciation des cellules de Sertoli qui expriment l'hormone anti-Müllerienne (AMH). L'AMH engendre la régression des canaux de Müller et la formation des cordons séminifères, précurseurs des tubes séminifères. Chez la femelle, l'absence de *SRY* engendre la régression des canaux de Wolff. La stabilisation de la voie WNT4 et l'expression de *FOXL2* dans les cellules somatiques de la gonade bipotente résultent au maintien de la différenciation de la lignée folliculaire, précurseur des follicules ovariens contenant les ovocytes.

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE
ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

cellules folliculaires dans une gonade femelle contenant à la base ~12 000 gonies chez la souris. Au stade 13.5 *jpc*, les ovogonies arrêtent de proliférer pour rentrer en méiose (McLaren 2003 ; Pepling and Spradling 2001), on parle alors non plus d'ovogonies mais d'ovocytes.

1.3. Ovogenèse

L'ovogenèse désigne la mise en place, la croissance et maturation des ovocytes chez la femelle. La mise en place commence dans l'embryon et la croissance de l'ovocyte se déroule dès la période périnatale. La maturation de l'ovocyte, tout comme la fin de la croissance, sont dépendantes des hormones gonadotrophines et se déroulent dans les follicules ovariens en développement (folliculogenèse). De ce fait, l'ovogenèse et la folliculogenèse sont des processus associés.

1.3.1 Cystes et contrôle méiotique

1.3.1.1 Formation des cystes

A 12.5 *jpc*, dans la gonade, les cellules germinales proliférantes (ovogonies) se divisent avec une grande synchronicité (Pepling and Spradling 1998). Chaque ovogonie subit une vague de mitoses générant au maximum 32 cellules correspondant à 5 mitoses successives. Le groupe cellulaire formé est nommé cyste. Le cyste interconnecte les futurs ovocytes et des cellules dites nourricières par des ponts cytoplasmiques qui résultent de cytodiérèses incomplètes (Pepling 2006).

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

1.3.1.2 Apport des cystes à l'ovocyte

Dès 14.5 *jpc*, une succession d'évènements prend place : les cystes dégènèrent et se fragmentent (**figure 4**). Les cellules nourricières, une fois activées, meurent et certaines contribuent à l'enrichissement des composants cytoplasmiques de l'ovocyte par déversement de leur contenu, organelles comprises (Pepling and Spradling 2001). L'équipe d'Allan C Spradling montre le mécanisme de déversement à l'échelle subcellulaire et confirme que la rupture des cystes a bien lieu juste avant la naissance chez la souris ce qui engendre leur déclin rapide et massif de cellules germinales (**figure 5**) (Pepling and Spradling 2001). Ainsi, le désassemblage des cystes est central à la sélection des ovocytes : à la naissance, la plupart des ovocytes sont morts par atresie, cependant 33% des ovocytes initiaux ont survécu (Spradling et al. 2022).

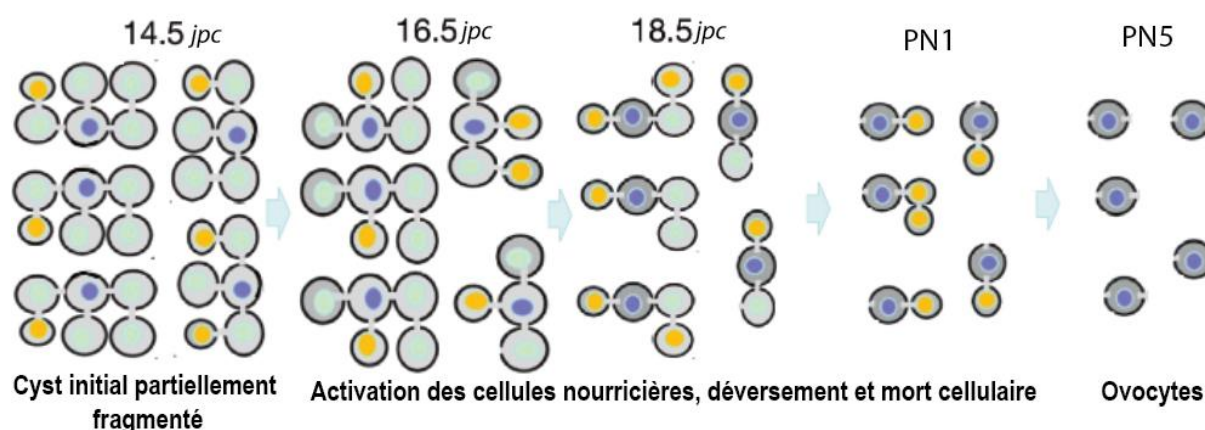


Figure 4 : Rupture, dégénération des cystes et formation des premiers ovocytes en période périnatale (Adapté de Spradling et al. 2022).

Un cyste initial contient, chez la souris, 32 cellules interconnectées par des ponts cytoplasmiques. 30 cellules sont représentées au jour embryonnaire E14.5 comme étant un cyste partiellement fragmenté contenant des cellules nourricières non activées (en vert). Parmi les cellules nourricières, certaines s'activent (en orange) déversent leur contenu cytoplasmique (organelles comprises) dans la cellule adjacente avant de mourir par mort cellulaire programmée : apoptose. Les futurs ovocytes en jour post-natal 5 (en bleu) représentent une petite proportion de cellules du cyste initial.

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

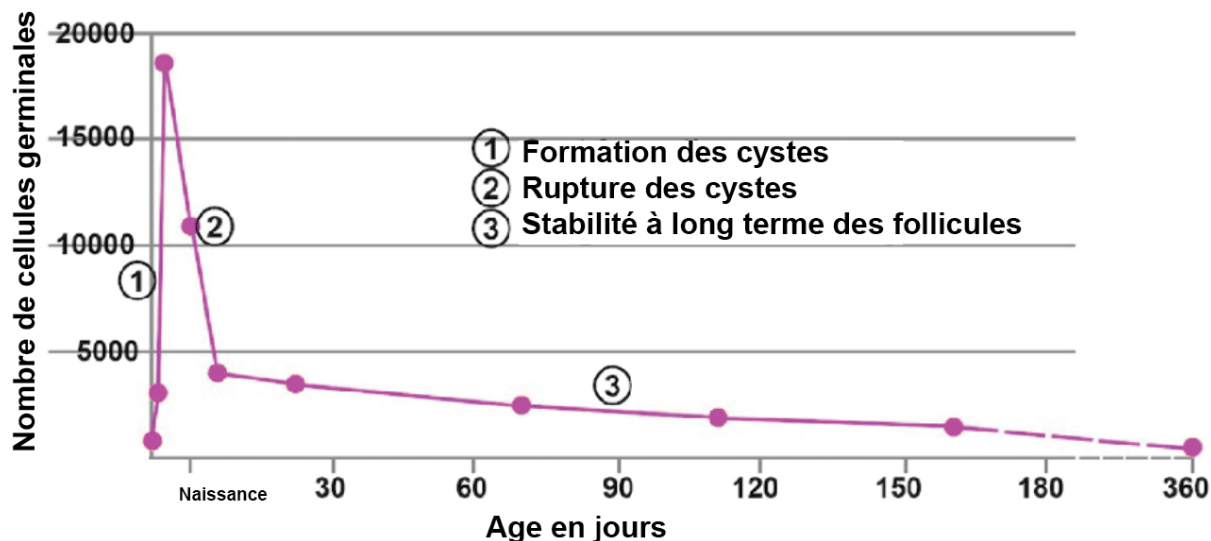


Figure 5 : La population initiale de cellules germinales décline rapidement (Spradling et al. 2022).

(1) La multiplication importante des ovogonies par mitoses engendre la formation des cystes. (2) En période périnatale, les cystes se rompent progressivement et les cellules germinales les constituant (cellules nourricières et futurs ovocytes) meurent en grande partie. (3) La diminution physiologique du nombre d'ovocytes au cours de la vie se fait de manière progressive et implique la mort cellulaire, ainsi que la sélection régulière d'ovocytes pour la folliculogénèse.

1.3.1.3 Entrée et blocage méiotique de l'ovocyte

A 13.5 *jpc*, dans les cystes, les ovocytes progressent tous jusqu'en prophase de première division méiotique durant laquelle ils resteront bloqués à long terme (stade diplotène) jusqu'à ovulation. Cette réserve d'ovocytes constitue l'unité de base des follicules ovariens (Pepling 2006). On parle alors d'ovocyte primaire. A ce stade, l'ovocyte contient 4 copies du génome ($2n$, 2 chromatides) et les chromosomes homologues sont liés uniquement par les zones de brassage génétique (*crossing-over*). Pendant des décennies, la signalisation de l'acide rétinoïque était admise comme impliquée dans l'entrée en méiose de l'ovocyte,

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

références dans (Teletin et al. 2017). Cependant, des études plus récentes, notamment dans les mutants pour les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RAR) remettent en question cette hypothèse (Chassot et al. 2020; Vernet et al. 2020). Même si les mécanismes d'entrée en méiose ne sont pas bien compris, certains acteurs protéiques permettant le blocage méiotique ont été identifiés. En effet, une concentration intracellulaire élevée d'AMP cyclique (cAMP) empêche la progression de la méiose par blocage du MPF (*Maturation Promoting Factor*) pour revue (Conti et al. 1998). Le MPF est composé de la kinase CDK1 et de la CYCLINE B. La régulation de la traductibilité des cyclines est essentielle à la progression méiotique (Bouftas and Wassmann 2019). La concentration élevée de cAMP empêche la traduction de la CYCLINE B et active la signalisation PKA ce qui renforce l'action inhibitrice de progression méiotique. De plus, l'ovocyte sécrète GDF9 et BMP15 qui, en synergie, stimulent la production de guanosine monophosphate cyclique (cGMP) par les cellules folliculaires adjacentes **figure 6** (Wigglesworth et al. 2013). En retour, le transfert de cGMP par des jonctions communicantes (*gap*) vers l'ovocyte inhibe l'activité de dégradation de cAMP par la phosphodiesterase PDE3 (Norris et al. 2009; Vaccari et al. 2009).

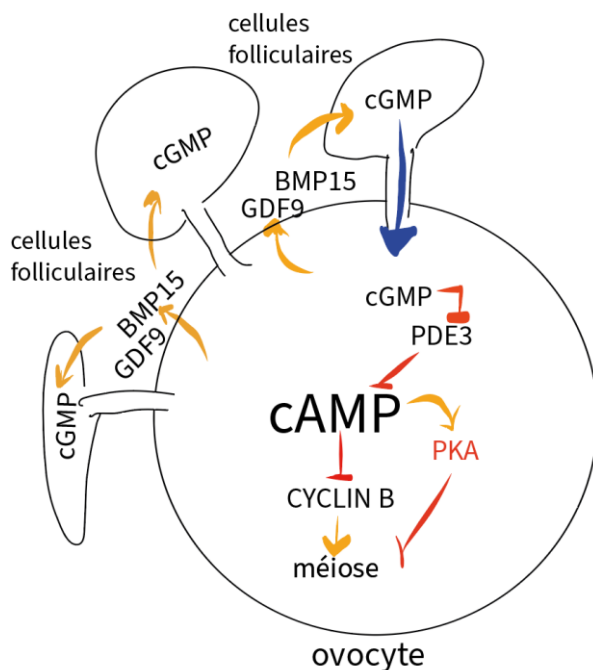


Figure 6 : Blocage méiotique par l'interaction des cellules folliculaires et l'ovocyte de premier ordre.

PDE3 : Phosphodiesterase

cAMP : Adénosine monophosphate cyclique

cGMP : Guanosine monophosphate cyclique

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

1.3.1.4 Reprise méiotique

A l'ovulation, la stimulation hormonale par la LH lève l'inhibition de la progression de méiose exercée par au moins trois mécanismes : la diminution de cAMP intra-ovocytaire, l'inactivation de la PKA et la traduction de la cycline B qui s'associe à la CDK1 formant un MPF fonctionnel, pour revue (Jones 2004). Le MPF phosphoryle les lamines résultant en la dissolution de l'enveloppe nucléaire, (GVBD : *Germinal Vesicle Break Down*) et en la formation du fuseau métaphasique méiotique (Jones 2004) . Enfin, l'ovocyte expulse un premier globule polaire et progresse jusqu'en métaphase II et sera bloqué à cette étape par l'action du facteur cytotatique (CSF : *Cytostatic Factor*) jusqu'à la fécondation, on parle alors d'ovocyte II.

L'existence du CSF fut mis en évidence, chez le Xénope, par l'expérience de Masui et Markert de 1971 (Masui and Markert 1971). L'injection du contenu cytoplasmique d'un ovocyte II bloqué en métaphase dans un ovocyte non mature induisait sa progression méiotique seulement jusqu'en métaphase II. Cette observation suggérait bien l'existence d'un facteur cytoplasmique dans l'ovocyte II empêchant la progression de la division. En réalité et par définition, le CSF ne n'est pas une molécule unique mais un ensemble de facteurs cytoplasmiques (Tunquist and Maller 2003). Chez les vertébrés, EMI2 (*Endogenous Meiotic Inhibitor*) a été identifié comme étant un composant essentiel du CSF puisqu'il inhibe le complexe de transition en anaphase (*APC Anaphase-Promoting Complex*) (Jia et al. 2015).

1.3.2 Folliculogenèse

1.3.2.1 Du follicule primordial à l'ovulation

Un follicule est composé d'un ovocyte et de cellules somatiques spécifiques de l'ovaire nommées cellules folliculaires. Un follicule primordial est l'association conjointe de quelques cellules folliculaires aplaties en surface d'un ovocyte (Pedersen and Peters 1968). La formation du follicule primordial repose initialement, lors de la rupture des cystes, sur l'individualisation

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE
ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

des ovocytes et sur l'infiltration et l'interaction de cellules folliculaires (Frost et al. 2021). Chez les mammifères, l'interaction intercellulaire de l'ovocyte avec les cellules folliculaires et la bidirectionnalité des communications conditionne la formation et la sélection des follicules primordiaux (Nilsson 2002) (Balla et al. 2003). En particulier, les projections transzonales (*TZPs : Transzonal projections*) sont des extensions cytoplasmiques des cellules folliculaires particulières juxtaposées à l'ovocyte. Les *TZPs* sont constituées de fins filaments d'actine, s'insérant sur la membrane de l'ovocyte et contribuant à l'inhibition de la progression méiotique et au contrôle de la croissance (Albertini et al. 2001). De plus, l'interaction des *TZPs* avec la membrane de l'ovocyte permet la mise en place de jonctions communicantes par le biais de connexines (Albertini et al. 2001). Notamment, les connexines 37 et 43 permettent la mise en place d'une communication réciproque entre l'ovocyte et les folliculaires qui l'entourent (Ackert et al. 2001; Mora et al. 2012).

Selon la classification de Pedersen (Pedersen and Peters 1968) (**figure 7**) qui décrit les follicules selon la complexité de l'amas des cellules folliculaires qui l'entoure, un follicule primaire se forme dès lors qu'un épithélium unistratifié complet de cellules folliculaires cubiques entoure l'ovocyte. Les cellules folliculaires se divisent formant un amas de plusieurs couches (follicule secondaire). Le follicule secondaire en fin de stade peut présenter une petite cavité remplie de liquide, on parle alors de follicule pré-antral. Puis, l'amas cellulaire se creuse en une cavité beaucoup plus grande nommée *antrum* qui se remplit de plus en plus de liquide interstitiel formant un follicule antral. L'augmentation de taille de l'*antrum* limite, au centre du follicule, les interactions entre cellules folliculaires, refoule l'ovocyte en périphérie et augmente la pression interne du follicule pré-ovulatoire. L'amas de quelques cellules folliculaires qui restent en contact de l'ovocyte est nommé *corona radiata*.

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

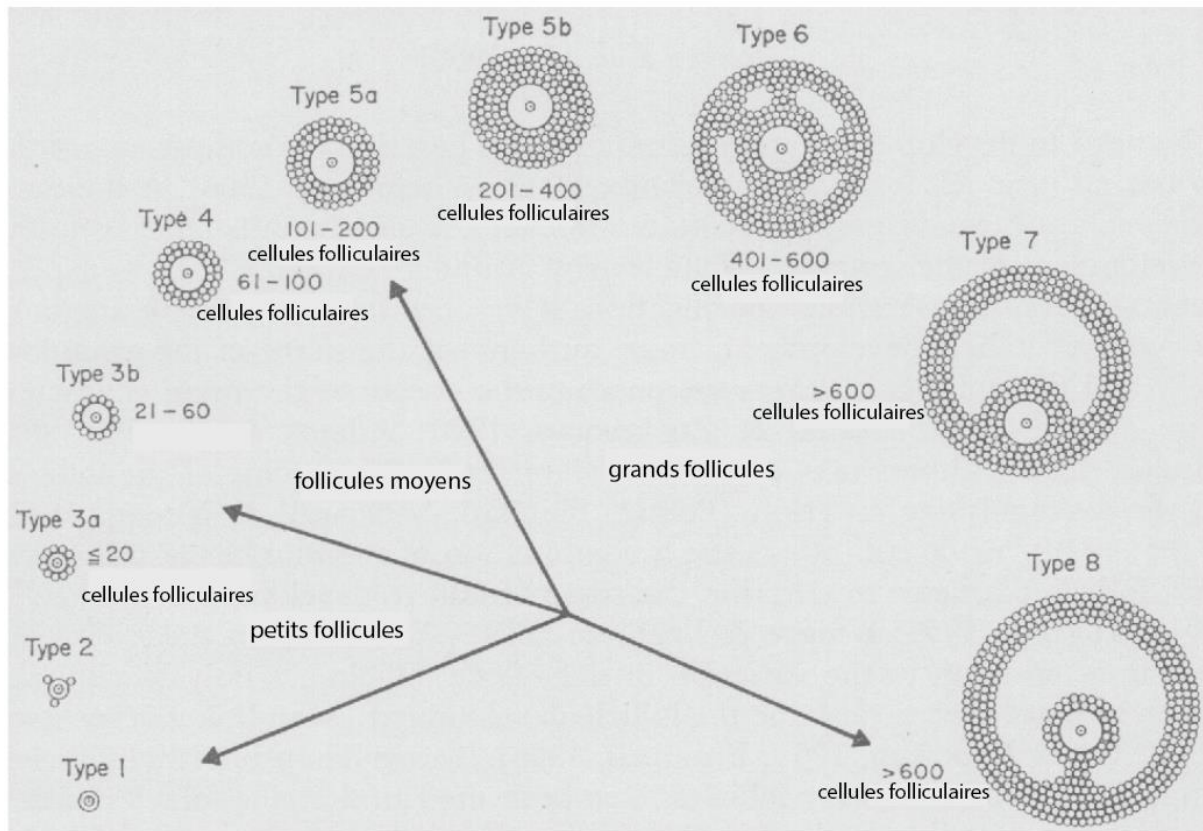


Figure 7 : Classification des follicules par Pedersen and Peters 1968

La *corona radiata* assure un rôle de nutrition et de protection physique le temps que l'ovocyte soit expulsé de l'ovaire, transite dans la trompe utérine et fusionne, éventuellement, avec un spermatozoïde. L'ovulation est l'expulsion de l'ovocyte dans l'ampoule tubaire positionnée sur le segment distal de la trompe utérine. La folliculogenèse et l'ovulation sont respectivement sous l'influence des hormones gonadotrophines FSH et LH (respectivement hormones folliculostimulante et lutéinisante) bien que les premières phases, à savoir les follicules primordiaux, primaire et secondaire soient indépendants des gonadotrophines. (**figure 8**) (Lee et al. 2021).

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

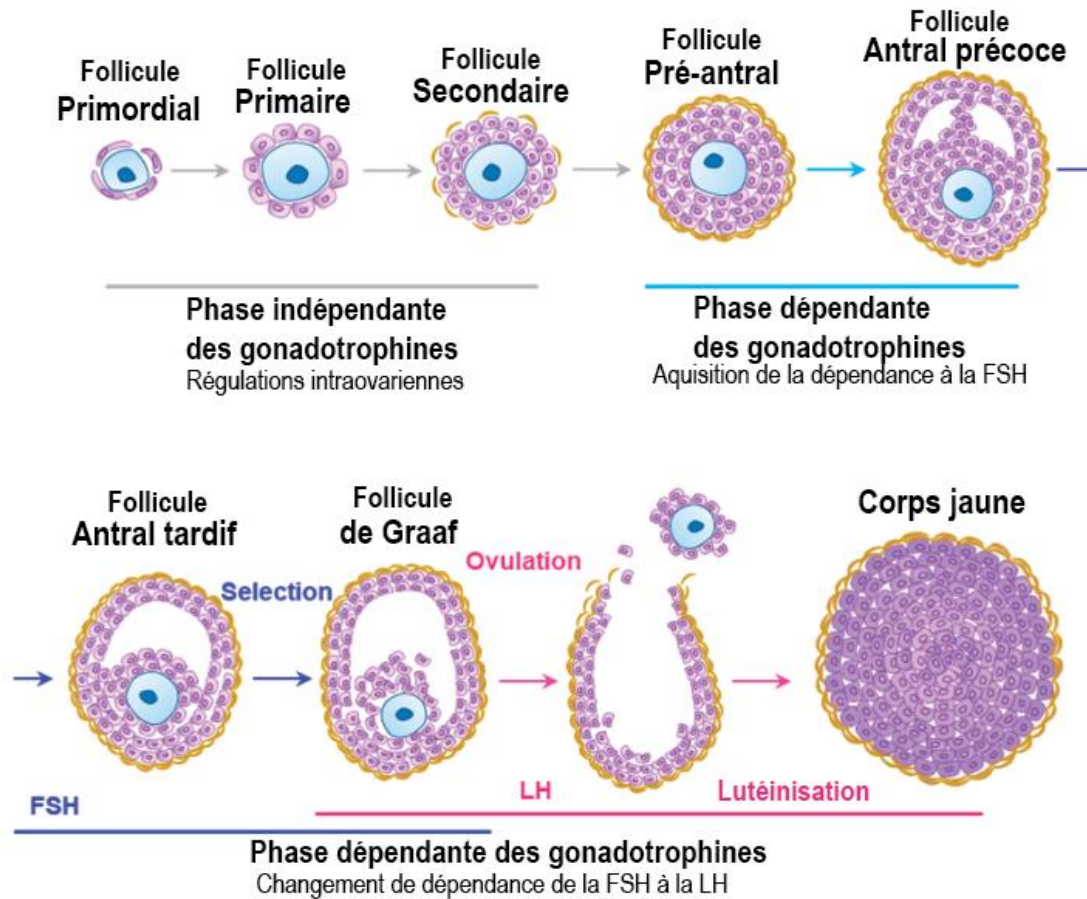


Figure 8 : La Folliculogenèse sous le contrôle partiel des hormones (Lee et al. 2021).

Le développement du follicule primordial, primaire et secondaire précoce est initialement indépendant des hormones gonadotrophines de l'axe hypothalamo-hypophysaire. En contraste, le développement jusqu'au stade antral ainsi que l'ovulation sont sous la dépendance, respectivement de la FSH et de la LH.

1.3.2.2 Les deux vagues de folliculogenèse

L'étude de la trajectoire du lignage folliculaire a mis en lumière que les cellules folliculaires provenaient de deux zones distinctes de l'ovaire : le centre ou *medulla* et la périphérie ou *cortex*, pour revue (Frost et al. 2021). L'étude de ces deux sources de cellules

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

folliculaires a mené à la découverte de deux vagues de folliculogénèse (Cordeiro et al. 2015; Eppig and Handel 2012; Mork et al. 2012).

1.3.2.2a Première vague de folliculogénèse

La première activation de follicules primordiaux se déroule dès la naissance au centre de l'ovaire dans la zone médullaire et se caractérise par sa spontanéité d'activation et par sa synchronicité, même si le développement sous-jacent est asynchrone puisque certains follicules atteignent la maturité trois mois après la naissance (Zheng, Zhang, and Liu 2014). En effet, les follicules de la première vague contribuent à la survenue de la puberté (**figure 9**).

1.3.2.2b Deuxième vague de folliculogénèse

La deuxième vague de folliculogénèse, plus tardive, commence après la naissance, devient dominante vers trois mois et se développe en périphérie de l'ovaire dans la zone corticale. L'activation des follicules primordiaux de la deuxième vague se fait de manière progressive et survient régulièrement durant la vie (**figure 9**) (Zheng et al. 2014).

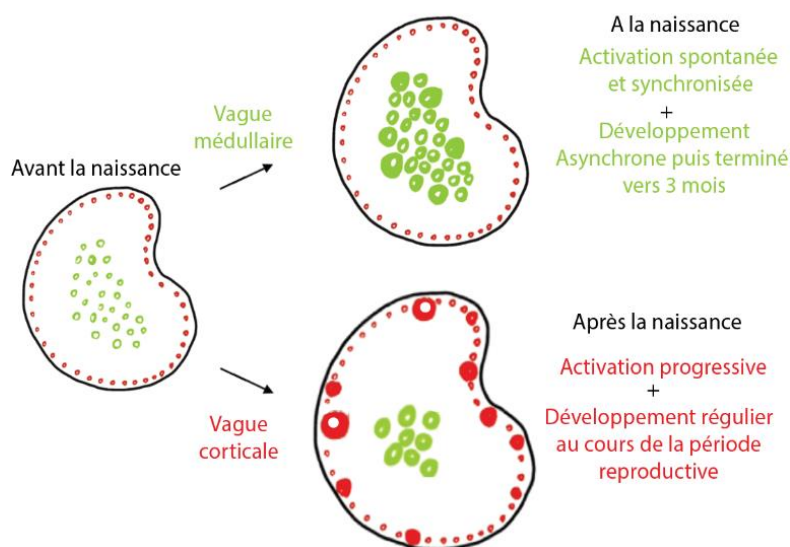


Figure 9 : Les deux vagues de la folliculogénèse

En vert, la vague médullaire plus précoce (à la naissance) située au centre de l'ovaire. En rouge, la vague corticale plus tardive (après la naissance) située en périphérie de l'ovaire. La vague corticale est exclusive à l'ovulation au cours de la période de reproduction. L'ovaire grandit en taille, ce qui reflète l'activation successive des deux vagues.

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

La signification fonctionnelle de la succession des deux vagues n'est pas connue. Hormis des communications hormonales avec l'axe hypothalamo-hypophysaire qui expliqueraient une émergence précoce et une discontinuité, on pourrait penser que la première vague « conditionne » l'ovaire à son fonctionnement normal. En réalité, comme abordé, l'initiation du processus de folliculogenèse est indépendante des hormones gonadotrophines (Lee et al. 2021). De plus, l'absence de la première vague de folliculogenèse n'altère pas l'émergence de la deuxième car les follicules corticaux se développent tout de même (John et al. 2008 ; Miura et al. 2017).

1.3.3 Croissance et identité de l'ovocyte

La période de croissance de l'ovocyte est une période intense de transcription active durant laquelle des ARNs et de nombreuses protéines sont stockés. L'expression de facteurs d'identité, le remodelage du cytosquelette et le positionnement subcellulaire des organelles permet la progression de la croissance et l'expression de l'identité au cours de la différenciation.

1.3.3.1 Croissance de l'ovocyte et zone pellucide

La croissance de l'ovocyte prend place du follicule primaire au follicule pré-antral dans lequel l'ovocyte est qualifié de « *fully grown oocyte* ». Il existe des différences de taille « *fully grown oocyte* » entre les espèces (Bahety, Böke, and Rodríguez-Nuevo 2024). Pour exemple, l'ovocyte en fin de croissance du Xénope atteint 1200 μm de diamètre alors que l'ovocyte en fin de croissance murin et humain ne dépasse pas, respectivement, les 80 μm et 120 μm (**figure 10**). Chez les vertébrés, la croissance est caractérisée par la synthèse d'une matrice extra-cellulaire nommée zone pellucide (ZP) qui s'intercale entre les cellules

INTRODUCTION

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

folliculaires adjacentes. La ZP est composée d'acide hyaluronique, de protéines sulfatées et de glycoprotéines. Quatre glycoprotéines sont majoritaires chez les vertébrés ZP1, ZP2 et ZP3 et ZP4 (Goudet et al. 2008). Cependant ZP4 n'est pas présente chez la souris (Goudet et al. 2008). La ZP permet de stabiliser les interactions cellule-cellule et favorise le développement et la cohésion du follicule (Wassarman and Litscher 2022). Chez la souris, la lignée *Zp3-Cre* est la plus répandue afin de déléter des séquences génomiques floxées à l'ovocyte durant la croissance. La recombinaison médiée par la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur *Zp3* commence dans le stade de follicule primaire et se poursuit au stade secondaire (Lewandoski, Montzka Wassarman, and Martin 1997).

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

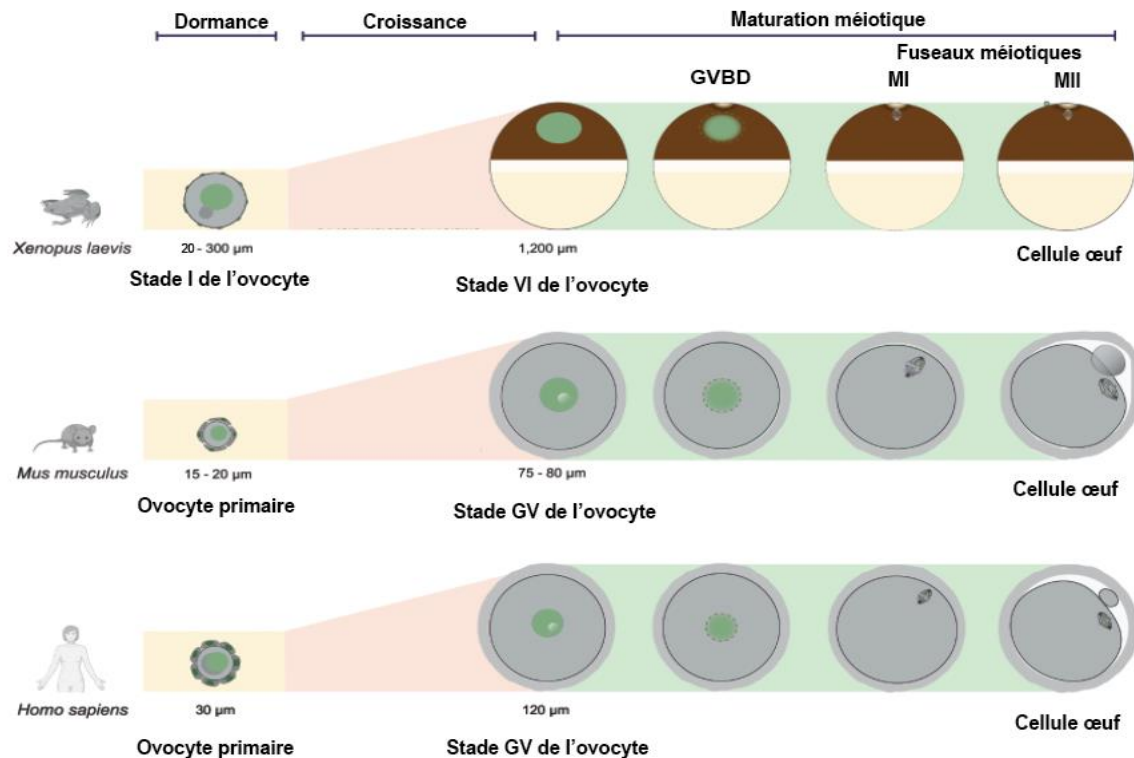


Figure 10 : Croissance ovocytaire chez les vertébrés, comparatif entre le Xénope, la souris et l'humain. (Adapté de Bahety, Böke, and Rodríguez-Nuevo 2024).

La croissance ovocytaire est un accroissement de volume cellulaire qui fait suite à une période de dormance. La dormance n'est pas pour autant une dormance transcriptionnelle mais seulement une période d'inactivation de croissance. L'ovocyte dormant du Xénope (Stade VI) varie entre 50 et 300 μm tandis que celui de la souris et de l'humain sont, respectivement, entre 15-20 μm et de 30 μm de diamètre. La vésicule germinale (GV-Germinal Vesicle) est le nom donné au noyau de l'ovocyte durant sa croissance. GVBD (Germinal Vesicle Break Down) est la dissolution de l'enveloppe nucléaire. MI est le stade métaphasique I, en première division de méiose (réductionnelle). MII est le stade métaphasique II, en deuxième division de méiose (équationnelle).

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

1.3.3.2 Activation de la croissance de l'ovocyte

L'activation de croissance est une activation ovocytaire irréversible qui dépend de FOXO3. La translocation du facteur de transcription FOXO3 dans le noyau de l'ovocyte dépend de l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt qui est régulé par au moins deux acteurs : (1) L'interaction du ligand Kit (*KL*) de la cellule folliculaire interagit sur son récepteur tyrosine kinase en surface de l'ovocyte. (2) L'inhibition par la phosphatase PTEN qui bloque la synthèse de PIP3 à partir de PIP2. Le lien entre KT et PTEN n'est pas clair lors de la croissance de l'ovocyte mais l'interaction de KIT et KITL régulerait l'activation de la voie PI3K (Cecconi et al. 2004). L'une des hypothèses est que l'intercalation et l'épaississement de la ZP dissocierait KIT et KITL ce qui favoriserait l'inactivation de PTEN et l'activation de la voie PI3K-AKT.

En effet, l'inhibition de PTEN, par un mécanisme non identifié, stimule l'activation de la voie PI3K-AKT par accumulation de PIP3 membranaire résultant en la phosphorylation d'AKT, en l'hyperphosphorylation de FOXO3 et son exclusion nucléaire (Ezzati et al. 2015; John et al. 2009). La translocation cytoplasmique de FOXO3 va de pair avec l'initiation de la croissance de l'ovocyte (**figure 11**) (John et al. 2008). La délétion conditionnelle des séquences codantes pour *Foxo3*, tout comme l'inhibition de PTEN (Reddy et al. 2008), engendre une hyperplasie ovarienne due, majoritairement, à l'activation massive de follicules primordiaux corticaux (John et al. 2008). Ainsi, l'action du facteur de transcription FOXO3 dans le noyau ovocytaire sauvegarde la réserve ovarienne quiescente (follicules primordiaux) en empêchant l'initiation de la croissance ovocytaire.

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

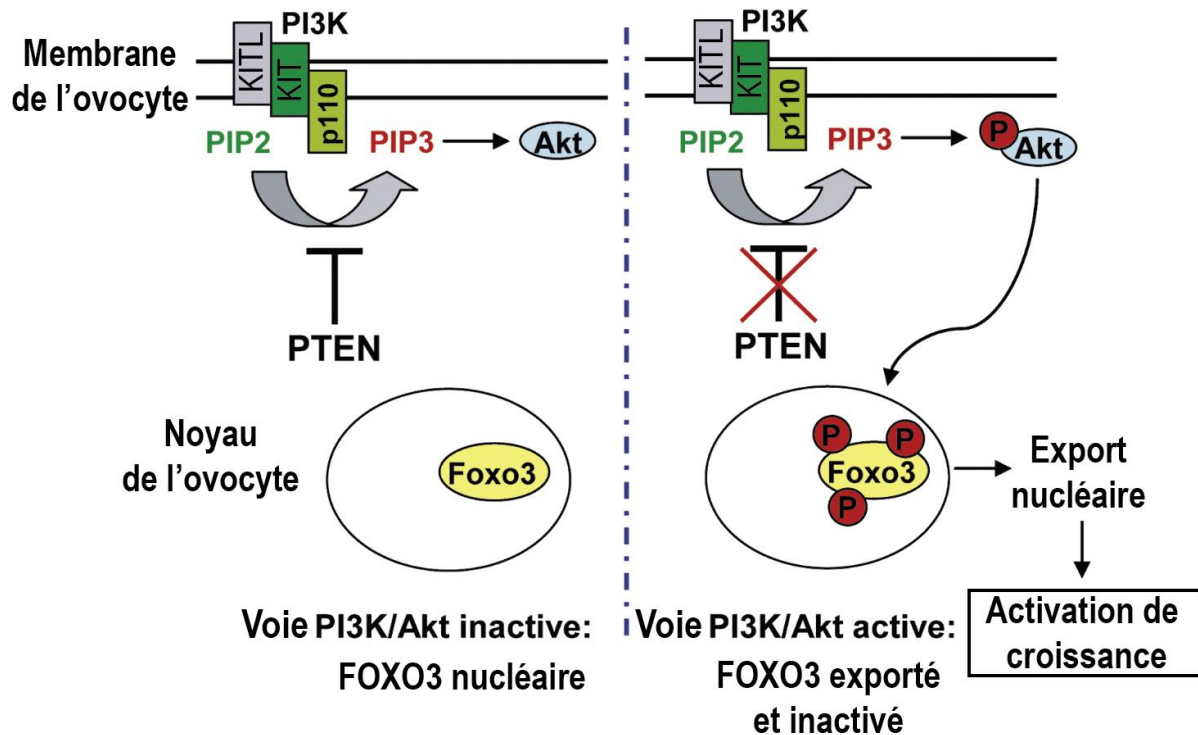


Figure 11 : La voie de signalisation PI3K/ AKT contrôle la survenue de la croissance ovocytaire (Adapté de John et al. 2008).

L'activation de la voie PI3K/Akt par inhibition de PTEN résulte en l'accumulation de phosphatidylinositol tri phosphate (PIP3) membranaire et en la phosphorylation de la kinase AKT qui phosphoryle à son tour FOXO3 dans le noyau de l'ovocyte. L'hyperphosphorylation de FOXO3 engendre son exclusion nucléaire et l'activation de croissance ovocytaire.

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE
ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

1.3.3.3 Facteurs d'identité de l'ovocyte

L'ovogenèse implique un réseau complexe de signaux et d'expression de facteurs qui permettent de maintenir le lignage ovocytaire (**Figure 12**), pour revue (Jagarlamudi et al. 2010). Pour exemple, le stade ovogonie se caractérise par l'expression de DDX4 et DAZL (Spiller and Bowles 2019). La formation des follicules primordiaux et la croissance sont dépendantes de l'expression de FIGLA, NOBOX, LHX8, KIT, GDF9, YY1, TAF4B et TBPL2 qui permettent la maintenance et la progression de différenciation. Leur mutation cause la stérilité des femelles par l'absence ou l'altération de l'ovogenèse à différents stades (Gazdag et al. 2009; Griffith et al. 2011; Grive et al. 2014; John et al. 2008; Rajkovic et al. 2004; Soyal, Amleh, and Dean 2000; Tay and Richter 2001).

In vitro, à partir de cellules embryonnaires de souris (mESCs), Hamazaki et al. démontrent que l'expression conjointe des transgènes pour *Nobox*, *Figla*, *Tbpl2* et *Lhx8* (nommés transgènes NFTL) est suffisante à la reprogrammation en ovocyte-like (DIOLs, *Directly Induced Oocyte Like cells*) capables de former des follicules secondaires en association avec des cellules folliculaires de l'ovaire (Hamazaki et al. 2021).

FIGLA est un facteur de transcription de la famille *basic helix-loop-helix* (bHLH) détecté dans ovogonies dès le stade 13 *jpc* (Soyal et al. 2000). En absence de FIGLA, à la naissance, les ovaires présentent une hypotrophie et aucun follicule primordial ne se forme (Soyal et al. 2000). D'autre part, LHX8 est un membre de la famille des facteurs de transcription *LIM-homeobox*. Les ovocytes délétés pour LHX8 perdent la réserve ovocytaire dans les 7 jours suivant la naissance causée par une activation massive de follicules primordiaux qui

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

dégénèrent au stade follicule primaire (Ren et al. 2015). Les ovocytes déplétés pour LHX8 expriment des niveaux faibles de *Kit* et présentent une dérégulation d'autres transcrits spécifiques à l'ovocyte comme *Gdf9* et *Nobox*. De même, les souris déplétées pour NOBOX et TAF4B qui sont exprimés dès le stade follicule primordial, présentent une accélération de la perte de la réserve initiale ovocytaire en postnatal ce qui empêche la survenue de la croissance

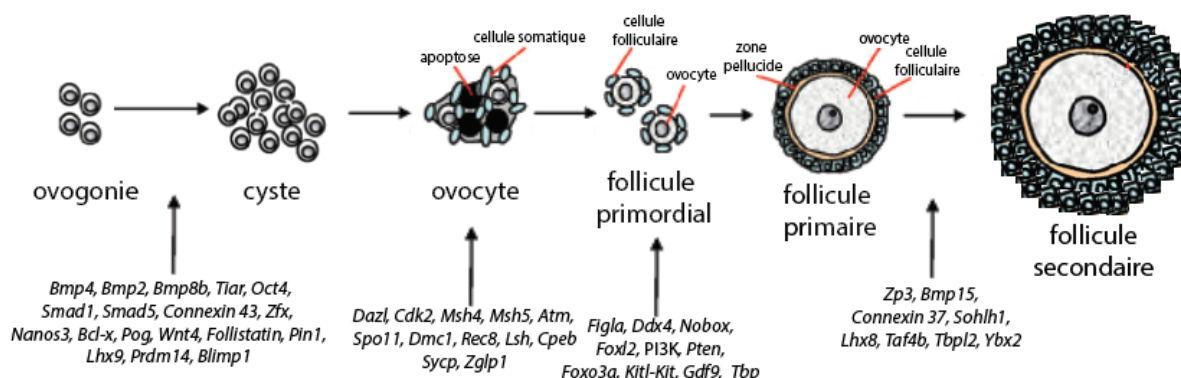


Figure 12 : Facteurs impliqués dans la progression de l'ovogenèse. (Adapté de Jagarlamudi et al. 2010).

ovocytaire puisque les ovocytes dégénèrent dès la transition follicule primordial vers follicule primaire (Grive et al. 2014; Rajkovic et al. 2004). D'autre part, les mutants conditionnels Yin-Yang1 (YY1), présentent une hausse de l'expression de KIT et KITL (Griffith et al. 2011). Les follicules ne passent pas le stade follicule secondaire et GDF9 et BMP15 sont déplétés (Griffith et al. 2011).

L'expression et l'exocytose de BMP15 et GDF9 par l'ovocyte, membres de la famille des TGF- β , sont essentiels à la régulation de l'activation de la croissance par stimulation paracrine de l'environnement folliculaire (Paulini and Melo 2011). Cependant leur rôle intrinsèque à l'ovocyte n'est pas étudié. La déplétion de GDF9 dans l'ovaire résulte en son hypotrophie à la naissance, à la perturbation des vagues de folliculogenèse durant les trois semaines de vie et au blocage des follicules au stade secondaire puisqu'aucun follicule antral n'est présent (Sanfins, Rodrigues, and Albertini 2018). De même, la délétion de *Tbp12* mène à un blocage développemental équivalent dans la transition follicule primaire vers secondaire

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

(Gazdag et al. 2009) et à l'arrêt de croissance de l'ovocyte suggérant des défauts de différenciation.

1.3.3.4 Structuration cytoplasmique de l'ovocyte

La détermination cellulaire est le processus par lequel le destin cellulaire est établi de manière stable. Par une série d'évènements ordonnés et successifs, la différenciation rend compte de l'expression de cette identité sous forme d'une spécialisation de fonction. Cette dernière peut être associée à un changement de morphologie important comme c'est le cas des neurones ou des spermatozoïdes. Néanmoins, dans certains contextes, la différenciation prend place de manière plus « discrète » comme c'est le cas lors de la croissance de l'ovocyte qui reflète l'accumulation et la structuration des ressources cytoplasmiques durant une période de transcription active.

Par « structuration cytoplasmique », je me réfère à la synthèse et à l'organisation des du cytosquelette et des organelles qui sont nécessaires à la spécialisation de fonction de l'ovocyte. La structuration cytoplasmique est nommée dans la littérature « maturation cytoplasmique » et fait partie intégrante de l'expression de son identité complète afin d'assurer le bon déroulement de la fécondation et du développement embryonnaire. Deux exemples clé de structuration cytoplasmique lié à une fonction spécifique de l'ovocyte sont la mise en place des granules corticaux à partir des membranes golgiennes, et les *lattices* dont je parlerai par la suite.

L'appareil de Golgi est une organelle impliquée dans les modifications post-traductionnelles de protéines assurant la distribution des composants cytoplasmiques pour exocytose ou d'adressage membranaire. L'appareil de Golgi permet la formation des granules corticaux (GC) dont leur contenu sera exocyté lors de la fécondation permettant de bloquer la polyspermie par imperméabilisation de la zone pellucide (Wolf and Hamada 1977). Dans l'ovocyte mature, les GC d'un diamètre de 0.2 à 0.6 μm et sont retrouvés en position sous-corticale (Guraya 1982). La migration des GCs en position sous-corticale est la signature que le cytoplasme de l'ovocyte se différencie correctement. L'appareil de Golgi peut être suivi en marquant la protéine GM130 codée par *Golga2*. Chez la souris, la délétion constitutive de *Golga2* est progressivement létale et, de façon surprenante, sa délétion conditionnelle dans

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

l'ovocyte n'altère pas la fertilité (Jiang et al. 2020). Cela est probablement dû à des mécanismes compensatoires par d'autres protéines golgiennes (Jiang et al. 2020).

Les GC sont initialement formés en position périnucléaire, à partir de membranes se détachant des dictyosomes golgiens, puis leur nombre augmente suivant la fragmentation des dictyosomes et leur dispersion dans le cytoplasme d'une multitude de « mini-Golgis » au cours de la croissance ovocytaire (**figure 13**) (Ducibella, Duffy, and Buetow 1994; Moreno, Schatten, and Ramalho-Santos 2002; Sedmíková et al. 2003).

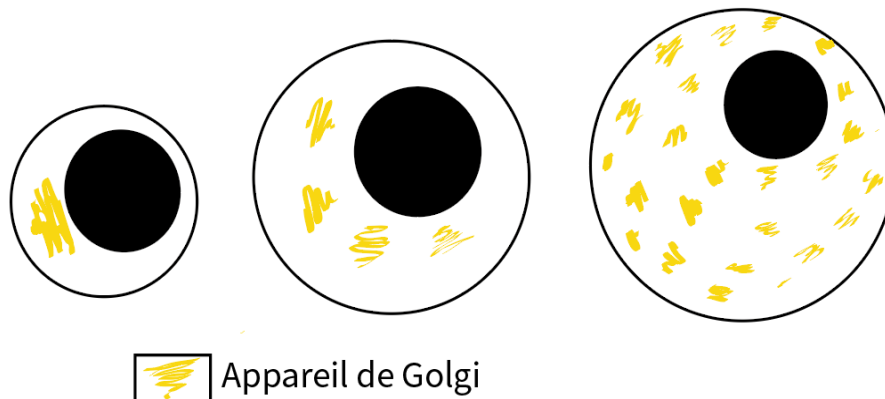


Figure 13 : Structuration de l'appareil de Golgi lors de la croissance de l'ovocyte

Plusieurs articles mentionnent le cytosquelette comme acteur dynamique permettant la dispersion des structures golgiennes et des GCs dans les ovocytes tant dans des modèles non mammifères comme mammifères (oursin, porc, humain et souris)(Connors et al. 1998; Kim et al. 1996; Liu et al. 2010; Sun et al. 2001; Wessel, Conner, and Berg 2002). La structuration du cytosquelette lors de la croissance de l'ovocyte permet de mettre en place des zones de cloisonnement assurant l'organisation et l'architecture du cytoplasme (**figure 14**) (Sathananthan 2013).

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

Notamment, le complexe sous-cortical (SCMC : *SubCortical Maternal Complex*) est un regroupement multiprotéique associé au cytosquelette et décrit comme étant positionné directement sous la membrane de l'ovocyte. Le SCMC est composé des protéines maternelles essentielles telles que NLRP5 (aussi nommée MATER), TLE6/COFILIN, OOEP (aussi nommée FLOPED), PADI6 et KHDC3 (aussi nommée FILIA) qui ont la particularité d'être codés par des gènes à effet maternel (Tashiro et al. 2010). Un gène à effet maternel est identifié lorsque le génotype d'une mère affecte directement le développement de la descendance,

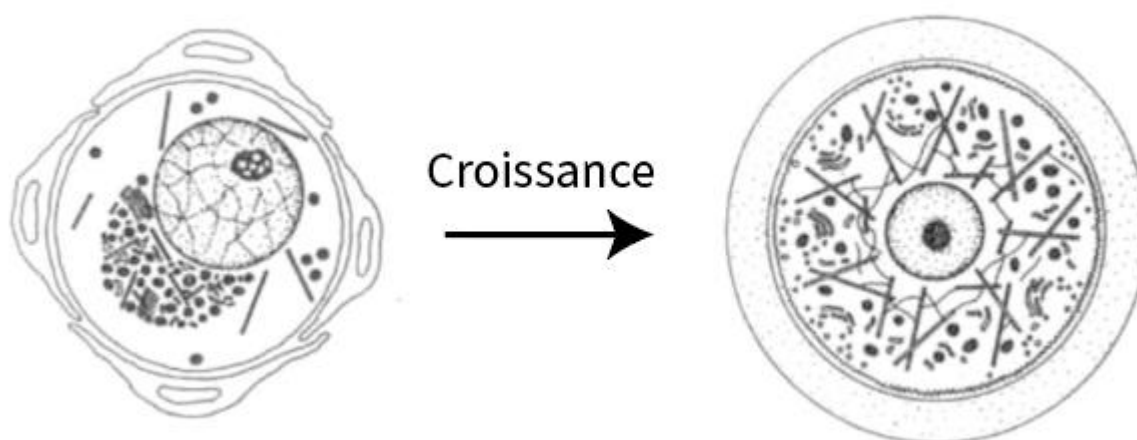


Figure 14 : Structuration du cytosquelette lors de la croissance ovocytaire. (Modifié de Sathananthan 2013).

Lors de la croissance de l'ovocyte à lieu une réorganisation des composants cytoplasmiques (mitochondries, granules corticaux dérivés de l'appareil de Golgi) par la mise en place d'un cytosquelette organisé. Durant le processus, le noyau diminue en taille et se recentre.

indépendamment du génotype de l'embryon, (pour revue (Mitchell 2022)). Le SCMC est impliqué dans le positionnement du fuseau méiotique via le réseau de F-ACTIN et certaines des sous-unités du SCMC sont suspectées de jouer un rôle dans la redistribution des mitochondries après fécondation, dans l'interaction avec des structures cytoplasmiques particulières à l'ovocyte que sont les *lattices* (CPL, ou *Cytoplasmic Lattices*), dans le contrôle de la stabilité de l'ARNm via YBX2 (Liu et al. 2017) et dans le contrôle de la traduction, (pour revue (Bebbere et al. 2016)). Durant ces quatre dernières années, il a été découvert qu'en

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE
ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

réalité le complexe SCMC et les CPLs sont d'une composition équivalente et forment ensemble une structure beaucoup plus vaste et distribuée dans tout le cytoplasme (Jentoft et al. 2023).

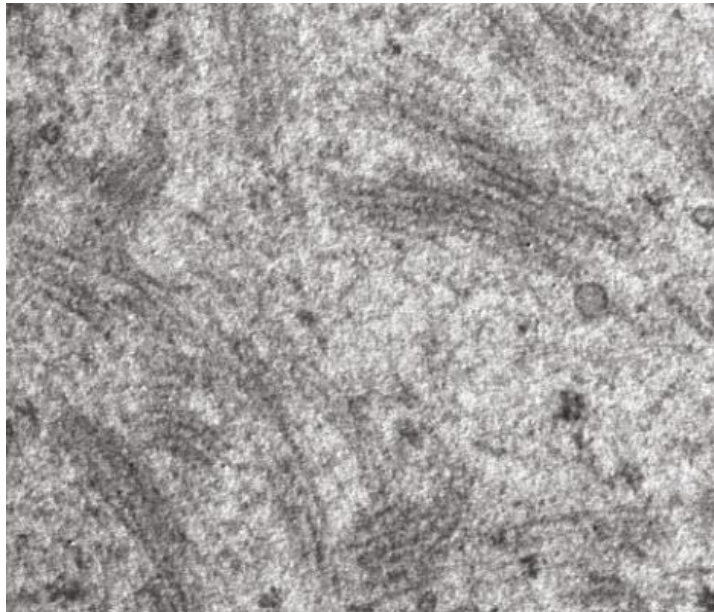


Figure 15 : Structure périodique des lattices

Les lattices (*CPLs*, CytoPlasmic Lattices) s'organisent dans le cytoplasme de l'ovocyte ce qui permet de stocker des protéines essentielles à la différenciation terminale de l'ovocyte et au début de la vie embryonnaire.

Les CPLs sont des filaments cytoplasmiques uniques à l'ovocyte qui ont été découverts dans les années 1960 (Weakley 1968) et leur fonction est restée longtemps méconnue. Par leur structure périodique particulière (**figure 15**) et leur distribution dans tout le cytoplasme, l'hypothèse était qu'il s'agissait essentiellement des filaments intermédiaires structurés (Weakley 1968) faisant office de « rails » dans lesquels étaient retenus des composants ribosomiques (Burkholder, Comings, and Okada 1971).

De nos jours, le rôle principal des *lattices* a été élucidé et correspond principalement au stockage à long terme de protéines et d'ARNs essentiels à l'ovogenèse et au début de la vie embryonnaire. Les protéines MATER et OOEP détectées par immunoélectromicroscopie (Jentoft et al. 2023 ; Tashiro et al. 2010), PADI6 et TLE6 (Cheng et al. 2022) sont les principales

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

protéines des *CPLs*. Les ovocytes conditionnellement délétés pour *Mater*, *Ooep* et *Padi6* ne forment pas de *lattices* ce qui impacte la fertilité des femelles (Tashiro et al. 2010; Vogt et al. 2019; Yurttas et al. 2008) et les granules corticaux ne se mettent pas en place suggérant que la formation et distribution des lattices est important pour la structuration cytoplasmique et le positionnement subcortical des granules corticaux (Vogt et al. 2019). Même si les mécanismes de formation *lattices* ne sont pas connus, ils ne sont pas présents au stade follicule primordial mais apparaissent pendant la croissance de l'ovocyte.

Recentrage du noyau et chromatine

D'autre part, (Almonacid et al. 2015) montrent que le recentrage du noyau de l'ovocyte et potentiellement le positionnement des organelles (Colin et al. 2020) est dû au phénomène de « diffusion active » dépendent de la dynamique de vésicules contenant de l'actine et mises en mouvement via myosin Vb. D'autre part, les ovocytes déplétés pour la formin 2, essentielle à aux branchements des filaments d'actine (F-ACTIN) présentent une désorganisation du cytoplasme (Nikalayevich et al. 2024), un noyau décentré et une réorganisation dynamique de la chromatine par remodelage de la position et du nombre de *speckles* nucléaires SRSF2 (SC-35), un facteur d'épissage de l'ARNm (Colin et al. 2020; Al Jord et al. 2022).

Ainsi, la différenciation de l'ovocyte est accompagnée d'une structuration cytoplasmique, dépendant du remodelage du cytosquelette qui influe sur la dynamique de la chromatine et potentiellement sur le contrôle de l'expression des gènes.

1.4 Variations de l'état chromatinien et transcriptionnel

Les variations dynamiques du paysage chromatinien et transcriptionnel créent un contexte unique durant la croissance de l'ovocyte qui est l'opportunité d'étudier les mécanismes contrôlant l'activité de transcription et ses variations temporelles puisque l'ovocyte en fin de croissance devient quiescent en transcription. Bien que les mécanismes d'arrêt de transcription ne soient pas tous caractérisés, plusieurs hypothèses ont été énoncées

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

et font appel aux configurations de la chromatine, aux modifications d'histones déposées en transcription active et au statut de méthylation de l'ADN.

1.4.1 Variations de l'état de compaction de la chromatine

Lors de la croissance de l'ovocyte, la chromatine adopte plusieurs états de compaction visibles sur les coupes histologiques qui attisent la curiosité depuis des décennies (**figure 16**) (Bonnet-Garnier et al. 2012). La chromatine sous forme « *Non Surrounded Nucleoli* » (NSN) présente une structure globalement décondensée avec certaines zones de condensations réparties dans le nucléoplasme (nommés chromocentres) et un nucléole proéminent. La configuration NSN est la configuration prédominante durant la croissance ovocytaire lorsque la transcription est active. En revanche, le déclin de l'activité de transcription corrèle avec l'apparition d'un contexte de chromatine extrêmement dense en forme de cercle compact qui s'organise autour de nucléole, on parle de configuration « *Surrounded Nucleoli* » (SN). La configuration SN est unique et caractéristique de l'ovocyte ayant fini sa croissance.

Même si, temporellement, la quiescence transcriptionnelle est en phase avec la survenue de la condensation de chromatine autour du nucléole, les deux événements semblent prendre place par des mécanismes distincts puisque dans les ovocytes déplétés pour la méthyltransférase (H3K4me3) KMT2B la transcription active continue à se faire en configuration SN (Andreu-Vieyra et al. 2010) et, en miroir, les ovocytes déplétés pour la nucléoplasmine (NPM) ne transitionnent pas vers la configuration SN et pourtant la transcription s'arrête tout de même (De La Fuente et al. 2004).

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

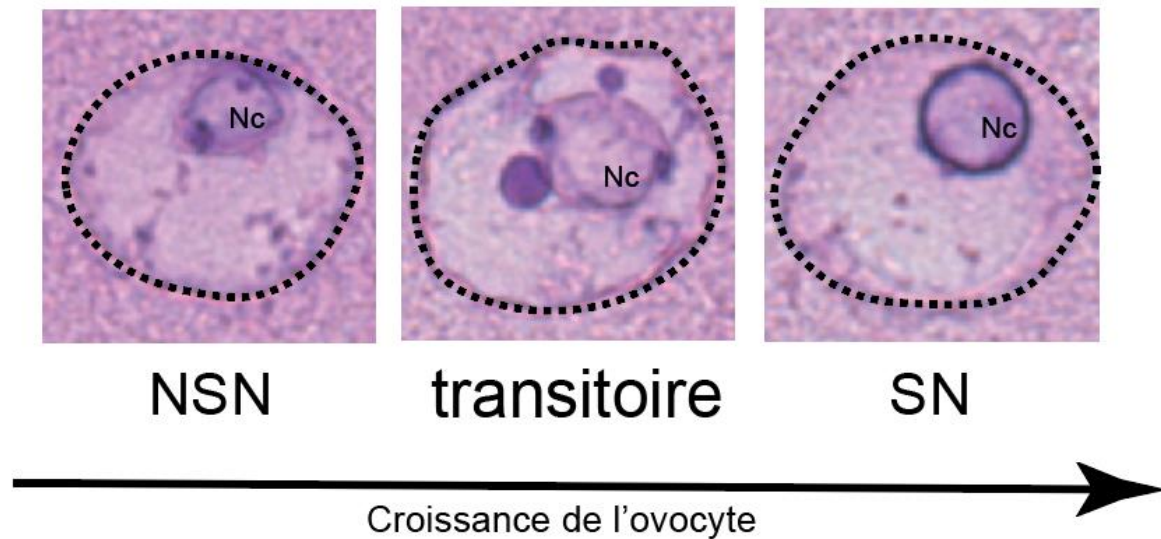


Figure 16 : Changements de la configuration de la chromatine de *Non Surrounded Nucleoli* (NSN) à *Surrounded Nucleoli* (SN) lors de la croissance ovocytaire

Coloration hématoxyline éosine montrant la dynamique chromatinienne lors de la croissance de l'ovocyte. Pointillés : position des noyau, Nc : Nucléole. Lors de la croissance ovocytaire, seulement quelques régions parsemées dans le noyau sont condensées, on parle de chromocentres. Les chromocentres correspondent à un regroupement de chromatine péri-centromérique. La configuration NSN de la chromatine est majoritairement décondensée et est associée à un contexte de transcription active. En contraste, la chromatine de l'ovocyte en fin de croissance adopte un cercle dense d'hétérochromatine qui se regroupe progressivement autour du nucléole. On parle alors de configuration SN qui corrèle avec l'entrée en quiescence transcriptionnelle et avec la fin de croissance de l'ovocyte.

1.4.2 Variations de l'activité de transcription

La transcription est élevée durant toute la croissance de l'ovocyte puis régresse progressivement dès le stade du follicule pré-antral. Dès lors, le follicule antral contient un ovocyte quiescent en transcription (**figure 17**) (Zuccotti et al. 2012) contenant, chez la souris, 200 fois plus d'ARN qu'une cellule somatique (Bachvarova 1974; Olds, Stern, and Biggers 1973; Sternlicht and Schultz 1981). Après fécondation, le processus d'Activation du Génome Zygotique (ZGA : *Zygotic Genome Activation*) engendre la reprise de l'activité de transcription. Si chez certaines espèces, à développement rapide, l'activation du génome ne survient qu'après plusieurs divisions de l'embryon (Schulz and Harrison 2019), la ZGA chez la souris survient à la fin du stade zygotique (vague mineure) et se poursuit au stade 2 cellules (vague majeure) uniquement. La vague mineure est transcriptionnellement dispersée dans le génome (Abe et al. 2015) tandis que la vague majeure est focalisée.

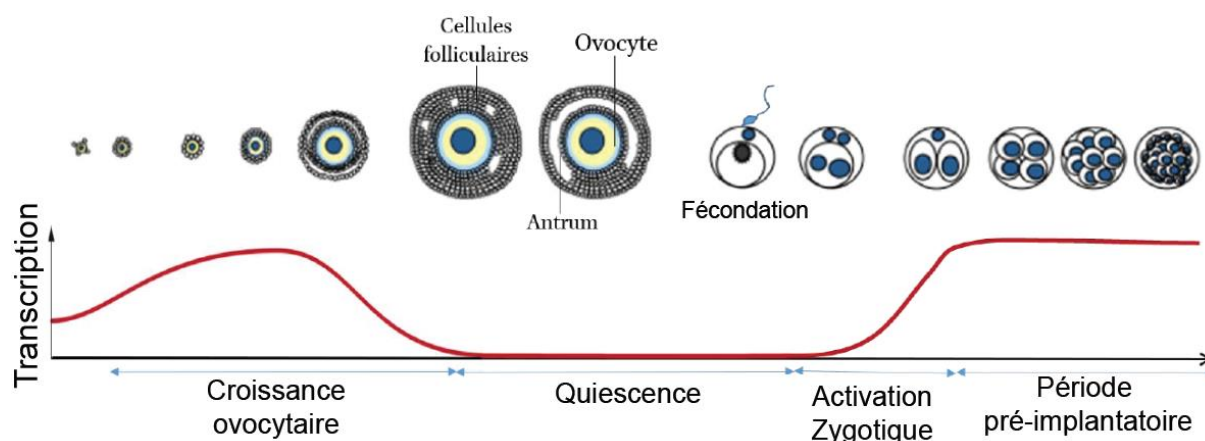


Figure 17 : Variations de l'activité de transcription ; De la folliculogénèse au début de la vie embryonnaire chez la souris (Adapté de Zuccotti et al. 2012).

L'ovocyte transcrit activement et en grande quantité durant sa croissance notamment dans les follicules primaires et secondaires. En revanche, dès le stade du follicule pré-antral, l'ovocyte est quiescent transcriptionnellement jusqu'à la fécondation où l'activité de transcription est rétablie progressivement.

1.4.3 Modifications post-traductionnelles des histones et autres hypothèses de l'arrêt de la transcription

Les modifications post-traductionnelles des histones (référées sous le nom de « marques d'histones ») sont aussi des acteurs importants qui sont régulés de façon dynamique durant l'ovogenèse. Particulièrement, de larges domaines H3K4me3 non canoniques englobant jusqu'à 22% du génome dans les régions intergéniques lors de la maturation ovocytaire ont été identifiés (Dahl et al. 2016). De plus, les marques d'histones répressives de la transcription (comme H3K9me3 et H3K27me3) co-localisent avec la configuration SN (X. Jiang et al. 2023). Mécanistiquement, l'acquisition et le maintien de la marque répressive H3K27me3 déposée par PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*) (Jarred et al. 2022) nécessite la mise en place préalable de domaines H2AK119Ub déposés en transcription active (Mei et al. 2021) lors de la croissance de l'ovocyte (Stäubli and Peters 2021). D'autre part, le détachement de l'ARN polymérase II (ARN Pol II) de la chromatine en fin de croissance (Abe et al. 2010), la déplétion et séquestration de facteurs contrôlant l'initiation de la transcription pourraient expliquer l'entrée en quiescence de l'ovocyte murin mais rien n'est reporté à ce sujet.

1.4.4 Méthylation de l'ADN

Chez les mammifères, les profils de méthylation de l'ADN des PGCs sont progressivement retirés par des vagues de déméthylation suivant au moins deux mécanismes : Une déméthylation passive et une déméthylation active dépendantes, respectivement, des enzymes DNMT (*DNA Methyl Transferase*) et TET (*Ten-Eleven Translocase*), pour revue (Zeng and Chen 2019). Ce n'est que lors de la croissance de l'ovocyte que les profils de méthylation *de novo* sont remis en place via DNMT3A (**figure 18**) (Shirane et al. 2013; Smallwood et al. 2011). L'inactivation conditionnelle de *Dnmta* dans les cellules

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

germinales résulte en la stérilité (Kaneda et al. 2004). DNMT3A contient une activité enzymatique et n'est pas spécifique aux cellules germinales. En revanche, DNMT3L ne contient pas d'activité enzymatique, est un co-facteur de DNMT3A spécifique aux cellules germinales et sa déplétion cause la stérilité chez le mâle mais aucun phénotype n'est reporté chez la femelle (Bourc'his and Bestor 2004; Kato et al. 2007).

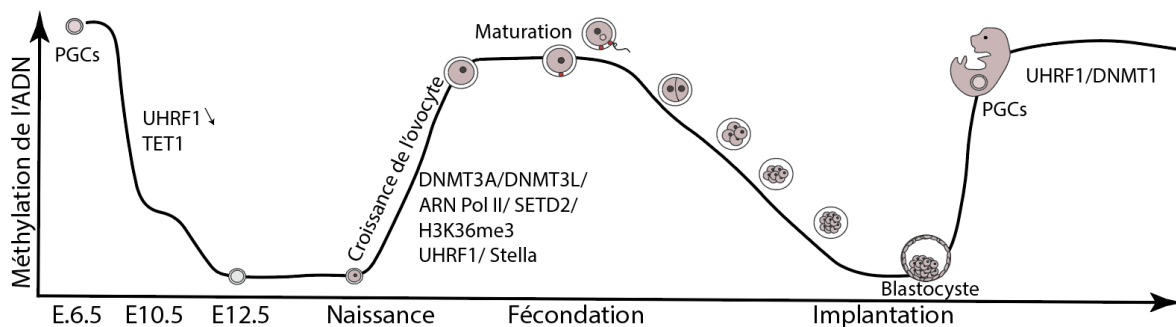


Figure 18 : Vagues de méthylation/ déméthylation des ovocytes (Adapté de Cler et al. 2009).

DNMT3A/ DNMT3L et DNMT3B sont impliquées dans la méthylation *de novo* alors que DNMT1 est impliquée dans la maintenance des profils de méthylation. Durant la croissance de l'ovocyte un système de mise en place des profils de méthylation particulier a été mis en évidence : La méthylation de l'ADN dépend de la marque d'histones H3K36me3 déposée en transcription active lors de la croissance de l'ovocyte.

Les modifications dynamiques des histones précèdent la méthylation de l'ADN durant la croissance de l'ovocyte (Stewart et al. 2015). En particulier, la méthyl transférase SETD2 est impliquée dans la mise en place de la marque H3K36me3. SETD2 est recrutée par RPB1, la plus grande sous unité de l'ARN polymérase II, en transcription active durant la croissance de l'ovocyte. La marque H3K36me3 permet l'acquisition de la méthylation de l'ADN par le complexe DNMTA/DNMT3L qui, pour son action, nécessite des zones dépourvues de H3K4me3 ou H3K4me2 (Stewart et al. 2015). En effet, les marques d'histones H3K4me3 et H3K4me2 sont réfractaires au dépôt des marques de méthylation sur l'ADN et à la déposition de H3K36me3 par SETD2 (Stewart et al. 2015). Une déficience en SETD2 dans l'ovocyte résulte en l'absence de mise en place de la marque H3K36me3, en l'incapacité d'établir le méthylome

CHAPITRE 1: LA LIGNEE GERMINALE, DETERMINATION DU SEXE, OVOGENESE ET IDENTITE DE L'OVOCYTE

de novo, en la persistance des domaines H3K4me3 (Xu et al. 2019) et en l'altération de la progression méiotique (Baumann 2019; Li et al. 2018).

De plus, la protection contre l'hypo et l'hyperméthylation de l'ADN est cruciale. Cette balance est régulée en partie par STELLA qui recrutée sur la modification d'histone H3K9me2 protège le génome maternel de la déméthylation précoce (Nakamura et al. 2007). STELLA contrôle la distribution subcellulaire d'UHRF1 qui régule la méthylation médié par DNMT1 dans les cellules mammifères (Bostick et al. 2007). L'absence de STELLA mène à la translocation nucléaire excessive de DNMT1 durant la croissance ovocytaire et résulte en l'hyperméthylation de l'ADN par DNMT1 ce qui impacte la fertilité (Li et al. 2018).

D'autre part, les domaines hétérochromatine co-localisent avec les chromocentres et HP1 β et sont dynamiques durant la croissance de l'ovocyte. En particulier, la réorganisation des foci HP1 β suit la compaction de la chromatine SN suggérant aussi son implication dans la mise en place de la quiescence transcriptionnelle (Bonnet-Garnier et al. 2013; Meglicki, Zientarski, and Borsuk 2008). Ainsi, la croissance de l'ovocyte est accompagnée d'une réorganisation chromatinienne et une compaction par méthylation de l'ADN qui coïncident avec l'émergence de la quiescence transcriptionnelle.

Chapitre 2

Régulation de la chromatine et Transcription

2. Ouverture de la chromatine et stabilisation du Complexe de Pré-Initiation (PIC)

Dans ce chapitre, les principaux acteurs permettant l'accès à la chromatine et le contrôle de la transcription seront décrits. Je me focaliserai principalement aux mécanismes qui permettent l'accès à la chromatine, à l'ARN Pol II, et aux étapes qui permettent son recrutement. Je commencerai par des généralités, des processus canoniques, puis sur des cas par cas, non canoniques, qui témoignent de l'importance de la diversité des processus biologiques régulant la transcription.

Deux principales régions de la chromatine ont été mises en évidence. L'hétérochromatine, ou contexte chromatinien condensé, restreint l'accès à l'ADN des facteurs de régulation de la transcription. En contraste, l'euchromatine, ou contexte chromatinien décondensé, facilite l'accès aux complexes multiprotéiques de type ATPases ou portant des activités enzymatiques. Leur action conjointe permet la mise en place d'un environnement chromatinien permissif au recrutement de l'ARN Pol II et à la stabilisation des acteurs régulant la transcription.

2.1 Facteur pionnier

Par définition, un facteur pionnier est un facteur de transcription qui a la capacité d'interagir rapidement et directement avec l'ADN en contexte de chromatine dense. L'interaction d'un facteur pionnier avec l'ADN nucléosomal via la séquence qui lui est spécifique, engendre un relâchement partiel et local en réduisant l'interaction avec les

nucléosomes et permet l'ouverture de la chromatine via le recrutement de deux classes de complexes co-activateurs : les remodeleurs et les modificateurs d'histones (pour revue (Barral and Zaret 2024)). Leur action conjointe facilite le recrutement et l'occupation d'autres facteurs de transcription spécifiques au lignage cellulaire (Biddie et al. 2011; Iwafuchi-Doi 2019; Mercer et al. 2011; Zaret and Mango 2016).

2.2 Remodeleur de la chromatine

Un remodeleur est un complexe multiprotéique intervenant dans la structuration de la chromatine et la mise en place d'un environnement permissif à la transcription. Les remodeleurs de la chromatine assurent les changements de composition et de disposition des nucléosomes. Les familles principales de remodeleurs SWI/SNF sont ATP-indépendants et ATP-dépendants comprenant respectivement 11 et 16 membres. Les 27 remodeleurs contiennent un site catalytique en forme de deux lobes RecA-like caractéristique des translocases (Becker and Workman 2013). La famille de complexes ATP-dépendants est subdivisée en 4 groupes qui sont largement et majoritairement impliqués dans le contrôle de la transcription : SWI/SNF, ISWI, CHD et INO80 (Bracken, Brien, and Verrijzer 2019; Clapier et al. 2017; Koster, Snel, and Timmers 2015; Moshkin et al. 2012) (**figure 19**). Les 4 groupes divergent par leurs structure et substrats sur lesquels ils agissent. Notamment, la spécificité est donnée par les domaines qu'ils contiennent comme le chromodomaine de la famille CHD qui reconnaît les marques de méthylation des histones et l'ADN méthylé, ou alors le bromodomaine et le crochet AT de la famille SWI/SNF qui reconnaissent, respectivement, les lysines acétylées et les séquences riches en AT.

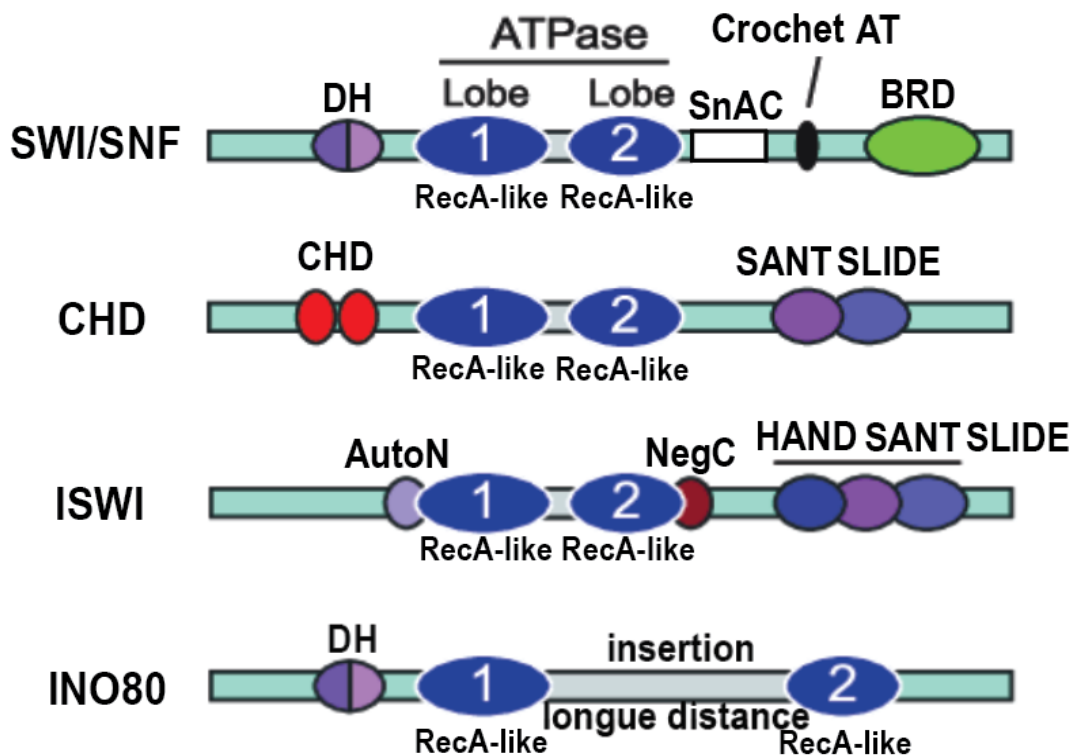


Figure 19: Caractéristiques des sous-unités catalytiques ATP-dépendantes des quatre classes de remodeleurs (Bracken et al.2019.)

Les deux lobes RecA-like ATP dépendants sont présents dans les quatre familles de remodeleurs. La famille SWI/SNF contient un bromodomaine (BRD) capable de lier les lysines acétylées et un crochet AT reconnaissant les séquences riches en AT. Le domaine SnAC est structuellement important pour l'interaction et l'éviction du nucléosome. La famille CHD comme son nom l'indique contient un chromodomaine capable de reconnaître et interagir avec les marques de méthylation. La classe ISWI contient deux domaines flanqués de part et d'autre des lobes RecA-like : AutoN et NegC qui permettent de moduler finement leur activité en contrôlant le taux de couplage et d'hydrolyse d'ATP. La famille INO80 se distingue par son insertion longue entre les deux lobes ATP-dépendants, conférant une plus grande flexibilité d'action. SWI/ SNF et INO80 intègrent aussi un domaine hélicase (DH) capable de dérouler l'ADN. Enfin, les domaines HAND, SANT et SLIDE présents dans certains remodeleurs CHD et ISWI favorisent, coordonnent et renouvellent l'action de translocation.

Un remodeleur agit continuellement en moyenne sur quatre nucléosomes différents (Moshkin et al. 2012). Leur mode d'action sur le nucléosome, afin de donner accès à la chromatine, peut procéder par glissement, restructuration, désassemblage partiel, éviction complète ou même d'insertion substitutive de variants d'histones non conventionnels comme H2A.Z et H3.3.

2.3 Nucléosomes, modificateurs d'histones et transcription

Le nucléosome est un octamère d'histones (2xH2A, 2xH2B, 2xH3 et 2xH4). Chaque histone expose en dehors de sa structure son extrémité N-terminale (N-ter) et les deux histones H2B exposent aussi leurs C-terminaux (C-ter). Ces 10 projections de queues d'histones subissent des modifications post-traductionnelles (PMT) qui rendent dynamique l'état de compaction chromatinien et l'accès aux promoteurs (**figure 20**)(R. Liu et al. 2023). En particulier, des enzymes éditrices spécialisées au type de modification ajoutent (« *writers* ») ou suppriment (« *erasers* ») des groupements sur des résidus d'acides aminés. Les modificateurs d'histones les éditent de manière post-traductionnelle sur les extrémités C-ter et N-ter.

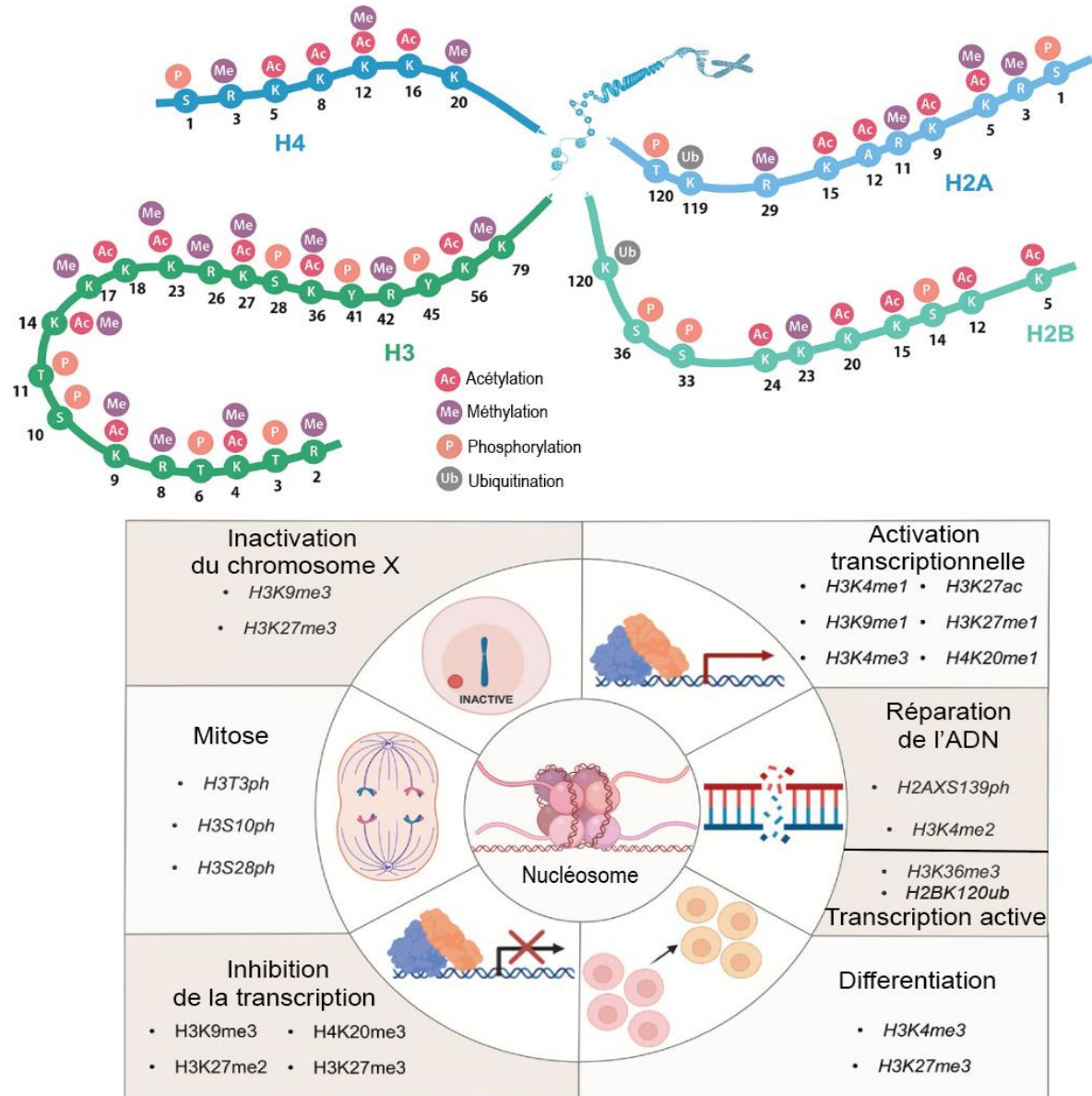


Figure 20: Code histone et ses principales fonctions cellulaires associées (Liu et al. 2023).

Vue d'ensemble des principales modifications nucléosomales récurrentes. Les queues d'histones (H2A, H2B, H3, H4) sont représentées avec les positions respectives aux modifications post-traductionnelles. Elles sont associées à la régulation de l'activation et la répression transcriptionnelle, et modifiées activement lors de processus cellulaires comme la mitose et la différenciation.

2.3.1 Code histone et découverte de la première enzyme histone acétyl transférase (HAT)

Plus d'une centaine de modifications post-traductionnelles (PTM *Post Translational Modifications*) des histones été découvertes rendant leur étude complexe et fascinante. Des positions précises sur les résidus de queues d'histones exposés en dehors du nucléosome subissent des modifications récurrentes, on parle de « code histone ». L'une des premières hypothèses du code histone fut énoncée dans (Strahl and Allis 2000) et la découverte de la première enzyme acétyltransférase d'histone (HAT- *Histone Acetyl Transferase*) KAT2A/GCN5 mit en lien la modification de chromatine et la transcription médiée par l'ARN Pol II (Brownell et al. 1996). Chez les métazoaires, KAT2A est retrouvée dans des complexes multiprotéiques différents comme le complexe Spt-Ada-Gcn5-acétyltransferase (SAGA) et Ada2a-containing complex (ATAC) (Krebs et al. 2011; Nagy et al. 2010).

2.3.2 SAGA, un complexe modificateur d'histones à plusieurs facettes

2.3.2.1 Découverte de SAGA

De façon anecdotique, la découverte de SAGA s'est faite en même temps que TFTC humain (TATA-binding protein-free TAF_{II} complex). Les deux complexes, régulant la transcription et comprenant des protéines TAFs avaient la particularité de ne pas contenir systématiquement la protéine TBP. Plus tard, on s'est rendu compte qu'en réalité TFTC avait une composition très similaire à SAGA (Brand et al. 1999; Helmlinger and Tora 2017; Wieczorek et al. 1998). De fait, TFTC et SAGA était un seul et même complexe.

2.3.2.2 Composition et caractéristiques fonctionnelles

Le complexe coactivateur SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acétyltransferase) est subdivisé en 5 modules aux fonctions distinctes : le module acétyl transférase (HAT), le module de dé-ubiquitination (DUB), le module core structural, le module d'interaction TF et le module d'épissage (présent chez les métazoaires). SAGA et ATAC partagent 3 protéines sur quatre du module HAT (KAT2A /B, SGF29 et ADA3) à l'exception des paralogues ADA2A et ADA2B qui

sont spécifiques, respectivement, d'ATAC et de SAGA (pour revue (Helmlinger and Tora 2017)). Chez les métazoaires, le module DUB est responsable de la dé-ubiquitination de l'histone H2B mono-ubiquitiné (H2Bub1) qui est une marque initialement déposée durant la transcription (F. Wang et al. 2021). En revanche, même si la dé-ubiquitination de H2B est nécessaire au développement, la transcription ARN Pol II n'est globalement pas affectée en son absence chez les mammifères (F. Wang et al. 2021).

Les mêmes sous unités partagées entre les complexes multiprotéiques de régulation de la transcription sont l'opportunité d'étudier les interfaces et spécificités médiées par ces complexes. SAGA partage des sous unités avec d'autres complexes multiprotéiques (**figure 21**). TRRAP est retrouvé dans le complexe TIP60, ENY2 dans le complexe TREX-2 et TAF9, TAF10 et TAF12 sont retrouvées dans TFIID. En contraste, chez les métazoaires TAF5 et TAF6 sont exclusifs à TFIID alors que les paralogues, chez les métazoaires, TAF5L et TAF6L sont uniquement retrouvés dans SAGA (**figure 21**) (Helmlinger et al. 2021; Helmlinger and Tora 2017).

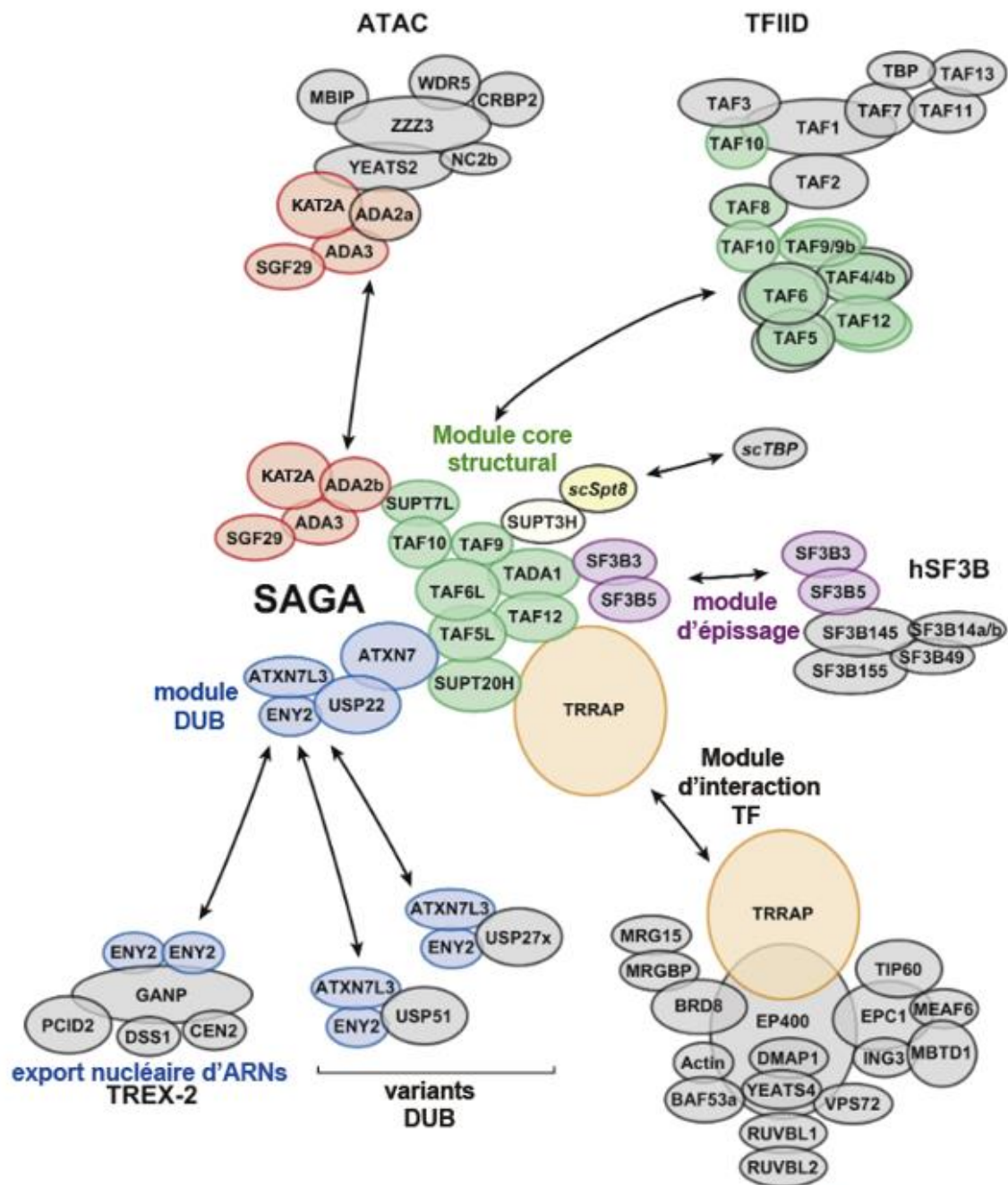


Figure 21 : Sous-fonctionnalisation des sous-unités des modificateurs d'histones. (Helmlinger, Tora 2017).

Le complexe SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acétyltransferase) partage ces sous-unités avec d'autres complexes multiprotéiques impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes. Sc : *Saccharomyces cerevisiae*.

De plus, la sous-unité de SAGA, SPT8, permet la déposition de TBP chez la levure (Baptista et al. 2017). En revanche, chez les métazoaires, SAGA ne contient pas SPT8 mais incorpore à la place un homologue de SPT3 (SUPT3H) qui n'est pas associé à la déposition de TBP (Fischer et al. 2022). Ainsi le mécanisme de déposition de TBP chez les métazoaires n'est pas clair.

2.4 Polymérases d'ARN

2.4.1 ARN Polymérases (ARN Pols) nucléaires : composition et fonction

Les ARN Pols sont des complexes multiprotéiques qui catalysent le processus de transcription. Cinq ARN Pols ont été identifiées : ARN Pols I, II, III, IV et V, pour revue (Roeder 2019). Les ARNs Pol IV et V sont spécifiques des plantes et associées à la répression de la transcription (Marasco et al. 2017). Les ARN Pols I, II et III sont les polymérases nucléaires (Girbig, Misiaszek, and Müller 2022). Les ARNs que les ARN Pol synthétisent font partie de classes distinctes. L'ARN Pol I synthétise le précurseur 45S. L'ARN Pol II est l'unique responsable de la synthèse des ARNs messagers (mRNA), de longs ARNs non codants (lncRNA) dont des précurseurs de micro-ARNs (miRNA) et de petits ARNs nucléolaires (snoRNA). L'ARN Pol III synthétise les petits ARNs dont les ARNs de transfert (tRNA), de petits ARNs nucléaires (snRNA), l'ARNs ribosomique 5S et des miRNAs.

L'ARN Pol I comporte 14 sous-unités, l'ARN Pol II 12 sous-unités et l'ARN Pol III en contient 17. Les ARN Pol I II et III ont en commun 5 sous unités (RPB5, RPB6, RPB8, RPB10 et RPB12) (**figure 22**) (Abel et al. 2018).

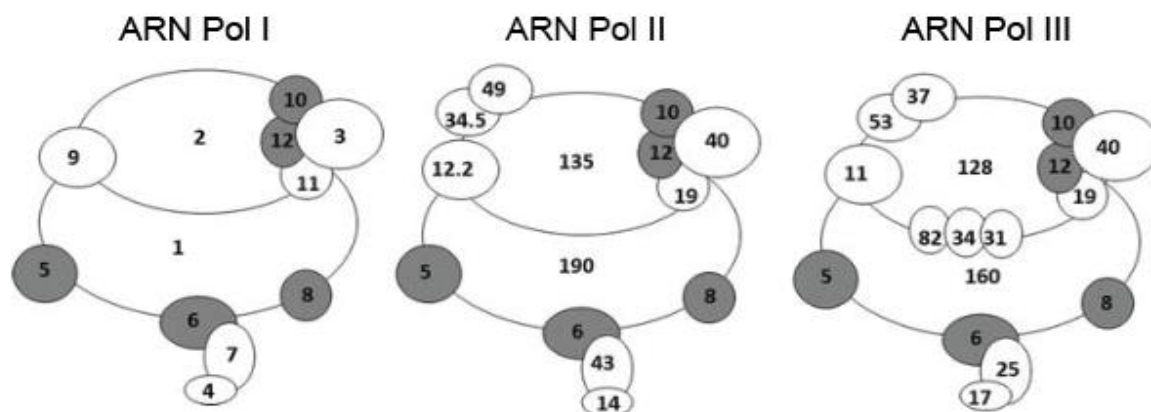


Figure 22 : Conservation des sous unités entre les ARN Pols I II et III. (Abel et al. 2018).

5 sous-unités sont communes aux trois polymérases nucléaires. (RPB5, RPB6, RPB8, RPB10 et RPB12).

2.4.2 Focus sur l'ARN Pol II et ses Facteurs Généraux de la transcription (GTFs)

L'ARN Pol II, à elle seule, ne permet pas de transcrire efficacement (Weil et al. 1979). Elle nécessite l'association avec des facteurs protéiques nommés Facteurs Généraux de la Transcription (GTFs, *General Transcription Factors*) comme le démontrent les études pionnières des années 1980 (Matsui et al. 1980; Weil et al. 1979). Les expériences de transcription *in vitro* avec le promoteur majeur de l'Adénovirus 2 combiné à des extraits cellulaires fractionnés par chromatographie a permis de purifier les facteurs associés à la transcription. Certaines fractions protéiques stimulant l'activité de synthèse ARN Pol II étaient différentes de celle de l'ARN Pol I et III qui avaient déjà commencé à être caractérisées (Matsui et al. 1980; Weil et al. 1979). L'hypothèse que la transcription ARN Pol II était complexe et impliquait une panoplie de facteurs uniques a émergé. Chaque ARN Pol contient son « arsenal » de GTFs, (pour revue (Girbig et al. 2022)). Le complexe de Pre-Initiation (PIC, *Pre-Initiation Complex*) fonctionnel est formé de 6 GTFs (TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIIF et TFIIH et de l'ARN Pol II).

2.5.1 Promoteur basal et initiation de la transcription

Le promoteur basal est défini comme la plus petite séquence d'ADN nécessaire à l'initiation de la transcription. Le promoteur basal se situe entre -50 paires de bases et +50 paires de bases du site d'initiation de la transcription (*TSS : Transcription Start Site*). Ces positions sur l'ADN renferment des séquences consensus conservées nommées motifs ou éléments de promoteur basal (EPBs) qui intègrent la syntaxe moléculaire nécessaire à la régulation de l'initiation de la transcription (**figure 23**), pour revue (Juven-Gershon and Kadonaga 2010).

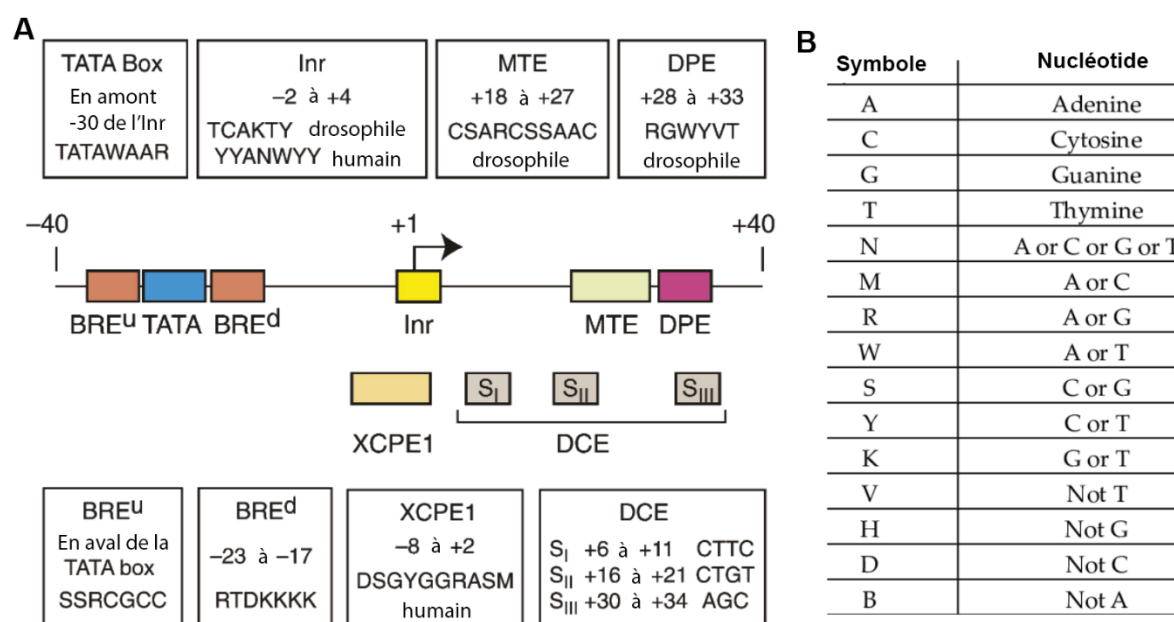


Figure 23 : Eléments de promoteur basal (Juven-Gershon et Kadonaga, 2010).

(A) Les différents éléments de promoteur basal sont représentés avec leurs positions relatives au site d'initiation de la transcription (TSS *Transcription Start Site*). Inr: *Initiator*, MTE: *Motif Ten Eleven*, DPE: *Downstream Promoter Element*, BRE: *TFIIB-Recognition Element*, XCPE: *X-gene Core Promoter Element 1*, DCE: *Downstream Core Element*. (B) Symboles et code nucléotidique.

Les EPBs apportent une partie des instructions à la formation du complexe de pré-initiation (PIC : *Pre-Initiation Complex*) et permettent de stabiliser la machinerie ARN Pol II. Pour exemple, TBP reconnaît la boîte TATA, TFIID est capable d'interagir avec le motif Inr qui constitue le site d'initiation de la transcription (position +1), et de reconnaître les séquences DPE et MTE. De plus, TFIIB reconnaît et est stabilisé sur le motif bipartite BRE lorsqu'il est présent.

Plus loin, je donnerai la composition du PIC. Ici, je me limiterai à la vue d'ensemble, aux étapes d'initiation et d'élongation de la transcription. Dans leur état initial, les GTFs et l'ARN Pol II au promoteur basal forment le complexe fermé (**figure 24**) (Girbig et al. 2022). Une fois la bulle de transcription sur place, c'est-à-dire que les deux brins d'ADN sont dissociés, on parle de complexe ouvert. Ensuite, il s'agit du complexe engagé lorsque la synthèse de l'ARN messager a commencé. Enfin, le complexe d'élongation désigne l'ARN Pol II activée qui quitte le promoteur basal et continue à transcrire.

2.5.1.1 Etat de pause de l'ARN Pol II

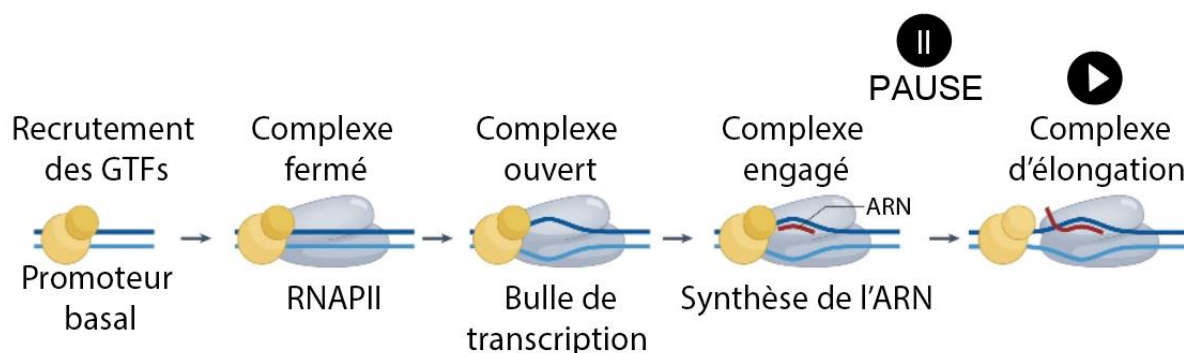


Figure 24 : Etapes de l'initiation de la transcription (Adapté de Girbig et al. 2022).

Entre le complexe engagé et d'élongation à lieu l'état de pause de l'ARN Pol II qui se caractérise par son arrêt momentané.

Le complexe ouvert fait référence à la bulle de transcription qui permet l'initiation de la transcription. L'ARN Pol II transcrit environ 50 nucléotides et s'arrête en état de pause, conférant un niveau de contrôle supplémentaire à la synthèse des transcrits (Fuda, Ardehali, and Lis 2009; Henriques et al. 2013; Levine 2011; Li and Gilmour 2011). Mécanistiquement,

l'interaction du complexe *5,6-Dichloro-1-β-d-Ribofuranosylbenzimidazole Sensitivity-Inducing Factor* et *Negative Elongation Factor* (DSIF /NELF) sur l'ARN Pol II engagée en transcription est responsable de son arrêt momentané. Structuellement, NELF exerce une action inhibitrice en interagissant avec DSIF, l'ARN pré-existant, via son domaine RRM (*RNA Recognition Motif*), et l'ARN Pol II (Vos et al. 2018). De plus, NELF exclut les facteurs d'élongation comme TFIIIS et masque les surfaces d'interaction sur lesquelles TFIIIB, TFIIIE et TFIIH interagissent avec l'ARN Pol II (Vos et al. 2018).

2.5.1.2 Levée de l'état de pause et élongation

La partie C-ter de RBP1 consiste en la répétition en tandem hautement conservée chez les eucaryotes d'un heptapeptide YSPTSPS : Tyrosine (1), Sérine (2), Proline (3), Thréonine (4), Sérine (5), Proline (6), Sérine (7). L'heptapeptide est répété jusqu'à 52 fois chez les vertébrés et les sérines aux positions 2 et 5 corrélient avec l'état d'avancement de la transcription de l'ARN Pol II (Egloff, Dienstbier, and Murphy 2012). Notamment, la phosphorylation en position 5 (via la CDK7 de TFIIH) est caractéristique de l'initiation de transcription et coïncide avec l'initiation de la transcription et la formation de la bulle de transcription. Tandis que la phosphorylation en position 2 est une signature du complexe d'élongation qui dépend du complexe P-TEF. Le complexe P-TEFb est constitué d'une kinase et d'une cycline, respectivement la CDK9 et la Cycline T. Via la sous-unité CDK9, P-TEFb, phosphoryle NELF qui se dissocie alors de l'ARN Pol II et de DSIF. DSIF reste associé avec l'ARN Pol II et contribue à l'élongation. Ainsi, DSIF, est un exemple de facteur inhibiteur qui devient stimulateur de la transcription une fois dissocié de NELF (**figure 25**)(Levine et al. 2011). Aussi, l'action de la kinase CDK9 est une étape pivot car elle permet aussi de recruter les sous-unités de maturation de l'ARNm (épissage, polyadénylation) et de terminaison de la transcription

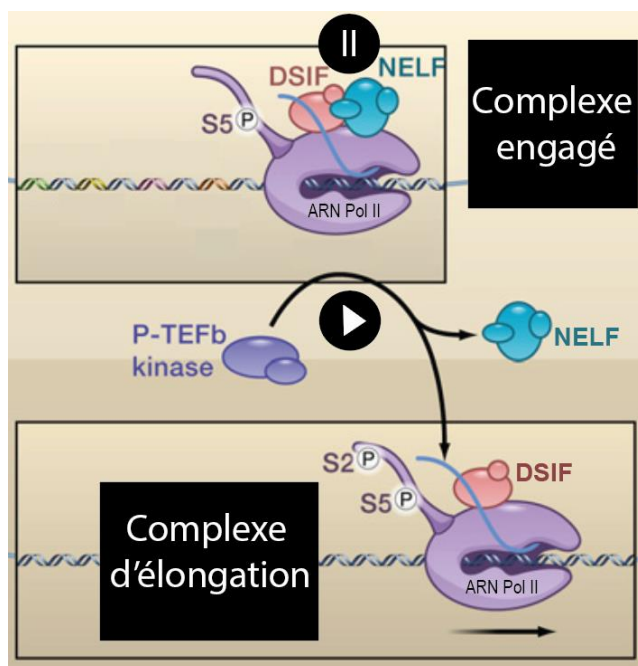


Figure 25 : Pausing, complexe engagé et d'élongation (Adapté de Levine et al. 2011).

La phosphorylation de NELF et de la Ser2 du C-ter de RPB1, par P-TEFb, résultent en la libération de DSIF qui reste accroché sur l'ARN Pol II et favorise l'élongation de la transcription.

2.5.1.3 Epissage de l'ARNm

L'épissage est un mécanisme co-transcriptionnel complexe de maturation de l'ARNm par lequel des séquences introniques sont excisées et par lequel prend place la ligation des exons correspondants (Shenasa and Bentley 2023). Notamment, la phosphorylation pSer5 du CTD de RPB1 est nécessaire au recrutement des facteurs d'épissage (McCracken et al. 1997; Nojima et al. 2018; Rimel et al. 2020).

Le mécanisme d'épissage modifie l'information génétique portée par l'ARNm et génère de la diversité dans les séquences des transcrits qui sont exportées dans le cytoplasme. Deux types d'épissage ont été identifiés : l'épissage constitutif et l'épissage alternatif. L'épissage constitutif permet l'élimination de la totalité des introns qui ne contribueront donc pas à la diversification d'isoformes de transcrits. En contraste, l'épissage alternatif permet la rétention de certains introns et le brassage combinatoire des exons permettant la génération, par le complexe d'épissage, d'isoformes d'ARNm uniques. Le complexe d'épissage ou *spliceosome* est formé de cinq nucléoprotéines (snRNPs *small nuclear ribonucleoproteins*) nommées U1, U2, U4, U5 et U6. De plus, les facteurs de la famille SR (*Serine and arginine-rich*) sont des

régulateurs des sous-unités du *spliceosome* qui modulent finement leur activité et contrôlent l'export nucléaire des ARNm (pour revue (Long and Cáceres 2009)). Notamment l'IDR (*Intrinsically Disordered Region*) de SRRM2 orchestre la formation de foci nucléaires impliqués dans le blocage de l'épissage alternatif par rétention des introns (Xu et al. 2022). D'autre part, certains facteurs d'épissage comme SC-35 interagissent directement avec le CTD de RPB1 et avec la CDK9 leur conférant un rôle actif durant l'étape d'élongation l'ARN Pol II (Lin et al. 2008). Notamment, SC-35 induit l'accumulation de l'ARN Pol II aux séquences transcrites (*gene body*) ce qui corrèle avec un défaut de recrutement de P-TEFb et la réduction des niveaux pSer2 du CTD de RPB1 (Lin et al. 2008).

2.5.1.4 Terminaison de la transcription

Deux modèles de terminaison de la transcription ont été proposés : le modèle allostérique et le modèle « torpedo ». Selon le modèle allostérique, la transcription de la séquence AAUAAA nommé PAS (*PolyAdenylation Séquence*) causerai le changement conformationnel de l'ARN Pol II qui ralentit en élongation et relâche l'ARN dans le nucléoplasme (Eaton et al. 2020). Selon le modèle « torpedo », le produit du clivage de la séquence PAS par le facteur CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity factor*) est dégradé par l'exonucléase XRN2 qui par son action déplace l'ARN Pol II et termine la transcription (Connelly and Manley 1988; Proudfoot 1989; West, Gromak, and Proudfoot 2004). Un modèle unifié de terminaison a aussi été proposé et implique le ralentissement de l'ARN Pol II en élongation par la phosphatase PP1 ce qui favorisai le clivage du PAS par le facteur CPSF73 et la terminaison de la transcription (Eaton et al. 2020).

2.5.2 Facteurs Généraux de la Transcription

Depuis la découverte des Facteurs Généraux de la Transcription (GTFs), l'une des préoccupations principales a été de comprendre leur composition et la manière dont ils sont recrutés au promoteur afin d'initier la transcription (Ohler and Wassarman 2010; Roeder 2019; Tora 2002). Comme vu précédemment, certains d'entre eux ont la capacité de

reconnaître directement la séquence d'ADN. Pour d'autres, leur incorporation dans les complexes multiprotéiques est essentielle à leur recrutement.

Modèle d'assemblage séquentiel

TFIID (TBP) est le premier Facteur Général de la Transcription (GTF : *General Transcription Factor*) à interagir avec le promoteur basal (Sainsbury, Bernecky, and Cramer 2015). L'interaction de TBP via son domaine C-ter (en forme de « selle de cheval ») sur la séquence promotrice, qu'elle soit riche en AT ou non, engendre une courbure à 80° de l'ADN favorisant l'assemblage du PIC (Blair, Goodrich, and Kugel 2012 ; Delgadillo et al. 2009). TFIIA est ensuite recruté et stabilise l'interaction (pour revue (Schier and Taatjes 2020)). Ensuite, TFIIIB reconnaît le complexe ADN-TFIID-TFIIA et peut s'ancrer sur le motif bipartite BRE (Nikolov et al. 1995). TFIIIB est à son tour stabilisé par le recrutement du complexe indépendant formé par TFIIIF et l'ARN Pol II (formant le complexe fermé de la transcription) (Chen et al. 2010; Gaiser, Tan, and Richmond 2000). Enfin TFIIIE et TFIIH complètent le PIC de l'initiation de la transcription favorisant la formation des complexes ouverts, engagés et d'élongation (Chen, Warfield, and Hahn 2008).

2.5.2.1 TFIID, composition et structuration

TFIID est composé de la protéine TBP (*TATA- Binding Protein*) et 13 facteurs associés (TAFs : *TBP associated factors*) (Patel, Greber, and Nogales 2020; Sainsbury et al. 2015).

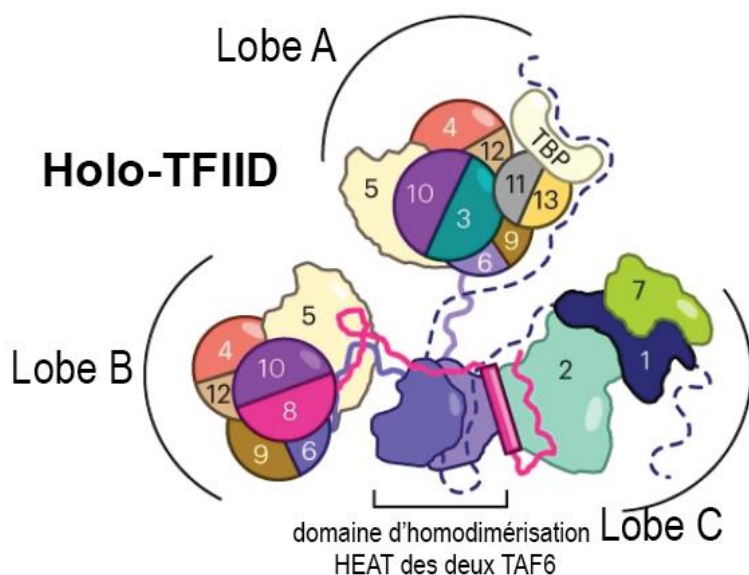


Figure 26 : Le complexe TFIID et la composition des trois lobes (Scheer et al. 2021).

Les deux TAF6 interagissent par leur domaine d'homodimérisation HEAT ce qui renforce la cohésion du complexe.

TFIID présente une structure à trois lobes (lobe A, lobe B et lobe C) (**figure 26**) (Bernardini et al. 2023; Scheer et al. 2021). Les lobes A et B se distinguent principalement par la sous-unité qui s'associe avec TAF10 : dans le lobe A il s'agit de TAF3 ; dans le lobe B c'est TAF8 qui par son interaction avec TAF2 en C-ter ancre les lobes B et C ensemble. Des complexes partiels du complexe TFIID sont retrouvés dans le cytoplasme et nombreux d'entre eux ont été cristallisés (Gupta et al. 2016). Récemment, il a été mis en évidence que TFIID s'assemble séquentiellement dans le cytoplasme par le mécanisme d'assemblage co-translationnel sur TAF1 et est importé rapidement dans le noyau (Bernardini et al. 2023; Kamenova et al. 2019). Ces découvertes représentent une avancée majeure dans le domaine d'investigation.

9 TAFs sur 13 contiennent un domaine HF (HFD : *Histone Fold Domain*) qui peuvent former une hétérodimérisation spécifique (pour revue (Gangloff et al. 2001)). TFIID comprend des sous-unités présentes en deux copies (TAF4, 5, 6, 9, 10 et 12) et certaines en une seule copie (TAF1, 2, 3, 7, 8, 11 et 13 et TBP). En conséquence, les interactions HF TAF11/13, TAF10/3 et TAF10/8 sont représentées une seule fois, alors que les paires HF TAF4/12 et TAF9/6 sont retrouvées deux fois dans le complexe. Ainsi, TAF10 est central dans TFIID et est retrouvé dans deux lobes distincts (A et B). En contraste, TAF7 est le dernier à être recruté sur le C-ter de TAF1 naissant via le motif T7iD (Bernardini et al. 2023). Les TAFs cités sont les TAFs canoniques. Cependant, certains TAFs et TBP ont des paralogues qui seront abordés plus loin.

2.5.2.2 TFIIA

TFIIA est composé de deux ($\alpha\beta$ et γ) ou de trois sous unités (α/β et γ) selon le contexte cellulaire. Le clivage protéolytique par la TASPASE1 de TFIIA $\alpha\beta$ génère TFIIA α et TFIIA β . Le clivage de TFIIA est une étape augmentant la susceptibilité pour dégradation par le protéasome (Høiby et al. 2004). Le mécanisme de recrutement de TFIIA sur le PIC dépend notamment de son domaine à six feuillets β qui interagit avec le N-ter de TBP (Geiger et al. 1996). TFIIA favorise l'assemblage du PIC. En effet, TFIIA interagit directement avec TAF4/12 via le déplacement de la paire HF TAF11/13 qui masque initialement le site d'interaction de TBP à TFIIB (Anandapadamanaban et al. 2013; Gupta et al. 2017)

2.5.2.3 TFIIB

TFIIB est le seul GTF à n'être composé que d'un seul polypeptide. TFIIB est impliqué dans le recrutement de l'ARN Pol II et l'interaction de TBP (Hawkes and Roberts 1999; Pardee, Bangur, and Ponticelli 1998). En effet, TFIIB peut s'ancrer stablement et de manière orientée de part et d'autre du TSS, reconnaît le complexe TBP-ADN (Nikolov et al. 1995) et s'insère en miroir de TFIIA sur TBP (**figure 27**). Le « ruban β » de TFIIB (Hahn 2004) interagit directement avec l'ARN Pol II en proximité de son site actif (Kostrewa et al. 2009; Sainsbury et al. 2015).

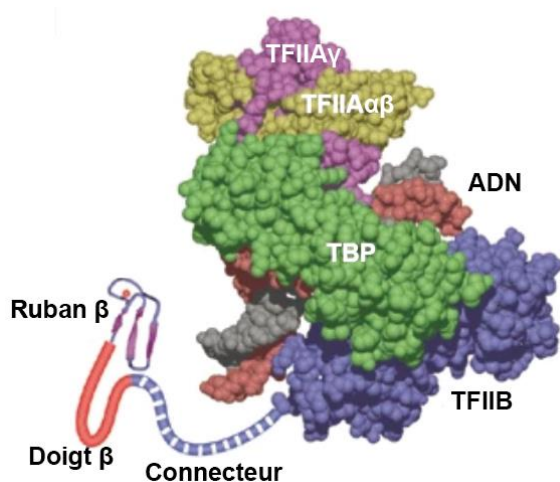


Figure 27 : TFIIB s'insère en miroir de TFIIA sur TBP et expose son ruban β (Hahn 2004).

Un connecteur flexible permet l'exposition, en dehors du complexe TFIID(TBP)-ADN-TFIIA-TFIIB, du ruban β de TFIIB via un « doigt β » qui interagit avec le centre actif de l'ARN Pol II.

Ainsi, TFIIB consolide par un lien physique direct TBP, l'ADN et l'ARN Pol II en permettant son recrutement (Chen and Hahn 2003).

2.5.2.4 TFIIF et l'ARN Pol II

L'ARN Pol II et TFIIF forme un complexe indépendant (Flores, Maldonado, and Reinberg 1989) et sont recrutés en même temps (Burton et al. 1988; Roeder and Roeder 1996; Söpta, Carthew, and Greenblatt 1985). TFIIF est un hétérodimère composé des sous-unités TFIIF α et TFIIF β (respectivement *RNA-Associated Proteins* RAP74 et RAP30) qui dimérisent via la structuration en tonneau de leurs deux extrémités N-ter (Floress, Ha, and Reinberg 1990 ; Gaiser, Tan, and Richmond 2000). TFIIF stabilise TFIIB contribuant à la sélection du TSS et interagit avec l'ARN Pol II, TAF1 et l'ADN (Chen et al. 2010; Fang and Burton 1996; Mühlbacher

et al. 2014; Wang and Burton 1995). L'ajout de TFIIF au PIC en construction engendre son changement conformationnel (He et al. 2013) permettant le passage du complexe fermé au complexe ouvert après le recrutement de TFIIH via TFIIIE (Maxon, Goodrich, and Tjian 1994).

2.5.2.5 TFIIIE

TFIIIE est un hétérodimère formé par TFIIIE α et TFIIIE β . La partie C-ter de TFIIIE α est suffisante pour l'interaction avec TFIIIE β et pour l'initiation de la transcription (Ohkuma et al. 1995). Le dimère formé s'étend depuis TFIIF jusqu'à l'ARN Pol II et interagit avec RPB1 (Chen et al. 2008). TFIIIE α contient un domaine WH (*WH : Winged-helix*) et TFIIIE β en contient deux qui permettent respectivement l'interaction avec l'ARN Pol II et la stabilisation sur le promoteur (Grünberg, Warfield, and Hahn 2012). TFIIIE recrute TFIIH et ensemble TFIIIE et TFIIH sont impliqués dans le maintien de la bulle de transcription (complexe ouvert) (Kandiah et al. 2014)

2.5.2.6 TFIIH

TFIIH contient 10 sous-unités organisées en trois modules, un module « *core* » structural, un module hélicase et un module kinase. Le module hélicase est ATP dépendant pour l'ouverture de l'ADN et comprend les sous-unités XPB et XPD (Conaway and Conaway 1989). Le module kinase (aussi nommé trimère TFIHK ou CAK) dont l'activité est assurée par la CDK7 permet de phosphoryler le C-ter de RPB1 (Feaver et al. 1994). TFIIH est aussi impliqué dans la réparation de l'ADN et son altération mène à l'apparition de maladies chez l'homme comme *Xeroderma pigmentosum* (Van Brabant, Stan, and Ellis 2000; Coin et al. 1999; Singh et al. 2015). TFIIH est stabilisé par TFIID, TFIIIE et TFIIF qui facilitent la formation du complexe ouvert (Okuda et al. 2016).

2.6 Variabilité de l'initiation de la transcription

2.6.1 Phénotypes suggérant une variabilité de TFIID lors du développement

TFIID est nécessaire au développement de l'embryon puisque les délétions de *Taf5*^{-/-} (He et al. 2024), *Taf7*^{-/-} (Gegonne et al. 2012), *Taf8*^{-/-} (Voss et al. 2000), *Taf10*^{-/-} (Mohan et al.

2003), *Taf12*^{-/-} (He et al. 2024) et *Tbp*^{-/-} (Martianov, Viville, and Davidson 2002) mènent à la dégénération de l'embryon de souris au stade blastocyste et les embryons *Taf13*^{-/-} ne mettent pas en place les feuillets embryonnaires (He et al. 2024). Néanmoins, dans ces six mutants, les annexes embryonnaires se développent tout de même ce qui suggère que les TAFs sont requis de manière différentielle dans ces cellules. De même, TAF4 n'est pas requis pour la spécification de nombreux tissus embryonnaires (Langer et al. 2016) mais les fœtus meurent dans la période mi-gestationnelle dû, notamment, à des défauts de la morphogenèse ventral et du positionnement du cœur.

D'autre part, les mutations conditionnelles des TAFs suggèrent une certaine variabilité lors du développement de la souris. Alors que TAF7 est requis pour la prolifération et différenciation précoce, TAF7 n'est pas requis pour l'étape de maturation lors différenciation terminale des thymocytes (Gegonne et al. 2012). De façon similaire, TAF10 est requis pour la mise en place de la barrière cutanée chez le fœtus alors que chez l'adulte TAF10 n'est pas requis dans l'épiderme (Indra et al. 2005). TAF10 n'est pas non plus toujours requis pour la formation des somites (Bardot et al. 2017) et pour la différenciation des hépatocytes (Tatarakis et al. 2008).

2.6.2 Paralogues

Au cours de l'évolution des espèces, les événements de duplication ont mené à l'expansion des séquences codantes pour certains TAFs et pour TBP (Müller and Tora 2004). Les paralogues constituent une opportunité de diversification des mécanismes de contrôle de la transcription (Levine, Cattoglio, and Tjian 2014; Müller and Tora 2004). De nombreuses études, parues ces dernières décennies, proposent des modèles alternatifs de la régulation de l'initiation de la transcription qui sont originaux de par la composition du PIC qu'ils intègrent. Ainsi, le modèle traditionnel (TFIID : 13 TAFs canoniques + TBP) qui est quasi-ubiquitaire chez les eucaryotes, est revisité.

2.6.2.1 Paralogues des TAFs et incorporation dans TFIID

Six *Tafs* ont un paralogue : *Taf1*, *Taf4*, *Taf5*, *Taf6*, *Taf7* et *Taf9*. TAF1L est uniquement retrouvé chez les primates et spécifique à la lignée germinale mâle (Wang and Page 2002). TAF1L peut interagir avec TBP mais l'incorporation dans TFIID n'est pas étudiée (Wang and Page 2002). TAF4B est présent chez les vertébrés, et TAF7L et TAF9B sont présents chez les placentaires (Antonova et al. 2019). *In vivo*, TAF4B et TAF9B sont capables de s'incorporer dans TFIID (Bardot et al. 2017b ; Liu et al. 2008) et TAF7L peut interagir avec TAF1 et TBP (Pointud et al. 2003) mais son intégration dans TFIID est indétectable dans certains contextes (Bardot et al. 2017). Bien que TAF9B puisse s'incorporer dans TFIID (Frontini et al. 2005), d'un point de vue fonctionnel le défaut des neurones est associé plutôt à SAGA qu'à TFIID (Herrera et al. 2014). De même, TAF5L et TAF6L sont aussi spécifiques à SAGA chez les métazoaires (Helmlinger and Tora 2017). Les paralogues des TAFs qui sont connus pour interagir avec des sous unités de TFIID sont représentés en **figure 28**, tirée de la revue (Müller, Zaucker, and Tora 2010).

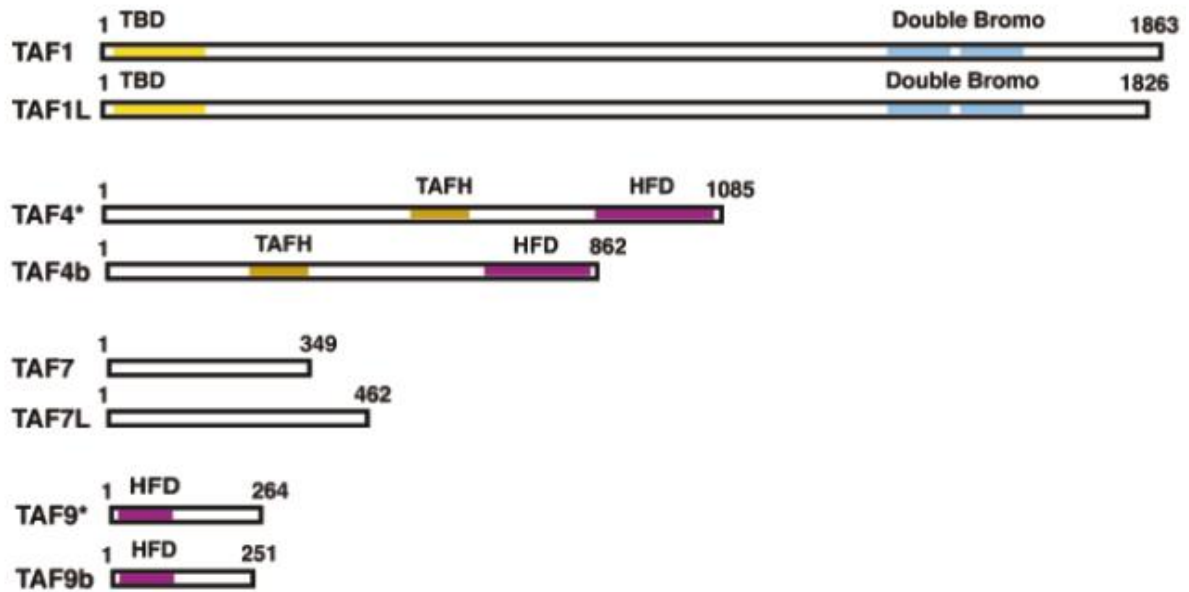


Figure 28 : Paralogues des TAFs potentiellement capables de s'incorporer dans TFIID (Müller, Zaucker, and Tora 2010).

TBD: *TBP-Binding Domain*; Bromo: *Bromodomaine*; TAFH: *domaine d'homologie de TAF4*; HFD: *Histone Fold Domain*.

2.6.2.1a Fonction de TAF7L dans la différenciation cellulaire

TAF7 partage 47% d'identité avec TAF7L chez la souris. TAF7L contribue à la différenciation des adipocytes blancs (**figure 29**) mais aussi à l'orientation de différenciation du tissu adipeux brun et des spermatides en fin de différenciation (Martianov et al. 2016; Pointud et al. 2003; Zhou, Grubisic, et al. 2013). De plus, l'expression ectopique de TAF7L dans des cellules musculaires *in vitro* est suffisant à la reprogrammation en adipocytes (Zhou, Kaplan, et al. 2013).

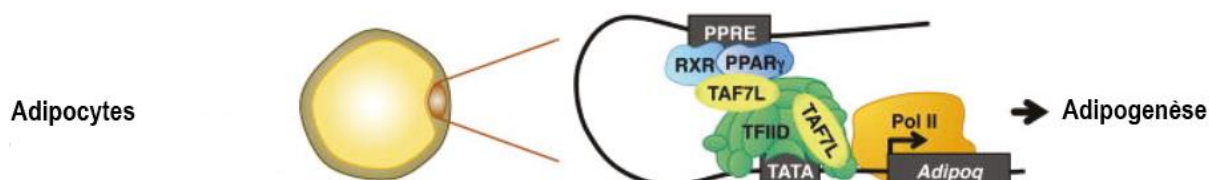


Figure 29 : TAF7L et adipogenèse (Levine et al. 2014).

TAF7L est nécessaire à l'activation des gènes spécifiques au lignage adipocytaire. D'une part, TAF7L interagit avec PPAR γ sur les séquences distales. D'autre part, TAF7L interagit avec TBP et s'incorpore potentiellement dans TFIID permettant la régulation de la transcription par l'ARN Pol II des gènes adipogéniques. PPRE: *PPAR γ Response Element*, RXR: *Rexinoids receptor*, Adipoq : *Adiponectin*.

2.6.2.1a Fonction de TAF4B dans la différenciation cellulaire

TAF4 partage 45 % d'identité TAF4B chez la souris. L'expression de TAF4B est enrichie dans gonades mâles et femelles et contrôle le maintien des cellules germinales (Falender, Freiman, et al. 2005; Falender, Shimada, et al. 2005; Freimann, Albright 2001). Les mâles dépourvus de TAF4B présentent une dégénérescence gonadique. Bien que fertiles au début de la vie reproductive, ils sont complètement stériles trois mois après la naissance dû à la perte progressive de cellules germinales (Falender, Freiman, et al. 2005; Lovasco et al. 2015). De plus, les femelles dépourvues de TAF4B sont complètement stériles dû à un défaut de mise en place des follicules primordiaux (Freimann, Albright 2001). De fait, les ovaires *Taf4b*^{-/-} sont réduits en taille dès la naissance et les quelques follicules primordiaux détectés présentent un

blocage de progression méiotique précoce de la transition pachytène vers diplotène qui se caractérise par une absence d'appariement de chromosomes homologues (asynapsis) (Grive et al. 2016). Les promoteurs cibles de TAF4B comprennent *Stra8*, *Figla* et *Dazl* (Grive et al. 2016) qui sont essentiels à la progression méiotique et de la différenciation terminale des ovocytes après la naissance. Les mutants *Taf4b*^{-/-} présentent une mort précoce de la réserve ovocytaire en l'espace d'un jour après la naissance (Grive et al. 2014). Le profil d'expression de *Taf4b* est soumis à controverse : certains articles disent que *Taf4b* est exclusivement exprimé dans l'ovocyte (Falender, Shimada, et al. 2005), d'autres montrent une expression dans les cellules folliculaires uniquement (Freimann, Albright 2001).

2.6.1.2 Paralogues de TBP

TBP possède trois paralogues (**figure 30**) qui ont été découverts par leur conservation du domaine C-ter, pour revue (Akhtar and Veenstra 2011): TRF (*TBP-Related Factor*) uniquement retrouvé chez les insectes (Hansen et al. 1997), TBPL1 (*TATA-Binding Protein-like*

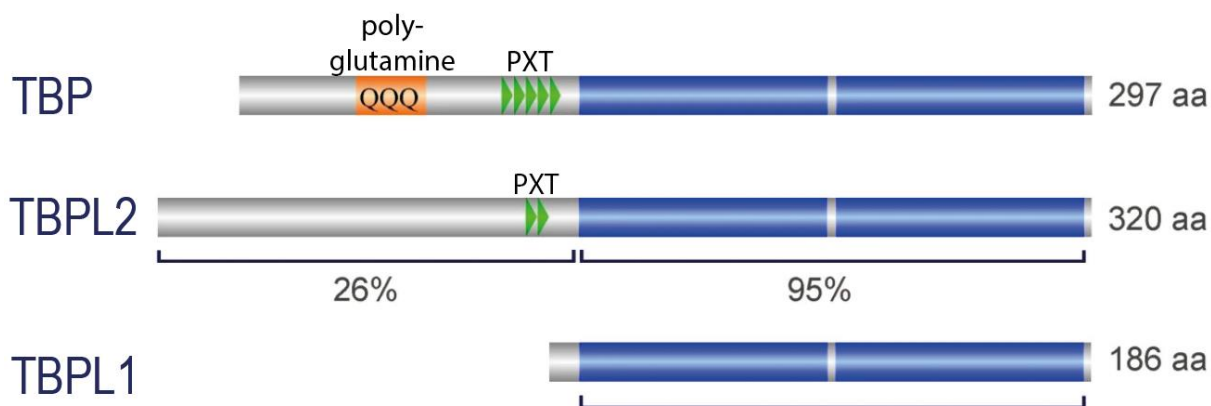


Figure 30 : Paralogues de TBP chez les vertébrés (Akhtar, Veenstra, 2011).

TBPL2 est le troisième paralogue de TBP. TBPL2 conserve un 95% d'identité au C-ter avec TBP ; le N-ter, quant à lui, est divergent avec un 26% d'identité (et absent dans TBPL1). Alors que le N-ter de TBP contient un segment poly-glutamine et cinq répétitions PXT (Proline-X-Thréonine), le N-ter de TBPL2 ne contient que deux répétitions PXT et n'intègre pas de segment poly-glutamine.

1, TLF ou TRF2) chez tous les organismes multicellulaires (Zehavi et al. 2015), et TBPL2 (*TATA-Binding Protein-like*, TBP2 ou TRF3) qui est restreint aux vertébrés (Di Pietro et al. 2007).

2.6.1.2a TBPL1 chez le poisson zèbre

TBPL1 est exprimé dans la période embryonnaire précoce chez le poisson zèbre (Müller et al. 2001). L'injection dans le zygote d'un ARNm codant pour des formes mutées pour TBPL1 et de TBP (mutations ponctuelles résultant en l'incapacité d'interagir avec TFIIB) résulte en la létalité des embryons dans la période de mise en place des feuilletts embryonnaires (stade épibolie) (Müller et al. 2001). Ces résultats sont reproduits par l'injection d'un inhibiteur de l'ARN Pol II (α -amanitine), ce qui suggère que l'altération de la gastrulation chez le poisson zèbre est due au défaut d'activation du génome embryonnaire par TBP et TBPL1. De plus, les la déplétion de TBP individuellement ou de TBPL1 ne résulte pas aux mêmes changements de l'expression des gènes (Müller et al. 2001). Ces résultats suggèrent que TBPL1 peut partiellement substituer ou agir ensemble avec TBP pour la fonctionnalité de l'ARN Pol II dans l'embryon (Müller et al. 2001). Rien n'est reporté sur l'expression de TBPL1 dans l'ovocyte du poisson zèbre.

2.6.1.2b TBPL1 chez le xénope

TBPL1 est exprimé dans les gonades et les embryons de Xénope durant l'étape de clivage et *blastula* (Jacobi et al. 2007; Veenstra, Weeks, and Wolffe 2000). Par l'injection d'oligonucléotides antisens permettant de dégrader les ARNm codant TBPL1 dans l'embryon précoce, les auteurs montrent que TBPL1 est nécessaire au développement, de manière différente à TBP, et à la transcription durant la période *mid-gastrula* (Veenstra et al. 2000). D'autres rôles complémentaires de TBPL1 ont aussi été reportés pour la protection des télomères et dans la réplication de l'ADN (Muraki et al. 2011) ce qui suggère la versalité de TBPL1 dans certains contextes cellulaires.

2.6.1.2c TBPL1 chez la souris

TBPL1 conserve avec TBP un 41% d'identité au C-ter, le N-ter n'est pas présent tout comme chez les autres vertébrés (Rabenstein et al. 1999). TBPL1 est exprimé dans différents

tissus et enrichi dans le testicule (Martianov et al. 2001; Rabenstein et al. 1999). Durant la spermatogenèse, TBPL1 interagit avec TAF7L et ensemble TBPL1/TAF7L régulent l'expression des gènes post-méiotiques (Zhou, Grubisic, et al. 2013). Les mâles déplétés pour TBPL1 présentent un défaut de formation de l'acrosome, qui est un organite juxtaposé au noyau. La majorité des spermatides rondes meurent par apoptose, ainsi la progression de différenciation vers des spermatides allongés est bloquée (Martianov et al. 2001; Zhang et al. 2001; Zhou, Grubisic, et al. 2013).

De plus, TFIIA et son paralogue ALF sont co-exprimés dans les spermatides ce qui suggère, que dans ce contexte, différentes compositions de PIC peuvent être présentes en même temps et réguler des promoteurs de manière différentielle voire complémentaire (Martianov et al. 2016). En effet, TBPL1 interagit avec TFIIA et/ou ALF et est recruté aux promoteurs spécifiques des spermatides avec TAF7L, TBP et l'ARN Pol II (**figure 31**). Il est intéressant de noter que le clivage de TFIIA par la protéase TASPASE1 est nécessaire pour la fonction de TBPL1 sur les promoteurs de la spermatogenèse (Oyama et al. 2013).

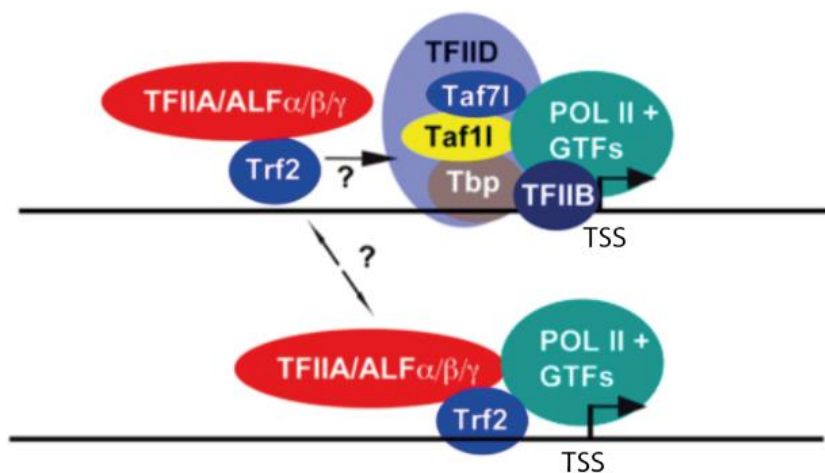


Figure 31 : TBPL1 en association avec TFIIA et son paralogue ALF régulent la transcription des gènes durant la spermatogenèse. (Martianov et al. 2016).

TSS: *Transcription Start Site*, GTF: *General Transcription Factors*, POL II (ARN polymerase II).

Aucun rôle de TBPL1 dans l'ovocyte n'a été reporté. Cependant, il est intéressant de noter que l'expression de son transcrit est détecté dans les ovocytes en croissance (Yu et al. 2020).

2.6.1.2d TBPL2 chez le poisson zèbre

TBPL2 est enrichi dans les gonades, des traces sont aussi retrouvées dans le rein et le cerveau (Bárfai et al. 2004). L'expression de TBP est faible dans le zygote et augmente au stade *morula* puis s'élève progressivement jusqu'à la gastrulation (*midblastula*). En revanche, TBPL2 est présent dans le zygote et son expression continue dans l'embryon au moins jusqu'au stade 5 somites. Ces résultats suggèrent des rôles distincts pour TBP et TBPL2 voir complémentaires dans l'embryon. Les études de déplétion de TBPL2 ont mis en évidence des perturbations des mouvements de la gastrulation (comme l'élongation de l'embryon) (Hart et al. 2007). De plus, chez le poisson zèbre, TBPL2 est capable d'interagir avec TFIIA et TFIIB (Bárfai et al. 2004).

2.6.1.2e TBPL2 chez le xénope

Dans les embryons, TBPL2 est moins abondant que TBP mais TBPL2 peut partiellement compenser la déplétion de TBP (Jallow et al. 2004). TBPL2 est nécessaire à la gastrulation et à la transcription dans l'embryon de Xénope (Jallow et al. 2004). En revanche, dans les ovocytes, TBPL2 est recruté aux constructions de promoteurs injectés au stade GV en l'absence de détection de TBP et la dégradation de TBPL2 durant la maturation de l'ovocyte coïncide avec la répression de la transcription (Akhtar and Veenstra 2009). En miroir, après fécondation, *Tbp* est transcrit à nouveau et la protéine TBP réapparaît durant les premiers clivages (Akhtar and Veenstra 2009). Ensemble ces données suggèrent un rôle spécialisé de TBPL2 pour la transcription dans l'ovocyte de Xénope.

2.6.1.2f TBPL2 chez la souris

Contrairement au poisson zèbre et au xénope, l'expression de TBPL2 chez la souris est restreinte à l'ovaire, à la croissance ovocytaire spécifiquement (**figure 32**) (Gazdag et al. 2007), et lorsque l'expression de TBPL2 est forcée dans le zygote cela mène à la létalité embryonnaire

au stade pré-implantatoire (Gazdag et al. 2009). Certains papiers suggéraient que TBPL2 chez la souris est nécessaire pour la différenciation des muscles striés squelettiques (Deato et al. 2008; Deato and Tjian 2007). Cependant ces papiers sur TBPL2 ont été remis en question puisqu'aucun phénotype n'a été retrouvé dans le muscle dans le mutant *Tbpl2* et qu'un rôle de TFIID a été mis en évidence (Gazdag et al. 2009; Malecova et al. 2016). Durant la croissance de l'ovocyte, l'expression de TBP est abolie alors que TBPL2 est exprimé tout le long (Gazdag et al. 2007). Dans ce contexte, TBPL2 n'interagit pas avec les TAFs, mais forme un complexe stable avec TFIIA (Yu et al. 2020). Ensemble, le complexe TBPL2/TFIIA contrôle l'initiation de

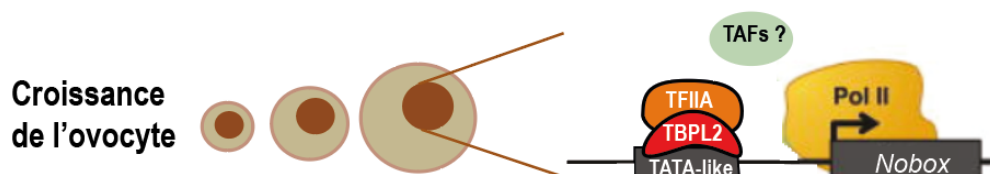


Figure 32: TBPL2 contrôle la croissance de l'ovocyte

Durant la croissance ovocytaire, le complexe TBPL2/TFIIA contrôle l'initiation de la transcription indépendamment des TAFs dont leurs profils d'expression ne sont pas connus dans ce contexte.

la transcription de l'ARN Pol II suivant une « grammaire »/ un usage des TSS particulière focalisée (mode *sharp*), différente de celle de TBP dont l'usage des TSS est plus dispersé (mode *broad*) (Yu et al. 2020). Les femelles déficientes pour *Tbpl2* sont stériles dû au blocage de la transition du follicule primaire à secondaire (Gazdag et al. 2009). Les ovocytes *Tbpl2*^{-/-} ne grandissent pas complètement en taille, leur chromatine est décondensée et l'expression des gènes d'identité de l'ovocyte est impactée (Gazdag et al. 2009).

De plus, en absence de TBPL2 le séquençage d'ARNs totaux de l'ovocyte à 14 jours après la naissance a révélé que 1802 des transcrits, identifiés et comparés au WT, sont régulés à la baisse tandis que 1396 transcrits sont régulés à la hausse (Yu et al. 2020). Cette observation est surprenante compte tenu du rôle de TBPL2 dans l'initiation de la transcription. Les analyses computationnelles ont permis de mettre en évidence que les transcrits régulés à la baisse sont enrichis dans la catégorie « ribonucléase poly(A) », suggérant que les transcrits

régulés à la hausse pourraient être la conséquence d'un défaut dans le système de stabilité/dégradation de l'ARN messager (Yu et al. 2020).

Les différents paralogues des TAFs et TBP sont listés (**Tableau 1**) (Antonova et al. 2019)

Tableau 1: Paralogues des TAFs et de TBP

Facteur	Paralogue	Expression du paraglogue	Interaction directe ou indirecte mise en évidence	Contexte	Références bibliographiques
TAF1	TAF1L	Restreint aux primates	TBP	Spermatogenèse chez l'homme	(Wang and Page 2002)
TAF4	TAF4B	Restreint aux vertébrés	Incorporation dans TFIID en absence de TAF4	Formation des follicules primordiaux	(Freiman et al. 2001; Grive et al. 2014, 2016)
TAF7	TAF7L	Placentaires	TBP, TAF1	Spermatogenèse Adipogenèse	(Pointud et al. 2003; Zhou, Grubisic, et al. 2013; Zhou, Kaplan, et al. 2013)
TAF9	TAF9B	Placentaires	TAF6	Neurogenèse	(Chen and Manley 2003; Frontini et al. 2005; Francisco

					J Herrera et al. 2014)
TBP	TRF1	Restreint aux insectes	/	/	(Hansen et al. 1997))
	TRF2 (TBPL1)	Restreint aux métazoaires	TAF7L ALF TFIIA TFIIB	Spermatogenèse	(Martianov et al. 2001; Zehavi et al. 2015; Zhou, Grubisic, et al. 2013)
	TRF3 (TBPL2)	Restreint aux vertébrés	TFIIA TFIIB	Croissance de l'ovocyte	(Akhtar and Veenstra 2009; Gazdag et al. 2009; Yu et al. 2020)

Chapitre 3

Stabilité et dégradation du transcriptome

Dans une cellule somatique, la durée de vie d'un ARN messenger est variable et de l'ordre de quelques secondes, minutes voire quelques heures (Sharova et al. 2009; Wang and Liu 2022), tandis que la demi-vie d'un ARN messenger dans un ovocyte est beaucoup plus longue pouvant atteindre jusqu'à 3 semaines (Brower et al. 1981; De Leon, Johnson, and Bachvarova 1983). Qu'est-ce qui rend l'ovocyte aussi unique pour permettre la stabilisation à longue durée des ARNs messagers ? Quels sont les paramètres à tenir en compte qui l'expliquent ? Pour répondre à ces questions essentielles, il est nécessaire de s'intéresser aux mécanismes de contrôle de la stabilité de l'ARNm et de les intégrer avec les spécificités de l'ovocyte en différenciation. Dans ce chapitre, je décrirai les mécanismes de contrôle de stabilité du transcriptome de l'ovocyte. Tous les ARNs stockés dans l'ovocyte sont dits « dormants » et constituent le transcriptome maternel (Tora and Vincent 2021). En parallèle, j'intégrerai des notions essentielles au contrôle de la stabilité du transcriptome dans les cellules somatiques.

L'ovocyte contient 10 fois plus ARNs qu'une cellule somatique (Piko and Clegg 1982) et 20% de ces ARNs sont des ARNm très stables (Bachvarova and De Leon 1980; Brower et al. 1981; De Leon et al. 1983; Piko and Clegg 1982). Comme vu au chapitre 1, l'ovocyte est transcriptionnellement quiescent en fin de croissance. De fait, la stabilité du transcriptome et des protéines maternelles sont nécessaires à la maturation de l'ovocyte et au développement précoce de l'embryon. Dans toute cellule, la régulation de la stabilité de l'ARNm est multifactorielle. Dès la synthèse d'un transcrit, les modifications post-transcriptionnelles et l'interaction séquentielle avec des protéines régulatrices assurent la stabilisation de l'ARNm. Notamment, la protection de l'ARNm dépend de l'acquisition d'une coiffe (*cap*) à l'extrémité 5' et de la synthèse d'une queue poly(A) à l'extrémité 3'.

3.1 Régulation co-transcriptionnelle de la stabilité de l'ARNm

3.1.1 La coiffe

L'acquisition d'une coiffe est un mécanisme co-transcriptionnel régulé par la phosphorylation du CTD de RPB1 (Cho et al. 1997), qui nécessite trois activités enzymatiques séquentielles : une triphosphatase, une guanylyltransferase et une méthyltransférase sur le carbone en position N7. (Ramanathan, Robb, and Chan 2016). L'ajout du groupement 7 méthyl guanosine (7mG) joue un rôle dans toutes les étapes de la vie d'un ARN messager comme la maturation (Edery and Sonenberg 1985; Konarska, Padgett, and Sharp 1984), l'export nucléaire (Hamm and Mattaj 1990), le contrôle de la stabilité par protection contre les exonucléases, et la traduction (Furuichi, LaFiandra, and Shatkin 1977; Muthukrishnan et al. 1975).

3.1.2 La queue poly(A)

En fin de synthèse de l'ARNm, la polymérisation d'une queue poly(A) en 3' est un mécanisme à deux étapes. La première est le clivage endonucléolytique de l'ARN via la reconnaissance par le complexe CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*) de la séquence de polyadénylation (PAS : *PolyAdenylation Site*) AAUAAA ou AUUAAA (Clerici et al. 2018; Hamilton, Sun, and Tong 2019) située dans le 3'UTR de l'ARNm. La deuxième étape est le recrutement de la polymérase de poly(A) (PAP α : *Poly(A) Polymerase α* , aussi nommée PAPOLA). La longueur de la queue poly(A) conditionne la stabilité de l'ARNm. Notamment, la queue poly(A) confère, comme la coiffe, une protection contre les exonucléases, et contrôle son export nucléaire et la stabilisation lors de la traduction, (pour revue (Passmore and Coller 2021)). La longueur de la queue poly(A) est comprise généralement entre 30 à 100 nucléotides bien qu'elle puisse atteindre 250 nucléotides (H. Chang et al. 2014; Subtelny et al. 2014).

3.1.3 Poly(A) Binding Proteins (PABPs)

Les PABPs représentent la classe majeure de protéines régulatrices de la stabilité de la queue poly(A). Cinq PABP majoritaires sont retrouvées chez les vertébrés: PABPC1, PABPC3, iPABP, PABPC5, PABPN1, (pour revue (Mangus, Evans, and Jacobson 2003). Auxquelles s'ajoutent deux PABP supplémentaires enrichies dans les ovocytes et embryons précoces :

PABPC1L (ePAB) et PABPN1L (Guzeloglu-Kayisli et al. 2008; Mangus et al. 2003; Seli et al. 2005) dont leurs fonctions seront décrites à la fin du chapitre.

Les protéines PABP les plus communes sont la PABPC1 (Poly(A)-Binding Protein Cytoplasmic 1) et la PABPN1 (Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1). La PABPC1 et PABPN1 peuvent interagir directement avec la queue poly(A). La PABPN1 est majoritairement nucléaire, favorise la polyadénylation par interaction avec la PAP (Kerwitz et al. 2003; Kühn et al. 2009) dès la synthèse de l'ARNm et est impliquée dans la maturation de l'ARNm et de son export nucléaire (Huang et al. 2023; Jenal et al. 2012; Kwiatak et al. 2023). La PABPC1 est majoritaire dans le cytoplasme et favorise l'initiation de la traduction par circularisation de l'ARNm en faisant le lien via les facteurs de traduction (eIF4E et eIF4G) entre la coiffe et la queue poly(A) (Kahvejian et al. 2005; Pestova et al. 2001; Sonenberg and Hinnebusch 2009). La PABPC1 nécessite un minimum de 11 A pour interagir (Deo et al. 1999) mais couvre physiquement 27 adénosines (Baer and Kornberg 1983; Smith et al. 1997), de fait dans une queue poly(A) de 250A on y retrouvera 9 PABPs. Dans certains contextes, la PABPC1 et la PABPN1 peuvent se trouver dans le cytoplasme et dans le noyau ce qui est suggéré comme nécessaire à leur échange sur la queue poly(A) (Afonina, Stauber, and Pavlakis 1998; Calado and Carmo-Fonseca 2000; Hosoda, Lejeune, and Maquat 2006; Lemay et al. 2010; Woods et al. 2002). Cependant, les mécanismes de passage de l'une à l'autre pour la protection de la queue poly(A) ne sont pas caractérisés (Nicholson-Shaw et al. 2022).

3.2 Stabilisation à long terme et traductibilité de l'ARNm dans l'ovocyte

Le raccourcissement de la queue poly(A) est synonyme de dégradation imminente excepté dans certains contextes. En effet, dans une cellule somatique, une queue poly(A) très courte (<20 nucléotides) mène à la dégradation alors que dans l'ovocyte un ARN portant une queue poly(A) courte (~40A) est stocké (**figure 33**) (Lorenzo-Orts and Pauli 2024). Pendant l'ovogenèse, l'acquisition de traductibilité du transcriptome maternel est finement régulée par le mécanisme de réadénylation cytoplasmique, initialement découvert chez le Xénope et qui repose en grande partie sur un code combinatoire complexe présent dans le 3'UTR de l'ARNm. En particulier, l'interaction de protéines régulatrices de liaison à l'ARN de type CPSF, CPEB,

PUMILIO, DAZL et AUBP contrôlent la stabilité et la dégradation de l'ARNm, (pour revue (Christou-Kent et al. 2020)).

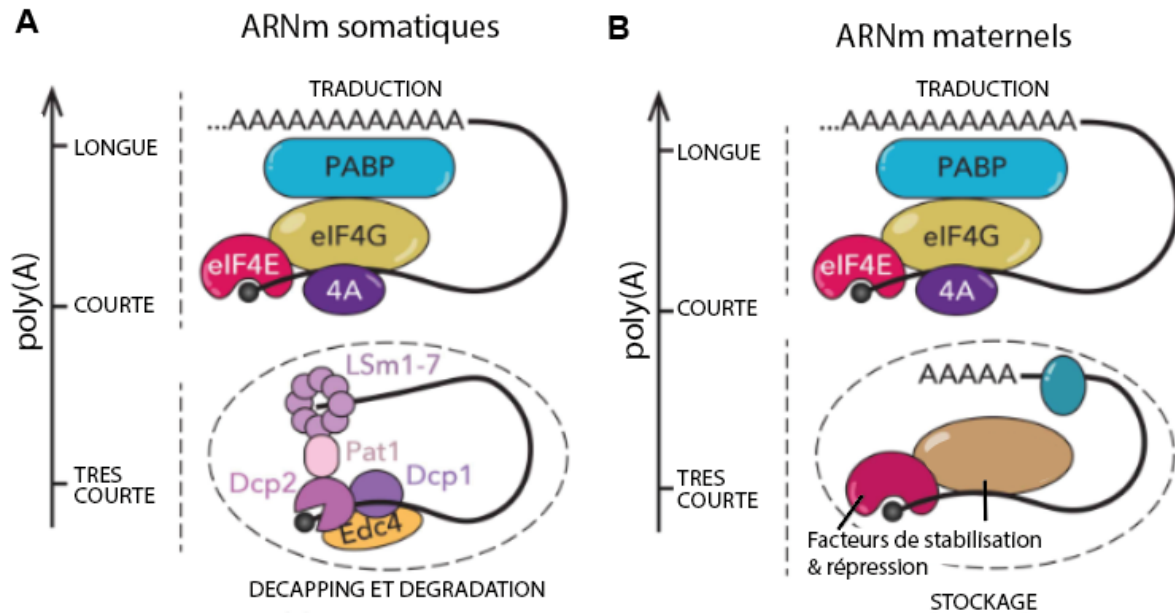


Figure 33 : Comparaison de la régulation de la stabilité de l'ARN messager dans une cellule somatique et dans l'ovocyte (Lorenzo-Orts and Pauli 2024).

3.2.1 Modification de la longueur de la poly(A) et impact sur la stabilité de l'ARNm

3.2.1.1 Rallongement de la queue poly(A), export nucléaire et dégradation

Dans les cellules eucaryotes, la stabilité de l'ARNm est compromise par les variations de la longueur de la queue poly(A) (Meola et al. 2016; Passmore and Collier 2021). D'une part, dans le noyau l'hyperadénylation (> 250 nucléotides) engendre la dégradation de l'ARN par le complexe de contrôle qualité PAXT (*Poly(A) tail eXosome Targeting connexion*) qui par ses sous-unités ZFC3H1, MTR4 (aussi nommée MTREX, *Mtr4 Exosome RNA Helicase*) et PABPN1 connectent l'exosome et ses deux ribonucléases EXOSC10 et DISL3 (Meola et al. 2016). Durant la mitose, l'hyperadénylation peut être contrecarrée par la phosphorylation de la

PABPN1 qui permet en retour de stabiliser le transcriptome (Gordon et al. 2024). La PABPN1 contrôle l'activité de la PAP (Kerwitz et al. 2003) et empêche l'export nucléaire d'ARNs messagers non matures par rétention du dernier intron (Kwiattek et al. 2023). Le blocage de l'export nucléaire mène à la dégradation d'ARNs polyadénylés non épissés (Bresson et al. 2015). Ainsi la PABPN1 est un acteur pivot de la stabilité de l'ARNm dans le noyau puisqu'elle est associée à la polyadénylation par la PAP, à la stabilisation et à l'export de l'ARNm.

3.2.1.2 Raccourcissement de la queue poly(A), déstabilisation et dégradation

En miroir, le raccourcissement de la queue poly(A), aussi associé au contrôle de la stabilité, a lieu en deux étapes successives (**figure 34**). Le complexe PAN2/PAN3 raccourcit la queue poly(A) jusqu'à 110 nucléotides, (pour revue (Wahle and Winkler 2013)). Puis, le complexe CCR4-NOT réduit la longueur de queue poly(A) à quelques nucléotides (<20A) (Bartlam and Yamamoto 2010; Yamashita et al. 2005). Ce raccourcissement extrême induit l'impossibilité des PABPCs de protéger l'ARN et recrute le complexe de déstabilisation LSM sur le 3' UTR (*UnTranslated Region*) de l'ARNm.

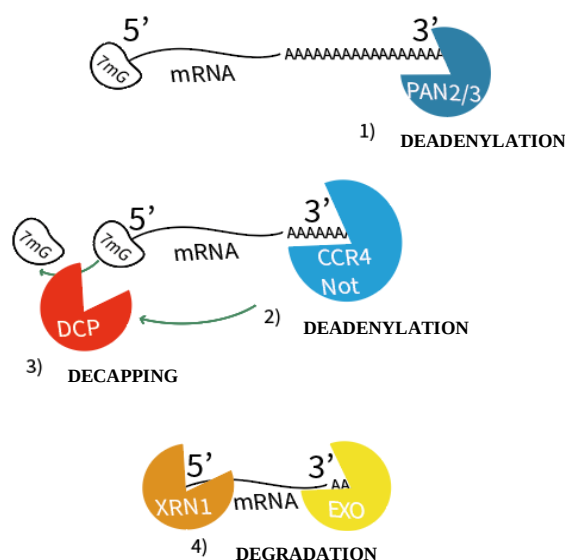


Figure 34 : La déadénylation est l'étape limitante pour la dégradation de l'ARNm

LSM1 à LSM7 forme un complexe à 8 sous-unités en forme d'anneau (**figure 35**) qui est associé à la déstabilisation cytoplasmique de l'ARNm par recrutement du complexe de *decapping* DCP1A/DCP2, la protéine d'échafaudage EDC4 et l'exonucléase XRN1 (Bouveret et al. 2000; C. Te Chang et al. 2014; Ingelfinger et al. 2002). Le complexe DCP1A/DCP2 induit la perte de la coiffe ce qui donne accès à l'exonucléase XRN1 en 5' et qui en conséquence dégrade l'ARNm, pour revue (He and Jacobson 2023).

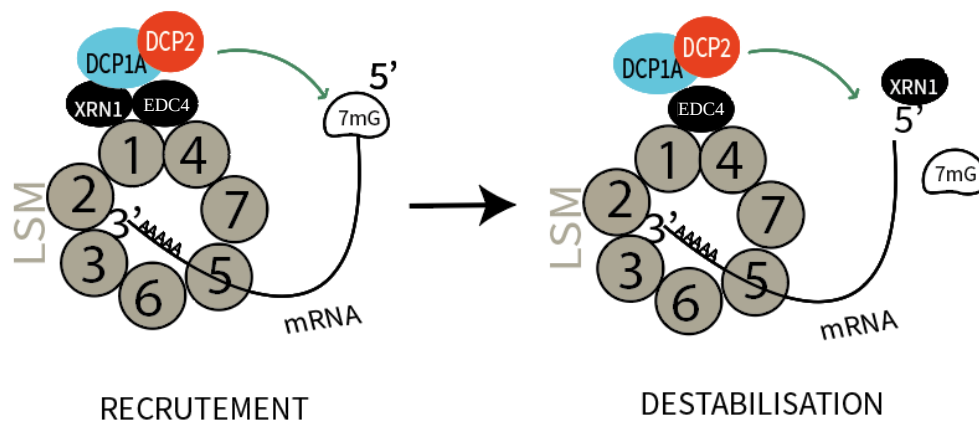


Figure 35 : Le complexe LSM reconnaît la queue poly(A) raccourcie et entraîne la perte de la coiffe par le recrutement du complexe de décaping

3.2.1.3 Le complexe CCR4-NOT et adressage à dégradation de l'ARNm

Chez les Eucaryotes, CCR4-NOT (*Carbon Catabolite Répression 4-Negative On TATA-less*) est le complexe majeur de contrôle de l'expression des gènes par raccourcissement de la queue poly(A) des transcrits. Chez les métazoaires, CCR4-NOT est composé de 9 sous unités (CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT4, CNOT6 /6L, CNOT7/8, CNOT9, CNOT10 et CNOT11). L'interaction CNOT4 avec CNOT9 n'est pas toujours retrouvée (Absmeier et al. 2023; Lau et al. 2009; Mauxion, Prève, and Séraphin 2013). CNOT1 est la plus grande sous-unité du complexe, sur laquelle s'organisent toutes les autres sous-unités tant structurales qu'enzymatiques (**figure 36**) (Shirai et al. 2014).

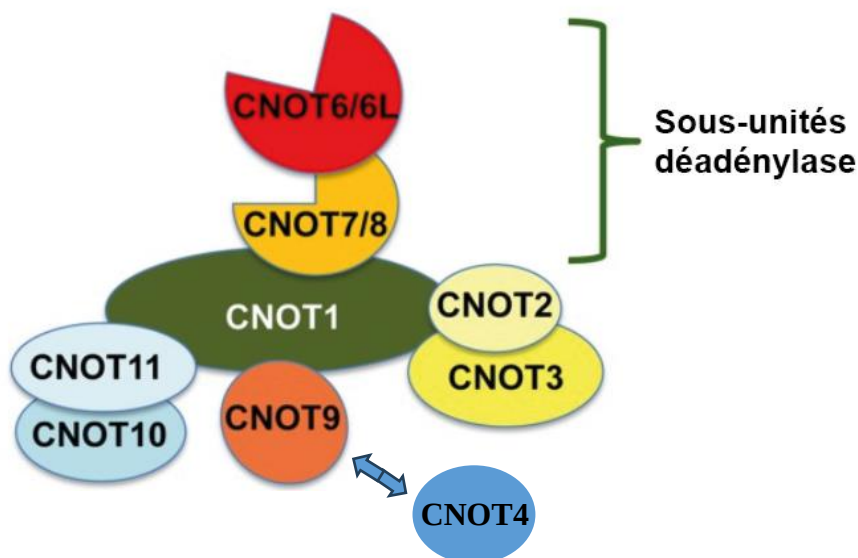


Figure 36 : Le complexe CCR4-NOT et ses sous unités enzymatiques (Shirai et al. 2014).

L'activité enzymatique du complexe CCR4-NOT est essentiellement portée par 4 sous unités qui sont 2 à 2 mutuellement exclusives : les sous-unités CNOT6/6L (orthologues de CCR4) de la famille EEP (exonucléase/ endonucléase/ phosphatase) et CNOT7/8 (orthologues de CAF1) de la famille DEDD (*Asp-Glu-Asp-Asp*) (Lau et al. 2009). Lorsqu'un transcrit est inefficacement traduit, ces sous unités facilitent le raccourcissement de la queue poly(A) entraînant la déstabilisation de l'ARNm. CNOT1 est une plateforme qui intègre les signaux des protéines de liaison à l'ARN ce qui permet de donner la spécificité au complexe pour des

transcrits ciblés. En effet, le complexe CCR4-NOT ne contient pas de domaine de liaison directe à l'ARN et nécessite des protéines adaptatrices comme GW182, de la famille TOB/BTG (Hosoda et al. 2011; Ogami et al. 2012) ou alors des protéines AUBP (*AU-rich Binding Proteins*), (pour revue (Doidge et al. 2012)). GW182 fait partie du complexe RISC qui permet la déadénylation d'ARNs spécifiques via les miRNAs et la protéine ARGONAUTE (AGO). A noter, chez la souris, la fonction des microRNA dans le contrôle de la stabilité du transcriptome maternel n'est pas présente (Ma et al. 2010; Suh et al. 2010). D'autre part, le facteur CPEB (*Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding*) est stabilisé par les protéines de la famille Tob/BTG qui interagissent avec la PABPC1 et permettent le recrutement de CCR4-NOT ce qui a pour conséquence de déstabiliser les ARNs ciblés (Funakoshi et al. 2007). De façon remarquable, CNOT7/8 interagissent avec la queue poly(A) sans PABP alors que CNOT6/6L sont recrutés via la PABP qui est ensuite déplacée pour dégradation (Yi et al. 2018).

Il est intéressant de noter que chez la souris, la déplétion de CNOT7, et de GGNBP2 (*GametoGenetiN Binding Protein 2*), un partenaire protéique de CNOT11 (Mauxion et al. 2023), et CPEB mènent à la stérilité (Ma, Fukuda, and Schultz 2015; Nakamura et al. 2004; Ogawa et al. 2004; Racki and Richter 2006).

3.2.2 CPEB : traduire ou pas traduire ?

La famille de protéines CPEB compte quatre membres (CPEB1, CPEB2, CPEB3 et CPEB4). CPEB1 contient deux motifs de liaison à l'ARN et un domaine similaire à un doigt de Zinc (Hake, Mendez, and Richter 1998) qui, ensemble, permettent son interaction avec la séquence consensus (UUUUUAAU) sur l'ARNm (Duran-Arqué et al. 2022). Dans l'ovocyte, cette séquence, positionnée dans le 3'UTR de l'ARNm, est un « élément de polyadénylation cytoplasmique » nommé CPE (*Cytoplasmic Polyadénylation Element*) qui joue un rôle tant dans la répression que dans le contrôle de la traductibilité de l'ARNm par la régulation de la

longueur de la queue poly(A) (Hake et al., 1998). Des variants de séquence existent, notamment le « variant G » (UUUUUGU) qui est uniquement ciblé par CPEB2-4 (Duran-Arqué et al. 2022). De plus, durant la maturation de l'ovocyte, CPEB peut interagir avec des protéines de la famille Pumilio, avec la PARN (*PolyA RiboNuclease*), la poly(A) polymérase cytoplasmique GLD-2 chez le Xénope (PAP α chez la souris (Jiang et al. 2021)), et avec eIF4E (4E-BP1 chez la souris (Jansova et al. 2017)). D'autre part, le statut de phosphorylation de la CPEB détermine le moment où l'ARNm sera traduit. La CPEB peut être phosphorylée par Aurora A, CDK1 (composant du MPF) et MAPK (Blengini et al. 2021, 2024; Kunitomi et al. 2024). La phosphorylation de CPEB lève la déadénylation de la PARN sur la queue poly(A), recrute CPSF et la PAP sur le PAS et permet la réadénylation cytoplasmique puis la traduction (**figure 37**). Ce mécanisme est d'importance majeure lors de la remobilisation d'ARNs stockés codant pour la CYCLINE B1, EMI2 et MOS (l'un des premiers transcrits à être traduit) qui régulent la reprise de la traduction et la progression de maturation de l'ovocyte (Barkoff et al. 2000; Gebauer and Richter 1997; Takei et al. 2021). L'injection cytoplasmique d'ARNs antisens pour la *cycline B1* retarde la polyadénylation cytoplasmique et la transition de GVBD vers la métaphase II (Li, Meyer, and Donoghue 1995; Tay, Hodgman, and Richter 2000).

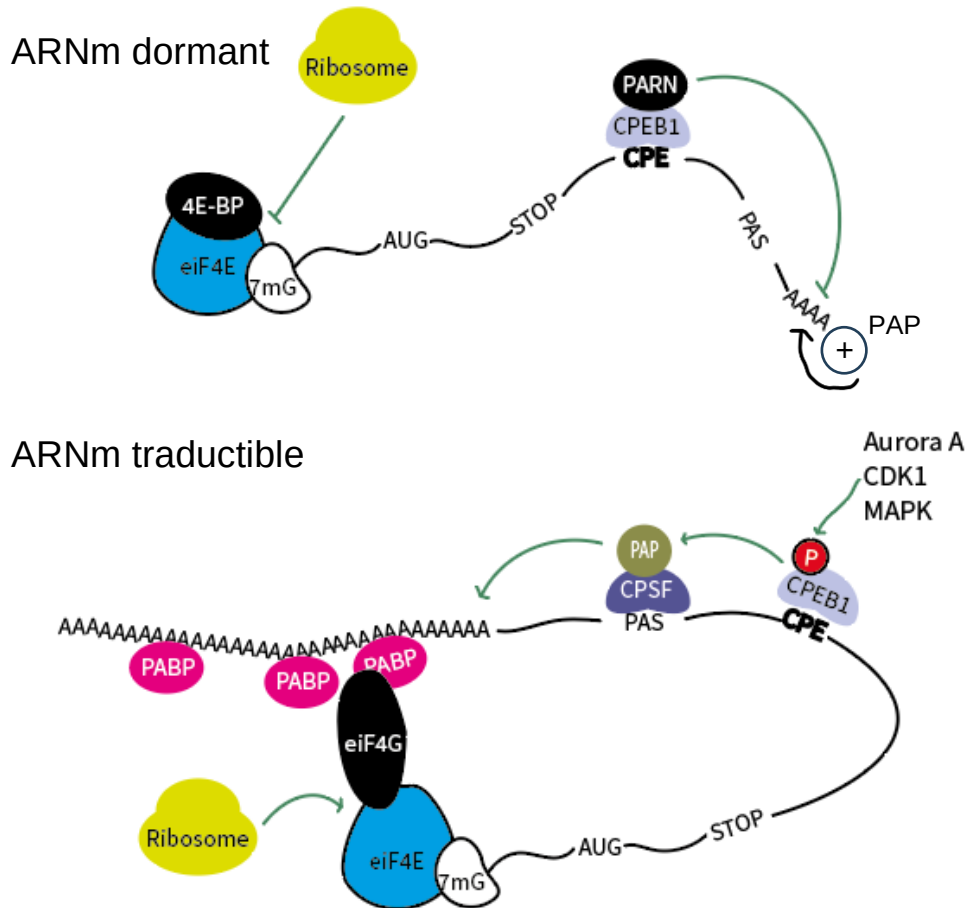


Figure 37 : Régulation de la dormance de l'ARNm via CPEB adapté de (Y. Jiang et al. 2023).

PARN: *Poly(A) Ribonuclease*, PAS: *PolyAdenylation Site*, CPE: *Cytoplasmic Polyadenylation Element*. PAP: *Poly(A) Polymerase*.

3.2.3 Code combinatoire PAS et CPE dépendant

Chez le Xénope, des analyses computationnelles ont permis de déterminer un code combinatoire entre répression et traduction par CPEB (Belloc, Piqué, and Méndez 2008; Piqué et al. 2008). La répression par CPEB nécessite au moins deux CPEs et la séparation optimale entre les deux CPE est de 12 nucléotides (Belloc et al. 2008; Piqué et al. 2008). En revanche, la

polyadénylation cytoplasmique et l'activation de la traduction est favorisée par la présence d'un seul CPE et la distance avec le PAS optimale est de 25 nucléotides (Belloc et al. 2008; Piqué et al. 2008). Cependant, ce code combinatoire n'est pas aussi précis chez la souris (Chen et al. 2011). Chez la souris, l'activation de la traduction par CPEB est favorisée par la présence d'au moins un CPE adjacent (<35 nucléotides) à un PAS et le nombre et la position des CPEs par rapport au PAS proximal fait varier l'efficacité de répression ou traductibilité (Dai et al. 2019).

D'autres facteurs autres que CPEB comme DAZL, PUMILIO, MUSASHI et YBX-2 sont impliqués dans le contrôle de la stabilité à long terme et de la traduction régulée d'ARNs spécifiques durant la maturation de l'ovocyte.

3.2.4 PUMILIO et traductibilité

Deux paralogues Pumilio existent : *Pum1* et *Pum2*. PUM1 et PUM2 interagissent sur l'ARNm par leur motif PBE (*Pumilio-Binding Element* : UGUAAAU) (Luong and Conti 2019). Tout comme CPEB1, la famille PUM est impliquée dans la régulation de la poly adénylation cytoplasmique et l'activation de la traduction des ARNs dormants dont le transcrit *Cdk1* (Mak et al. 2016). Chez la souris, PUM1 facilite la transition de l'ovocyte du stade pachytène vers diplotène pendant la période fœtale et la déplétion de PUM1 mène à la diminution significative du nombre de follicules primordiaux, alors que la déplétion de PUM2 n'a aucun effet sur la reproduction des femelles (Mak et al. 2016). Durant la maturation de l'ovocyte de Xénope, PUM2 coopère avec DAZL pour la régulation l'activation de traduction de la CYCLINE B1 (Ota, Kotani, and Yamashita 2011) et la dissociation de PUMILIO de DAZL et de la ePAB (*embryonic Poly(A)-Binding Protein* ou PABPC1L) engendre l'activation de traduction médiée par la CPEB de l'ARNm *RINGO/Spy* (Padmanabhan and Richter 2006). Le blocage de PUM1 et PUM2 mène à l'accélération de phosphorylation de CPEB et à la traduction précoce de la CYCLINE B1 (Ota et al. 2011). Le contrôle médié par les protéines PUM dans la répression et activation de la polyadénylation a été aussi montré chez le poisson zèbre (pour revue (Kotani, Maehata, and Takei 2017)).

3.2.5 DAZL et traductibilité

DAZL reconnaît les séquences ARNm riches en U nommé motif DBE (*DAZL-Binding Element* : UUGGUU). DAZL contribue à l'activation de la traduction d'ARNs dormants dans les cellules germinales (Collier et al. 2005). DAZL peut être activateur en synergie avec CPEB (Martins et al. 2016) ou répresseur de la traduction durant la maturation de l'ovocyte (Yang et al. 2020). Chez la souris, la délétion des séquences codantes pour DAZL engendre la stérilité des femelles et des mâles par une absence de production de cellules germinales (Ruggiu et al. 1997). DAZL est exprimé dès le stade ovogonie et son expression se poursuit durant la maturation de l'ovocyte, au stade deux cellules et dans l'embryon de 8 cellules à partir duquel l'expression diminue (Pan et al. 2008). La déplétion de DAZL dans l'ovocyte mature mène au blocage de la traduction de composants essentiels à la formation du fuseau méiotique et à la dégradation de l'ARNm (Chen et al. 2011). Chez le Xénope, XDAZL interagit avec la PABP (Collier et al. 2005) et l'inhibition maternelle de *Xdazl* résulte en des défauts de migration des PGCs dont leur population est sévèrement voire complètement déplétée dans les têtards (Houston and King 2000). Ces données suggèrent que DAZL est requis très tôt pour l'activation de traduction lors de la spécification de la lignée germinale (Houston and King 2000). Chez le poisson zèbre, DAZL favorise la réadénylation cytoplasmique (Takeda et al. 2009).

3.2.6 MUSASHI et traductibilité

MUSASHI, via son motif sur l'ARNm spécifique (MBE, *Musashi-Binding Element* :), est impliqué dans la réadénylation cytoplasmique et l'activation de la traduction (Charlesworth et al. 2006; Cragle et al. 2019). Les mécanismes médiés par MUSASHI dans l'ovocyte ont uniquement commencé à être caractérisés chez le Xénope. Notamment, la traduction de *Mos* et de la cycline B1 sont dépendantes de MUSASHI (Charlesworth et al. 2006; Weill et al. 2017). De manière élégante, (Cragle et al. 2019), démontrent que MUSASHI nécessite l'association avec la ePAB ou de la PABPC1 pour activer la traduction, selon une boucle positive, de son propre ARNm (Cragle et al. 2019). L'injection dans ARNm codants pour un dominant négatif

MUSASHI dans les ovocytes immatures cause le blocage de la polyadénylation cytoplasmique et de la progression méiotique (Charlesworth et al. 2006).

3.3 De la stabilité du transcriptome maternel à sa dégradation

3.3.1 YBX2 : de la stabilité à l'instabilité du transcriptome maternel

YBX2 (aussi nommée MSY2) est une protéine, de la famille Y-box, non spécifique de liaison à l'ARNm qui joue un rôle dans la répression à long terme et dans l'activation de traduction du transcriptome maternel (Gu et al. 1998). Chez le Xénope, FRoG Y-box 2 (FRGY2) est impliqué dans l'empaquetage cytoplasmique de 80% des ARNm synthétisés par l'ovocyte dans des structures de type RiboNucléoProtéines (RNPs) (Bouvet and Wolffe 1994; Matsumoto et al. 2003; Tafuri and Wolffe 1993; Yu, Hecht, and Schultz 2002). Dans l'ovocyte, YBX2 est la protéine de liaison à l'ARN la plus abondante (2% des protéines totales) (Yu, Hecht, and Schultz 2001). Chez la souris, la déplétion d'YBX2 mène à la stérilité (Medvedev, Pan, and Schultz 2011; Yang et al. 2007). YBX2 est associée avec le cytosquelette (Liu et al. 2017) et est exprimée durant la croissance et la maturation de l'ovocyte puis régresse dans l'embryon de deux cellules (Yu et al. 2001). La croissance des ovocytes déplétés pour YBX2 est retardée dès la première vague de folliculogénèse et la cohésion du follicule est perdue (Medvedev et al. 2011) et les ovocytes sont plus petits (Yu et al. 2004). Ces défauts s'accompagnent d'une diminution considérable de la quantité d'ARNs poly(A) (Medvedev et al. 2011; Yu et al. 2004).

Fonctionnellement, chez la souris, durant la maturation de l'ovocyte, la phosphorylation par la kinase CDK1 d'YBX2 marque la transition de la stabilité du transcriptome maternel vers la remobilisation massive d'ARNs dormants pour traduction et la régulation contrôlée de leur dégradation par vagues. Ces caractéristiques fonctionnelles définissent la transition maternelle zygotique (MZT, *Maternal-to-Zygotic Transition*) (Medvedev et al. 2008). Il est intéressant de noter que la protéine YBX2 est stable jusqu'au stade 2 cellules chez la souris puis son expression est abolie lorsque la vague majeure du redémarrage de la transcription a lieu (Yu et al. 2001), (pour revue (Schulz and Harrison 2019)).

3.3.2 Régulateurs de la dégradation du transcriptome maternel

Comme abordé au chapitre 1, l'ovocyte est transcriptionnellement quiescent à la fin de sa croissance. Cette caractéristique conservée chez les espèces s'articule avec la MZT qui dépend entièrement des protéines déjà présentes dans l'ovocyte et de la régulation de la stabilité et la traductibilité du transcriptome maternel. En effet, la MZT est un relais entre le contrôle du développement par les produits des gènes maternels stockés dans l'ovocyte et le contrôle par l'expression des gènes zygotiques (Schulz and Harrison 2019). Des expériences pionnières, chez le Xénope qui a la particularité de présenter une taille ovocytaire élevée avaient mis en évidence une dégradation progressive par vagues des ARNs maternels (Piko and Clegg 1982). De fait, durant la MZT, chez toutes les espèces étudiées le transcriptome maternel est dégradé progressivement par vagues mais les modalités de dégradation diffèrent (Bai et al. 2019). Notamment, le *timing* n'est pas le même puisque chez les espèces à développement rapide (poisson zèbre et xénope) le transcriptome maternel contribue aux premiers clivages et au développement de l'embryon, alors que chez la souris la dégradation des ARNs maternels est déjà bien entamée durant la maturation de l'ovocyte, dans le zygote et dans l'embryon de deux cellules (**figure 38**).

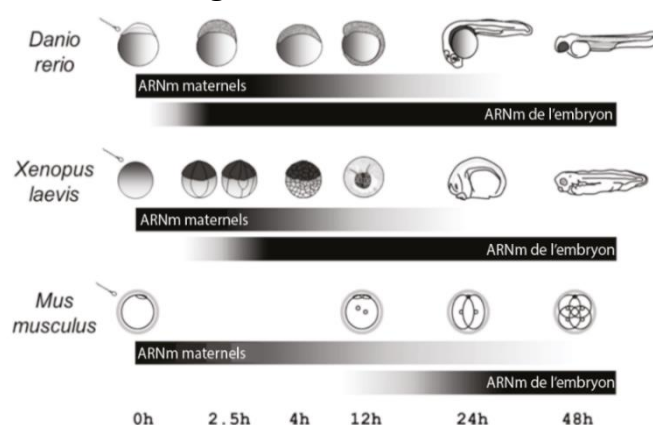


Figure 38 : La transition Maternelle-Zygotique implique la dégradation progressive du transcriptome maternel par vagues (Svoboda, Fulka, and Malik 2017).

L'une des caractéristiques durant la maturation de l'ovocyte est que certains ARNm sont dégradés alors que d'autres sont stabilisés jusqu'à la ZGA, (pour revue (Tadros and Lipshitz 2009)). Cela a permis la mise en évidence que la dégradation du transcriptome maternel a lieu de manière graduelle et sélective. Je focaliserai ma rédaction pour des soucis de clarté avec mon projet de thèse, sur les modes de dégradation de l'ARNm durant la MZT chez la souris.

Chez la souris, pendant la maturation de l'ovocyte, 50% des transcrits maternels polyadénylés sont dégradés (Ma et al. 2015; Paynton, Rempel, and Bachvarova 1988) et à la fécondation seulement 30% sont présents (Bachvarova et al. 1985). Plusieurs mécanismes de dégradation contrôlés ont été mis en évidence et font appel à des sous unités du contrôle de la stabilité des transcrits comme CNOT6L, BTG4, ZFP36L2, CNOT7/8, BTG4, TUT, DISL3L2, EXOSC10, YTHDF2, PABPN1, PABPC1L, DCP1A/2 et ZAR.

3.3.2.1 CNOT6L et ZFP36L2

L'une des sous unités enzymatiques de CCR4-NOT, CNOT6L, est exprimée préférentiellement dans les ovocytes comparés à d'autres types cellulaires. Les femelles *Cnot6l*^{-/-} sont viables et ne présentent pas de défaut de formation des follicules primordiaux (Sha et al. 2018). En revanche, la mutation engendre un blocage de la progression méiotique lors de la réactivation traductionnelle d'ARNs dormants (Sha et al. 2018). L'ARNm *Cnot6l* est un ARN dormant qui est remobilisé et traduit durant la maturation de l'ovocyte (Ma et al. 2015). Dans les ovocytes mutants *Cnot6l*, les analyses subcellulaires démontrent la formation de fuseaux méiotiques multiples et incomplets résultant au blocage méiotique (Sha et al. 2018). Les approches transcriptomiques comparatives avec le WT révèlent l'inefficacité de dégradation sélective des ARNs maternels entre le stade GV et MII (Sha et al. 2018). De plus, le processus de raccourcissement des queues poly(A) des transcrits maternels est compromis (Sha et al. 2018). En particulier, les ARNs codant pour des facteurs de la machinerie de traduction sont stabilisés, ce qui engendre la traduction exacerbée d'ARNs maternels non dégradés (Sha et al. 2018). Durant la maturation de l'ovocyte, CNOT6L est recrutée via la

protéine de liaison à l'ARN *Zinc-Finger Protein 36 Like 2* (ZFP36L2) aux ARNs riches en AU (ARE, *AU-rich Element*) ce qui engendre leur dégradation rapide (Ball et al. 2014). Les femelles déplétées pour ZFP36L2 dans l'ovocyte sont stériles dû au blocage de l'ovulation (Ball et al. 2014) car les niveaux élevés de *cAMP* dans les mutants empêchent la progression méiotique (Ball et al. 2014). D'autre part, en lien avec le contrôle de la stabilité du transcriptome maternel, un rôle de ZFP36L2 pour la dynamique de chromatine et la mise en place de la répression de la transcription dans l'ovocyte mature a été suggérée (Dumdie et al. 2018). Mécanistiquement, ZFP36L2 cible, pour dégradation par CCR4-NOT, les ARNs codant pour des déméthylases d'histone H3K4 et H3K9 ce qui en retour engendre l'accumulation des marques d'histone et est proposé comme étant en lien avec la répression de la transcription (Dumdie et al. 2018).

3.3.2.2 CNOT7/8 et BTG4

BTG4 fait partie de la famille BTG/TOB connues pour recruter le complexe CCR4-NOT via l'interaction avec la PABPC1 (pour revue (Winkler 2010)), BTG4 peut aussi être recruté via la ePAB et la PABPN1L (Liu et al. 2016; Zhao et al. 2020). La déplétion de la ePAB dans l'ovocyte en croissance résulte au blocage développemental des embryons au stade deux cellules qui présentent un défaut de dégradation d'ARNm avec des queues poly(A) longues et un blocage de reprise de la transcription (Zhao et al. 2020). En parallèle, la déplétion de BTG4 cause la dissociation de CNOT7 des ARNm cibles et est associée avec la stérilité (Zheng et al. 2020). L'ARNm *Btg4* s'accumule dans l'ovocyte en croissance (Liu et al. 2016). Durant la reprise de la méiose, l'activation de la voie ERK engendre la phosphorylation de CPEB et de la PAP α (PAPOLA) qui en retour permet la réadénylation cytoplasmique de *Btg4* et sa traduction (**figure 39**) (Jiang et al. 2021; Yu et al. 2016). En effet, *Btg4* est un ARN dormant jusqu'à maturation de l'ovocyte tout comme *Cnot7*, dont on détecte quand même un peu de protéine CNOT7 dans le GV (Ma et al. 2015). Dans le contexte de maturation de l'ovocyte, BTG4 recrute les sous unités enzymatiques CNOT7 ou CNOT8 ce qui conduit à la dégradation considérable des ARNs maternels (Yu et al. 2016). La déplétion de BTG4 et CNOT7 mène à l'inhibition du raccourcissement de queues poly(A) durant la maturation de l'ovocyte et au blocage du

développement embryonnaire au stade 2 cellules (Liu et al. 2016; Ma et al. 2015; Yu et al. 2016).

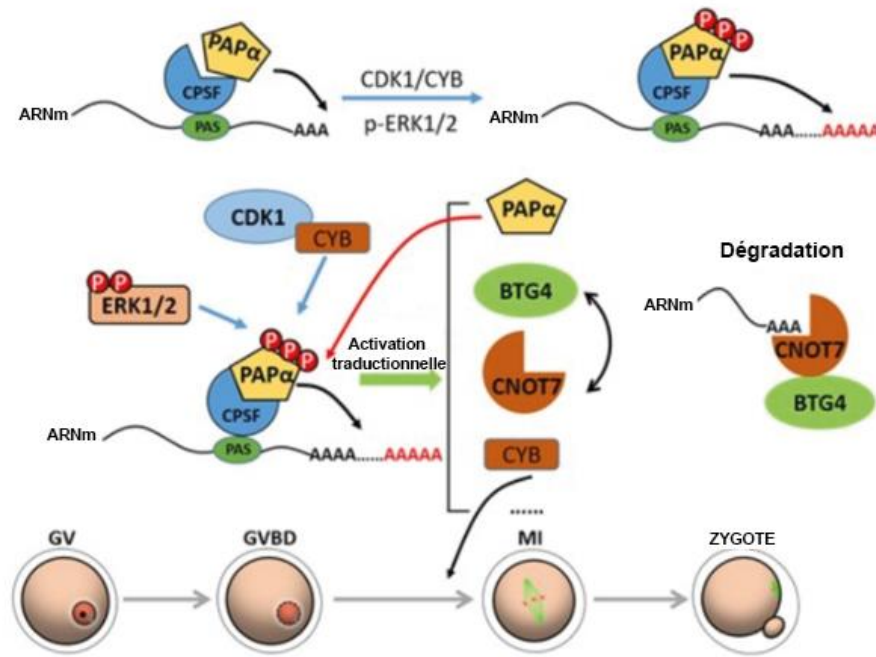


Figure 39 : Contrôle de la readénylation cytoplasmique et de la dégradation sélective d'ARNs maternels par l'activation de la voie ERK (Jiang et al. 2021).

3.3.2.3 TUT, l'exosome et la PABPN1

Les transférases d'uridine de la famille TUT (*Terminal Uridin Transferase*) sont impliquées dans la dégradation du transcriptome (Lim et al. 2014). Notamment, les ARNs raccourcis en queue poly(A) (<25 nucléotides) sont susceptibles d'être uridylés par TUT4 et TUT7 aussi nommées ZCCHC11 et ZCCHC6 respectivement. L'uridylation est une marque de dégradation imminente de l'ARNm (Lim et al. 2014; Yi et al. 2018). En effet, l'ajout d'uridine à une queue poly(A) courte favorise l'adressage de l'ARNm pour dégradation par recrutement en 3' des sous unités enzymatiques exonucléases de l'exosome comme DIS3L2 ou EXOSC10 (figure 40).

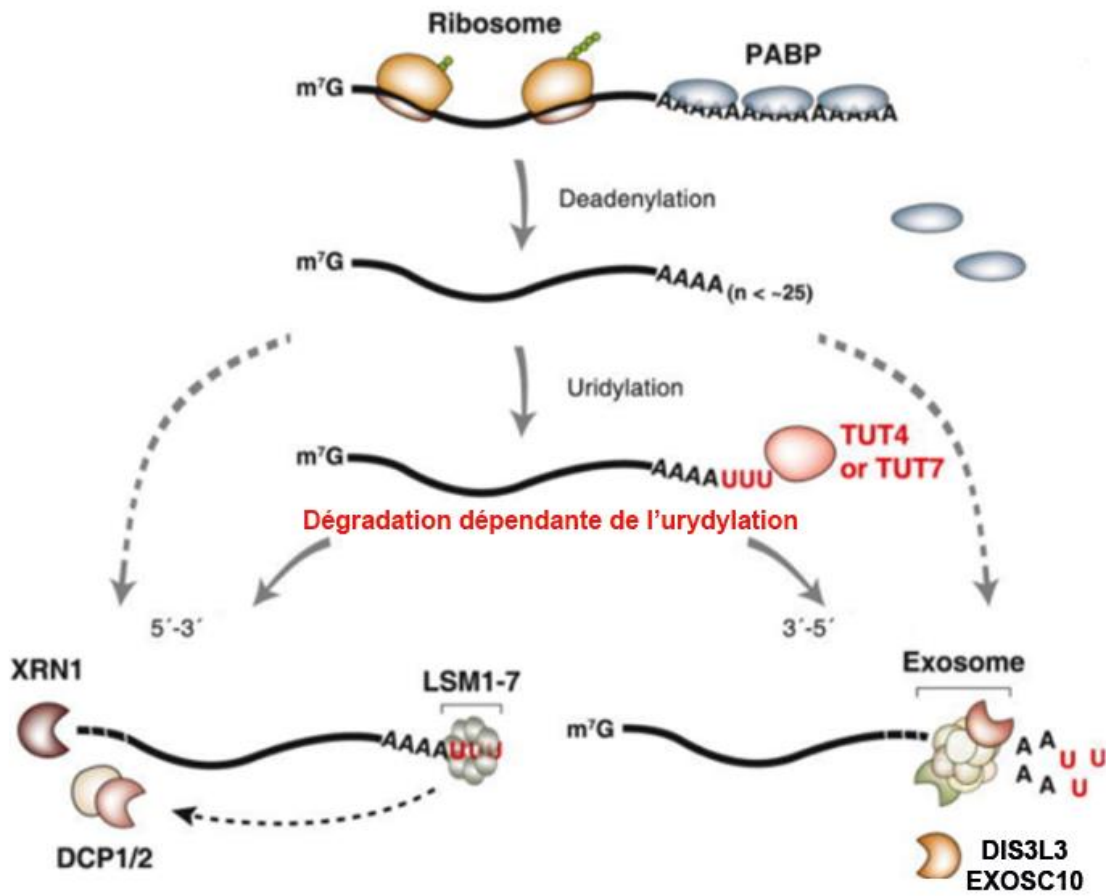


Figure 40 : Voies de dégradation de l'ARNm après déadénylation et uridylation (Lim et al. 2014)

Durant la croissance de l'ovocyte la dégradation de 700 ARNm après uridylation de queues poly(A) très courtes (<20 nucléotides) ont été identifiés (Morgan et al. 2017). Ces résultats montrent une première activité de dégradation avant la maturation de l'ovocyte chez la souris. D'autre part, EXOSC10 est nécessaire très tôt durant la folliculogénèse puisque sa délétion précoce au stade follicule primordial cause une dégénérescence ovarienne progressive chez la souris (Demini et al. 2023) : A 3 semaines, la folliculogénèse n'est pas altérée. Cependant, durant la période de reproduction (6 semaines), les mutants ont

significativement moins de follicules primordiaux mais en revanche plus de follicules secondaires que le WT. A 8 semaines, la réserve de follicules primordiaux est considérablement déplétée et plus aucun follicule secondaire n'est retrouvé dans les ovaires (Demini et al. 2023). Ces données montrent une altération des vagues de la folliculogenèse et de la croissance de l'ovocyte. Les quelques ovocytes mutants ovulés sont dégénérés. Les données de protéomique indiquent la déplétion considérable des régulateurs de la méiose comme CDK1 mais aussi d'YBX2 et des composants des *lattices* (comme PADI6 et TLE) (Demini et al. 2023). D'autre part, une étude plus récente montre qu'EXOSC10 est responsable de la dégradation d'ARNm durant la croissance de l'ovocyte (Wu and Dean 2020). La déplétion d'EXOSC10 durant la croissance de l'ovocyte entraîne une dérégulation de l'abondance des transcrits (Wu and Dean 2020). En particulier, les transcrits régulés à la hausse codent pour des protéines impliquées dans le système endomembranaire (lysosomes et Golgi), le transport de protéines et la régulation de la transcription. Le phénotype se caractérise par un retard de la dissociation de l'enveloppe nucléaire qui s'explique par un défaut d'activation de la CDK1 ce qui rend les femelles subfertiles (Wu and Dean 2020). D'autre part, la deuxième sous unité catalytique de l'exosome DIS3L2 joue aussi un rôle durant la croissance, puisque sa déplétion résulte en l'accumulation d'ARNs à queue poly(A) courte et uridylés ce qui entraîne l'arrêt de l'ovocyte au stade GV (les femelles sont complètement stériles) (Wu et al. 2023). De manière surprenante DIS3L2 ne dégrade pas seulement les ARNs messagers raccourcis en poly(A) et ciblés par les TUTs (*oligoU*) mais est responsable de la dégradation d'autres types d'ARNs qui sont édités différemment en 3' (addition de G ou de C), ces derniers s'accumulent chez le mutant (Wu et al. 2023). DIS3L2 est recrutée par la PABPN1 sur les ARNs uridylés durant la MZT et contrôle leur dégradation (Zhao et al. 2022). Cependant, le recrutement d'EXOSC10 par la PABPN1 n'est pas démontrée pour les ARNs uridylés durant la croissance. Durant la croissance de l'ovocyte, la PABPN1 est impliquée dans la stabilisation de l'ARNm par assemblage nucléaire de domaines poly(A) sans membrane (*NPADs*: *Nuclear Poly(A) Domains*) (Dai et al. 2022). Notamment, dans l'ovocyte en croissance l'inhibition de l'activité de transcription réduit le nombre de NPADs qui semblent fusionner dans une structure plus ample et non caractérisée (Dai et al. 2022). De plus, la formation et le maintien des *NPADs* nécessite l'interaction de la PABPN1 avec les queues poly(A) puisque la délétion des sites

d'interaction à l'ARNm de la PABPN1 engendre leur disparition (Dai et al. 2022) tout comme la déplétion de l'ARN hélicase MTR4 (Wu et al. 2024). Cependant la fonction exacte de ces foci nucléaires ne sont pas caractérisés.

Ensemble ces données suggèrent un rôle principal de l'exosome dans le contrôle de la stabilité des transcrits lors de la croissance ovocytaire.

3.3.2.4 YTHDF2

YTHDF2 est une protéine de liaison à l'ARN reconnaissant la modification m6A et impliquée dans le recrutement du complexe CCR4-NOT (Du et al. 2016). YTHDF2 interagit directement CNOT1, ce qui résulte en la déstabilisation de l'ARNm par raccourcissement de la queue poly(A) (Du et al. 2016). Dans les cellules de mammifères, la modification m6A est déposée dans le noyau par le complexe méthyltransférase METTL3/METTL14/WTAP (Liu et al. 2013) et est enlevée par la déméthylase FTO ou ALKBH5 (Jia et al. 2011; Zheng et al. 2013). La croissance de l'ovocyte n'est pas affectée par la déplétion de YTHDF2 (Ivanova et al. 2017). En revanche, les embryons, selon un effet maternel, sont anormaux au stade deux cellules (Ivanova et al. 2017). D'autre part, la déplétion de METTL3 dans l'ovocyte engendre l'augmentation des dommages à l'ADN de l'ovocyte, des défauts de maturation de l'ovocyte et une ovulation anormale. Parmi les nombreux défauts on peut citer le blocage de la formation du fuseau méiotique et la désorganisation du cytosquelette par l'accumulation de l'alpha-tubuline juxtaposée au noyau (Mu et al. 2021). Les embryons ne passent pas le stade 2 cellules (Mu et al. 2021). En miroir, la déplétion de la déméthylase m6A (ALKBH5) entraîne la stabilisation de nombreux transcrits (Zheng et al. 2013). Ainsi, la dynamique de déposition/élimination de m6A, plutôt que la déposition elle-même, semble contrôler la dégradation du transcriptome maternel. Il est intéressant de noter que, dans les cellules de mammifères, les niveaux de déposition post-transcriptionnelle de m6A contrôlent le temps de rétention nucléaire des ARNm (Tang et al. 2024).

3.3.2.5 Le complexe de decapping DCP1A DCP2

Dcp1a et *Dcp2* sont décrits comme des ARNs dormants puisque leurs protéines correspondantes ne sont pas détectables dans l'ovocyte GV mais qu'elles sont traduites et s'accumulent durant la maturation de l'ovocyte (Ma et al. 2013). Aucun article ne parle de l'expression du paralogue de DCP1A, DCP1B dans l'ovocyte qui pourtant pourrait jouer un rôle fonctionnel dans la stabilité du transcriptome (Vukovic et al. 2024). Cependant, l'inhibition de l'accumulation de DCP1A et DCP2 durant la maturation de l'ovocyte diminue le taux de dégradation du transcriptome maternel et la reprise de la transcription dans l'embryon de deux cellules (Ma et al. 2013). Ces données suggèrent l'importance de la dégradation du transcriptome maternel médié par le complexe de decapping DCP1A/DCP2 dans la progression méiotique et la reprise de la transcription de l'embryon précoce.

Chez les eucaryotes, DCP1A est un cofacteur nécessaire à l'activité catalytique de DCP2 qui par son interaction induit un changement conformationnel actif (She et al. 2008). Chez les métazoaires, l'interaction de DCP1A et DCP2 est faible et nécessite l'interaction d'EDC afin de stabiliser le processus de décapping (C. Te Chang et al. 2014; Charenton et al. 2016). Dans les cellules somatiques, EDC, XRN1, DCP1A/ DCP2, LSM1-7 et LSM14B font partie des granules cytoplasmiques sans membrane nommées P-bodies (Bashkirov et al. 1997; Cougot, Babajko, and Séraphin 2004; Van Dijk et al. 2002; Ingelfinger et al. 2002).

Les *P-bodies* sont les granules cytoplasmiques le plus communes dans les cellules de mammifères et impliquées dans la répression de la traduction des ARNm. De façon bivalente, les *P-bodies* sont impliqués dans la dégradation et le stockage d'ARNs (Cougot et al. 2004). De fait, les *P-bodies* sont des centres de tri dans lesquels se déroule une sélection d'ARNs dégradés via raccourcissement de la queue poly(A). Le contrôle de la traductibilité se fait par assemblage et dissolution dynamique de la structure qui, lors de sa dissolution, relâche des ARNs messagers dans le cytoplasme prêts à être rallongés en queue poly(A) et traduits, (pour revue (Parker and Sheth 2007)). Chez la souris, les *P-bodies* sont présents dans l'ovocyte dans les follicules primordiaux mais disparaissent rapidement au début de la croissance (Flemer et al. 2010). En particulier, la désagrégation progressive de P-bodies se fait dans le cytoplasme

et coïncide avec la formation de SCA (*SubCortical Aggregate*) en périphérie de l'ovocyte qui co-localise avec le signal poly(A), la protéine YBX-2 et CPEB (Flemr et al. 2010).

3.3.2.6 ZAR

Les protéines de liaison à l'ARNm, *Zygotic ARrest (ZAR)*, ZAR1 et ZAR2 exprimées spécifiquement durant la croissance et maturation de l'ovocyte puis sont dégradées au cours de la progression méiotique (Rong et al. 2019). *Zar1* a été l'un des premiers gènes à effet maternel à être identifié (Wu et al. 2003). ZAR1 et ZAR2 sont nécessaires à la maturation méiotique, à la régulation du transcriptome maternel et à l'activation de la traduction (Rong et al. 2019). Leur déplétion mène à des défauts de la reprise de la méiose (ségrégation anormale des chromosomes (aneuploïdie), altération de l'expulsion des globules polaires) et à l'arrêt du développement au stade zygote (Wu et al. 2003). Dans les ovocytes en croissance, les protéines ZAR sont associées à YBX2 et au cytosquelette et l'absence de ZAR1 et ZAR2 résulte en la déplétion du transcriptome maternel et à des niveaux protéiques faibles lors de la maturation comme la CYCLINE B1 et BTG4 (Rong et al. 2019). De plus, ZAR1 lors de la maturation de l'ovocyte est nécessaire à formation d'une structure cytoplasmique récemment découverte nommée *Mitochondrial-Associated RiboNucleo protein Domain (MARDO)*. Le MARDO contient des ARNs dormants qui co-localisent avec un regroupement de mitochondries (Cheng et al. 2022). La mise en place du MARDO dépend du positionnement des mitochondries, de ZAR1 (Cheng et al. 2022) et LSM14B (Wan et al. 2023) et colocalise avec YBX2 (Cheng et al. 2022) ce qui stabilise le transcriptome (**figure 41**).

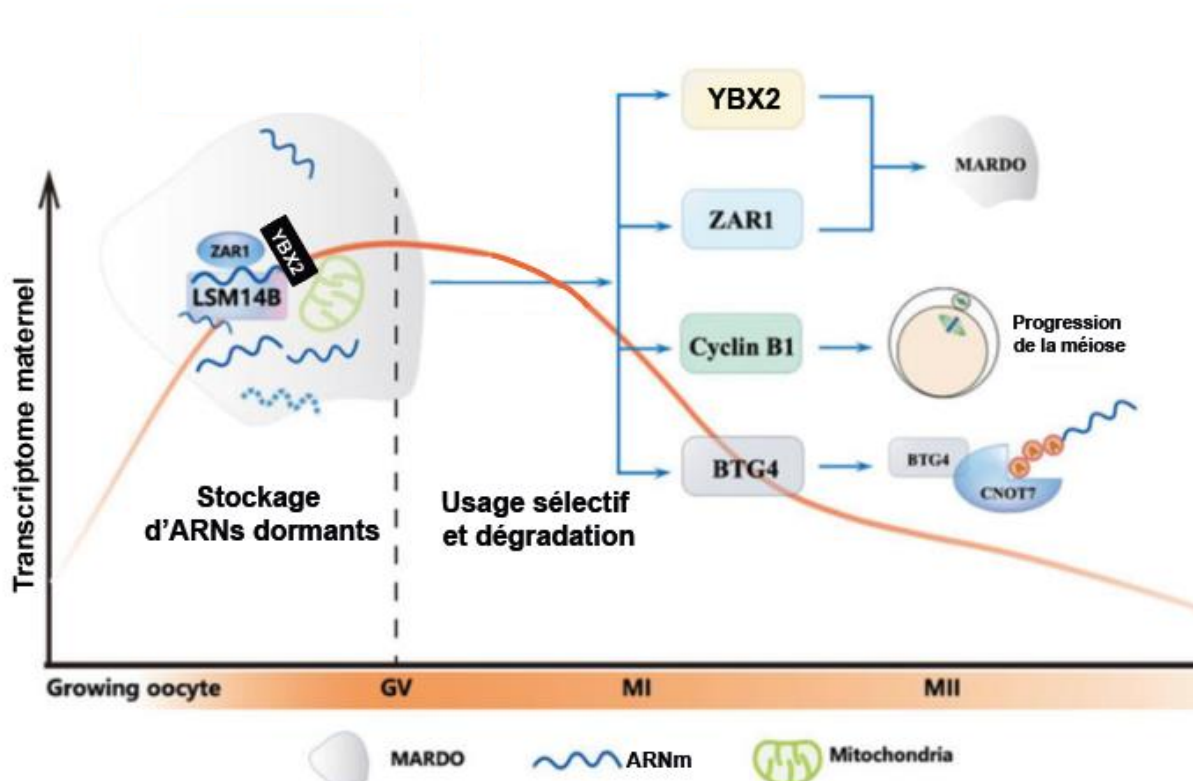


Figure 41 : LSM14B promeut l'assemblage du MARDO durant la croissance de l'ovocyte (Lim et al. 2014)

Au début de la croissance de l'ovocyte, ZAR1 et les mitochondries ne co-localisent pas et un regroupement important de mitochondries sont juxtaposées au noyau mais sont aussi retrouvées en minorité dispersées dans le cytoplasme (Cheng et al. 2022). En revanche, lorsque l'ovocyte croît en taille, l'on commence à voir apparaître zones de co-localisation entre ZAR1 et les mitochondries sous la membrane cytoplasmique puis, dans les ovocytes ayant fini leur croissance, ZAR1 et les mitochondries co-localisent dans des foci dispersés dans tout le cytoplasme (Cheng et al. 2022). De plus, lorsque la configuration SN de l'ovocyte est présente et aussi lorsque l'ovocyte mature, les mitochondries et ZAR1 se rassemblent en amas autour du noyau, puis autour du fuseau méiotique (Cheng et al. 2022). Ce réarrangement de la distribution du MARDO est impliqué dans le contrôle du stockage et dans la dégradation du transcriptome maternel. Notamment, le regroupement des mitochondries actives favorise le stockage alors que la dégradation de ZAR1 par le protéasome entraîne la dissolution du

MARDO et entrainerait le relâchement des ARN messagers dormants associés à YBX2 et LSM14B (**figure 42**) (Cheng et al. 2022; Wan et al. 2023).

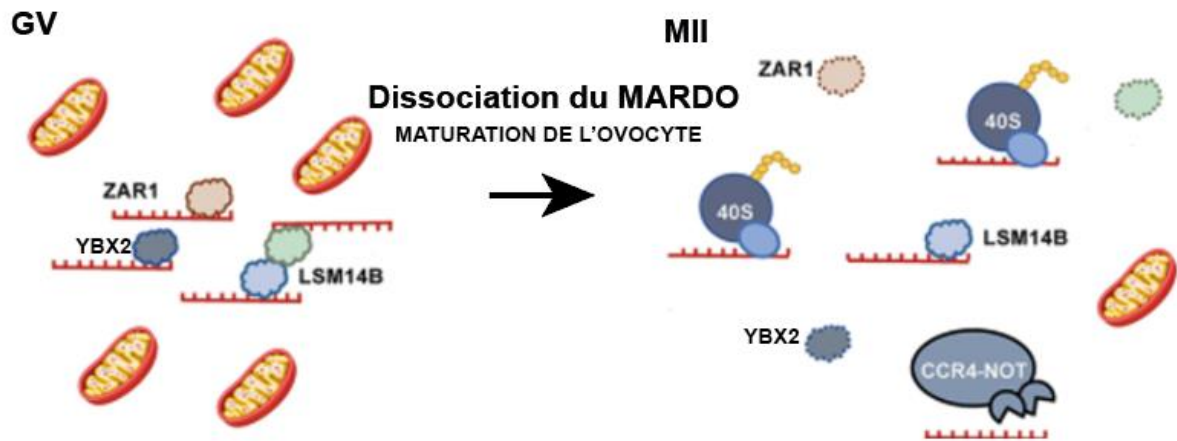


Figure 42 : La dissolution du MARDO durant la maturation de l'ovocyte relâche des ARNm dormants prêts à être traduits et dégradés après usage (Ermisch and Wood 2024).

Il est intéressant de noter que LSM14B est retrouvé dans des granules cytoplasmiques de type *P-bodies* lors de la formation des follicules primordiaux (Shan et al. 2023). La déplétion de LSM14b mène à l'absence des granules cytoplasmiques, à la disparition de la réserve de follicules primordiaux et une diminution considérable de l'abondance en ARNm des ovocytes restants (Shan et al. 2023).

Les principales sous-unités du contrôle de la stabilité du transcriptome maternel sont listées **tableau 2**.

Ensemble, ces données montrent que le contrôle de la traductibilité et de la dégradation du transcriptome maternel est crucial durant la maturation de l'ovocyte et suggèrent fortement l'implication des différentes sous-unités régulatrices lors de la croissance de l'ovocyte. Notamment YBX2 fait le lien entre le MARDO, le SCMC et les *lattices* (mentionnés au chapitre 1).

Tableau 2 : Principales sous unités du contrôle de la stabilité du transcriptome maternel, adapté de (Y. Jiang et al. 2023).

ARE, *AU-rich element*; BTG4, *BTG anti-proliferation factor 4*; CCR4–NOT, *carbon catabolite repression 4 (CCR4)–negative on TATA-less (NOT) deadenylase complex*; CPE, *cytoplasmic polyadenylation element*; CPEB1, *cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1*; DAZL, *deleted in azoospermia-like*; DBE, *DAZL binding element*; eIF4E, *eukaryotic translation initiation factor 4E*; ePAB, *embryonic poly(A)-binding protein*; m7G, *7-methylguanosine*; MBE, *Musashi binding element*; MSY2, *mouse Y-box protein 2*; PABPC1, *cytoplasmic PABP 1*; PABPN1L, *nuclear PABP 1 like protein*; PBE, *Pumilio protein binding element*; PUM1/2, *Pumilio protein 1/2*; ZAR1/2, *zygote arrest protein 1/2*; ZFP36L2, *Zinc finger protein 36-like 2*.

Nom	Mode de recrutement	Fonction associée	Références
BTG4	PABPN1L ePAB	Adaptateur pour CCR4–NOT	(Doidge et al. 2012; Liu et al. 2016; Pasternak et al. 2016; Yu et al. 2016; Zhao et al. 2020; Zheng et al. 2020)
CNOT6L	ZFP36L2	Dégradation sélective d'ARNm	(Sha et al. 2018)
CPEB1	CPE (UUUUA[A]U)	Régulation de la polyadénylation	(Belloc et al. 2008; Mendez et al. 2000; Piqué et al. 2008; Tay and Richter 2001)
DAZL	DBE (UU[G/C]UU)	Activation de la traduction	(Chen et al. 2011)

DCP1A/DCP2	Coiffe LSM	Déstabilisation de l'ARNm	(Ma et al. 2013; Mehlmann 2013)
DIS3L2	Poly(A) courte via la PABPN1	Sous unité catalytique de l'exosome (cytoplasmique)	(Wu et al. 2023; Zhao et al. 2022)
eIF4E (4EBP)	Coiffe	Initiation de la traduction	(Susor et al. 2015)
EXOSC10	Poly(A) courte via la PABPN1 ?	Sous unité catalytique de l'exosome (nucléaire)	(Demini et al. 2023; Wu and Dean 2020)
MUSASHI	MBE ([G/A]U ₁₋₃ AGU)	Activation de la traduction	(Arumugam, MacNicol, et al. 2012; Arumugam, Macnicol, and Macnicol 2012; Charlesworth et al. 2006; Cragle et al. 2019; Sutherland et al. 2015)
PABPC1	Poly(A)>12 nucléotides	Initiation de la traduction et stabilité de l'ARNm	(Ozturk, Sozen, and Demir 2015; Yi et al. 2018)
PABPC1L (ePAB)	Poly(A)>12 nucléotides	Initiation de la traduction et	(Ozturk et al. 2015; Ozturk and Uysal 2017; Seli et al.

		stabilité de l'ARNm	2005; Uysal and Ozturk 2019)
PABPN1	Poly(A)>12 nucléotides	Stabilité de l'ARNm naissant Epissage alternatif/Export des ARNs	(Bear et al. 2003; Huang et al. 2023; Kwiatek et al. 2023)
PABPN1L	Poly(A)	Adaptateur de BTG4	(Liu et al. 2016; Zhao et al. 2020)
PAPOLA (PAP α)	CPSF	Régulation de la polyadénylation	(Jiang et al. 2021)
PUM1/PUM2	PBE (UGUANAUA)	Répression de la traduction	(Jansova et al. 2018; Mak et al. 2016; Ota et al. 2011; Padmanabhan and Richter 2006)
TUT4/TUT7	Poly(A) courte	Déstabilisation de l'ARNm	(Lim et al. 2014)
YBX2 (MSY2)	UCCAUCA	Stabilisation de l'ARNm	(Medvedev et al. 2008, 2011; Yang et al. 2005)
ZAR1/ZAR2	([A/U]UU[A/G]UCU)	Stabilisation de l'ARNm, activation de la	(Charlesworth et al. 2012; Rong et al. 2019)

		traduction et stockage	
ZFP36L2	ARE(AUUUA)	Adaptateur pour recrutement de CCR4-NOT/ ARNm riches en AU Modification de la chromatine Répression de la transcription	(Ball et al. 2014; Dumdie et al. 2018; Sha et al. 2018)

Objectifs du projet de recherche

Dans l'introduction, j'ai parlé des caractéristiques de la folliculogenèse, de la croissance et de l'identité ovocytaire et de l'importance de la diversité des mécanismes d'initiation de la transcription dans les processus de différenciation cellulaire précis. L'étude de TBPL2 chez la souris est l'opportunité d'étudier un contexte unique d'initiation de la transcription médiée par l'ARN Pol II durant la croissance de l'ovocyte puisque l'ovocyte ne se divise pas et accumule de grandes quantités d'ARNs qui sont stabilisées à long terme dans des structures sans membrane. Le raccourcissement de la queue poly(A) contrôle la stabilité à long terme de l'ARN messager et sa répression traductionnelle tandis que son rallongement cytoplasmique est associé avec la traduction active et aux vagues de dégradation sélectives durant la maturation de l'ovocyte et le développement embryonnaire précoce. Cependant, les mécanismes de mise en place du stockage et de remodelage des populations d'ARNs messagers durant la croissance de l'ovocyte ne sont pas caractérisés. Les ovocytes *Tbpl2*^{-/-} sont bloqués en croissance (Gazdag et al. 2009). Est-ce que l'arrêt de croissance est lié à des défauts de régulation de la stabilité des transcrits ? Le séquençage d'ARNs totaux a révélé que les ovocytes en croissance mutants pour *Tbpl2* présentent un grand nombre d'ARNm régulés à la baisse, mais aussi un nombre équivalent de transcrits qui sont régulés à la hausse (Yu et al. 2020). Cette observation est étonnante, compte tenu du rôle de TBPL2 dans l'initiation de la transcription par l'ARN Pol II, et suggère que les mécanismes de stabilisation sélective et dégradation sont actifs durant la croissance de l'ovocyte. L'hypothèse initiale étant que la stabilisation des nombreux ARNs messagers est la conséquence d'un défaut de la machinerie de dégradation de l'ARNm. Cette hypothèse est soutenue par l'analyse GO des ARNs régulés à la baisse qui révèle l'enrichissement de la catégorie « Ribonucléase Poly(A) » (Yu et al 2020).

Mon projet de thèse s'inscrit dans la caractérisation du phénotype *Tbpl2* à différentes échelles et vise à mieux comprendre l'importance fonctionnelle des mécanismes de contrôle de la stabilité du transcriptome maternel durant la croissance de l'ovocyte selon 4 axes.

- I. Etude de l'implication du cytosquelette et de la distribution des organelles pour la croissance ovocytaire

PROJET DE RECHERCHE

II. Analyse temporelle de la folliculogenèse et étude du devenir des ovocytes *Tbp12^{-/-}*

III. Evaluation de l'expression de sous unités protéiques impliquées dans la stabilité et la traductibilité des ARNm

IV. Etude de la transcription naissante, de localisation subcellulaire d'ARNm et analyse de la longueur des queues poly(A)

Matériel et Méthodes

1. Lignées murines

L'expérimentation animale a été réalisée en accord et suivant les règles et recommandations éthiques du ministère de l'Agriculture. Le projet a été évalué en équipe, validé par nos tutelles, par les membres du HCERES et est financé par la FRM. Le projet a été validé par le ministère de l'éducation et par le comité d'éthique de la recherche.

Les lignées murines étudiées sont les suivantes :

Tbp2^{-/-} (Gazdag et al., 2009) ; *Taf7*^{flox/flox} (Gegonne et al 2012) ; *Taf10*^{flox/flox} (Mohan et al, 2003) ; *Zp3-Cre* (Lewandoski et al. 1997) ; *Taf2*^{flox/flox} a été nouvellement générée (2023) par l'Institut Clinique de la Souris. Le croisement d'une lignée *gène*^{flox/flox} avec la lignée *Zp3-Cre* permet de déléter conditionnellement le gène en question au début et pendant la croissance de l'ovocyte et seulement spécifiquement dans l'ovocyte.

2. Génotypage

La récupération des premières phalanges correspondant au numéro de l'animal permet de réaliser le génotypage. L'extraction d'ADN génomique est réalisée par lyse des tissus une nuit à 55°C dans une solution contenant 100 µL de buffer de lyse DirectPCR (cat#102-T, Viagen) et 2.4 µL Protéinase K (10 mg/mL, P6556-1G, SIGMA) par tube. Le lendemain matin, les échantillons sont bouillis pendant 5 min afin de désactiver la protéinase, puis les tubes sont centrifugés rapidement. Le mix de PCR est le suivant **Tableau 3** pour 400 tubes, il est ensuite aliquoté et congelé dans des tubes de 2 mL. Les lignées *Zp3* ont été génotypées par Matthieu STIERLE.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau 3 : Mix pour génotypage

10 mM dNTP (04728858001, Roche)	200 µL
10X Red Cresol	1000 µL
10X PCR buffer (11271318001, Roche)	1000 µL
100% DMSO (Culture Cellulaire)	800 µL
Eau pure (MediaPrep, IGBMC)	6800 µL
100 µM primer Fw voir <i>Tableau 10</i>	60 µL
100 µM primer Rv voir <i>Tableau 10</i>	60 µL

Chaque réaction PCR contient : 1 µL d'ADN génomique, 25 µL de mix PCR et 0.2 µL de Taq polymérase (04728858001, Roche) et suit le programme d'amplification suivant **Tableau 4**.

Tableau 4 : Programme pour PCR génomique

Dénaturation	94°C, 2 min	1 x
Dénaturation	94°C, 30 sec	35 cycles
Hybridation	62°C, 30 sec	
Elongation	72°C, 30 sec	
Elongation terminale	72°C, 7 min	1 x
Incubation	12°C	∞

La révélation se fait sur un gel 1.2% agarose (50004, Lonza) contenant 10 μ L de bromure d'éthidium (10mg/mL, EU0070, Euromedex) pour 400 mL de solution TAE. 4 μ L de marqueur de taille moléculaire (SM0331, Thermo Scientist) permet de déterminer la taille des fragments obtenus.

3. Collecte d'ovocytes en croissance : jours 5, 7 et 14 après la naissance (PN5, PN7, PN14)

Les ovaires sont rapidement disséqués et retirés de leurs tissus adhérents dans du PBS 1x filtré puis transférés dans un milieu enzymatique (volume final~ 500 μ L) contenant 430 μ L de PBS 1x filtré, 30 μ L de Collagénase (30 mg/mL, C2674-100MG, SIGMA), 12,5 μ L de Trypsine (1%, 93615-5G, SIGMA) et 25 μ L de Hyaluronidase (10 mg/mL, H3884, type IV-S, SIGMA). Les ovaires sont incubés dans le milieu réactionnel à 37°C pendant 30 minutes en homogénéisant avec une P1000 toutes les 5 minutes. La digestion enzymatique est arrêtée en ajoutant 1 mL de milieu M2 (M7167-100ML, SIGMA) dans chaque tube. Ensuite, la solution de 1,5 mL est transférée dans une boîte de Petri 35 mm, les ovocytes, dépourvus de cellules folliculaires sont rapidement aspirés sous binoculaire avec système d'aspiration manuel en utilisant une pipette pasteur préalablement affinée sous un bec Benzen.

Les zygotes et embryons deux cellules sont récupérées dans l'ampoule tubaire, respectivement 24 et 48h après l'apparition d'un bouchon vaginal (BV). La collecte se fait dans des plaques PIREX en verre à 9 puits (7220-85, Life Sciences) dans 500 μ L/ puits de milieu M2 (M7167 avec HEPES, SIGMA) préchauffé à 37°C.

4. Immunofluorescence : ovocytes en croissance, zygotes et embryons 2 cellules

Les échantillons issus de la collecte sont fixés dans une solution de PFA 4 %, 15 minutes. Ensuite, ils sont lavés, bloqués et perméabilisés dans deux bains successifs de 500 μ L de « Blocking Solution » (BS : 1 % BSA (p/v) 0.2 % Triton X-100 (v/v)). Le premier bain est rapide afin de « rincer » la PFA, le deuxième est de 20 minutes afin de perméabiliser efficacement. Tous les anticorps primaires sont dilués au 1 : 500 (v/v) dans la solution de BS.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'incubation des anticorps primaires se fait à 4°C, dans une chambre humide, pendant une nuit jusqu'au lendemain matin (« *Over Night* », ON). Le jour suivant, les échantillons sont lavés dans 500 µL de solution de BS pendant 20 minutes, puis incubés avec l'anticorps secondaire dilué au 1 : 500 (v/v) pendant 2h à température ambiante, protégés de la lumière. Enfin, les échantillons sont lavés dans deux bains de 500 µL de BS pendant 15 minutes, puis rincés dans un troisième bain. Ensuite, les échantillons sont montés sur des lamelles 18 mm (PB-5170, EUROMEDEX) recouvertes en leur centre, d'une solution de Poly-D-Lysine (A38904-01 0.1mg/mL, GIBCO) dans une goutte de Vectashield-DAPI (H-1200 Vectorlabs) sur une lame SuperFrost Plus (J1800AMNZ, Epredia).

Le nom des anticorps, les espèces animales d'origine et les épitopes utilisés pour l'inoculation sont listés **Tableau 5**

Tableau 5 : Table des anticorps utilisés en immunofluorescence

Nom/ provenance	Epitope	Peptide inoculé (séquence conservée entre la souris et l'homme)	Espèce/ clonalité
1PB7C2 IGBMC Equipe TORA	RPB1	TSPSYSP TSPSYSP PSYSP	SOURIS monoclonal
90 IGBMC Equipe SERAPHIN	DCP1A	“Domaine N-ter”	LAPIN polyclonal
PA5-115102	DCP2	LKGKNQSMRGNGR KQYQDSPNQKK	LAPIN polyclonal

MATÉRIEL ET MÉTHODES

ab21060	PABPC1	Non renseigné	LAPIN polyclonal
A303-523A	PABPN1	MAAAAAAAAAAAGA AGGRGSGPGRRL VPGAGGEAGEGDPG GAGDYGNGL	LAPIN polyclonal
ab251660	PAPOLA	HVLQK- KKHSTEGVKLTALN DSSLDLSDSDNSM SVPSPTSA- KTSPLNSSGSSQGRN SPAPAVTAASVT- IQA-EVSVPQ-NSES- GG- SSESIPQTATQPAISP PPKPTVSRVVSSTRL VNP-PRSSGN----- ATK-P-PIVGVK	LAPIN polyclonal
Don à l'équipe SERAPHIN de Tadashi Yamamoto, OIST, Japon	CNOT8	Non renseigné	SOURIS monoclonal
Don à l'équipe SERAPHIN de Shigeki Jinno, Equipe OKAYAMA, Japon	CNOT9 (α Rcd-C)	Non renseigné	LAPIN polyclonal

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3025 IGBMC Equipe SERAPHIN	CNOT11	KELSSLLSIISEEAGG GSTFEGGLSTAFHHYF SKADHFRLGSLVM LLQQPDLLPSAAQRL TALYLLWEMYRTEP LAANPFAASFAHLL NPAPPARGGQEPDR PPLSGFLPPITPPEKF FLSQLMLAPPRELFK KTPRQIALMDVGNM GQSVDISGLQLALAE RQSELPTQSKASFPSI LSDPDPDSSNSGFDS SVASRITESLVSGPK PPIESHFRPEFIRP	LAPIN polyclonal
ab264327 IGBMC Andrea BERNARDINI	TAF1 (TAFII250)	GSYEEDPKSNTQD TSFSSIGGYEVS EEEEDEEEEEQRS GPSVLSQVHLS	LAPIN polyclonal
3039 IGBMC Equipe TORA	TAF2 (TAFII150)	Protéine entière (<i>full length</i>)	LAPIN polyclonal
S4045	SC-35 et SRRM1/2	Non renseigné	SOURIS monoclonal
MABE419- H20	7mcap	Non renseigné	SOURIS monoclonal

MATÉRIEL ET MÉTHODES

39TA2F5 IGBMC Equipe TORA	TAF3 (TAFII140)	QFPQPGSKDAEERK EYIPD	SOURIS monoclonal
32TA2B9 IGBMC Equipe TORA	TAF4 (TAFII135)	LAASAAHHHHHLAP RTPEVRAC	SOURIS monoclonal
1TA1C2 IGBMC Equipe TORA	TAF5 (TAFII100)	AFEDLETDDFTTATG HINLC	SOURIS monoclonal
25TA2G7 IGBMC Equipe TORA	TAF6 (TAFII80)	LTDEVSYRIKEIAQD ALK	SOURIS monoclonal
3475 fraction1 2015 IGBMC Equipe TORA	TAF7 (TAFII55)	Protéine entière (<i>full length</i>)	LAPIN polyclonal
2TAU2B8 IGBMC Equipe TORA	TAF8 (TAUBEN USS)	GTR- GSKQSTNPADNYHL AC	SOURIS monoclonal
53TA1E12 IGBMC Equipe TORA	TAF9 (TAFII31)	LQKKA---AGRITVP	SOURIS monoclonal
3024 IGBMC Equipe TORA	TBPL2	PDEHGSELNLNSNSS PDPQ	LAPIN polyclonal
ab33164	YBX2 (MSY2)	DGETKPSQGPTDGS RPEPQRPRNRPYFQR	LAPIN polyclonal

MATÉRIEL ET MÉTHODES

		RRQQPPGPRQPIAAE TSAPINSGDPPTTILE	
2USP3A2 3.04.05 IGBMC Equipe TORA	USP22	Non renseigné	SOURIS monoclonal
2ATX 2B1 IGBMC Equipe TORA	ATXN7L3	KKKPKPPAPPTPSIY DDIN	SOURIS monoclonal
2GC2C11 IGBMC Equipe TORA	KAT2A/GC N5	CKCNGWKNP-PPTA-	SOURIS monoclonal
610822 35/RUO	GM130	QDKEEMKVKLLELQ ELVLRLVNERNEWQ GKFLAVSQNP-DV-- PVPTGSQEFGAADQ Q-DLREVSLADD- EPAQGEAGVPAP- ENPTAQQIMQLLREI QNP-ERPGLGSNPCIP	SOURIS monoclonal
ab15200	DESMINE	VEIATYRKLLLEGES RINLPIQT- SALNFRETSPEQRGS EVHTKKTVMIKTJET RDGEVVSEATQQQH EVL	LAPIN polyclonal
1Tu2A2 IGBMC	B- TUBULINE	Non renseigné	SOURIS monoclonal

3E8	p-Ser5	Peptide linéaire conjugué à l'ovalbumine correspondant à la sous-unité B1 de l'ARN polymérase (CTD phosphorylé au niveau du résidu Ser-5).	RAT monoclonal
75D8	FOXO3A	Protéine entière	LAPIN monoclonal

5. Immunohistofluorescence

Les ovaires sont disséqués sous binoculaire et retirés de leurs tissus adhérents puis transférés dans 1mL de solution de PFA 4 % (v/v) une nuit à 4°C sur un homogénéisateur tournant. Les ovaires sont ensuite lavés dans trois bains de PBS 1X puis transférés dans une solution de sucrose 20 % (p/v) pendant 4h à 4°C puis inclus dans un milieu Cryomatrix (6769006, Epremedia) solidifié aux vapeurs d'azote liquide. Des coupes (sections) de 14 µm sont réalisés à l'aide d'un cryostat et stockées à -80°C.

Les sections sont perméabilisées dans une solution PBS-Triton 0.1 % (v/v) pendant 20 minutes à température ambiante. Les sections d'ovaire sont bloquées dans une solution de BS contenant 0.5% de sérum de chèvre (16210-064, GIBCO) pendant 20 minutes. Les sections sont ensuite détournées à l'aide d'un feutre Dakopen (S2002, Dako) puis incubées avec l'anticorps primaire dilué au 1 :500 dans la solution de blocage dans une chambre humide à 4°C O/N. Le lendemain les lames sont lavées, deux fois 15 minutes dans une solution de PBS-Tween 0.05 % (v/v) sous agitation (20 rpm) puis incubées, avec l'anticorps secondaire et le Hoechst (33342, 10mg/mL SIGMA) dilués au 1 :1000 (v/v), dans la solution de blocage pendant 1h30 à température ambiante dans une chambre humide protégée de la lumière.

Enfin les lames sont lavées cinq fois (5 minutes chaque) dans une solution de PBS-Tween 0.05 % dans une cuve en verre sous agitation (30 rpm). Les lames sont montées dans du Vectashield sans DAPI (H-1000, Vectorlabs).

6. smiFISH adapté pour cellules non adhérentes

Adapté de :2016 Dec 15; 44(22): e165. doi: 10.1093/nar/gkw784

Tableau 6 : Produits nécessaires pour le smiFISH

Produits	Référence	Stockage (IMPORTANT)
SSC 20X	MediaPrep	Temperature ambiante
20 µg/µL ARNt de levure	Roche, 10109541001	-20°C
Formamide 100%	F90376-100mL- Sigma	Température ambiante
Flap-structured duplexes/fluorophore 100 µM	IDT	-20°C
Eau traitée RNase-free	693520, Millipore	Température ambiante
BSA RNase-free	B9000S NEB	-20°C
Vanadyl ribonucleoside complexes (VRC)	94742-10mL - SIGMA	-20°C
Dextran Sulfate 40 %	D8906-5G, SIGMA	4°C

Un total de 26 sondes ADN sont générées pour cibler un même ARN, leurs séquences sont listées **Tableau 9**. Pour cela, le script *OligoStan* sur R développé par Thierry GOSTAN (Tsanov et al. 2016) est utilisé. Le programme génère des sondes couvrant l'ARN de manière non redondante. De cette façon, une amplification de fluorescence en points (=spots) sera

MATÉRIEL ET MÉTHODES

visible dans les cellules. Les sondes sont synthétisées par IDT (*option in plates*) sous forme diluée à 100 μM dans un tampon Tris-EDTA (TE). Pour chaque transcrit cible, 2 μL de chaque sonde parmi les 26 sont dilués ensemble pour une concentration finale de 4.15 μM (= sonde 5X). Un mix de sonde 1X contient : 3 μL de sonde 5 X + 12 μL 1x Tris EDTA(TE) pour une concentration finale de sondes à 0.83 μM . Ensuite, la réaction d'annealing consiste en l'hybridation des sondes contenant les fluorophores par appariement de bases de la séquence FLAP (CCTCGTCGACATGCATT) selon le schéma ci-dessus :

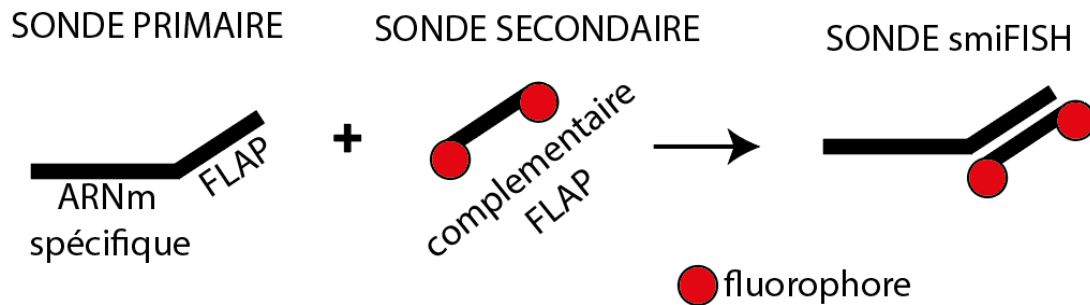


Figure 43 : Etape d'hybridation des sondes fluorescentes en smiFISH

Le tampon d'annealing "NEBuffer 3 | NEB 10X" contient 1M NaCl, 500 mM Tris-HCl et 100 mM MgCl₂, (ajusté à pH8). Le mix d'annealing (20 μL) est récapitulé **Tableau 7**.

Tableau 7 : Etape d'annealing smiFISH

Produits	Volume	Cf
Mix sonde (1X)	4 μL	4 μM
FLAP-cy3 ou Atto 488	2 μL	5 μM
Tampon NEB 10X	2 μL	1x
Eau (RNase-free)	12 μL	20 μL totaux

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les 20 µL totaux de sondes primaires+ secondaires sont incubées dans le thermocycleur suivant le programme : 85°C, 3 min ; 65°C, 3 min. 25°C, 5 min puis les sondes (0.83 µM final) sont aliquotées et conservées à -20°C.

Les ovocytes issus de la collecte sont fixés 10 minutes avec une solution de PFA 4% (v/v) puis perméabilisés dans une solution de Triton 0.3 % (v/v) /VRC 1x (v/v) pendant 20 min à température ambiante puis conditionnés pendant 10 minutes dans une solution « PHB » contenant du formamide 10% (v/v) et du SSC 2x (v/v). Ensuite, les ovocytes sont adhérents sur des lamelles de 18 mm couvertes de poly-lysine. Les lamelles contenant les ovocytes sont délicatement transférées dans 1 mL de solution PHB dans une plaque 12 puits (*Falcon 12-well Clear Flat Bottom Not Treated Multiwell Cell Culture Plate*) le temps de préparer les mix 1 et 2, récapitulés ci-dessous au **Tableau 8**.

Tableau 8 : Composition des mix 1 et mix 2 pour smiFISH

Mix 1(pour 2 lamelles)	Mix 2 (un par ARN cible)
42 µL eau RNase-free	° 26.3 µL eau RNase-free
° 2 µL BSA RNase-free (20 mg/mL)	° 15 µL formamide 100%
° 2µL VRC (200 mM)	° 5 µL SSC 20x
° 54 µL dextran sulfate (40%)	° 1.7 µL ARNt de levure (20 mg/ mL)
100 µL totaux	° 2 µL de sonde (0.83 µM)
	50 µL totaux

Les mix 1 et 2 sont vortexés et homogénéisés à la pipette avant de mélanger 40 µL de mix 1 avec 40 µL de mix 2 pour former la solution d'hybridation. Les 80 µL sont déposés dans la chambre d'incubation. La lamelle contenant les ovocytes est égouttée et retournée délicatement sur les 80 µL de solution d'hybridation sans faire de bulles. Afin d'éviter le dessèchement des sondes, la chambre d'incubation contient à l'intérieur une boîte de Petri 3.5

MATÉRIEL ET MÉTHODES

cm avec 1 mL de solution PHB (formamide 10% (v/v) et du SSC 2x (v/v)). Le tout est scélé avec du Parafilm, protégé de la lumière avec de l'aluminium et incubé 16h à 37°C. Le lendemain, les lamelles sont délicatement décollées et lavées deux fois avec 1 mL de solution PHB à 37 °C dans un puits de plaque 12 puits à l'abri de la lumière. Enfin, les lamelles sont égouttées, et sont retournées sur une goutte de Vectashield DAPI (H-1200, Vectorlabs) sur une lame SuperFrostPlus. Les ovocytes sont imagés avec un microscope Spinning Disk Yokogawa CSU-W1, Leica DMI8 équipé d'une caméra «Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V3» et analysées avec ImajeJ.

Tableau 9 : Liste des sondes primaires smiFISH

ARN cible	Séquence (5'→3') de la sonde primaire + séquence FLAPY (TTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT)
zp3-01	GAAACTAGCTTGGACCACTGGCGGGGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-02	CTCTGGCCGGGGTCTGGGGACTTGAATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-03	CTGCCTGGGGTATCGGCACTCAATGGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-04	CTGGGGTGGGAGTTCCACCCGGCAAATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-05	GAGGAAATAGCTTGACGCCATGGTCCCGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-06	GTGACAGCAAGGACTATAGCTGCCAGGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-07	CCACAGTCTGGTCGTTGGCCTTTCCATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-08	GAATATCAGGGGCCCTACAGTGACATCATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-09	TTCATCGGTCACGTGCCTGCGGTTTCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-10	CCTCTACTGGCAACCAACTCTGGGAAGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-11	GTTGAACGAACAGGCTTTGTTGAGCTTATCGGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-12	ATCTGGTTAGCTGGCGCGACTTTGAGATTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT

MATÉRIEL ET MÉTHODES

zp3-13	CAGGTGATGTAGAGCGTATTTCTGGAGCTGTTTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-14	GGGGGAGGAGTTCGGGTCTGGCAAAGGTTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-15	GGCTGGATAGGGTGGCTGCTCACATTTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-16	CCACTCACAGGGCGAGGGTCGTGGAGTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-17	CTGCACTCGTGCAACTGGGCGTTGAACTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-18	CTCTACTGACAGTCACCACTAGTTCAGCTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-19	CCACAGAGTCTGGGAATTGCACAGCTCTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-20	GGATACAAGGTAGGAAGAGGAGTGACACTTCCTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-21	AGGCAACCGTGGAAGTCCACGATGAAGTGATTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-22	ACCTCCACACGGTTAGTCCTGAGGATGTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-23	GCTGACAACCCTCTGAGCCAAGGGTGTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-24	CCAGACACTCCACCTTCACAGGTGATTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-25	CAAAATGGAATACATCCACCGTGAAGTGGAGATTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
zp3-26	TGCACCAGCTTCCCCGTGCCAAAAAGTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_1	CCAGAGGGATGCGGCGGCCATAAGTCTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_2	CCTGGGCTAGAGGTGTGCCCTGGAATTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_3	CTGTGAGTCTTCCAGACTACTGTTCTGCATTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_4	GCAGTGTGCTCTCGAGTGCTGTAGGCTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_5	CGAGCGGCGGGTGCGAAGTAGCACTTGTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_6	TGCGCAGAGCGGAGTCTGAGGCGCAATTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_7	TTCTCAATAGGGCTTTATTGGGGGTAAGTGGTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_8	TGCCTGTGCAGACTTCCTGCCTAGAATTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_9	CAGAACATGCCACTGCGGATCCGGTTTTACTCTCGGACCTCGTCGACATGCATT

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Uqcrc1_10	GGTGGTGCCATCCAAATGAGACACCAAAGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_11	TTCCTAAGGATGTTTTTGCCCCGAGTCACTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_12	CACTCTCTGTAGCACTGGTACATAGGCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_13	CTTGACAGGTGCACTCCACCACCGTATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_14	TGCAGTCATAGTGGCCTATGATGGCATTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_15	CCACTTGGAGGGTCACGTTGTCTGGGTATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_16	CGTCATCGCGATGGCGGATCTCACTGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_17	CTGTTGAGGTAGTCAGTCAAGTCTGTGCGCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_18	TGTCGCATGCAGGTAATCAAAGACCACGTTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_19	TTCTCTAAGGCATTGCCAGGCCGATTCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_20	TGGAGGGCCTGGGCGAAGGTTGCGGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_21	GTTAGCCACAGCAACGGAAGCCAGCGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_22	AGTGAAGCGACATGGAGTGAGACCAGGCATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_23	CCACCGTGCAGGTAGCATGCGAGGACTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_24	CCACACGCAGCCCGTTGTCCAAGATGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_25	CGCCGCCATCTTCTAACTTCCGTCAGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Uqcrc1_26	TAAGATGAGCCCCAATACTCTCTACCTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-01	AGGCACCGTGTCTGAGTTAAGGCCAGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-02	GGCTCTCGGGGATTTGCCTGTGTATCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-03	AATACACTTCCCGTGGCCTTAAAGTGGTCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-04	AGAGCTTGCTCCGTGGGACTTCGGACTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-05	CTGACCGGCTCAGTGGTGTGGTCCAGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-06	GGAGAGGTCTCCTGAGTGGCAAACACCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tysnd1-07	CACGGGGGTCCGAGATCGCGCAGAGGTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-08	GTCCGGGCAGAAGGCACCGAACGGAGTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-09	CGTGGCACAGCACTAGGCCTGGGTTATTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-10	TGTGGCAATGGGAAGAACTCTTGTTACTGATTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-11	ACTAGGACTCTGGGCTTCCAGGAAGAGTTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-12	GGTGGACCAGGGGCTATCAGGCTGAGTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-13	AGAAGTTGCACGTGGTTAGCCAGTGGGTGAATTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-14	CGATGAGGGGGTGGCTTGGGCTCTATTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-15	CTGGCTGGAGCACCGTGATGGGGATGTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-16	GAAGTTCAGGTGTGGGTAGGTGGCTCCCTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-17	GTTGTTGTCTCGAGTGTTGCTGGCGACAATTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-18	CCATGCACAGCGCACGTGGTCTGTAGTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-19	CCGACAGGATGCCTGAGGTCACCGAGTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-20	CGCTGACAGGCTCGCCTTCATGGAAGTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-21	CAGCAGGGACAGGCGTGGGAACACCATTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-22	TTCCAGGCTCACCCTGCTATGTCATTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-23	TAGCGGAGTGTACCAACACCCTGGCTTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-24	CATGGCGACAGGTGACCACCAGGCGATTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-25	GTGGCGGCAGCAGCACAGACAGGAATTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Tysnd1-26	CGCCGCGGCTCAGCGTGTTGAGGAAGTTAACTCGGACCTCGTCGACATGCATT

Tableau 10 : Table des primers

Nom	Séquence (5'→3')	Usage
2654	CCATAGCTCCATATCCAGGGGG	PCR génomique <i>Tbpl2</i> WT et <i>Tbpl2</i> KO
2655	CAATGTCTAGGTCTGTTCTCTACAC	PCR génomique <i>Tbpl2</i> WT
2659	CTTCCAAACAAGATTCCAAATGATGAAGCA AAG	PCR génomique <i>Tbpl2</i> KO
SDV27	TGATGGACATGTTTCAGGGATC	PCR génomique <i>Cre</i>
SDV28	CAGCCACCAGCTTGCATGA	PCR génomique <i>Cre</i>
SDV107	GTAGTGTCCAGCACACCTCT	PCR génomique <i>Taf10</i> ^{flox} et WT
SDV101	CAGTCTAACCTGCTCCGAGT	PCR génomique <i>Taf10</i> ^{flox} et WT

MATÉRIEL ET MÉTHODES

SDV430	GTATGAAAACCTGTGTCCTGGTCTG	PCR génomique <i>Taf7^{flox}</i> et WT
SDV431	GAAGGCAAGTTCTCAATGAAAGGG	PCR génomique <i>Taf7^{flox}</i> et WT
Ef	GGGATGCCAGGTGCAGATATAAACTC	PCR génomique <i>Taf2^{flox}</i> et WT
Er	TGGGCTCAAAACAGGAAGGGAGG	PCR génomique <i>Taf2^{flox}</i> et WT
F loxP E2-E3	CGTCGTCCAAAACACTGACACGTGC	PCR génomique <i>Tbp^{flox}</i> et WT
R loxP E2-E3	AGTACCCAGGCATGGTGGCA	PCR génomique <i>Tbp^{flox}</i> et WT
qPadi6 Fw	ACTCAGGCTCCTCACAAGAC	qPCR
qPadi6 Rv	TGGTCCTCAGTTTGTCTGGAT	qPCR
qUqcrc1 Fw	AAAGAATCGGCCTGGCAATG	qPCR
qUqcrc1 Rv	ACTACTGTTCTGCACGATATCTG	qPCR
qTysnd1 Fw	GTGCTGGTGGAGTGTGGTA	qPCR
qTysnd1 Rv	GTCCCCAGATTGCCACATTC	qPCR
qMap3k11 Fw	CCTTTGCACAACTCATGGCT	qPCR

MATÉRIEL ET MÉTHODES

qMap3k11 Rv	GAGTCCCGTGGCATCTCC	qPCR
qStat3 Fw	ATCTACGTGTTCCCAGACCG	qPCR
qStat3 Rv	TCAGGGACCACTTGCTTGAT	qPCR
q18s Fw	GTATCCCGTTGAACCCCAT	qPCR
q18s Rv	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	qPCR
PAT-ANCHOR	GCGAGCTCCGCGGCCGCGTTTTTTTTTTTTT	ePAT
PAT TVN	GCGAGCTCCGCGGCCGCGTTTTTTTTTTTTTVN	ePAT
Adaptateur Hairpin /RT	GAT CGG AAG AGC ACA CGT CTG /iSpC3/ TCA CAC GAC GCT CTT CCG ATC WWT TTT T*T*T* *T /3Phos	HA-PAT
Pre-HA primer	CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC	HA-PAT
HAPrimerR	CGC TCT TCC GAT CWW TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	HA-PAT
P5TSO-GGG	ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT rGrG+G /3Phos	HA-PAT
<i>Zp3</i> 189	TAGGGCCCCTGATATTCCTT	ePAT
<i>Csnk1d</i> 192	CACGACGTACCACCTACTGA	ePAT
<i>Zar1</i> 110	CTAGATGGGGCTAATGGAATGG	HA-PAT et ePAT
<i>Zar1</i> A0-120	TGCAATACCTTTTATTACAGGC	HA-PAT et ePAT
<i>Uqcrc1</i> -182	GAGCAGCTCCCAGACTACAA	HA-PAT

MATÉRIEL ET MÉTHODES

<i>Uqcrc1</i> A0-173	AGGGCTTTATTGGGGGTAAC	HA-PAT
nested <i>Uqcrc1</i>	GCTCCCAGACTACA	ePAT
<i>Map3k11</i> -149	CAAGTCCTGTTACTGTGGCC	HA-PAT
<i>Map3k11</i> A0-169	TTGGGGAGACAGCTTACAAGT	HA-PAT
<i>Tysnd1</i>	GAAGCCCAGAGTCCTAGTGG	HA-PAT et ePAT
<i>Tysnd1</i> A0-170	AGAGGTCAAGCCATTCAGATTGT	HA-PAT
nested <i>Tysnd1</i>	GTCTTCCCATTGCCACAGTGATAC	ePAT
<i>Stat3</i>	AGTGGCTTGTGTTCTGGC	HA-PAT
<i>Stat3</i> A0-160	TGCCAGACAGTTCCTATATAATCTTT	HA-PAT
<i>Esy3</i>	TGTCTTTAGTCCCAGCCCTG	HA-PAT
<i>Strap</i>	GCTCCTGCGACCATCAATTC	HA-PAT
<i>Btg4</i>	AGAGGCCTTGTCTTCCCTAA	HA-PAT
<i>Btg4</i> A0-250	TATCACCGGCAACATCTCTG	HA-PAT

7. Oligod(T) *FISH*

Adapté de Science 2022 Oct 21;378(6617):eabq4835. doi: 10.1126/science.abq4835. 2022

« Mammalian oocytes store mRNAs in a mitochondria-associated membraneless compartment »

Les ovocytes issus de la collecte sont fixés 30 minutes dans une solution de PFA 4% (v/v) puis perméabilisés dans une solution d'éthanol 70 % (v/v) durant 20 minutes, le tout à température ambiante. Les ovocytes perméabilisés sont déposés sur lamelle 18 mm (PB-5170,

EUROMEDEX) recouverte d'une solution de Poly-D-Lysine (A38904-01 0.1mg/mL, GIBCO). Les lamelles sont transférées rapidement dans un bain de réhydratation dans 1 mL de « *Wash Buffer A* » (SMF-WA1-60, Biosearch Technologies) supplémenté avec 10 % (v/v) de formamide (F9037-100ML, SIGMA). Le bain de réhydratation est enlevé par aspiration et les lamelles (une par puits) sont incubées avec 200 nM de sonde oligod(T)²⁰ (26-4320-02 Oligo d(T)20 cy3 Gene Link) dans un tampon d'hybridation (SMF-HB1-10, Biosearch Technologies) pendant 16 heures à 37°C. Le lendemain les lamelles sont lavées deux fois avec le « *Wash buffer A* » pendant 30 minutes à 37°C. Puis avec le « *Wash buffer B* » (SMF-WB1-20, Biosearch Technologies) pendant 30 minutes à 37°C, puis 30 minutes à température ambiante. Les lamelles sont montées dans du Vectashield-DAPI (Vectorlabs H-1200) sur des lames SuperFrost Plus (J1800AMNZ, EpreDia).

8. Incorporation métabolique d'éthynyl uridine (EU) adaptée pour cellules non adhérentes

Les ovocytes issus de la collecte sont mis en culture dans 1 mL de solution M16 (M7292-100ML, SIGMA) dans une plaque 12 puits (351143, *non treated multiwell* FALCON) dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂ pendant une heure. Le contrôle négatif contient 0.1 mM d'inhibiteur Triptolide dans le milieu. L'EU à 1mM est ensuite ajouté et incubé pendant 1 heure. Les ovocytes sont fixés dans une solution de PFA 4 % (v/v) à température ambiante pendant 30 minutes puis lavés dans une solution BS contenant 1% (p/v) de BSA et 0.2% (v/v) de Triton X-100. Les ovocytes sont ensuite perméabilisés dans du BS pendant 20 minutes. La réaction de Click-iT est réalisée suivant les recommandations du fournisseur (C10329, Invitrogen) et contient 428 µL du composant C (*RNA Reaction buffer*), 20 µL de CuSO₄ (Composant D), 1.8 µL d'Alexa Fluor azide, 50 µL d'additif de réaction. Les ovocytes sont transférés dans le mélange réactionnel et incubés 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Les ovocytes sont lavés deux fois avec le composant F (*Click-iT Reaction rinse buffer*) et sont délicatement adhérents sur des lamelles 18 mm (PB-5170, EUROMEDEX) recouvertes d'une solution de Poly-D-Lysine (A38904-01 0.1mg/mL, GIBCO) et montées sur une goutte de Vectashield DAPI (H-1200, Vectorlabs) sur une lame SuperFrost Plus (J1800AMNZ, EpreDia).

9. Incorporation métabolique de L-Homopropargylglycine (L-HPG) adaptée pour cellules non adhérentes

Les ovocytes issus de la collecte sont mis en culture dans 1 mL de solution filtrée de DNEM sans méthionine dans une plaque 12 puits (351143, *non treated multiwell* FALCON) dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂ pendant deux heures. Le contrôle négatif contient de l'EDTA à 100 mM dans le milieu. Ensuite, les ovocytes sont incubés avec 50 µM (v/v) de L-HPG à 37°C, 5% CO₂ pendant 30 minutes. Puis, les ovocytes sont fixés avec une solution de PFA 4 % (v/v) à température ambiante pendant 30 minutes. Ensuite ils sont lavés dans la solution BS contenant 1% (p/v) de BSA et 0.2% (v/v) de Triton X-100. La réaction de Click-iT est réalisée suivant les recommandations du fournisseur (C10429, Life Technologies) et contient 430 µL du composant C (*RNA Reaction buffer*), 20 µL de CuSO₄ (Composant D), 1.7 µL d'Alexa Fluor azide, 50 µL d'additif de réaction. Les ovocytes sont transférés dans le mélange réactionnel et incubés 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Les ovocytes sont lavés deux fois avec le composant F (*Click-iT Reaction rinse buffer*) et sont délicatement adhérents sur des lamelles 18 mm (PB-5170, EUROMEDEX) recouvertes d'une solution de Poly-D-Lysine (A38904-01 0.1mg/mL, GIBCO) et montées sur une goutte de Vectashield DAPI (H-1200, Vectorlabs) sur une lame SuperFrost Plus (J1800AMNZ, Epredia).

10. Microscopie confocale

L'acquisition d'images est faite avec un microscope confocal inversé SP8-X à l'aide d'un objectif HC PL APO CS2 63x/1.4 oil pour les immunofluorescences sur ovocytes et embryons et un objectif 40x/1.3 oil pour les immunohistofluorescences. Les images sont analysées avec Fiji.

11. Microscopie électronique

Les échantillons (ovaires ou ovocytes) sont fixés par immersion dans une solution contenant 2.5 % (v/v) de glutaraldéhyde et 2.5 % (v/v) de paraformaldéhyde dans un tampon cacodylate (0.1M, pH 7.4). Les échantillons sont post-fixés 1H à 4°C dans une solution de 1 % (p/v) de tétroxyde d'osmium dans un tampon cacodylate (0.1M, pH 7.4) et déhydratés dans des

bains successifs, de 30 minutes chacun, d'alcool à concentration croissante (50, 70, 90 et 100 %) puis dans une solution d'oxyde de propylène. L'inclusion se fait dans une résine Epon 812. Des coupes semi-fines (2 μm) puis ultra-fines (70 nm) de la région d'intérêt sont réalisées (Leica Ultracut UCT) et contrastées à l'acétate d'uranyl/ citrate de plomb. L'observation des échantillons et l'acquisition d'images s'est réalisée sur un microscope électronique Morgagni 268D 70kv (FEI Electron Optics Eindhoven) à l'aide du logiciel Mega View III camera (Soft Imaging System).

12. Microscopie épiscopique à haute résolution (HREM)

Les ovaires sont fixés au liquide de Bouin une nuit à 4°C puis déshydratés dans des bains successifs d'éthanol croissants (70, 80, 90, 95 et 100%). Ensuite, les ovaires sont incubés dans une solution *JB4 resin* [1 :1] ethanol (Polysciences) puis dans de la résine pure. La résine est couverte d'huile minérale pour éviter le contact avec l'air et incubée à 4°C pendant une nuit. Le lendemain, les coupes sériées sont réalisées et imagées à l'aide d'un microtome HistoCore NANOCUT R Rotary Microtome (Leica Biosystems). Les tranches d'ovaire sont reconstruites avec ImajeJ. Le travail a été essentiellement réalisé par Olivia Wendling de la plateforme d'histopathologie et embryologie de l'IGBMC.

13. Extraction d'ARN (adaptation pour ovocytes en croissance)

Les ovocytes issus de la collecte sont lysés dans 300 μL de TRIzol (15596026, Ambion) et l'ARN est extrait suivant le kit d'extraction DirectZol RNA Microprep (R2020 Zymo Research) puis élué dans 12 μL d'eau traitée DEPC (693520, Millipore). L'éluat est stocké à -80°C. La qualité et la concentration des ARNs est vérifiée par solution d'électrophorèse automatisée sur une puce RNA HS (5067-5579) sur TapeStation 4150 (Agilent Technologies).

14. Synthèse de l'ADN complémentaire (cDNA)

5 ng d'ARNs sont mélangés avec 1 μL de primers *Random hexamers* à 50 μM (SO142, Thermo Scientific), 1 μL de mix dNTPs à 10mM (42793424, Roche) et réajusté à 13 μL avec de l'eau traitée DEPC (693520, Millipore). Les 13 μL sont chauffés 5 minutes à 65°C. Ensuite, 4 μL de tampon SuperScript IV (SSIV) 5X concentré (18090050, Invitrogen), 1 μL de RNAsin à 40U/ μL (N251X, Promega), 1 μL de 0.1M DTT (Invitrogen) et 1 μL d'enzyme SSIV 200

U/μL (15307696, Invitrogen) sont ajoutés. Les 20 μL totaux sont rétrotranscrits 10 minutes à 23°C et 10 minutes à 52°C puis incubés 10 minutes à 80 °C afin de désactiver l'enzyme.

15. qPCR

Les qPCRs sont réalisées dans des plaques 96 puits (04 729 692 001, Roche) dans un *Light Cycler 480* à partir de 2 μL de cDNA dilué 5 fois avec de l'eau ultra pure (MediaPrep). 10 μL de *Sybr Green 2 x mix* (G04887352001, Roche) 1 μL de primer Forward (Fw), 1 μL de primer *Reverse* (chacun dilué à 10 μM) et 6 μL d'eau ultra pure sont ajoutés à chaque réaction (volume final de 20 μL). Les sondes primers sont listées **tableau 10**. Le programme qPCR et le paramètres *Light Cycler 480* sont les suivants, **tableau 11**:

Tableau 11 : Programme qPCR

Pre-incubation : 1 cycle 95°C none 10min 4.4
Amplification 3 steps : 50 cycles Quantification
• 95°C none 10sec 4.4
• 60°C none 15sec 2.2
• 72°C single 25sec 4.4
Melting : 1 cycle melting curve
• 95°C none 5sec 4.4
• 64°C none 20sec 2.2
• 97°C continuous
Cooling : 40°C none 30sec 2.2

16. ePAT (*extended Poly(A) Tail assay*) (adapté pour ovocytes en croissance)

Adapté à partir des trois articles suivants (Beilharz and Preiss 2009; Dankert et al. 2014; Jänicke et al. 2012a)

11 µL d'ARN sont mélangés avec 1 µL de primer PAT-Anchor 100 µM (GCGAGCTCCGCGGCCGCGTTTTTTTTTTTTT) et incubés à 80 °C pendant 5 minutes. Ensuite sont ajoutés 7.5 µL d'un mix contenant : 4 µL de tampon SuperScript III (Y02321 Invitrogen), 1 µL de DTT (Y00147 Invitrogen), 1 µL de dNTPs (42793424 Roche), 1µL de RNAsin (N251X Promega) et 0.5 µL de Polymérase *Klenow* (EP0051, Thermo Scientific). Les 19 µL sont incubés selon le programme suivant : 1h à 37°C, 10 minutes à 80 °C et une minute à 55°C. 1 µL de rétrotranscriptase SSIII est rajoutée dans chaque tube. Les 20 µL totaux sont rétrotranscrits 1 heure à 55°C puis l'enzyme est désactivée à 80 °C pendant 10 minutes.

5 µL de cDNA non dilués sont amplifiés avec 12.5 µL de AmpliTaq Gold concentré 2x (4398876 Applied Biosystem), 6.5 µL d'eau traitée DEPC (693520 Millipore), 1 µL de primer PAT-Anchor (ou alors TVN). et 1 µL de primer spécifique (voir **Tableau 10**). Le programme PCR est le suivant : 93°C, 5minutes, (93°C, 30 sec ; 55°C, 1 min ; 72 °C, 1 min)* 35 cycles ; 72°C, 10 min ; 12 °C ∞. 5 µL de 6X Purple Loading Dye sont ajoutés à chaque échantillon et le tout est déposé sur un gel agarose 2%. Le marqueur de poids moléculaire est le suivant : 100 bp *DNA Ladder* (N3231S NEB). Pour l'expérience « nested », 7 µL de pré-amplification précédente sont réamplifiés 20x supplémentaires avec le même programme et avec le même mix en ajustant le volume d'eau (QSP 25 µL).

17. HA-PAT (*Hairpin Adaptor Poly(A) Tail assay*) (adapté pour ovocytes en croissance)

Adapté de Nat Commun. 2023 Jun 22;14(1):3729. doi: 10.1038/s41467-023-39256-0.

« Maternal NAT10 orchestrates oocyte meiotic cell-cycle progression and maturation in mice »

Les primers « généraux » (**tableau 10**) sont commandés sur IDT à hauteur de 25 nmoles (scale) pour les primers Pre-HA et HAPrimerR et à 100 nmoles (scale) pour l'adaptateur hairpin. Ils sont livrés « secs » puis dilués avec les tampons adéquats (eau pour les deux

MATÉRIEL ET MÉTHODES

premiers et tampon d'annealing pour l'adaptateur hairpin). Le primer « *hairpin* » est dilué à 30 μ M dans le tampon d'annealing (1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50 mM Tris HCl) et incubé à 95°C pendant 5 minutes puis stabilisé progressivement à température ambiante durant une heure. Pour l'extraction des ARNs, les ovocytes sont incubés dans 2 μ l de tampon d'extraction (0.2% triton X-100, 4U RNAsin) à 72°C pendant 3 minutes puis 1 μ L du primer hairpin stabilisé (30 μ M) y est ajouté. L'hybridation se fait à 25°C pendant 10 minutes. La rétrotranscription se fait dans le même tube en ajoutant les composants adéquats (**Tableau 12**) et en ajustant le volume à 20 μ L avec de l'eau DEPC. Le programme de rétrotranscription est le suivant : 23°C, 10 minutes ; 52°C, 10 minutes et 80°C, 10 minutes. La pré-amplification se fait avec 5 μ L de cDNA pur avec les primers P5TSO-GGG (Fw) et Pre-HA (Rv) (**Tableau 10**). Le programme de PCR est le suivant : 93°C, 5 minutes --- (93°C, 30 secondes ; 55°C, 1 minute ; 72°C, 1 minute) x 8 ou 16 cycles --- 72°C, 10 minutes. La pré-amplification est diluée au 1/5. L'amplification « transcrit spécifique » est réalisée avec 5 μ L de pré-amplification diluée au 1/5 avec un primer *Fw* ciblant le transcrit en question et le primer HA (Rv) ou à la place un primer (Rv) reconnaissant le transcrit spécifique juste avant (150-200 pb) du site de polyadénylation (A0) (**Tableau 10**). Le programme PCR est le suivant : 93°C, 5 minutes --- (93°C, 30 secondes ; 55°C, 1 minute ; 72°C, 1 minute) x 35 cycles --- 72°C, 10 minutes.

Tableau 12 : Etapes HA-PAT

Rétrotranscription (pour une réaction de 20 μ L)	Pré-amplification (8 ou 16 cycles) (pour une réaction de 25 μ L)	PCR Transcrit spécifique (35 cycles) (pour une réaction de 25 μ L)
4 μ L tampon SSIV 5X	5 μ L cDNA pur	5 μ L pré-amplification diluée au 1/5
4 μ L Betain 5 M (B0300 Sigma)	12.5 μ L 2x mix Taq Gold (4398876, applied Biosystems)	12.5 μ L 2x mix Taq Gold (4398876, applied Biosystems)
1 μ L RNAsin 10 U μ L	5.5 μ L d'eau	5.5 μ L d'eau

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 µL DTT 100 Mm (Invitrogen)	1 µL du primer (Fw) P5TSO-GGG 10 µM	1 µL du primer (Fw) transcript spécifique 10 µM
0.5 µL dCTP 100 µM (18253013, Invitrogen)	1 µL du primer (Rv) Pre-HA primer Rv 10 µM	1 µL du primer HA- (Rv) ou primer A0 10 µM
0.5 µL dNTPs 100 µM	Diluer la pré-amplification à 1/5 avec de l'eau DEPC	
0.5 µL d'enzyme SSIV 200 U/ µL		
0.5 µL MgCl2 (MediaPrep) 1M		
Ajusté avec de l'eau traitée DEPC → 20 µL		

La révélation se fait sur un gel agarose 2% (p/v) (BP160-500, Molecular Biology Grade)

18. Spectrométrie de masse

600 ovocytes en croissance pour chaque condition WT et mutants *Tbpl2*^{-/-} sont resuspendus dans 1 µL d'urée à 0.1mM Tris-HCl pH.5 contenant 5mM de TCEP pendant 30 minutes. Ensuite 1 µL d'iodoacetamide est ajouté et incubé 30 minutes à température ambiante. 100 ng de Trypsine (Promega 1 µL à 10 mM) sont ajoutés et incubés à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, les peptides sont déssalés dans une colonne C18 et séchés au « Speed Vacuum » avant l'analyse LC-MS/MS. L'analyse se fait avec un Ultimate 3000 nano RSLC (ThermoScientific) couplé avec un quadrupole orbitrap Exploris 480 par ionisation electrospray et l'interface FAIMS. L'analyse a été réalisée par Pascal JANSEN et Michiel VERMEULEN.

19. Culture cellulaire de 293T/HEK, transfection et immunofluorescence

Les cellules HEK sont cultivées dans du DNEM sur des lamelles 18 mm gélatinisées dans des plaques 12 puits pendant une nuit. Le lendemain, les cellules sont conditionnées avec 1 mL d'OptiMEM (31985062, Gibco) pendant 30 minutes. 2 mL d'OptiMEM contenant 2 µg de plasmide pCIG (ou pCIG-hTBPL2) sont mélangés goutte à goutte sur un vortex en agitation avec une solution contenant 2 mL d'OptiMEM et 80 µL de Lipofectamine 2000 (2497106, Invitrogen). Les cellules sont incubées 6 h à 37°C, 5% CO₂ avec 200 µL de mélange pCIG + lipofectamine (ou pCIG-hTBPL2+lipofectamine), fixées avec une solution de PFA 4% (v/v), lavées 2 fois avec du PBS 1x et perméabilisées avec une solution PBS-Triton 0.1% pendant 20 minutes à température ambiante.

Les anticorps monoclonaux (surnagent d'hybridome de souris) sont dilués au 1/2 et les anticorps polyclonaux (fractions de sérum de lapin) sont dilués au 1/200 dans une solution de PBS 1x/ FCS 10 %. Les cellules sont incubées une nuit avec les anticorps primaires. Les anticorps primaires testés sont les suivants : monoclonaux (2A3, 4B12, 4F5, 2A9, 2D2, 4A1, 1H2, 1H8 et 1D5) et polyclonaux (261, 266-01 et 266-02). Le lendemain, les cellules sont lavées deux fois 10 minutes avec une solution PBS 1x/ Triton 0.02%, une fois avec du PBS1x pendant 10 minutes et incubés 1h, à l'abri de la lumière avec les anticorps secondaires (A11037, ThermoScientific et A11004, Life Technologies) dilués au 1/1000 et du DAPI (1 mg/mL) dans une solution de PBS1x, 10 % FCS. Ensuite les lamelles sont lavées deux fois 10 minutes avec une solution PBS 1x/ Triton 0.02%, une fois supplémentaire avec du PBS1x pendant 10 minutes et montées sur des lames SuperFrost Plus (J1800AMNZ, Epremedia) avec un milieu de montage Aqua-Polymount (18606-20, PolySciences). Les lames sont séchées une nuit à 4°C puis imagées avec un microscope à épifluorescence inversé « myc-2 » avec un objectif HCxPLS-APO 20X/0.5. Les images sont analysées avec ImajeJ.

Résultats

During oocyte growth TBPL2-mediated RNA polymerase II transcription initiation is required to control RNA stability and for cellular organization

Emmanuel Garcia Sanchez^{1,2,3,4}, Dylane Detilleux^{1,2,3,4}, Claire Richard^{1,2,3,4}, Céline Ziegler-Birling^{1,2,3,4}, Nadia Messaddeq^{1,2,3,4}, Fabienne Mauxion^{1,2,3,4}, Bertrand Séraphin^{1,2,3,4}, László Tora^{1,2,3,4} and Stéphane D. Vincent^{1,2,3,4,*}

¹ Université de Strasbourg, IGBMC UMR 7104-UMR-S 1258, F-67400 Illkirch, France

² CNRS, UMR 7104, F-67400 Illkirch, France

³ Inserm, UMR-S 1258, F-67400 Illkirch, France

⁴ IGBMC, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, F-67400 Illkirch, France

*Lead corresponding author, e-mail: vincent@igbmc.fr

Key words

Growing oocytes, mouse, RNA decay, TATA binding protein (TBP), TBP-like 2 (TBPL2), RNA polymerase II, organelles, cytoskeleton

Abstract

During oocyte growth, the important increase in size is associated with active RNA polymerase II (Pol II) transcription providing transcripts which will be either translated into proteins or stored as the maternal transcriptome. The RNA decay machinery plays an important role to regulate the maternal transcriptome during oocyte maturation but its involvement during oocyte growth is unclear. We previously reported an oocyte-specific transcription machinery dependent on the TBP paralog TBPL2, which is required for the growth of the oocyte. In order to investigate the impact of the lack of TBPL2-mediated transcription on the oocyte cellular state, we analyzed the cellular phenotypes associated with the *Tbpl2*^{-/-} mutant growing oocytes. Our data indicates that both the nuclear and the cytoplasmic organizations are severely perturbed in the absence of TBPL2-mediated transcription. As the organization of the cytoplasm is associated with the ability of the oocyte to store RNA, we further studied the expression of proteins required for the correct regulation, stability and storage of mRNAs and showed an impairment in the redistribution of these key proteins in *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes. When investigating the role of TBPL2 on the impact on the RNA storage, we observed that the poly(A) level was strongly increased in the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes. Thus, our data suggests that in the absence of TBPL2-mediated transcription, the cellular organization of the oocytes becomes perturbed as the functioning of the RNA decay machinery is impaired.

Introduction

In female mice, oogenesis is initiated during embryonic development, with the proliferation of oogonia and their entry in meiosis I around embryonic day (E) 13.5. Remarkably, all the primary oocytes are arrested at the end of prophase I (dictyate stage) and will remain arrested throughout adulthood unless they are selected for ovulation. These primary oocytes are initially interconnected, forming germ cysts (for a review, see (Pepling 2006)). At birth, the breaking of germ cysts leads to the formation of primordial follicles, each composed of a single arrested primary oocyte associated with few somatic follicular cells. These primordial follicles constitute the reserve of germ cells that will support the reproductive life of the females. Regularly, a subset of these primordial follicles is primed for further differentiation, a process called folliculogenesis.

Folliculogenesis is the process by which follicles increase in size and complexity, involving the proliferation of follicular cells, and progress from a primordial stage to a pre-ovulatory stage (for a review, see (Tora and Vincent 2021)). The primary oocyte, still arrested at the dictyate stage, also undergoes changes during folliculogenesis, which is divided in two phases. The first phase occurs from the primary to the pre-antral follicular stage and is associated with the oocyte growth. By the end of the pre-antral follicular stage, the oocyte growth is complete, and the oocyte enters the second phase which involves oocyte maturation. During this second phase, maturation leads to the resumption of meiosis culminating in ovulation. In mammals, there are two waves of folliculogenesis. The first wave occurs after birth in the medullar region of the ovary on the mouse, while the second wave occurs in the cortical region of the ovary and will support the whole reproductive life of the females (Mork et al. 2012; Zheng et al. 2013).

The intense growing phase is associated with an increase in transcription activity in the growing oocytes, allowing the accumulation of transcripts that are stored and constitute

the maternal transcriptome. As transcription stops at the end of the growing phase and will only resumes after fertilization, post-transcriptional regulation of the maternal transcriptome is crucial to support maturation, ovulation and initiation of development. A key mechanism to control the storage and the translatability of the transcripts is the regulation of the poly(A) tail length (Bachvarova 1992; Paynton and Bachvarova 1994). During oocyte growth, several compartments are established, associated with the storage of these mRNAs. First, the formation of highly ordered lattice-like structures called cytoplasmic lattices (CPLs) has been observed in the cytoplasm of the growing oocyte (Burkholder et al. 1971) (for a review, (Giaccari et al. 2024)). These CPLs are a matrix composed of proteins and RNA and play a major role in the storage of ribosomes (Yurttas et al. 2008). Interestingly, these structures are also involved in the storage of maternal mRNA via their interaction with the non-specific RNA binding protein YBX2 (MSY2), which is involved in the stabilization of maternal RNA in oocytes (Liu et al. 2017), and also the storage of maternal proteins (Jentoft et al. 2023). This compartment is associated with a second compartment in the cortical region of the oocytes, called the subcortical maternal complex (SCMC) (Li et al. 2008) which is important for the regulation of the actin dynamics (Yu et al. 2014). These two structures share many proteins such as TLE6, MATER/NLRP5, FILIA/KHDC3 and OOEP (for a review see (Bebbere et al. 2021)), and a recent study suggests that they are actually one structure, organizing the cytoplasm of the growing oocyte (Jentoft et al. 2023). In the same sub cortical region, subcortical aggregates (SCA) have been described to be associated with RNA as a result of the dissolution of the P-bodies during oocyte growth (Flemr et al. 2010). Recently, another compartment associated with mitochondria and the storage of RNA, established during oocyte growth, has been described, called the mitochondria associated ribonucleic domain (MARDO) (Cheng et al. 2022).

Interestingly, the intense transcription activity during oocyte growth is associated with a transition in the RNA polymerase II (Pol II) transcription initiation machinery. The initiation of Pol II transcription starts with the nucleation of the Pre-Initiation Complex (PIC) on the core promoters. A functional PIC is composed of the Pol II and 6 General Transcription Factors (GTF) and among these GTF, TFIID, composed of the TATA binding protein (TBP) and 13 TBP-associated factors (TAFs), is the first complex to recognize and to bind to the core promoter sequences (for a review, see (Malik and Roeder 2023)). At the beginning of oocyte growth, TBP is replaced by its closest paralog TBPL2/TBP2/TRF3 (hereafter called TBPL2) in vertebrates (Gazdag et al. 2007) and transcription initiation is mediated independently of TFIID by a complex composed of TBPL2 and the GTF TFIIA (Yu et al. 2020). In *Tbpl2*^{-/-} female, oocyte growth is blocked between the primary and the secondary follicular stages, associated with a strong reduction in H3K4me3 and barely detectable serine 2 phosphorylation on C-terminal repeat (CTD) of Pol II largest subunit RPB1 (Gazdag et al. 2009). No increase in apoptosis could be detected by TUNEL in the mutant oocytes, but the follicles' structure was disorganized at 6 weeks (Gazdag et al. 2009).

In this study, we investigated the cellular phenotype associated with the *Tbpl2*^{-/-} mutant growing oocytes in order to evaluate the impact of the lack of Pol II transcription mediated by TBPL2 on the development of the growing oocytes. Our data indicates that both the nuclear and the cytoplasmic organization of the mutant oocytes are severely perturbed. As the cytoplasm organization is associated with the ability of the oocyte to store RNA, we investigated the expression of proteins associated with the regulation, the stability and storage of mRNA and showed an impairment in the redistribution of these proteins in the mutant oocytes. Finally, we investigated the impact on the RNA storage and surprisingly detected increased level of poly(A) in absence of TBPL2, suggesting that the RNA metabolism and the cellular organization are severely perturbed in these *Tbpl2*^{-/-} mutant growing oocytes.

Results

Tbpl2^{-/-} oocytes have an abnormal structure

The disorganization of the *Tbpl2^{-/-}* mutant follicle was not yet precisely evaluated in earlier studies (Gazdag et al. 2009). To get more insight into the defects in the *Tbpl2^{-/-}* mutant growing oocytes, we carried out histological analyses at different times: post-natal day (PN) 14, 6 weeks, 8 weeks and 32 weeks (Figure 1). At PN14, the *Tbpl2^{-/-}* mutant ovaries are much smaller, due to the reduced size of the mutant follicles associated with the accumulation of primary follicles and failure to develop secondary follicles (Figure 1A). While the size of the WT ovaries increased with age, the mutant ovaries remained smaller at all stages analyzed (Figure 1B-D). The depletion of follicles in the mutant ovaries, already reported at 6 weeks (Gazdag et al. 2009) (Figure 1B) became very severe at 8 and 32 weeks, with only few follicles with an abnormal structure (Figures 1C,D). The residual follicles remaining in the mutant at 8 weeks were characterized by a loss of the interaction between follicular cells and the oocyte (Figure 1E). Analysis at 32 weeks showed that some oocytes were still present in the mutant ovaries, but the remaining follicles are completely disassembled and the *corona radiata* is absent. Interestingly, we observed that in the young ovaries, the cortical folliculogenesis was impaired (Figure 1F) and that oocytes persisted in the mutant but started to lose their connections with the follicular cells (Figure 1G). In addition to their abnormal structure, the nuclei of the mutant oocytes were significantly bigger compared to the control counterpart at all ages (Figure 1H). Altogether, these data indicate that in addition to the impairment of the primary to secondary follicles transition, absence of TBPL2-mediated transcription also impacts the structure of the follicles and the oocyte cellular organization.

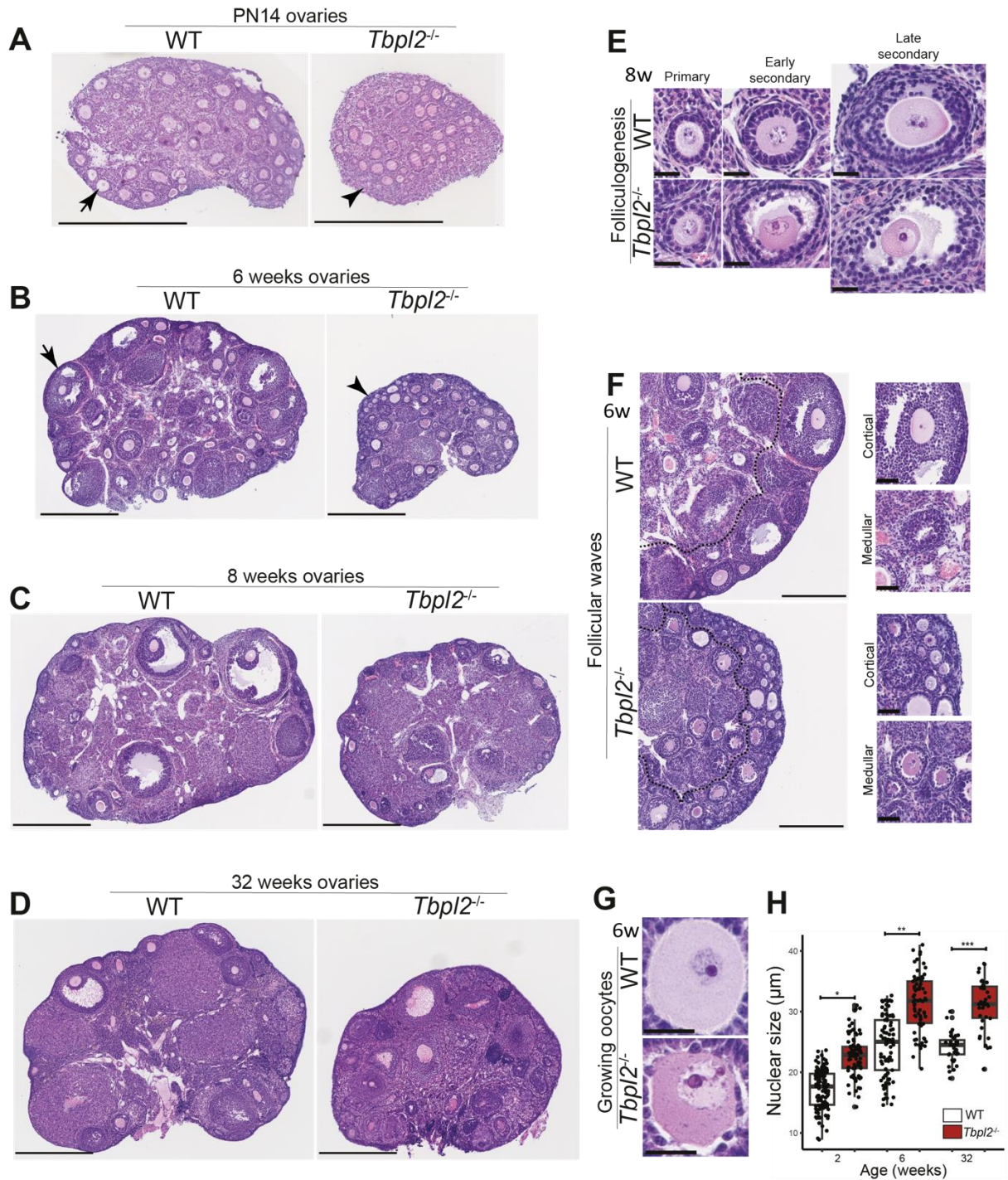


Figure 1: Histological analysis of *Tbp12^{-/-}* ovaries

(A-D) Comparative hematoxylin-eosin (HE) study of WT and *Tbp12^{-/-}* ovaries at post-natal (PN) 14 days (A), 6 weeks (B), 8 weeks (C) and 32 weeks (D) old females. Scale bars: 500 μm. (E) Folliculogenesis at primary, early secondary and late secondary follicular stages from WT and *Tbp12^{-/-}* ovaries at 8 weeks. Scale bars: 25μm. (F) Follicular waves at 6 weeks in WT and *Tbp12^{-/-}* mutant ovaries. Dashed line: delimitation of the cortical and medullar follicular waves. Magnification of cortical versus medullar follicles. Scale bars: 250 μm and 50 μm (magnifications). (G) Abnormal structure of the *Tbp12^{-/-}* oocytes at 6 weeks. Scale: 25 μm. (H) Quantification of the size of the oocytes nuclei at PN14, 6 and 32 weeks. Nuclei of *Tbp12^{-/-}* oocytes are significantly bigger compared to WT counterparts. Wilcoxon test, *, **, ***: *p*-value ≤ 0.05.

Abnormal chromatin organization in *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes

As the larger size of the mutant nuclei could be the result of a failure to properly pack the chromatin in the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes, we evaluated the expression of markers associated with chromatin structure. Previous study has indicated that H3K4me3 histone marks are decreased in the mutant oocytes at 6 weeks (Gazdag et al. 2009). In order to investigate the potential defects at an early step, we carried out immunolocalization in PN14 oocytes. We first analyzed histone marks associated with compacted chromatin (facultative heterochromatin; H3K27me3 and constitutive chromatin; H3K9me3) (Figure 2). While no major differences could be observed in the H3K27me3 expression pattern (Figure 2A), H3K9me3 was completely abrogated (Figure 2B), strongly suggesting that the chromatin is globally decompacted in absence of TBPL2. Expression of the HP1beta protein associated with chromatin compaction did not appear obviously perturbed in the mutant nuclei as foci were still present, however, there was a diffuse signal in the nucleus suggesting that the chromatin was not comparably compacted between the control and the mutant oocytes (Figure 2C). Finally, analysis of (5mC) using anti 5-methyl cytosine antibody showed a severe decrease intensity (Figure 2D), in agreement with the fact that this mark is deposited co-transcriptionally (Veselovska et al. 2015) and with the fact that TBPL2 is required for active transcription in the oocytes (Yu et al. 2020). Altogether these data indicate that there is a correlation between the decompacted state of the chromatin and the increased size of the nuclei in the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes.

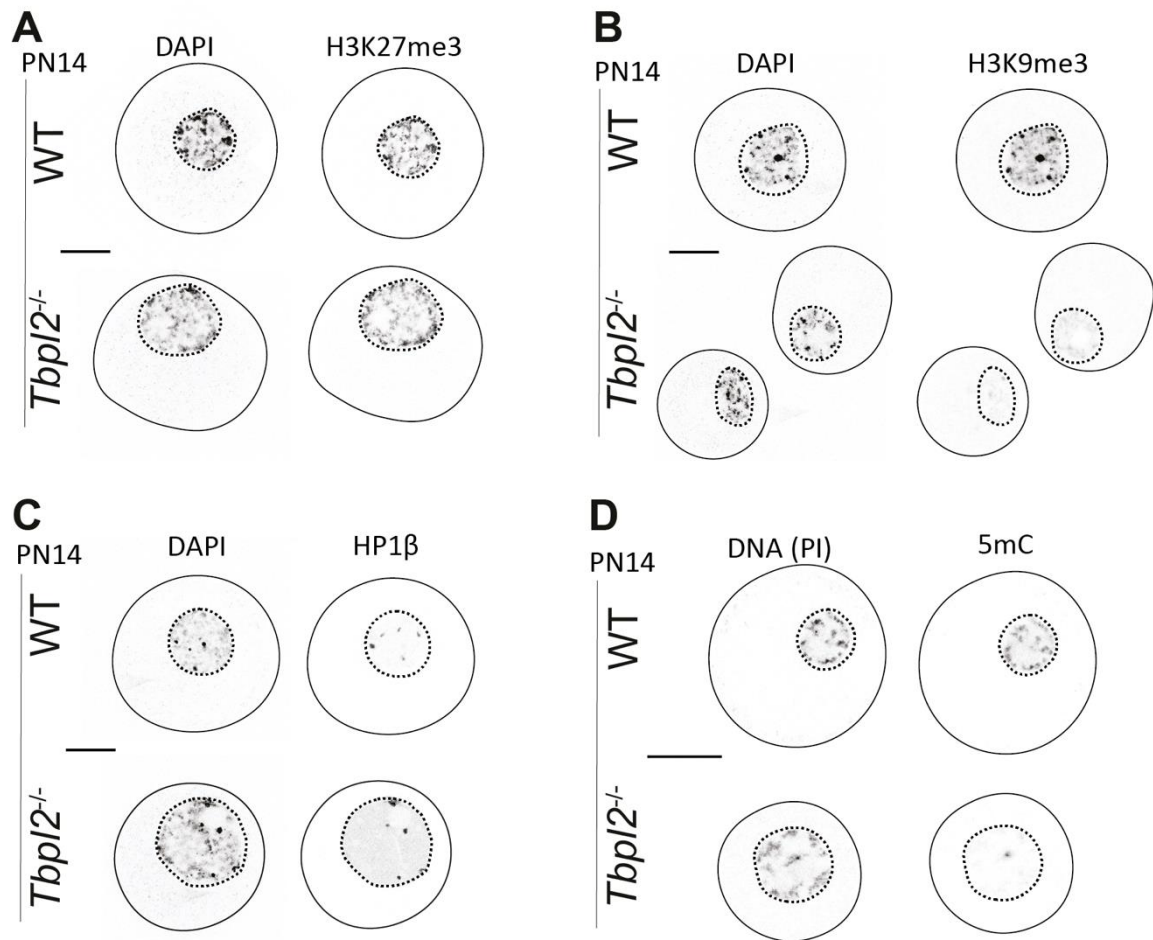


Figure 2: Abnormal chromatin organization in *Tbp12*^{-/-} oocytes

(A-D) Negative grayscale pictures of immunofluorescence on growing WT and *Tbp12*^{-/-} oocytes at PN14 using antibodies against: facultative heterochromatin histone mark H3K27me3 (A), constitutive chromatin histone mark H3K9me3 (B), heterochromatin-associated factor HP1β (C) and 5mC modification (D). Pictures displayed are single planes, scale bars: 20 μm.

Disorganization of the cytoplasmic structures in the absence of Tbp12

Next, we analyzed the expression and localization of different cytoskeletal proteins, such as - TUBULIN, F-ACTIN and DESMIN, in oocytes at PN7 (primary follicles, initiation of growth) and PN14 (secondary follicles, growing oocytes) stages. At PN7, expression and localization of β -TUBULIN (Figure 3A) and F-ACTIN (Figure 3B) were comparable between controls and *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes with their apparent accumulation in the subcortical region. In the PN7 controls, expression of the intermediate filament protein DESMIN was localized in a cluster close to the nucleus and this pattern was similar in absence of TBPL2 (Figure 3C). Altogether, these data indicate that at the early stage of oocyte growth, the cytoskeleton organization is not affected in the *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes. Remarkably, absence of TBPL2 expression severely affects the re-organization of the cytoskeleton during oocyte growth as observed at PN14. While both TUBULIN and ACTIN are strongly enriched in the subcortical domain in the WT growing oocytes at PN14, in the *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes, no such subcortical localization is achieved (Figures 3D,E). More precisely, these proteins remained clustered in close contact with the nucleus (Figures 3D,E). During growth, the initial clustered DESMIN domain observed at PN7 is reorganized in a more diffuse pattern of cytoplasmic aggregates (Figure 3F). This drastic reorganization is not observed in the *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes as DESMIN containing cytoplasmic aggregates are still clustered in close apposition to the nucleus (Figure 3F). As the cytoskeleton was initially similar in both WT and the *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes at the initiation of growth, these data indicate that the defects were a consequence of the lack of TBPL2 and also suggest that the cytoplasm cytoskeleton does not reorganize in the mutant oocytes.

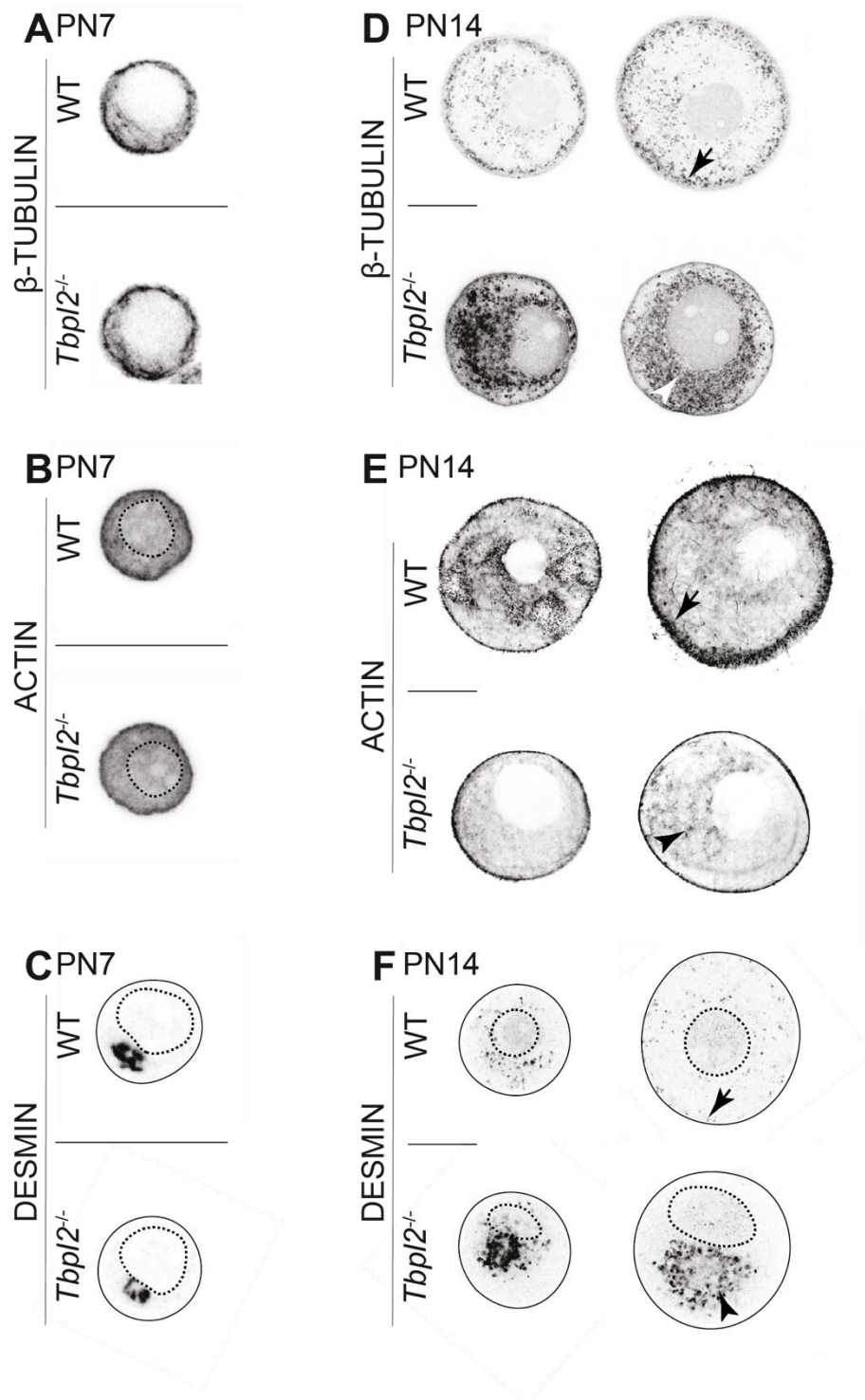


Figure 3: Disorganization of the cytoskeleton in *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes

(A-F) Detection of β-TUBULIN (A,D), ACTIN (B,E) and DESMIN (C,F) in growing WT and *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes at PN7 (A-C) and PN14 (D-F). Arrows indicate cortical signal and arrow heads show cytoplasmic aggregation in close apposition to the nucleus in (D-F). The negative grayscale pictures displayed are single planes, scale bars: 25 μm.

RÉSULTATS

To get more insight into the re-organization we observed during the growth phase, we investigated two organelles, the Golgi and the mitochondria. The analysis of the Golgi marker GM130 showed that the Golgi is following a similar reorganization as DESMIN, with an initial accumulation in a cluster close to the nucleus at PN5 (before initiation of the growth) and at PN7 (Figure S1A, Figure 4A), which became more diffuse with the appearance of aggregates enriched around the nucleus but also present in the whole cytoplasm at PN14 (Figure 4B). As observed for DESMIN, the Golgi fails to be reorganized and is limited to cytoplasmic aggregates clustered in the center of the oocytes, in close apposition of the nucleus in the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes (Figure 4A,B). Then we analyzed the distribution of the mitochondria during oocyte growth. It has been shown that during oocyte growth, the mitochondria are initially present as cytoplasmic clusters in a homogenous pattern (Cheng et al. 2022), as we observed in the control growing oocytes at PN14 (Figure 4C, Figure S1B). In contrast, in the absence of TBPL2, the distribution of the mitochondria was not homogenous as they were clustered in close apposition to the nucleus (Figure 4C). Interestingly, we observed that in the mutant oocytes, the Golgi and the mitochondria were regrouped together compared to the WT oocytes (Figure S1B). The association of a more centrally located Golgi surrounded by mitochondria, in association with one side of the nucleus is strikingly reminiscent of the structure of the Balbiani body commonly found in the oocytes of many organisms, including zebrafish or human, but surprisingly not in the mouse (Jamieson-Lucy and Mullins 2019; Dhandapani et al. 2024).

Our electron microscopy analysis confirmed that in the small oocytes which are not yet growing, the Golgi is initially located between mitochondrial clusters similarly in WT and *Tbpl2*^{-/-} (Figure S2B). During oocyte growth, the disorganization of the cytoplasm of the mutant oocytes, is also further supported by the accumulation of stressed mitochondria, stacked Golgi membranes and the appearance of multivesicular bodies in close proximity of

RÉSULTATS

the nucleus (Figure 4D and E). At PN7, the Golgi starts to reorganize in the WT cytoplasm and fragmentation of the dictyosomes are visible (Figure 4D, black arrows). Moreover, the mitochondria are reorganized by intercalation in “waves” of rough endoplasmic reticulum (RER) membranes (Figure 4D, white arrows). However, at PN7 in the mutant, no such waves are visible and mitochondria and stacked Golgi accumulate in close apposition to the nucleus (Figure 4D, black and white arrows, respectively). At PN14 in the WT growing oocytes, the lattices are clearly formed and nicely distributed in the cytoplasm (Figure 4E, red arrows), as well as mitochondria and Golgi that are distributed homogeneously in the cytoplasm (Figure 4E, black and white arrows, respectively). To the contrary, in the PN14 *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes, the cytoplasm is crowded with inflated mitochondria and stacked Golgi membranes and no lattices are detected (Figure 4E). Altogether, these data indicate that the cytoplasmic organization is severely perturbed in the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes and that cytoplasmic reorganization associated with the growing phase in WT oocytes is not occurring in absence of TBPL2.

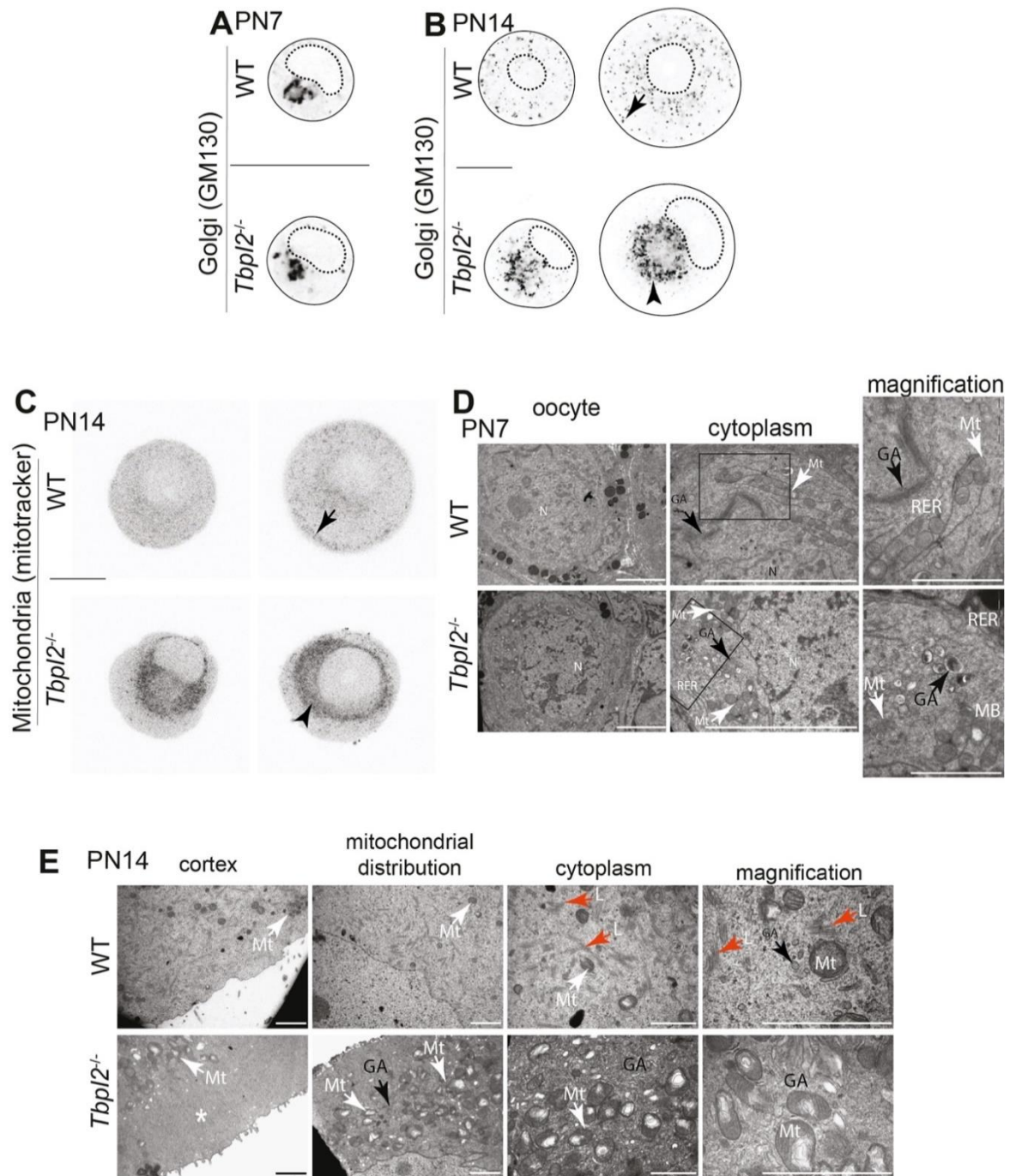


Figure 4: Abnormal cytoplasmic organization in *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes

(A,B) Negative grayscale pictures of immunofluorescence on growing WT and *Tbp12*^{-/-} oocytes: Golgi-associated protein GM130 at PN7 (A) and PN14 (B). Scale bars: 25 μ m. (C) Mitochondria detection, using Mitotracker-647, on PN14 oocytes. The arrow indicates the subcortical localization, and the arrowhead depicts cytoplasmic aggregation. Scale bars: 25 μ m. (D,E) Electron microscopy ultrastructural analysis of WT and *Tbp12*^{-/-} oocytes at PN7 (D) and PN14 (E). N: Nucleus, GA: Golgi Apparatus, L: Lattices; MB: Multivesicular Bodies, Mt: Mitochondria, RER: Rough Endoplasmic Reticulum. White arrows: mitochondria; black arrows: Golgi membranes; red arrows: lattices. The rectangles indicate the magnified field. Pictures displayed in (A-C) are single planes, scale bars: 2 μ m, except in the magnifications in (E): 1 μ m.

Defects in the expression of the protein complexes associated with the regulation of RNA decay

During oocyte growth, the organization of the cytoplasm, including the presence of CPLs is important for the storage and the regulation of the maternal transcripts. The abnormal cytoplasm organization of the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes strongly suggests that the regulation of RNA stability is affected. This hypothesis is supported by the transcriptome analysis of *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes revealing that transcripts coding for key regulators of the RNA decay machinery were down-regulated (Yu et al. 2020). Thus, we next investigated the expression at the protein levels of several proteins associated with the RNA decay pathway. First, we analyzed the expression of proteins associated with the stabilization of the mRNA, such as PABPC1 which binds to the poly(A) tail in the cytoplasm (for a review, (Passmore and Collier 2022)) and the non-specific RNA binding protein YBX2. The level of PABPC1 was increased in the mutant oocytes (Figure 5A, Figure S3A). Note that the specificity of the anti PABPC1 antibody was validated by siRNA (Figure S4B). While the level of YBX2 was comparable between the WT and the mutant conditions at PN7 (Figure 5B), YBX2 aggregates could be observed in the cytoplasm of mutant oocytes at PN14 (Figure 5C).

Second, we looked at the two subunits of the decapping complex (for a review, (Collier and Parker 2004)); the catalytic subunit DCP2 and its mandatory partner DCP1A. Interestingly, the mRNAs coding for these proteins were thought to be dormant, meaning that they would be stored but not translated (Ma et al. 2013). The specificity of the anti DCP1A antibody was validated by siRNA in NIH 3T3 cells (Figure S3B). Interestingly, our data indicates that these two proteins are actually detected during oocyte growth in the control conditions (Figure 5D-G, Figure S3C). Moreover, in WT oocytes, we observed a reorganization of the distribution of DCP1A and DCP2 in the subcortical region of the oocyte at PN14 (Figure 5E,G). In the

RÉSULTATS

mutant oocytes, while initially no major difference could be observed at PN5 or PN7 (Figure 5D,F, Figure S3C), we could not observe the relocalization of DCP2 and DCP1A to the subcortical area at PN14 oocytes (Figure 5E,F) and surprisingly, only the expression level of DCP2 appeared highly increased in the cytoplasm in close proximity with the nucleus (Figure 5G, Figure S3H) while DCP1A levels were reduced in the cytoplasm (Figure 5E, Figure S3D), suggesting that the DCP complex may be disorganized and functionally impaired. Next, we tested whether the impairment of the decapping complex impacted the presence of capped mRNAs using an anti-7mG cap antibody in the mutant oocytes. Interestingly, we observed increased levels of 7mG cap in *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes compared to the WT arguing for increased mRNA levels mist likely owing to impaired decapping activity in the mutant oocytes (Figure 5H).

Third, we analyzed the expression of 3 subunits of the CCR4-NOT deadenylating complex: CNOT8, homolog of the yeast Caf1 deadenylase, CNOT9, homolog of the yeast Caf40 that recruits targeting partners of the deadenylase, and CNOT11 (for a review, (Miller and Reese 2012; Shirai et al. 2014)). CNOT11 is a conserved subunit of the CCR4NOT complex, present in most eukaryotic organisms except some fungi, that forms with CNOT1 and CNOT1 a platform for protein-protein interaction (Mauxion et al. 2013, 2023). Levels of these subunits were also affected in the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes (Figure S3E-G). Altogether, our above data indicates that the establishment of the machinery regulating the storage and the stability of the maternal mRNAs is defective in the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes.

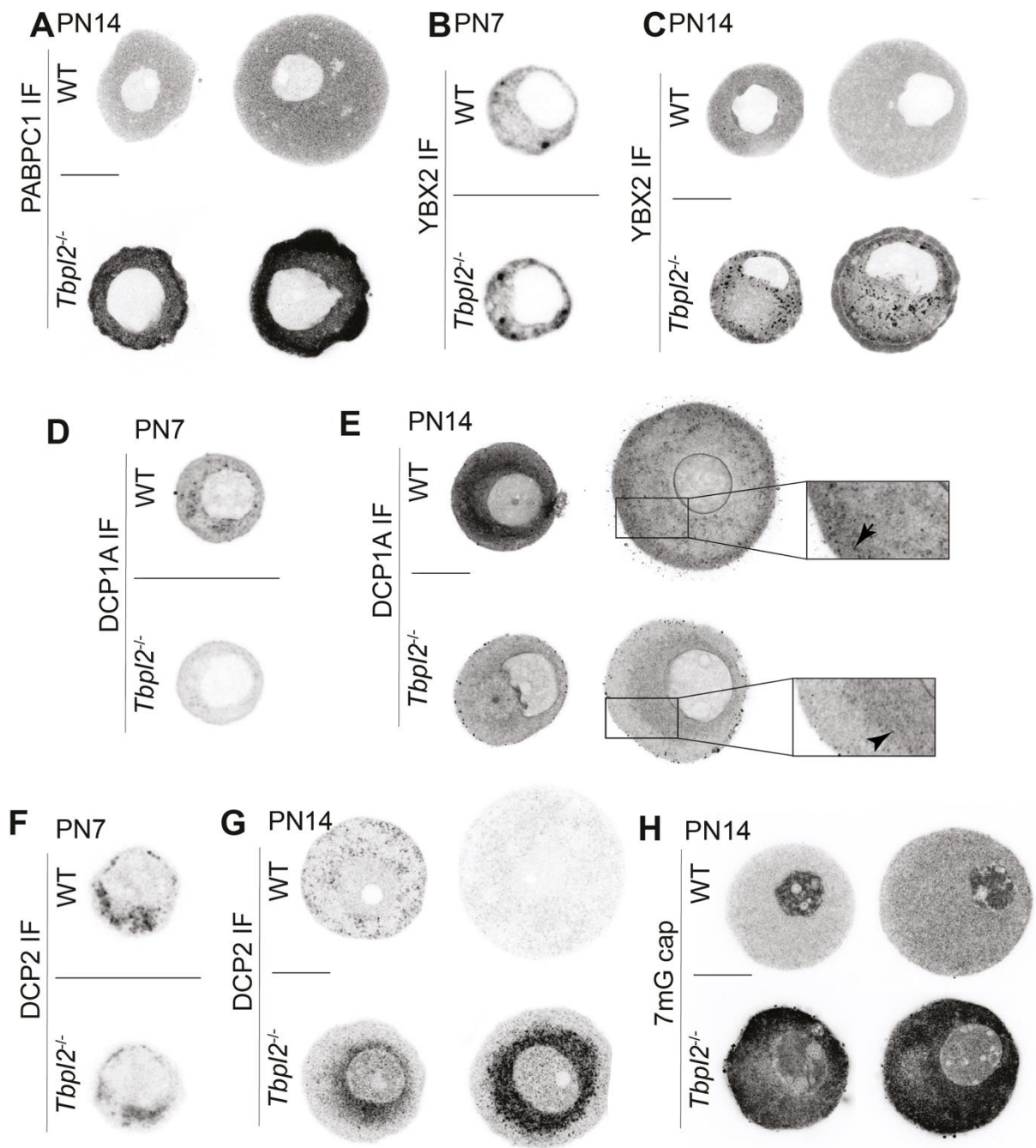


Figure 5: Defects in the protein complexes associated with the regulation of RNA stability

(A-H) Negative grayscale pictures of immunofluorescence on growing WT and *Tbp12*^{-/-} oocytes at PN7 (B,C,E) and PN14 (A,C,D,F,G) using antibodies against: PABPC1 (A), YBX2 (B,C), DCP1A (D,E), DCP2 (F,G) and 7mG cap (H). Pictures displayed are single planes, scale bar: 25 μm.

Aberrant regulation of mRNA poly(A) tail length in the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes

As the length of the poly(A) tail is associated with the stability of mRNAs, we carried out poly(T) FISH. As shown in Figure 6A, no difference could be detected at PN7 between WT and *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes with a homogenous cytoplasmic signal and some foci in the nucleus. However, at PN14, we detected an increased signal in the cytoplasm of the mutant oocytes as well as in the nucleus, with the persistence and increased number as well as intensity of the nuclear foci observed earlier (Figure 6B). Quantification of the nuclear signal confirmed the increased poly(A) signal of the mutant oocytes compared to the WT in the nucleus (Figure 6C) and in the cytoplasm (Figure S4A). As in the nucleus the poly(A) tail of the mRNAs is interacting with the PABPN1 protein, we analyzed the level of PABPN1. The specificity of the anti PABPN1 antibody was validated by siRNA (Figure S4B). The distribution of PABPN1 is initially comparable between WT and mutant oocytes at PN5 and PN7. However, at PN14, we observed an increased number of bigger nuclear foci in mutant growing oocytes, (Figure 6D and Figure S4C). Quantification analyses further confirmed that the increase in foci number was significant in the mutant oocytes (Figure 6E). Consistently, the increased size of some nuclear foci was also observed in the electron microscopy analyses (Figure 6F). We also analyzed the expression of PAPOLA, the enzyme associated with the polymerization of the poly(A) tail. The expression pattern and intensity were similar at PN7 in both WT and mutant oocytes (Figure 6G), however at PN14, PAPOLA expression was more important in the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes (Figure 6H), both in the nucleus (Figure 6I) and in the cytoplasm (Figure S4D). Altogether, these data suggest that in *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes, the poly(A) length of the mRNA is increased due, at least partially, to an increased activity of PAPOLA.

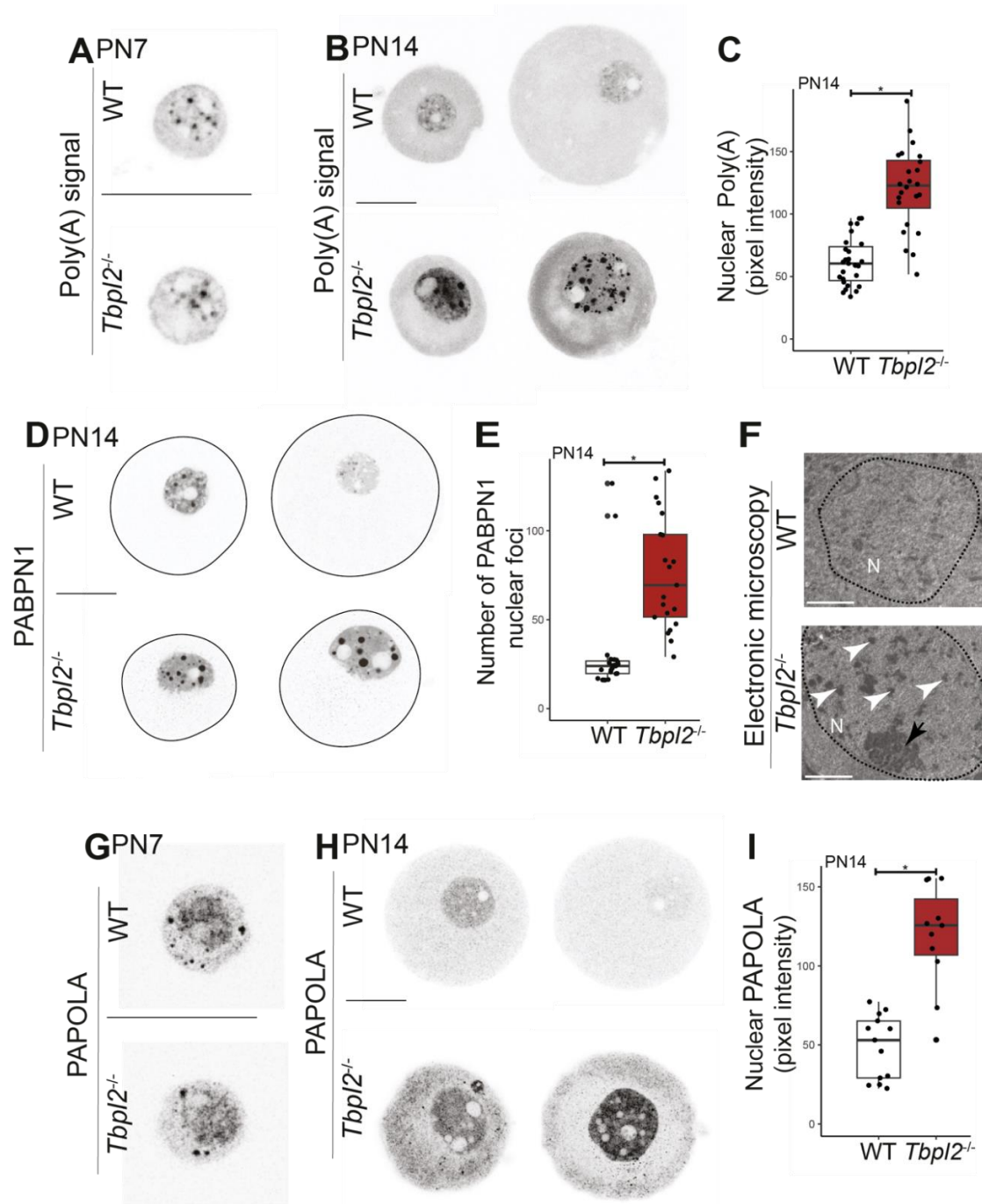


Figure 6: Abnormal nuclear organization in *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes

(A,B) Oligo (dT) FISH on growing WT and *Tbp12*^{-/-} oocytes targeting poly(A) tails at PN7 (A) and PN14 (B). Scale bars: 25 μ m. (C) Quantification of nuclear poly(A) signal in PN14 WT and *Tbp12*^{-/-} growing oocytes. Wilcoxon test, *: p -value ≤ 0.05 . (D) Immunofluorescence on growing WT and *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes using an anti-PABPN1 antibody. Scale bar: 25 μ m. (E) Quantification of the number of PABPN1 foci per PN14 oocyte nucleus. Wilcoxon test, *: p -value ≤ 0.05 . (F) Ultrastructural analysis by electron microscopy of WT and *Tbp12*^{-/-} nuclei. Scale bar: 5 μ m. White arrowheads: nuclear foci, black arrow: nucleolus. (G,H) Detection of PAPOLA by immunofluorescence on growing WT and *Tbp12*^{-/-} oocytes at PN7 (G) and PN14 (H). Scale bars: 25 μ m. (I) Quantification of nuclear PAPOLA in PN14 WT and *Tbp12*^{-/-} growing oocytes. The negative grayscale pictures displayed in (A,B,D,G,H) are single planes. Wilcoxon test, *: p -value ≤ 0.05 .

Discussion

In this study, we analyzed the cellular phenotype of the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes. In absence of TBPL2-mediated transcription initiation, we showed that the growing oocytes fail to reorganize their cytoplasmic and nuclear compartments. The chromatin of the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes is less compacted and might cause the increased size of the nucleus. In the cytoplasm, the organelles and the cytoskeleton also fail to be reorganized. The disorganization of the cytoplasm is also associated with defects in the expression and localization of proteins associated with RNA stability regulation. The increase in poly(A) signal observed in absence of TBPL2-mediated transcription is correlating with an increase in expression of the poly(A) polymerase PAPOLA and increase colocalization with PABPN1 nuclear foci. Our data suggest that in absence of transcription in the mutant oocytes, there is an increase stabilization of mRNA that could be associated with an increase poly(A) length.

*Abnormal cellular organization in the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes*

In this study, we report that defects in the *Tbpl2*^{-/-} mutant ovaries are detectable earlier than initially thought (Gazdag et al. 2009), as they are already smaller than their control counterparts at PN14. In addition, we observed that the nucleus of the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes are significantly bigger than the controls at all stages analyzed, from 2 weeks to 32 weeks of age. We already showed that TBPL2 is essential for the chromatin organization as shown by diminished levels of H3K4me3 and failure to reach the non-surrounded nucleolus (NSN) organization (Gazdag et al. 2009). Our new data confirmed that TBPL2-mediated transcription is required for compaction of the chromatin as expression of different markers associated with chromatin compaction are severely downregulated in the mutant oocytes. Interestingly, the establishment of the methylome is associated with active transcription (Veselovska et al. 2015). We showed that in absence of TBPL2 mediated transcription, 5mC

signal is not detected in the mutant growing oocytes. These new data strongly suggest that it is TBPL2-mediated transcription which is responsible for the establishment of the DNA methylome during oocyte growth.

In addition to the abnormal nuclear organization, we also observed that the cytoplasm is also affected. Our analyses indicated that these defects are associated with the induction of the oocyte growth as we could not observe major phenotype at P7 or earlier at P5. Interestingly, this pre-growth organization seems to persist in the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes suggesting that the cytoplasm is not reorganized at the level of the cytoskeleton and of the organelles. We also failed to detect the constitution of the SCMC compartment as actin failed to accumulate in the sub cortical domain of the mutant oocytes, suggesting defects in regulation of actin dynamics. In our previous transcriptomic analysis, we could not detect decreased expression of *Actb*, however, expression of the positive regulator of actin polymerization, such as *Fmn2* or genes coding for the ARP2/3 complex were deregulated in the *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes (Yu et al. 2020). Further analysis of the expression of these key regulators at the protein levels will be required to understand the strong decrease in cortical actin in the mutant oocytes. Altogether, our data indicate that in absence of TBPL2-mediated transcription, the mutant oocytes are unable to engage in the growth program.

RNA decay during oocyte growth?

The modulation of the maternal transcriptome has been well described during maturation (for reviews, see (Vastenhouw et al. 2019; Tora and Vincent 2021)). As transcription stops after oocyte growth, all the subsequent events are controlled via the sequential and specific degradation of transcripts that are no longer required and/or the cytoplasmic readenylation of previously stored transcripts associated with the induction of their translation. Transcripts coding for proteins directly associated with RNA decay such as DCP1A and DCP2 (decapping complex), CNOT6L and CNOT7 (CCR4-NOT complex deadenylases) and PAN2

RÉSULTATS

(PAN2/PAN3 deadenylase complex) have been categorized as be dormant, i.e. stored and not translated (Ma et al. 2013, 2015), suggesting that the decapping activity is reduced in the growing oocytes. Due to the lack of available antibodies, we could not test all these proteins, but our data indicate that at least DCP1A and DCP2 are still detectable during oocyte growth, suggesting that some of the *Dcp1a* and *Dcp2* mRNA are translated. These proteins could be stored or functional during this period. We previously showed that in the *Tbpl2*^{-/-} mutant growing oocytes, several transcripts coding for protein associated with the regulation of RNA stability, including *Dcp1a*, and to a lesser extent *Dcp2*, are down-regulated (Yu et al. 2020). Our new data showing an increase signal of 7mG cap in the mutant oocytes is in agreement with an active decapping complex activity during oocyte growth. In addition, the increase poly(A) signal we detected in the *Tbpl2*^{-/-} mutant growing oocytes could also be associated with a defect in the deadenylation activity during oocyte growth. Interestingly, two conditional deletions of *Exosc10* coding the catalytic subunit of the 3'-5' exoribonuclease exosome complex have been reported (Wu and Dean 2020; Demini et al. 2023), using two different Cre line. While Wu *et al.* used the Zp3-Cre which starts to be active at day 5, becoming fully active after the onset of oocyte growth and reported a defect in the transition between growth and maturation, Demini *et al.* used the iGdf9-Cre line, which is active as early as day 3 in primordial follicles oocytes and fully active at day 5 prior to the initiation of oocyte growth (Lan et al. 2004) and reported a role for EXOSC10 during oocyte growth. These data suggest that the contribution of the RNA decay machinery has been underestimated during oocyte growth in the mouse.

Altogether, these data strongly support that mRNA decay regulation is active and functionally important during oocyte growth and is impaired in absence of TBPL2-mediated transcription.

Increased poly(A) signal in absence of TBPL2-mediated transcription

We observed an increased level of the poly(A) signal in absence of TBPL2-mediated transcription. We previously showed that TBP expression was decreasing during oocyte growth being replaced by TBPL2 (Gazdag et al. 2007) and that H3K4me3 levels and serine 2 phosphorylation of RBP1 CTD, associated with active Pol II activity were strongly reduced in *Tbpl2*^{-/-} mutant growing oocytes (Gazdag et al. 2009), indicating that active transcription is severely impaired in absence of TBPL2. Therefore, the increased poly(A) signal in the mutant oocytes could be the result of lack of poly(A) deadenylation associated with the stabilization of an important population of mRNA. This hypothesis is in agreement with the observation that in our previous transcriptomic analysis, about 1400 transcripts were upregulated (Yu et al. 2020) Evaluation of the impact of the lack of TBPL2-mediated transcription on poly(A) length of specific transcripts, either by poly(A) tail assay (HA-PAT) (Jiang et al. 2023) or at the level of the transcriptome by Nanopore sequencing (Lee et al. 2024) will be required to clarify the mechanism involved.

Acknowledgements

We thank all members of the Vincent/Tora lab for protocols, discussions and suggestions, Alicia Garcia Sanchez for assistance with the analysis of the *Tbpl2*^{-/-} sections, Sylvie Falcone, Michael Gendron and the IGBMC animal facility for the animal caretaking, the PluriCell East platform for cell culture services, the Histopathology and Embryology platform and we acknowledge the support of the Light Microscopy Facility at the IGBMC imaging center, member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). This work was supported by funds from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-23-CE12-0034) to SDV and Fondation pour la Recherche Médicale (EQU-2021-0312631) to SDV and LT. This work, as part of the ITI 2021-2028

program of the University of Strasbourg was also supported by IdEx Unistra (ANR-10IDEX-0002) and by SFRI-STRAT'US project (ANR 20-SFRI-0012) and EUR IMCBio (ANR-17-EURE-0023) under the framework of the French Investments for the Future Program. EGS was a recipient of a fellowship from the University of Strasbourg Doctoral School ED414.

Author's contributions

EGS, DD, CR and CZB performed experiments. EGS and SDV designed the experiments with the help of FM and BS. SDV conceived, supervised the project and wrote the paper with support from EGS, FM, BS; DD, CR and LT.

Declaration of interests

The authors declare that they have no competing interests.

Main Figure titles and legends

Figure 1: Histological analysis of *Tbpl2*^{-/-} ovaries

(A-D) Comparative hematoxylin-eosin (HE) study of WT and *Tbpl2*^{-/-} ovaries at post-natal (PN) 14 days (A), 6 weeks (B), 8 weeks (C) and 32 weeks (D) old females. Scale bars: 500 μ m. (E) Folliculogenesis at primary, early secondary and late secondary follicular stages from WT and *Tbpl2*^{-/-} ovaries at 8 weeks. Scale bars: 25 μ m. (F) Follicular waves at 6 weeks in WT and *Tbpl2*^{-/-} mutant ovaries. Dashed line: delimitation of the cortical and medullar follicular waves. Magnification of cortical versus medullar follicles. Scale bars: 250 μ m and 50 μ m (magnifications). (G) Abnormal structure of the *Tbpl2*^{-/-} oocytes at 6 weeks. Scale: 25 μ m. (H) Quantification of the size of the oocytes nuclei at PN14, 6 and 32 weeks. Nuclei of *Tbpl2*^{-/-} oocytes are significantly bigger compared to WT counterparts. Wilcoxon test, *, **, ***: *p*-value ≤ 0.05 .

Figure 2: Abnormal chromatin organization in *Tbpl2*^{-/-} oocytes

(A-D) Negative grayscale pictures of immunofluorescence on growing WT and *Tbpl2*^{-/-} oocytes at PN14 using antibodies against: facultative heterochromatin histone mark H3K27me3 (A), constitutive chromatin histone mark H3K9me3 (B), heterochromatin-associated factor HP1 β (C) and 5mC modification (D). Pictures displayed are single planes, scale bars: 20 μ m.

Figure 3: Disorganization of the cytoskeleton in *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes

(A-F) Detection of β -TUBULIN (A,D), ACTIN (B,E) and DESMIN (C,F) in growing WT and *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes at PN7 (A-C) and PN14 (D-F). Arrows indicate cortical signal and arrow heads show cytoplasmic aggregation in close apposition to the nucleus in (D-F). The negative grayscale pictures displayed are single planes, scale bars: 25 μ m.

Figure 4: Abnormal cytoplasmic organization in *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes

(A,B) Negative grayscale pictures of immunofluorescence on growing WT and *Tbpl2*^{-/-} oocytes: Golgi-associated protein GM130 at PN7 (A) and PN14 (B). Scale bars: 25 μ m. (C) Mitochondria detection, using Mitotracker-647, on PN14 oocytes. The arrow indicates the subcortical localization, and the arrowhead depicts cytoplasmic aggregation. Scale bars: 25 μ m. (D,E) Electron microscopy ultrastructural analysis of WT and *Tbpl2*^{-/-} oocytes at PN7 (D) and PN14 (E). N: Nucleus, GA: Golgi Apparatus, L: Lattices; MB: Multivesicular Bodies, Mt: Mitochondria, RER: Rough Endoplasmic Reticulum. White arrows: mitochondria; black arrows: Golgi membranes; red arrows: lattices. The rectangles indicate the magnified field. Pictures displayed in (A-C) are single planes, scale bars: 2 μ m, except in the magnifications in (E): 1 μ m.

Figure 5: Defects in the protein complexes associated with the regulation of RNA stability

(A-H) Negative grayscale pictures of immunofluorescence on growing WT and *Tbpl2*^{-/-} oocytes at PN7 (B,C,E) and PN14 (A,C,D,F,G) using antibodies against: PABPC1 (A), YBX2 (B,C), DCP1A (D,E), DCP2 (F,G) and 7mG cap (H). Pictures displayed are single planes, scale bar: 25 μ m.

Figure 6: Increased poly(A) signal and expression of poly(A) associated proteins in *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes

(A,B) Oligo (dT) FISH on growing WT and *Tbpl2*^{-/-} oocytes targeting poly(A) tails at PN7 (A) and PN14 (B). Scale bars: 25 μ m. (C) Quantification of nuclear poly(A) signal in PN14 WT and *Tbpl2*^{-/-} growing oocytes. Wilcoxon test, *: p -value ≤ 0.05 . (D) Immunofluorescence on

RÉSULTATS

growing WT and *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes using an anti-PABPN1 antibody. Scale bar: 25 μ m. (E) Quantification of the number of PABPN1 foci per PN14 oocyte nucleus. Wilcoxon test, *: p -value ≤ 0.05 . (F) Ultrastructural analysis by electron microscopy of WT and *Tbpl2*^{-/-} nuclei. Scale bar: 5 μ m. White arrowheads: nuclear foci, black arrow: nucleolus. (G,H) Detection of PAPOLA by immunofluorescence on growing WT and *Tbpl2*^{-/-} oocytes at PN7 (G) and PN14 (H). Scale bars: 25 μ m. (I) Quantification of nuclear PAPOLA in PN14 WT and *Tbpl2*^{-/-} growing oocytes. The negative grayscale pictures displayed in (A,B,D,G,H) are single planes. Wilcoxon test, *: p -value ≤ 0.05 . Pictures displayed in (A,B,D,G,H) are single planes.

Material and Methods

Animal experimentation

Animal experimentation was carried out in accordance with the ethical welfare guidelines of the French Ministry of Agriculture. The *Tbpl2* mouse line was already described (Gazdag et al. 2009). *Tbp2*^{-/-} male were mate with *Tbp2*^{+/-} females to generate heterozygous females (WT) and homozygous females (KO).

Histological analyses of ovaries

Ovaries were collected from post-natal day (PN) 14, and 6-, 8- and 32-weeks old WT and KO females and fixed 16 hours in Bouin's fixative at 4°C. Ovaries were washed twice in PBS and dehydrated by immersion in successive and increasing ethanol solution concentrations (70, 90, 95 and 100%, 20 minutes each) ending in Sub-X solution (3803670, Leica Biosystems). Dehydrated ovaries were embedded in paraffin, 6 µm sections were mounted on SuperFrost Plus slides (J1800AMNZ, Eprelia) and incubated 16 hours at 37°C. The sections were rehydrated in successive and decreasing ethanol solution concentrations (100, 95, 90, 70%) and stained with hematoxylin-eosin (Clinisciences K1142-1000). Image acquisition was performed with the slide scanner HAMAMATSU NanoZoomer2.0T and analysis was done using the NanoZoomer Digital Pathology view software (NDP view 3.4).

Oocytes collection

PN5, PN7 and PN14 ovaries were dissected and adherent tissues were removed in PBS. They were incubated in a digestion buffer containing 430 µL of filtered PBS, 30 µL of collagenase (30 mg/mL, C2674-100MG, Sigma), 25 µL of hyaluronidase (10 mg/mL, H3884, type IV-S, Sigma) and 12.5 µL of trypsin (1%, 93615-5G, Sigma) The solution was incubated during 30 minutes at 37°C and homogenized each 5 minutes in order to release the oocytes. Enzymatic

RÉSULTATS

reaction was stopped by adding 1 mL of M2 medium (M7167-100ML, Sigma) and the oocyte suspension was transferred into a Petri dish. Oocytes were mouth-pipetted in M2 medium.

Immunofluorescence

Oocytes were fixed 15 minutes at room temperature (RT) in a 4% PFA solution and permeabilized 20 minutes in a Blocking permeabilization Solution (BS): 0.2% Triton X-100, 1% BSA, PBS x1. Primary antibodies were diluted at 1:500 in BS and incubated overnight at 4°C in a humid chamber. Oocytes were washed twice in BS for 15 minutes each, followed by secondary antibody incubation at RT for 1 hour (dilution 1:500 in BS). Oocytes were then transferred in BS/secondary antibodies solution and incubated 1 hour at RT in a humid chamber protected from the light. Oocytes were then washed three times in BS for 10 minutes each and mounted in Vectashield-DAPI (H-1200, Vector laboratories). Antibodies references are listed in supplemental Table1.

5mC staining of oocytes

Oocytes were processed as in (Hajkova et al. 2010). Briefly, oocytes were fixed in 4% PFA for 20 minutes and washed three times in PBS, 1% BSA for 10 minutes. Oocytes were then permeabilized in PBS, 1% BSA, 0.5% Triton X-100 for 30 minutes, washed three times in PBS, 1%BSA for 10 minutes and treated with RNaseA (10 mg/ml) for 1hr at 37°C. Following three subsequent 10 min washes in PBS, 1% BSA, samples were rinsed in PBS and treated with 4N HCl for 20 minutes at 37°C. Oocytes were then rinsed in PBS, washed three times in PBS, 1% BSA for 10 minutes, incubated in PBS, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 for 30 minutes and incubated in the same buffer with 5mC antibody at 4°C overnight. Oocytes were subsequently washed three times in PBS, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 for 10 minutes and incubated with Alexa fluorophore conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) for 1 hour at RT in the dark. Oocytes were then washed once in PBS, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 for 10 minutes and twice in PBS, 1% BSA for 10 minutes, followed by propidium iodide (PI) staining (0.25mg/ml)

RÉSULTATS

for 25 minutes. The final wash was carried out in PBS, 1% BSA for 20 minutes to remove excess of PI, the oocytes were mounted in Vectashield (Vector laboratories).

Oligo (dT) FISH

Oocytes were fixed 30 minutes at RT in a 4% PFA solution and permeabilized 20 minutes at RT in a 70% ethanol solution. Permeabilized oocytes were placed on poly-lysine coated coverslips (PB-5170, Euromedex and A38904-01, Gibco), transferred in Stellaris Wash Buffer A (SMF-WA1-60, Biosearch Technologies) supplemented 10% formamide (F9037-100ML, Sigma) and were incubated in the dark for 16 hours at 37°C in Stellaris hybridization buffer (SMF-HB1-10, Biosearch Technologies) containing 200 nM of oligo (dT)₂₀ cy3 probe (26-4320-02, Gene Link). Then, oocytes were washed twice at 37°C in Wash buffer A for 30 minutes each and then twice in Stellaris Wash buffer B (SMF-WB1-20, Biosearch Technologies), first at 37°C then at RT. Oocytes were mounted in Vectashield-DAPI (H-1200, Vector laboratories).

Actin network labeling

Oocytes were fixed for 10 minutes at RT in a 4% PFA solution, and permeabilized 20 minutes in 0.2 % Triton X-100, 1 % BSA, PBS solution. Oocytes were incubated 20 minutes with 0.5 µL of Phalloidin-iFluor 488 Conjugate (23115, AAT Bioquest) in 500 µL in PBS. Then, oocytes were rinsed twice with PBS and mounted in Vectashield-DAPI (H-1200, Vector laboratories).

Mitochondria labelling

Oocytes were incubated 20 minutes with 500 nM of Mitotracker Deep Red FM (8778, Cell Signaling) in M2 medium (M7167-100ML, Sigma). Oocytes were then fixed for 30 minutes at RT in a 4% PFA solution, rinsed twice with PBS and mounted in Vectashield-DAPI (H-1200, Vector laboratories).

Imaging and fluorescence quantifications

Samples were imaged using Leica inverted confocal microscope with a HC PL APO CS2 63x/1.4 oil and 10x objective. Analyses and quantifications were processed using ImageJ.

Electron microscopy

The samples were fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4) and washed in cacodylate buffer for further 30 minutes. Oocytes were post fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 hour at 4°C and dehydrated through increasing ethanol solution concentrations (50, 70, 90, and 100%) and propylene oxide for 30 minutes each. Samples were embedded in Epon 812 (Euromedex EM-14900), and 70 nm ultrathin sections were generated (Leica Ultracut UCT), contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined at 70kv with a Morgagni 268D electron microscope (FEI Electron Optics, Eindhoven, the Netherlands). Images were captured with Mega View III camera (Soft Imaging System).

NIH3T3 culture and siRNA validation

NIH3T3 cells were cultured on coverslips in DMEM (10% NCS supplemented) for 70% confluency and conditioned 2 hours in Opti-MEM reduced serum medium (31985062, Gibco). ON-TARGETplus (Dharmacon) siRNA were diluted with Lipofectamine (52887 Invitrogen) in Opti-MEM to 50 nM. NIH3T3 cells were silenced during 48h, fixed with 4 % PFA for 15 minutes, washed twice with PBS and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 20 minutes. Antibodies were diluted 1:500 in Blocking permeabilization Solution (BS, 0.2 % Triton X-100, 1 % BSA, PBS x1) and incubated overnight at 4°C. Cells were washed twice with PBS and secondary antibodies were incubated 1 hour at RT. Coverslips were washed twice and mounted in Vectashield-DAPI (H-1200, Vector laboratories).

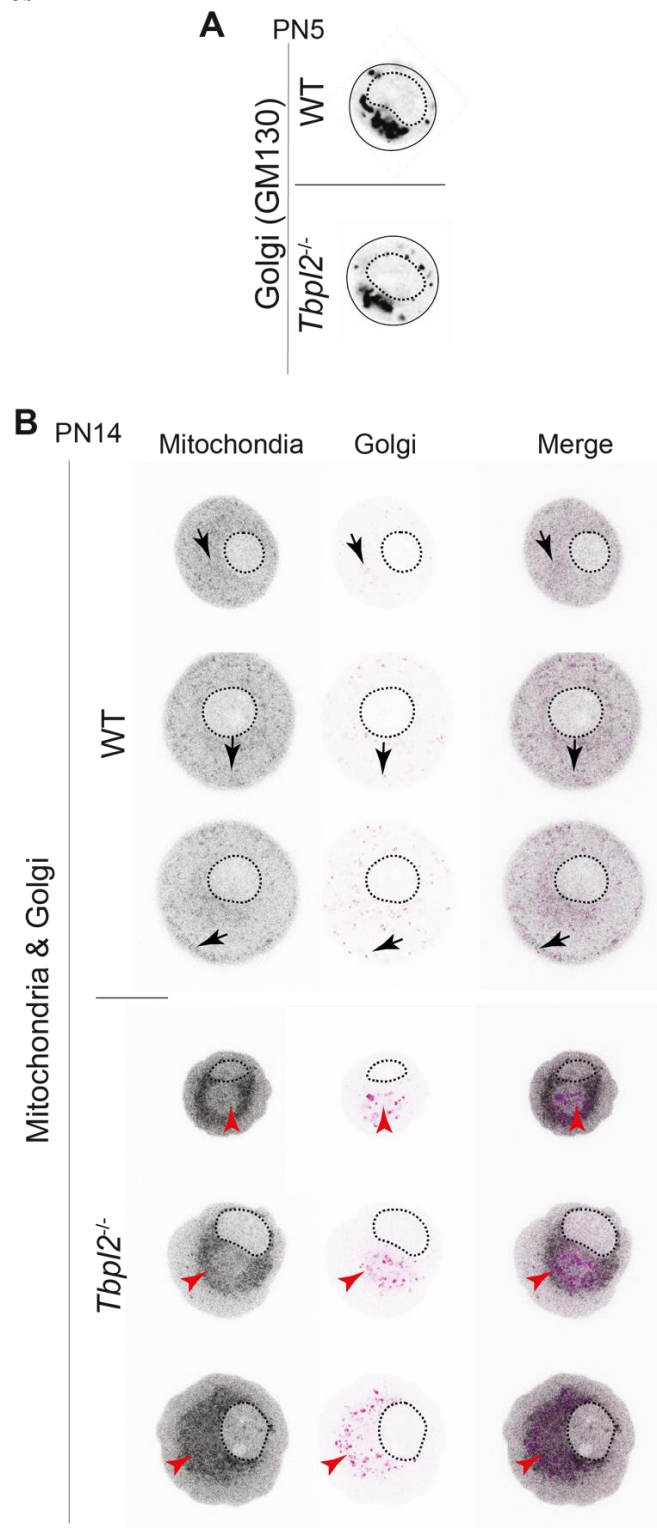
References

- Bachvarova RF. A maternal tail of poly(A): the long and the short of it. *Cell*. 1992 Jun 12;69(6):895–7.
- Bebbere D, Albertini DF, Coticchio G, Borini A, Ledda S. The subcortical maternal complex: emerging roles and novel perspectives. *Mol Hum Reprod*. 2021;27(7):gaab043.
- Burkholder GD, Comings DE, Okada TA. A storage form of ribosomes in mouse oocytes. *Exp Cell Res*. 1971;69(2):361–71.
- Cheng S, Altmeppen G, So C, Welp LM, Penir S, Ruhwedel T, et al. Mammalian oocytes store mRNAs in a mitochondria-associated membraneless compartment. *Science* [Internet]. 2022 Oct 21;378(6617):eba4835.
- Coller J, Parker R. Eukaryotic mRNA decapping. *Annual review of biochemistry* [Internet]. 2004;73(1):861–90.
- Demini L, Kervarrec C, Guillot L, Com E, Lavigne R, Kernanec PY, et al. Inactivation of Exosc10 in the oocyte impairs oocyte development and maturation, leading to a depletion of the ovarian reserve in mice. *Int J Biol Sci*. 2023;19(4):1080–93.
- Dhandapani L, Salzer MC, Duran JM, Zaffagnini G, Guirior CD, Martínez-Zamora MA, et al. Comparative analysis of vertebrates reveals that mouse primordial oocytes do not contain a Balbiani body. *J Cell Sci*. 2024;135(1).
- Dijk E van, Cougot N, Meyer S, Babajko S, Wahle E, Séraphin B. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *Embo J*. 2002;21(24):6915–24.
- Flemr M, Ma J, Schultz RM, Svoboda P. P-body loss is concomitant with formation of a messenger RNA storage domain in mouse oocytes. *Biology of reproduction*. 2010 May;82(5):1008–17.
- Gazdag E, Rajkovic A, Torres-Padilla ME, Tora L. Analysis of TATA-binding protein 2 (TBP2) and TBP expression suggests different roles for the two proteins in regulation of gene expression during oogenesis and early mouse development. *Reproduction*. 2007 Jul;134(1):51–62.
- Gazdag E, Santenard A, Ziegler-Birling C, Altobelli G, Poch O, Tora L, et al. TBP2 is essential for germ cell development by regulating transcription and chromatin condensation in the oocyte. *Genes Dev*. 2009 Sep 15;23(18):2210–23.
- Giacconi C, Cecere F, Argenziano L, Pagano A, Riccio A. New insights into oocyte cytoplasmic lattice-associated proteins. *Trends Genet*. 2024;
- Hajkova P, Jeffries SJ, Lee C, Miller N, Jackson SP, Surani MA. Genome-Wide Reprogramming in the Mouse Germ Line Entails the Base Excision Repair Pathway. *Science*. 2010;329(5987):78–82.
- Hiroi N, Ito T, Yamamoto H, Ochiya T, Jinno S, Okayama H. Mammalian Rcd1 is a novel transcriptional cofactor that mediates retinoic acid-induced cell differentiation. *EMBO J*. 2002;21(19):5235–44.

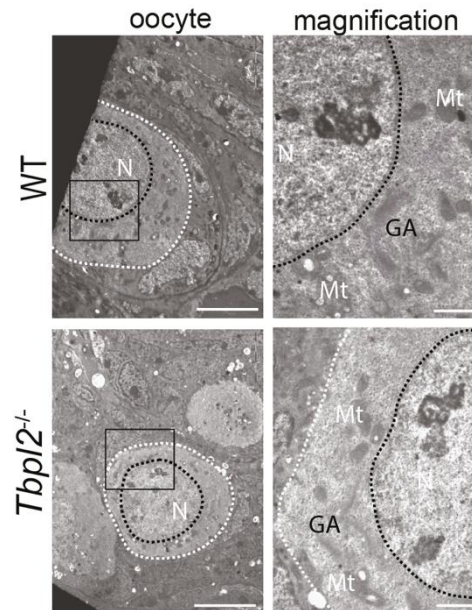
- Jamieson-Lucy A, Mullins MC. The vertebrate Balbiani body, germ plasm, and oocyte polarity. *Curr Top Dev Biol*. 2019;135:1–34.
- Jentoft IMA, Bäuerlein FJB, Welp LM, Cooper BH, Petrovic A, So C, et al. Mammalian oocytes store proteins for the early embryo on cytoplasmic lattices. *Cell*. 2023;186(24):5308-5327.e25.
- Jiang X, Cheng Y, Zhu Y, Xu C, Li Q, Xing X, et al. Maternal NAT10 orchestrates oocyte meiotic cell-cycle progression and maturation in mice. *Nat Commun*. 2023;14(1):3729.
- Lan ZJ, Xu X, Cooney AJ. Differential oocyte-specific expression of Cre recombinase activity in GDF-9-iCre, Zp3cre, and Msx2Cre transgenic mice. *Biol Reprod*. 2004 Nov;71(5):1469–74.
- Lee K, Cho K, Morey R, Cook-Andersen H. An extended wave of global mRNA deadenylation sets up a switch in translation regulation across the mammalian oocyte-to-embryo transition. *Cell Rep*. 2024;43(2):113710.
- Li L, Baibakov B, Dean J. A Subcortical Maternal Complex Essential for Preimplantation Mouse Embryogenesis. *Dev Cell*. 2008;15(3):416–25.
- Liu X, Morency E, Li T, Qin H, Zhang X, Zhang X, et al. Role for PADI6 in securing the mRNA-MSY2 complex to the oocyte cytoplasmic lattices. *Cell cycle (Georgetown, Tex) [Internet]*. 2017 Jan 12;16(4):360–6.
- Ma J, Flemr M, Strnad H, Svoboda P, Schultz RM. Maternally recruited DCP1A and DCP2 contribute to messenger RNA degradation during oocyte maturation and genome activation in mouse. *Biol Reprod*. 2013 Jan;88(1):11.
- Ma J, Fukuda Y, Schultz RM. Mobilization of Dormant Cnot7 mRNA Promotes Deadenylation of Maternal Transcripts During Mouse Oocyte Maturation. *Biol Reprod*. 2015 Aug;93(2):48.
- Malik S, Roeder RG. Regulation of the RNA polymerase II pre-initiation complex by its associated coactivators. *Nat Rev Genet*. 2023;1–16.
- Mauxion F, Basquin J, Ozgur S, Rame M, Albrecht J, Schäfer I, et al. The human CNOT1-CNOT10-CNOT11 complex forms a structural platform for protein-protein interactions. *Cell Reports*. 2023;42(1):111902.
- Mauxion F, Prève B, Séraphin B. C2ORF29/CNOT11 and CNOT10 form a new module of the CCR4-NOT complex. *RNA Biol*. 2013;10(2):267–76.
- Miller JE, Reese JC. Ccr4-Not complex: the control freak of eukaryotic cells. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2012 Jul;47(4):315–33.
- Mork L, Maatouk DM, McMahon JA, Guo JJ, Zhang P, McMahon AP, et al. Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice. *Biology of reproduction*. 2012 Feb;86(2):37.
- Passmore LA, Collier J. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(2):93–106.

- Paynton BV, Bachvarova R. Polyadenylation and deadenylation of maternal mRNAs during oocyte growth and maturation in the mouse. *Molecular reproduction and development*. 1994 Feb;37(2):172–80.
- Pepling ME. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis (New York, NY : 2000)*. 2006 Dec;44(12):622–32.
- Shirai YT, Suzuki T, Morita M, Takahashi A, Yamamoto T. Multifunctional roles of the mammalian CCR4-NOT complex in physiological phenomena. *Frontiers in genetics* [Internet]. 2014 Aug 21;5(e51331):673.
- Takahashi A, Adachi S, Morita M, Tokumasu M, Natsume T, Suzuki T, et al. Post-transcriptional Stabilization of Ucp1 mRNA Protects Mice from Diet-Induced Obesity. *Cell Rep*. 2015;13(12):2756–67.
- Tora L, Vincent SD. What defines the maternal transcriptome? *Biochem Soc T*. 2021;49(5):2051–62.
- Vastenhouw NL, Cao WX, Lipshitz HD. The maternal-to-zygotic transition revisited. *Development*. 2019 Jun 12;146(11):dev161471.
- Veselovska L, Smallwood SA, Saadeh H, Stewart KR, Krueger F, Maupetit-Méhouas S, et al. Deep sequencing and de novo assembly of the mouse oocyte transcriptome define the contribution of transcription to the DNA methylation landscape. *Genome Biol*. 2015 Sep 25;16(1):209.
- Wu D, Dean J. EXOSC10 sculpts the transcriptome during the growth-to-maturation transition in mouse oocytes. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(10):5349–65.
- Yu C, Cveticic N, Hisler V, Gupta K, Ye T, Gazdag E, et al. TBPL2/TFIIA complex establishes the maternal transcriptome through oocyte-specific promoter usage. *Nat commun*. 2020 Dec 22;11(1):6439.
- Yu XJ, Yi Z, Gao Z, Qin D, Zhai Y, Chen X, et al. The subcortical maternal complex controls symmetric division of mouse zygotes by regulating F-actin dynamics. *Nat Commun*. 2014;5(1):4887.
- Yurttas P, Vitale AM, Fitzhenry RJ, Cohen-Gould L, Wu W, Gossen JA, et al. Role for PADI6 and the cytoplasmic lattices in ribosomal storage in oocytes and translational control in the early mouse embryo. *Development*. 2008;135(15):2627–36.
- Zheng W, Zhang H, Gorre N, Risal S, Shen Y, Liu K. Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2013 Oct 1;23(4):920–8.

Supplemental Figures

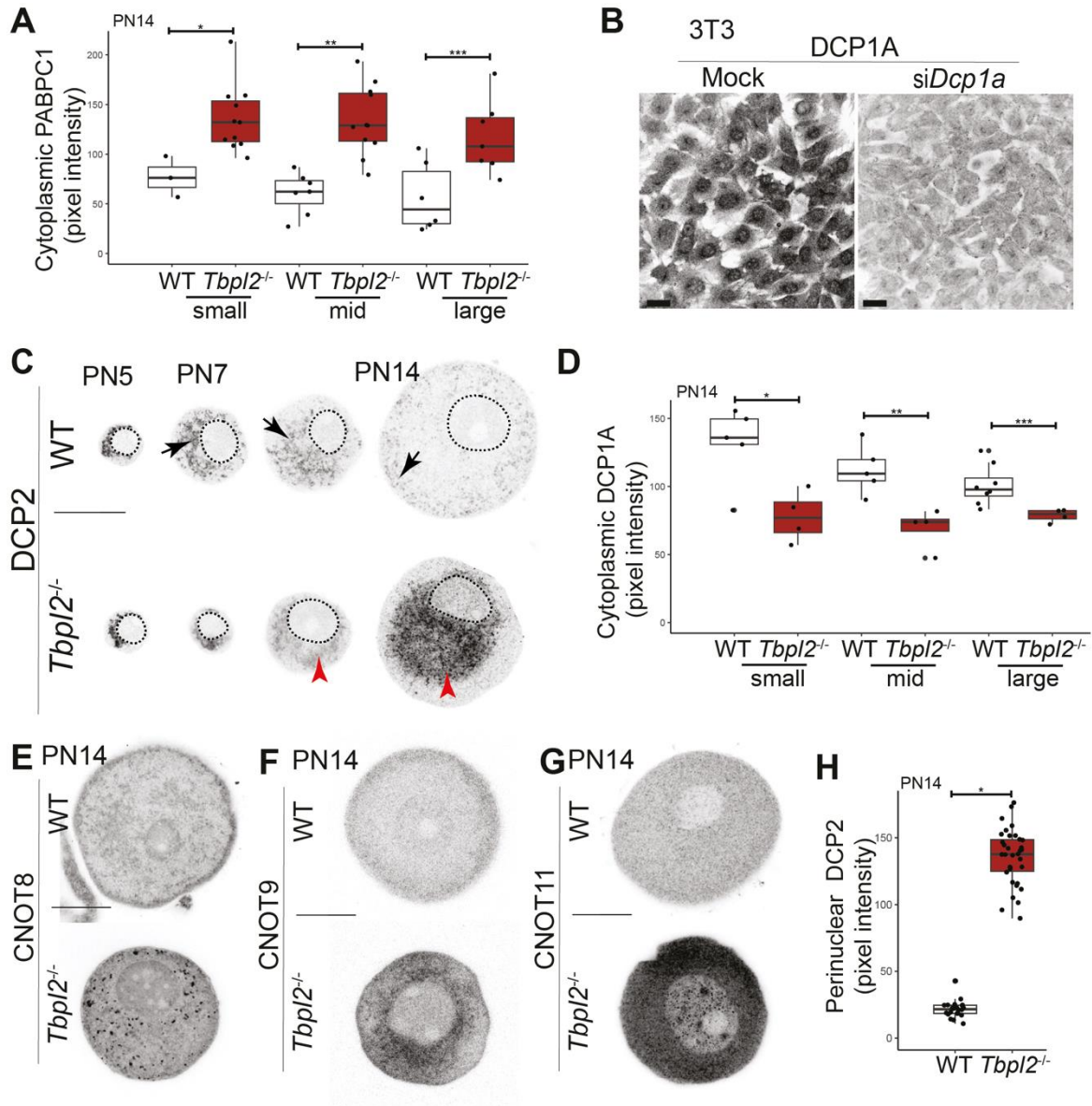
**Supplemental Figure 1: Subcellular localization of Golgi and mitochondria**

(A) Immunofluorescence on WT and *Tbpl2*^{-/-} mutant oocytes using antibody against the Golgi protein GM130 at PN5. (B) Codetection of the Golgi (anti-GM130 immunostaining) and of the mitochondria using Mitotracker-647 at PN14. Black arrows: cytoplasmic distribution of Golgi and mitochondria, red arrowheads: cluster of Golgi and mitochondria in close apposition to the nucleus in the mutant *Tbpl2*^{-/-} oocytes. Scale bar: 25 μ m.



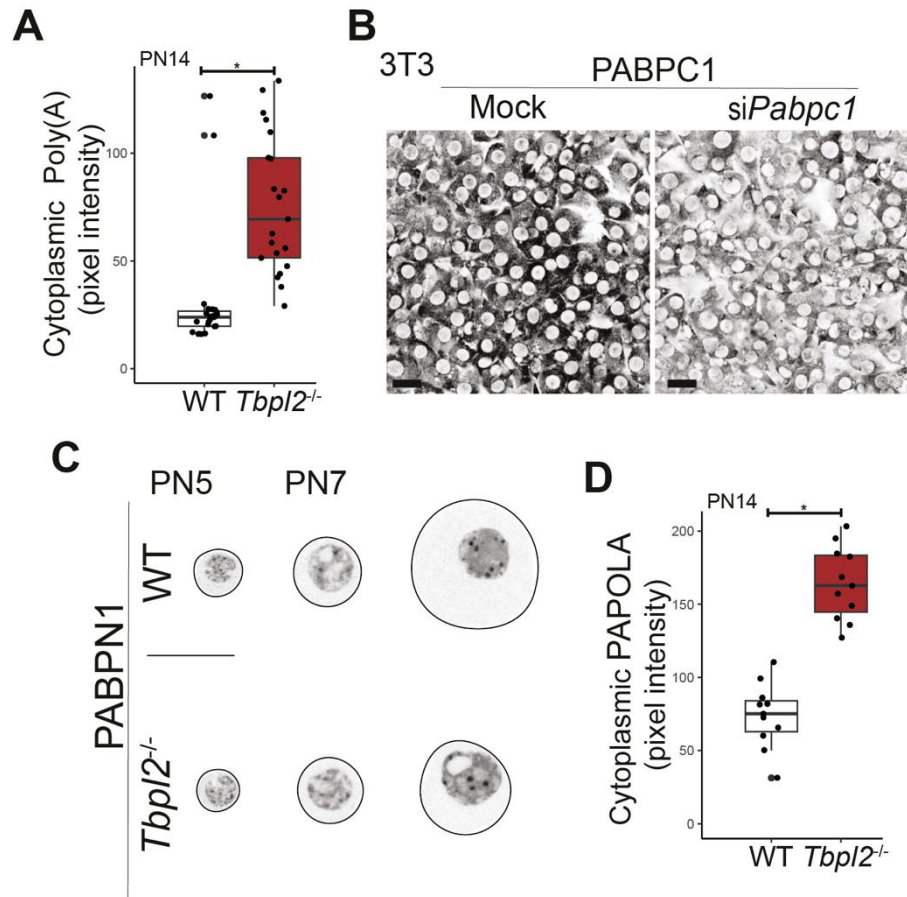
Supplemental Figure 2: Additional ultrastructural analysis of the subcellular distribution of organelles.

Ultrastructural analysis by electronic microscopy of the subcellular organization of a small oocyte not yet growing at PN14. Magnified fields are indicated by rectangles. White and black dashed lines, respectively highlight the oocyte and nucleus delimitations. N: Nucleus, GA; Golgi Apparatus, Mt: Mitochondria. Scale bars: 10 μ m, 2 μ m for magnifications.



Supplemental Figure 3: Analysis of the expression of subunits of protein complexes associated with the regulation of RNA stability

(A) Quantification of cytoplasmic immunostaining of PABPC1 in PN14 WT and *Tbp12*^{-/-} growing oocytes according to their size (small, mid and large). Wilcoxon test, *p*-values (*, ** and ***) ≤ 0.05. (B) Immunofluorescence detection of DCP1A on 3T3 cell line after siRNA treatment (mock and siDcp1a). Scale bars: 15 μm. (C) Analysis of DCP2 expression at different developmental time points (PN5, PN7 and PN14) by immunofluorescence in WT and *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes. The big WT oocytes are underrepresented in the ovary at PN7 but are depicted in order to show that the *Tbp12*^{-/-} phenotype is first detected at that stage. (D) Quantification of cytoplasmic immunostaining of DCP1A in PN14 WT and *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes. Wilcoxon test, *p*-values (*, ** and ***) ≤ 0.05. (E-G) Immunofluorescence on PN14 growing WT and *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes using antibodies against CCR4-NOT subunits CNOT8 (E), CNOT9 (F) and CNOT11 (G). Scale bars: 25 μm. (H) Quantification of DCP2 perinuclear immunostaining in PN14 WT and *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes. Wilcoxon test, *: *p*-value ≤ 0.05.



Supplemental Figure 4: Additional quantifications and analysis of poly(A) tail and poly(A) associated proteins

(A) Quantification of cytoplasmic poly(A) signal in PN14 WT and *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes. Wilcoxon test, *: p -value ≤ 0.05 . (B) Immunofluorescence on 3T3 cell line of PABPC1 protein after siRNA (mock and *siPabpc1*). Scale bars: 15 μ m. (C) Analysis of PABPN1 expression at two developmental PN5 and PN7 by immunofluorescence in WT and *Tbp12*^{-/-} mutant oocytes. The big WT oocytes are underrepresented in the ovary at PN7 but are depicted in order to show that the *Tbp12*^{-/-} phenotype is first detected at that stage. (D) Quantification of cytoplasmic immunostaining of PAPOLA in PN14 WT and *Tbp12*^{-/-} growing oocytes. Wilcoxon test, *: p -value ≤ 0.05 .

RÉSULTATS

Supplemental Table 1

Antibodies	Source	reference
Mouse monoclonal anti-5mC	Diagenode	C15200081-100
Mouse monoclonal anti-7mG	Sigma	MABE419
Mouse monoclonal anti- β -TUBULIN	IGBMC	1TU-2A2
Mouse monoclonal anti-GM130	BD BioSciences	610822 35/RUO
Mouse monoclonal anti-CNOT8	T. Yamamoto, OIST, Japan	(Takahashi et al. 2015)
Rabbit polyclonal anti-CNOT9	H. Okayama, Tokyo University, Japan	α Rcd-C, (Hiroi et al. 2002)
Rabbit polyclonal anti-CNOT11	IGBMC	3025, (Mauxion et al. 2013)
Rabbit polyclonal anti-DCP1A	IGBMC	90, (Dijk et al. 2002)
Rabbit polyclonal anti-DCP2	Invitrogen	PA5-115102
Rabbit polyclonal anti- DESMIN	Abcam	ab15200
Mouse monoclonal anti-GM130	BD BioSciences	610822 35/RUO
Rabbit polyclonal anti-H3K27me3	Millipore	07-449
Rabbit polyclonal anti-H3K9me3	Diagenode	C15200146-10
Rabbit polyclonal anti-HP1 β	Cell signaling	8676T
Rabbit polyclonal anti-PABPC1	Abcam	ab21060
Rabbit polyclonal anti-PABPN1	Bethyl laboratories	A303-523A
Rabbit polyclonal anti-PAPOLA	Abcam	ab251660
Rabbit polyclonal anti-YBX2	Abcam	ab33164
Goat anti-mouse; Secondary Antibody 488	Thermo Scientific	A32723
Goat anti-rabbit; Secondary Antibody 594	Thermo Scientific	A-11037

Résultats non publiés

I. Analyse de la longueur de la queue poly(A) en approche transcrit spécifique

Le but de ces approches est de déterminer la longueur de la queue poly(A) en transcrit spécifique en partant de très peu de matériel de départ (*low input*, ovocytes en croissance de souris WT et le mutant *Tbpl2^{-/-}*, ce qui est un vrai challenge. L'hypothèse initiale est que les ARNs messagers régulés à la hausse chez le mutant pourraient s'expliquer par la stabilisation que confère une queue poly(A) longue puisque dans le mutant *Tbpl2^{-/-}*, la catégorie GO Ribonucléase poly(A) est enrichie dans les ARNs régulés à la baisse (Yu et al. 2020), ce qui inclut des ARNs codant pour des sous-unités de complexes régulant la dégradation de l'ARN (Yu et al. 2020). Dylane Détilleux, la chercheuse post-doctorante de notre équipe m'a aidé dans la mise en place des approches.

I.a) ePAT, extended Poly(A) Tail assay

L'approche ePAT (Beilharz and Preiss 2009) est basée sur l'extension des ARNm par la polymérase *Klenow* en 3' de la queue poly(A) d'une séquence d'ancrage courte (*anchor* : GCGAGCTCCGCGGCCGCG) (**figure 44**). La séquence d'ancrage permet de rétrotranscrire tous les ARNs messagers l'ayant intégrée (figure 44). Suite à une PCR « transcrit spécifique », le dépôt sur gel d'agarose permet potentiellement de visualiser les différentes tailles de longueur de la queue poly(A) d'un transcrit cible. Le primer A0 cible l'amplification de la version courte, sans queue poly(A), de l'ARNm pour deux raisons : 1) S'assurer que l'on peut détecter l'ARNm en question sans tenir compte de la longueur de la queue poly(A), 2) déterminer avec précision, par comparaison avec la version courte, les longueurs de la queue des versions plus longues. L'expression RNAseq (Yu et al. 2020) et les A0 attendus des ARNs messagers testés en HA-PAT se trouve **tableau 13**.

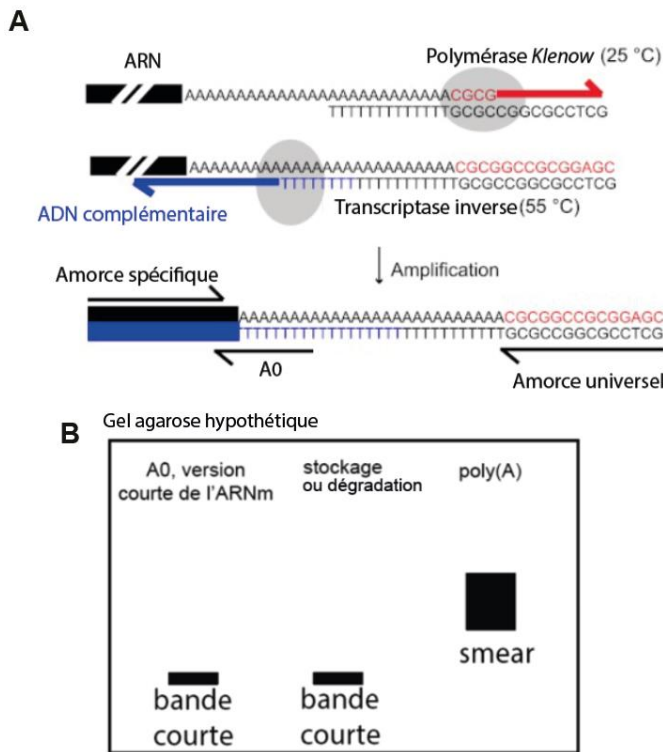


Figure 44: Approche expérimentale ePAT.
(Jänicke et al. 2012)

(A) Les différentes étapes de l'approche sont représentées ci-contre. (B) La visualisation sur gel d'agarose permet de déterminer la longueur de la queue poly(A) pour un transcrit cible en partant de très peu de matériel de départ. Une version longue de la queue poly(A) est attribuée à la traduction active potentielle alors que la version courte reflète le stockage ou la dégradation de l'ARNm et donc sa répression traductionnelle potentielle.

Puisque le matériel de départ est limité, la première mise au point a consisté en la détection de transcrits fortement exprimés dans les ovocytes en croissance comme *Zp3* et *Zar1*. Cela a permis de visualiser la longueur de la queue poly(A) de ces deux transcrits (**figure 45A**). Les primers spécifiques ayant été générés en amont de la séquence PAS, il est nécessaire de déduire cette taille aux longueurs détectées sur le gel afin de déterminer la longueur de la queue poly(A) du transcrit étudié. Après réduction, la queue poly(A) de *Zp3* est estimée de 70-300 nucléotides (**figure 45A**) tandis que la queue poly(A) de *Zar1* est estimée de 60 à 240 nucléotides. Ces données valident la technique avec 300 ovocytes initiaux. Cependant, en faisant varier les quantités de cDNA (1, 2 ou 5µL amplifié), on ne visualise pas de différences marquantes sur le gel ce qui montre que l'approche n'est pas quantitative mais seulement qualitative (**figure 45A**). L'étape suivante a été de diminuer le nombre d'ovocytes de départ. Avec 150 ovocytes, le *smear correspondant* à la queue poly(A) de *Zar1* est encore détecté (**figure 45B**) et la bande A0 attendue correspond, voir **tableau 13**.

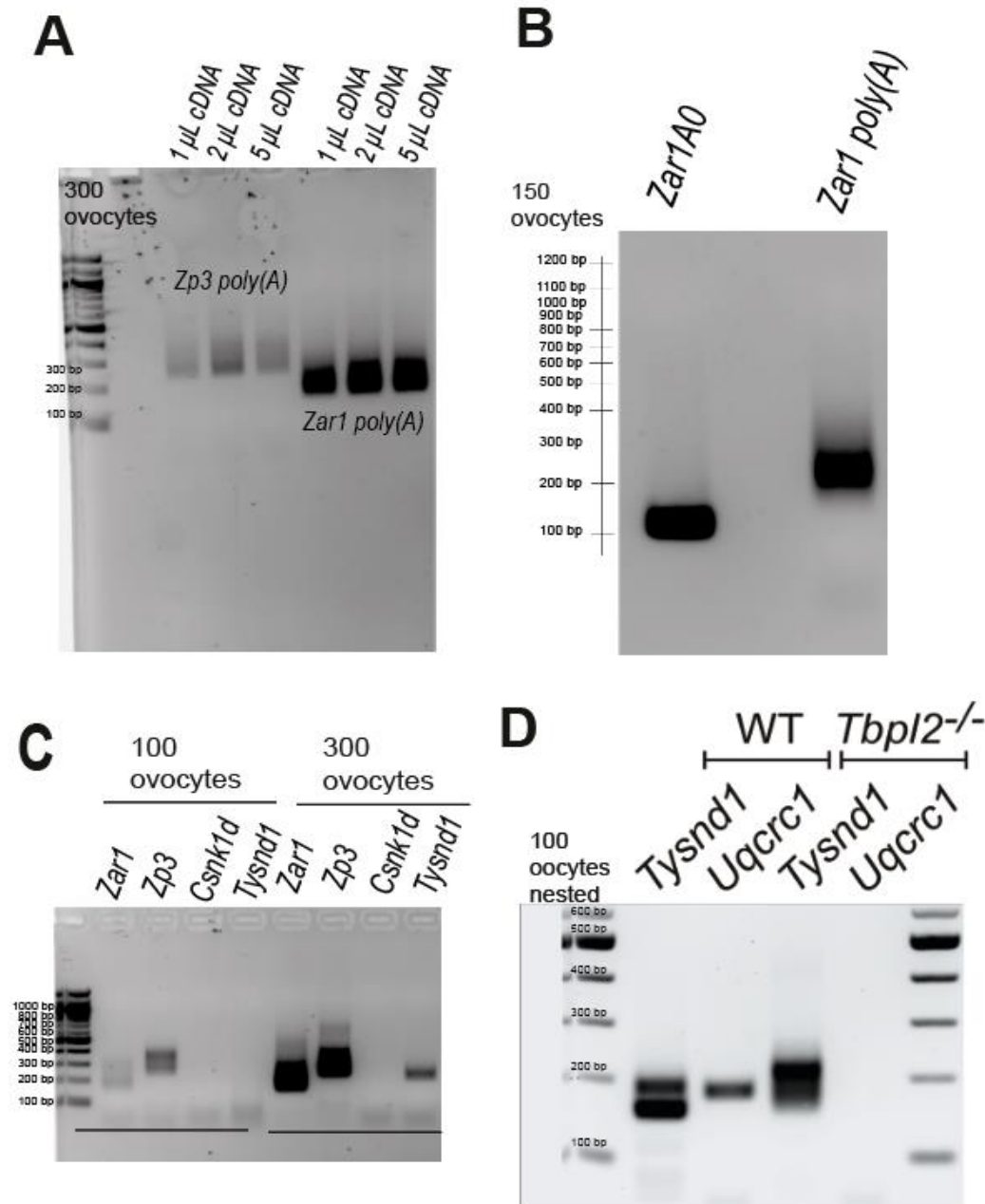


Figure 45: Développement de l'approche ePAT pour des ovocytes en croissance

Afin de continuer le développement de l'approche, j'ai récupéré à nouveau des ARNs d'ovocytes en croissance essentiellement chez le WT (100 et 300 initiaux) et me suis intéressé à la détection de deux transcrits régulés à la hausse (**figure 45C**) chez le mutant que sont *Csnk1d* (logFoldChange : 0.34) et *Tysnd1* (logFC :0.26). En parallèle, j'ai ajouté les contrôles

internes qui avaient été validés auparavant à savoir *Zar1* et *Zp3*. Les contrôles internes fonctionnent bien et le signal est augmenté avec 300 ovocytes initiaux comparé aux 100 ovocytes (**figure 45C**). En revanche, il existe des variations importantes de l'intensité des signaux sur gel si l'on compare aux expériences **figure 45A** qui ont été réalisées avec le même nombre d'ovocytes initiaux. Cela montre la variabilité de l'approche. Néanmoins, même si pour 100 ovocytes initiaux *Csnk1d* et *Tysnd1* ne sont pas détectés (**figure 45C**), pour 300 ovocytes l'expression de *Tysnd1* est détectable (**figure 45C**). Ces dernières données montrent que l'approche n'est pas très sensible pour les ARNm peu exprimés mais la détection de *Tysnd1* avec 300 ovocytes laisse entendre que l'amplification du signal avec plus de cycles de PCR faciliterait la visualisation du transcrit et de la longueur de la queue poly(A). Dans la condition 100 ovocytes WT et *Tbpl2*^{-/-} (KO) et me suis intéressé à nouveau à la détection de *Tysnd1* et d'un autre candidat *Uqcrc1*. Pourquoi ce transcrit en particulier ? En fait, *Uqcrc1* est le transcrit détecté avec la plus grande stabilisation (logFC :0.52) et dont l'expression est la plus élevée chez le mutant comparé au WT, voir **tableau 13**. Avec une étape d'amplification supplémentaire (PCR *nested* : 20 cycles en plus), dans la condition WT, *Tysnd1* et *Uqcrc1* ont été détectés (**figure 45D**). Néanmoins, en condition KO, *Uqcrc1* n'est pas détecté suggérant que l'approche ne fonctionne pas pour ce transcrit (**figure 45D**). En miroir, *Tysnd1* est détecté aussi chez le mutant mais la taille des queues poly(A) après réduction de la séquence en amont du PAS, ne dépasse pas les 50 nucléotides suggérant que *Tysnd1* à une queue poly(A) courte dans les deux conditions. En revanche, il est intéressant de noter que dans la condition WT on peut voir apparaître des bandes plus courtes pour *Tysnd1* qui n'apparaissent pas chez le KO et qui pourraient être des intermédiaires de dégradation du transcrit. Ensemble, ces données montrent la difficulté de mettre au point la technique ePAT pour des ARNs faiblement exprimés. L'approche est laborieuse en termes de collecte d'ovocytes nécessaires à l'analyse de trop peu de transcrits. La mise au point d'une autre approche plus sensible et nécessitant moins d'ovocytes par expérience a été nécessaire.

Tableau 13 : Expression RNAseq des ARNm testés en ePAT

L'expression à PN14 est normalisée par la médiane de la longueur en kb des différentes isoformes du transcrit (Yu et al.2020)

Transcrit (A0)	Expression WT	Expression <i>Tbpl2</i> ^{-/-}	KO/WT (FC)	Log2FC
<i>Zp3</i> (189)	200990,7939	71185,12823	0,354171	-0,45
<i>Zar1</i> (120)	49496,97772	18092,0009	0,365517	-0.44
<i>Csnk1d</i> (192)	10742,14147	23670,68327	2,203535	0.34
<i>Tysnd1</i> (170)	10414,57856	19028,41638	1,827094	0.26
<i>Uqcrc1</i> (173)	9636,149	31651,16	3,284627	0.52

I.b) HA-PAT, Hairpin Adaptor Poly(A) Tail assay

L'approche HA-PAT (X. Jiang et al. 2023) (**figure 46**) est similaire à l'ePAT en termes d'analyse sur gel mais est initialement basée sur l'utilisation d'un adaptateur « épingle » (*hairpin C3*) contenant un brin complémentaire de 10 T à la queue poly(A). Après hybridation avec les queues poly(A) d'ARNs de l'ovocyte, le *hairpin* confère de la stabilité en empêchant l'accès aux exonucléases 3'. De plus, l'approche HA-PAT, exploite la capacité naturelle de la rétrotranscriptase à ajouter une séquence CCC en fin de synthèse afin de ne pré-amplifier dans l'étape suivante que les produits rétrotranscrits par « *template switching* » en utilisant une amorce GGG. Suite à une pré-amplification (8 ou 16 cycles) et une PCR spécifique du transcrit ciblé, le dépôt sur gel d'agarose permet de visualiser les différentes tailles de longueur de la queue poly(A) d'un transcrit cible. L'expression RNAseq (Yu et al. 2020) et les A0 attendus des ARNs messagers testés en HA-PAT se trouve **tableau 14**.

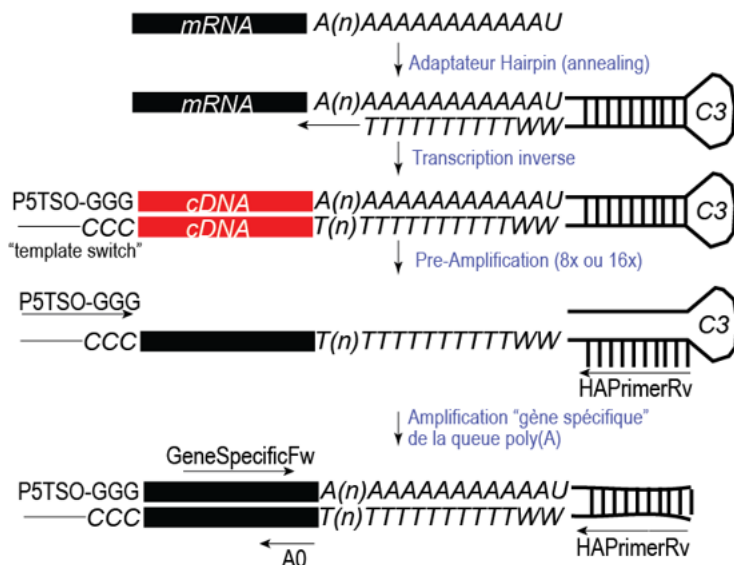


Figure 46 : Approche expérimentale HA-PAT

L'adaptateur *hairpin* reconnaît, par complémentarité de bases, les queues poly(A) sur lesquelles il s'hybride. Lors de la transcription inverse le brin complémentaire est synthétisé en ajoutant la séquence CCC à l'extrémité 3'. Cette séquence est utilisée pour préamplifier les ARNs poly(A) rétrotranscrits à l'aide du primer P5TSO-GGG (*template switching*) et HAPrimerRv. Il s'ensuit une amplification « transcrit spécifique ».

L'approche expérimentale est décrite comme fonctionnelle pour 10 ovocytes matures (X. Jiang et al. 2023). Par mesure de précaution, puisque les ovocytes en croissance sont plus petits, j'ai fait des collectes par groupes de 10 mais aussi de 30 ovocytes (**figure 47A**). Premièrement, l'approche HA-PAT a été réalisée avec du cDNA de 10 ovocytes avec une pré-amplification de 8 cycles. Les résultats (**figure 47B**) montrent que *Zar1*, *Uqcrc1*, *Map3k11* et *Tysnd1* sont détectés mais pas *Stat3* (**figure 47B**). J'ai alors refait l'expérience avec en parallèle le mutant *Tbpl2* avec 30 et 10 ovocytes initiaux (**figure 47C**). La détection de smears est équivalente pour les deux conditions et aucune différence de taille pour *Zar1*, *Uqcrc1*, *Map3k11* et *Tysnd1* n'est détectée (**figure 47C**). Ces derniers résultats montrent d'une part que l'approche HA-PAT est sensible et permet l'analyse de beaucoup plus de transcrits que l'ePAT en partant de très peu d'ovocytes initiaux. Si l'ARNm testé est stabilisé dans le mutant, on s'attendrait à voir une augmentation du signal dans le mutant comparé au WT. Cependant, la visualisation sur gel ne montre aucune différence évidente entre les smears WT et KO suggérant qu'il s'agit d'amplifications aspécifiques.

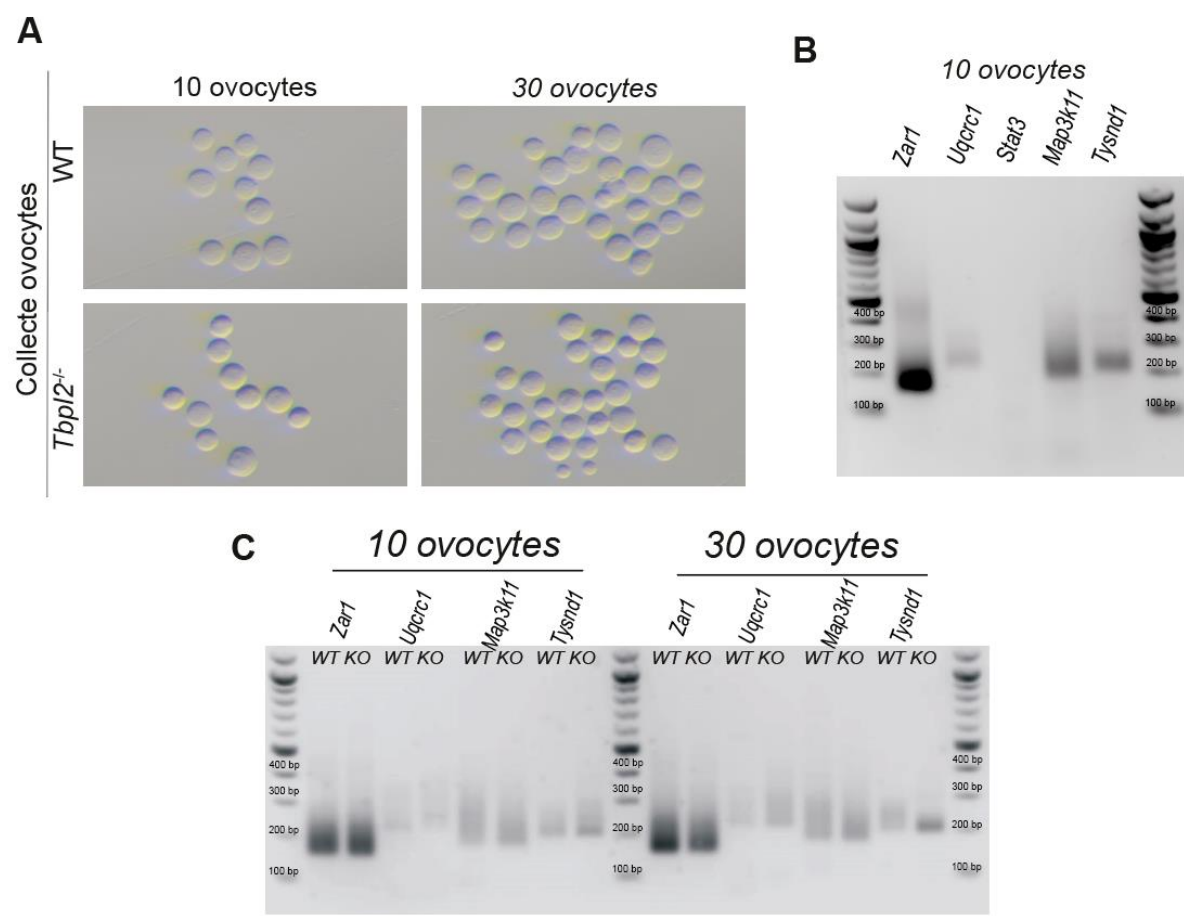


Figure 47: Développement de l’approche HA-PAT pour des ovocytes en croissance_ partie 1

Tableau 14 : Expression RNAseq des ARNm testés en HA-PAT

L'expression à PN14 est normalisée par la médiane de la longueur en kb des différentes isoformes du transcrit (Yu et al. 2020).

Transcrit (A0)	Expression WT	Expression <i>Tbpl2</i> ^{-/-}	KO/WT (FC)	Log2(FC)
<i>Zar1</i> (120)	49496,97772	18092,0009	0,365517	-0.44
<i>Btg4</i> (250)	53629,80869	10585,71231	0,197385	-0.7
<i>Csnk1d</i> (192)	10742,14147	23670,68327	2,203535	0.34
<i>Tysnd1</i> (170)	10414,57856	19028,41638	1,827094	0.26
<i>Uqcrc1</i> (173)	9636,149	31651,16	3,284627	0.52
<i>Strap</i> (170)	8859,984421	16942,52492	1,912252	0.28
<i>Esy3</i> (200)	8742,344375	18487,69035	2,114729	0.33
<i>Stat3</i> (160)	25183,79093	46206,74592	1,834781	0.26
<i>Map3k11</i> (169)	12092,21298	20587,05206	1,702505	0.23

En conséquence des observations précédentes, pour la suite des optimisations, j'ai repris le protocole classique dans lequel j'ai redilué les amorces spécifiques avec une concentration, cette fois ci, plus élevée (30 µM initiaux au lieu de 10 µM) dans l'hypothèse qu'une concentration plus élevée en amorces pourrait permettre de visualiser une détection certes avec plus de bruit de fond mais avec l'espoir de voir des changements de queue poly(A) entre WT et KO si l'hypothèse initiale était correcte. Ainsi j'ai refait une autre collecte de 10 ovocytes WT et 10 ovocytes KO. Les résultats montrent qu'à part des bandes aspécifiques de dimères de primers qui apparaissent, rien ne change (**figure 48B et C**), je n'ai pas vu de différences en longueurs de queue poly(A) entre WT et KO même en augmentant le temps d'exposition. (**figure 48B et C**). De plus, les smears pour *Stat3*, *Csk1d*, *Esy3* et *Strap* sont indétectables, ces transcrits ne seront plus cités par la suite. Donc *Uqcrc1*, *Map3k11* et *Tysnd1* sont les transcrits candidats les plus intéressants car une détection de changement de queue poly(A) pourrait être potentiellement détectée.

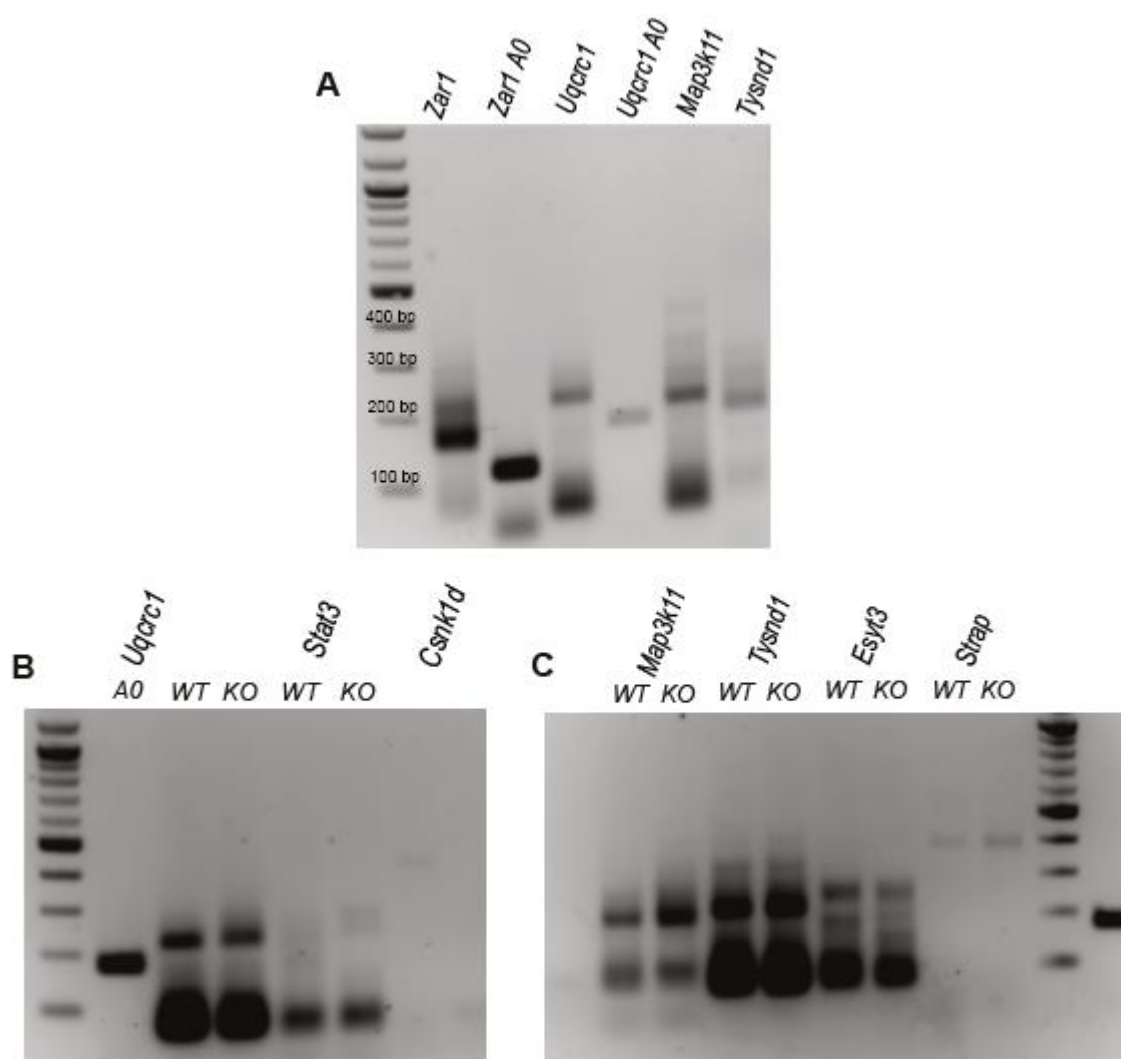


Figure 48 : Développement de l'approche HA-PAT pour des ovocytes en croissance_ partie 2

Ensuite, j'ai repris le protocole classique avec les primers à 10 μ M et j'ai fait varier le nombre de pré-amplifications (8x et 16x) avec l'hypothèse que plus de cycles de pré-amplification me permettraient de visualiser des résultats différents sur gel mais le risque est de favoriser les amplifications de fragments courts. Les résultats (**figure 49**) ne montrent pas de différences des queues poly(A) entre la condition pré-amplification 8x et 16x (**figure 49A**), mis à part pour *Zar1* qui est un transcrit fortement exprimé (voir **tableau 14**) et dont le *smear* est « renforcé » de façon cohérente par l'amplification 16x comparée au 8x (**figure 49A**). Ces derniers résultats montrent qu'un nombre de cycles de pré-amplification plus élevé n'influe

pas forcément sur la détection finale sur gel surtout pour les transcrits testés ce qui va encore dans le sens d'une détection aspécifique.

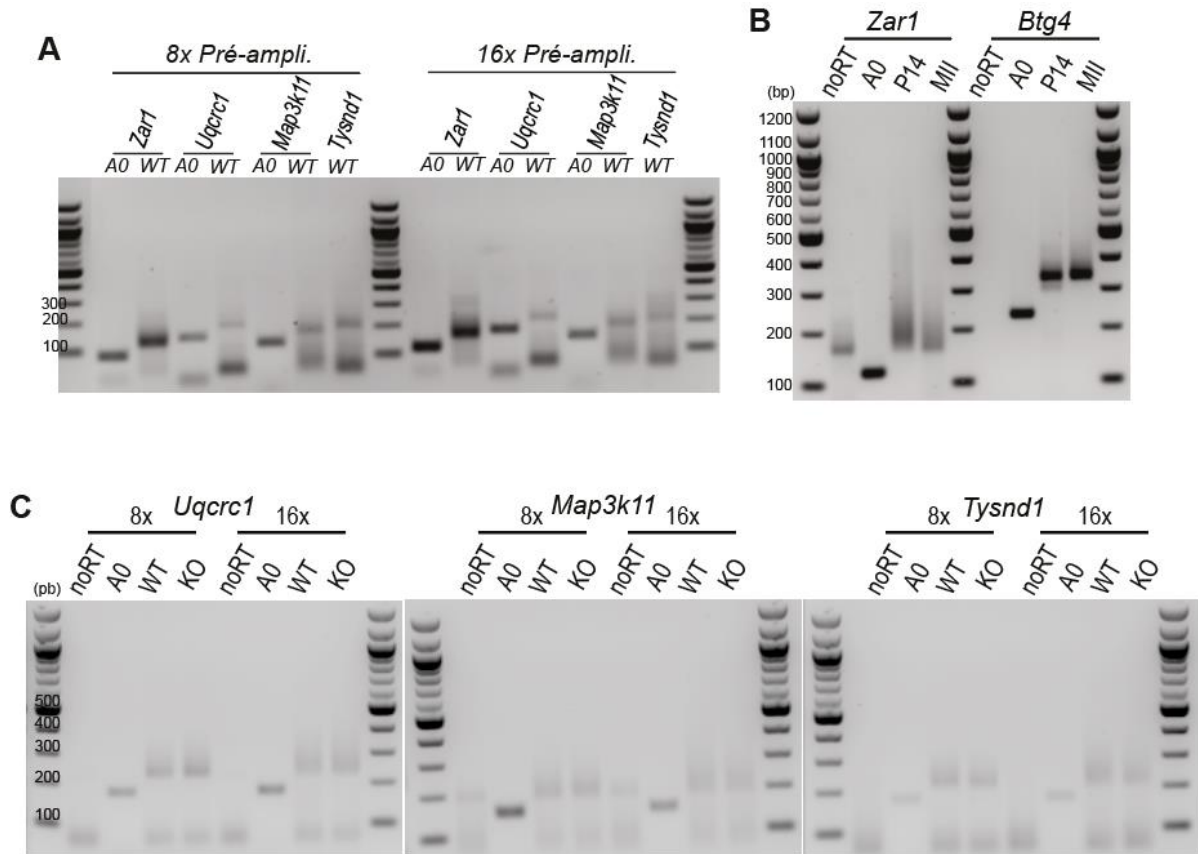


Figure 49 : Développement de l'approche HA-PAT pour des ovocytes en croissance_ partie 3

Enfin en dernier recours, j'ai voulu tester autrement la validation de l'approche en collectant en parallèle des ovocytes MII WT, des ovocytes croissance WT et *Tbpl2*^{-/-}. Des changements de queues *poly(A)* de *Zar1* et *Btg4*, dont leur poly-adénylation durant la maturation de l'ovocyte est démontrée dans la littérature par des approches équivalentes et du séquençage mesurant la queue des transcrits par *PAT assay* et *PAISOseq* (Y. Liu et al. 2023; Rong et al. 2019; Yu et al. 2016). Entre l'ovocyte en croissance et le MII, on s'attendrait à voir une augmentation en taille de la queue poly(A) de *Zar1* et *Btg4* dans l'ovocyte MII par rapport à PN14. Cependant, les résultats (**figure 49B**) ne vont pas dans ce sens. De plus, pour *Zar1* le contrôle *noRT* détecte une amplification non spécifique qui contamine le *smear* dans l'ovocyte en croissance P14 et le MII (**figure 49B**). Pour *Btg4*, même si le contrôle sans rétrotranscription (*noRT*) ne montre pas d'amplification et que des *smears* sont détectables, aucune différence

notable en termes de taille poly(A) n'est mise en évidence (**figure 49B**). En plus de ce dernier résultat, j'ai refait une dernière expérience en comparant WT et mutant *Tbpl2*^{-/-} à partir de 30 ovocytes initiaux et avec les contrôles *noRT* adéquats pour détecter les candidats régulés à la hausse chez le KO qui avaient été mis au point auparavant, à savoir *Uqcrc1*, *Map3k11* et *Tysnd1*. (**figure 49C**) Même si les contrôles *no RT* ne donnent pas d'amplification (*Uqcrc1* et *Tysnd1*) et que les versions courtes (A0) correspondent à chaque fois à la bande attendue *Uqcrc1*, *Map3k11* et *Tysnd1* (voir **tableau 14**), aucune différence en termes de longueur poly(A) n'est détectable entre WT et mutant *Tbpl2*^{-/-}, les signaux faibles détectés correspondraient à des queues poly(A) toutes courtes (**figure 49C**). Ainsi, ces résultats ne permettent pas de conclure quant au changement de longueur des queues poly(A) et ne permettent pas d'expliquer la stabilisation des transcrits dans le mutant puisque je n'ai pas pu démontrer un changement de queue poly(A) publié pour valider l'approche et que les détections sont faibles.

II. Analyse de la localisation subcellulaire d'ARNm spécifiques

Le but de l'approche est de rechercher des éléments autres que la longueur des queues poly(A) qui puissent expliquer la stabilisation des ARNs messager chez le mutant *Tbpl2*^{-/-}. L'hypothèse initiale est que la stabilisation des ARNs régulés à la hausse chez le mutant peut s'expliquer par une localisation subcellulaire particulière dans l'ovocyte. La localisation subcellulaire précise des ARNs messagers est étudiée en approche spécifique d'un transcrit cible. Andréa Bernardini, le chercheur post-doctorant de notre équipe m'a aidé dans la mise en place de l'approche. L'approche développée a été l'hybridation *in situ* (*smiFISH*, *single molecule inexpensive Fluorescent In Situ Hybridization*) (Tsanov et al. 2016) que j'ai adaptée pour des cellules isolées et non adhérentes (ovocytes en croissance aux stades PN7 et PN14). Un total de 26 sondes sont générées pour cibler un même ARNm (Tsanov et al. 2016). Les sondes ADN sont hybridées avec des sondes secondaires qui sont couplées à un fluorophore (cy3 ou Atto488). De cette façon, une amplification de fluorescence en points (nommés *spots* ou *foci*) est théoriquement visible dans les cellules et révèle l'ARN d'intérêt et sa distribution subcellulaire. Tout d'abord, puisqu'aucun changement n'a été détecté en HA-PAT, il a été question de valider l'expression à la hausse des transcrits candidats (*Uqcrc1*, *Tysnd1* et *Map3k11*) par RTqPCR avec en parallèle un contrôle dont l'expression est régulée à la baisse

chez le mutant (*Padi6*) (voir **tableau 15**). Les résultats (**figure 50A**) valident l'approche puisque *Padi6* est régulé à la baisse tandis que les trois autres sont régulés à la hausse en phase avec les détections en séquençage d'ARNs totaux (Yu et al. 2020).

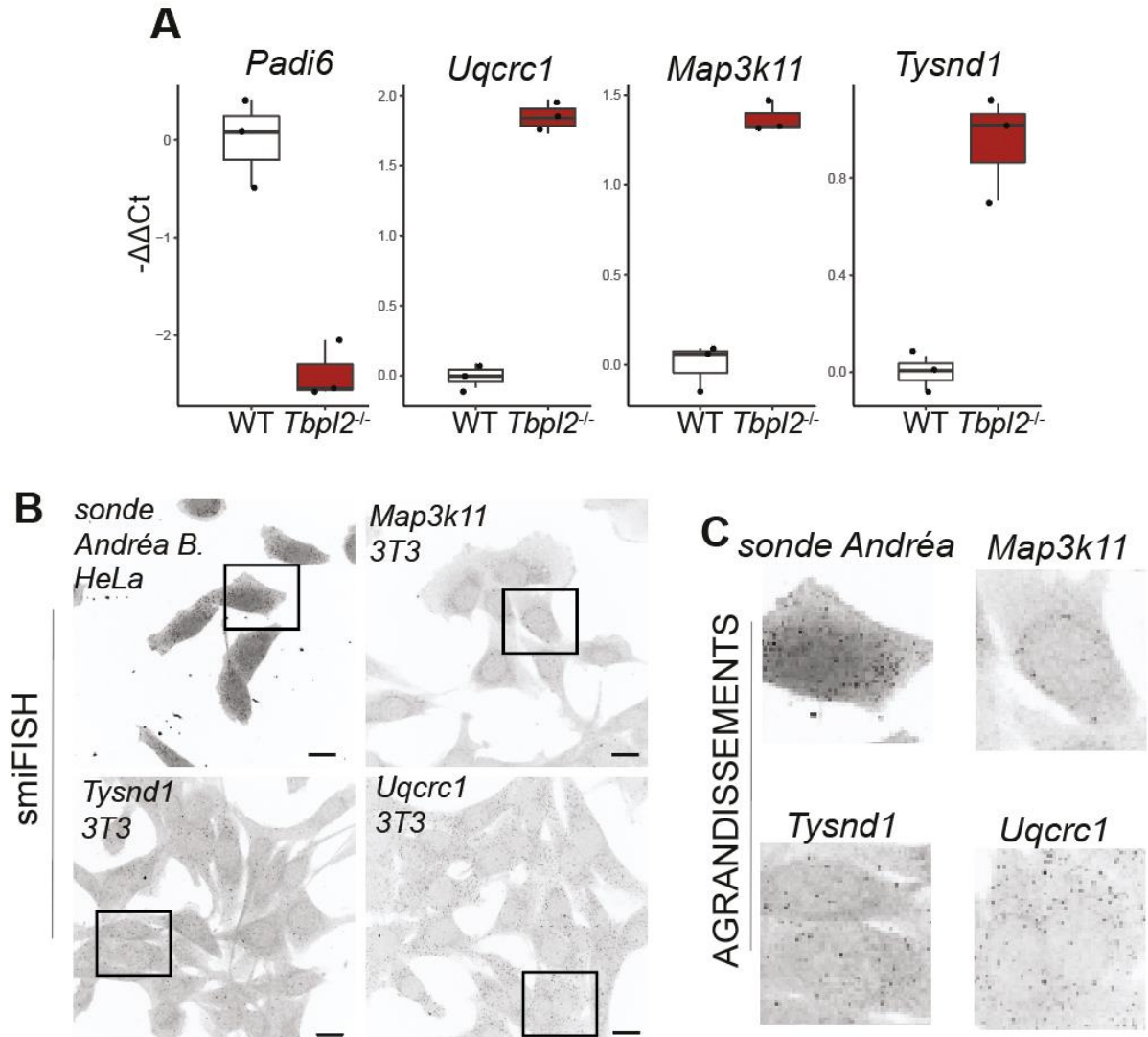


Figure 50 : Validation de l'approche *smiFISH*

(A) Résultats RTqPCR. (B,C) Résultats *smiFISH* sur lignées cellulaires HeLa et 3T3.

Barres d'échelle 10 μ m

La deuxième étape a consisté en la validation des amorces pour hybridation in situ dans un autre type cellulaire et en intégrant un contrôle positif de détection déjà publié (Bernardini et al. 2023), qu'Andréa Bernardini m'a donné. Les résultats (**figure 50B,C**) montrent la détection subcellulaire en foci du contrôle positif ce qui valide l'approche. En

parallèle la détection de foci pour *Uqcrc1* et *Tysnd1* a validé les sondes pour ces deux transcrits mais pas pour *Map3k11*.

Tableau 15 : Expression RNAseq des ARNm testés en smiFISH

L'expression à PN14 est normalisée par la médiane de la longueur en kb des différentes isoformes du transcrit (Yu et al. 2020).

Transcrit	Expression WT	Expression <i>Tbpl2</i> ^{-/-}	KO/WT (FC)	Log2(FC)
<i>Zp3</i>	200990,7939	71185,12823	0,354171	-0.45
<i>Tysnd1</i>	10414,57856	19028,41638	1,827094	0.26
<i>Uqcrc1</i>	9636,149	31651,16	3,284627	0.52
<i>Map3k11</i>	12092,21298	20587,05206	1,702505	0.23

Ensuite, il a été question d'étudier un transcrit fortement exprimé dans l'ovocyte et afin de valider l'approche et la spécificité du signal ovocytaire : *Zp3* était le candidat idéal (**tableau 15**). Les premiers résultats (**figure 51A**) montrent une expression de *Zp3* dans l'ovocyte en foci majoritairement cytoplasmiques (**figure 51A**). Durant la croissance de l'ovocyte (**figure 51A,B**), ce que l'on peut observer c'est que les foci cytoplasmiques sont au début enrichis à proximité du noyau. Puis dans les ovocytes moyens et de grand en taille (**figure 51A,B**), les foci sont retrouvés un peu partout dans le cytoplasme et l'expression au pourtour du noyau est moins prononcée dans le grand ovocyte comparé au moyen et au petit. En revanche, chez le mutant *Tbpl2*^{-/-} (**figure 51B**), les foci *Zp3* sont difficilement visibles (et qui corrèle avec la diminution d'expression de *Zp3* (**tableau 15**), ce que l'on voit c'est plutôt un « nuage » d'expression proche du noyau (tête de flèche **figure 51B**, mutant *Tbpl2*^{-/-}) comparé aux foci cytoplasmiques du WT (flèche **figure 51B**) à un même stade de croissance. Ces derniers résultats (**figure 51A, B**) valident l'approche puisque les foci *Zp3* suivent une dynamique subcellulaire au cours de la croissance de l'ovocyte chez le WT et puisque la déplétion des foci *Zp3* chez le mutant coïncide avec la diminution des transcrits en RNAseq (log2FC=-0.45).

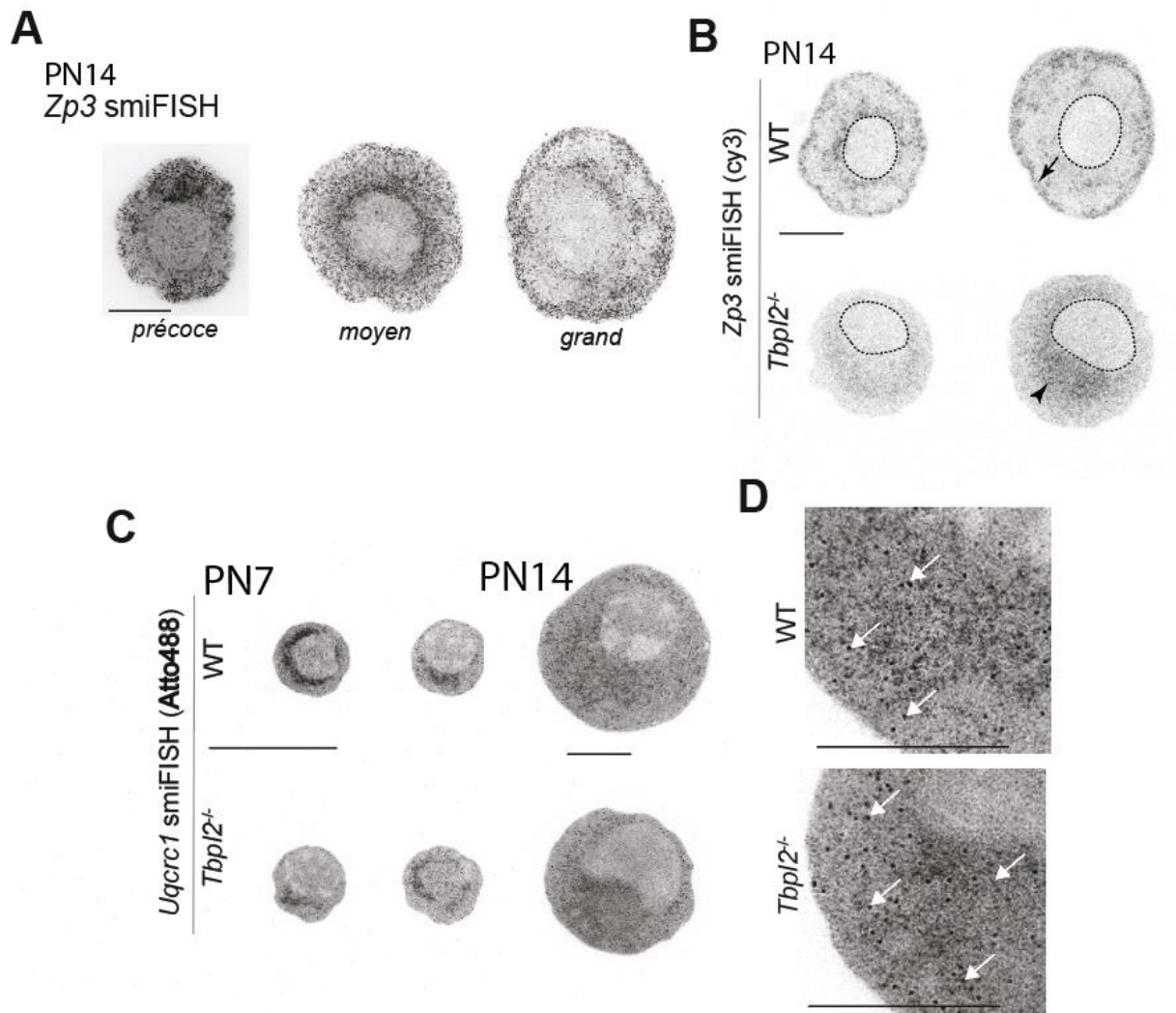


Figure 51 : Développement de l'approche *smiFISH* sur ovocytes en croissance

$n \geq 4$ ovocytes analysés pour chaque condition. Flèches : foci cytoplasmiques à PN14. Barres d'échelle 25 μm .

Ensuite, il a été question de déterminer si les ARNs régulés à la hausse chez le mutant étaient détectables car ils sont moins abondants que *Zp3* (voir **tableau 15**). Ainsi, j'ai répété l'approche avec le transcrit *Uqcrc1* dont la détection de son expression est la plus élevée chez le mutant comparé au WT (**tableau 15**). Des foci cytoplasmiques ont été détectés à PN7 et PN14 (**figure 51C, D**). A PN7, les foci sont regroupés dans le cytoplasme à proximité du noyau (**figure 51C**) et aucune différence majeure avec les mutants n'est observable. En parallèle,

dans les ovocytes plus grands à PN14 (**figure 51C, D**), les nombreux foci *Uqcrc1* sont distribués dans le cytoplasme (flèches, **figure 51D**) et aucune différence notable n'est détectée dans les deux conditions (WT et mutant *Tbpl2*^{-/-}). Ces derniers résultats suggèrent que la régulation à la hausse d'*Uqcrc1* n'est pas associée avec un compartiment particulier ou du moins que l'approche ne permet pas de détecter une différence nette entre l'expression d'*Uqcrc1* chez WT comparé au mutant *Tbpl2*^{-/-}.

Ensuite, j'ai continué avec *Tysnd1* en validant les sondes. Les résultats (**figure 52**) montrent que par rapport à une cellule somatique (**figure 50C**), il y a beaucoup plus (~25X plus) de foci mais ces résultats tout comme pour *Uqcrc1* ne permettent pas de conclure sur une localisation spécifique des ARNs stabilisés en absence de *Tbpl2*. Peut-être qu'en regroupant les sondes pour plusieurs transcrits régulés à la hausse chez le mutant *Tbpl2*^{-/-} on pourrait voir apparaître des zones d'accumulations dans le noyau comme c'était le cas pour l'expérience de FISH poly(A).

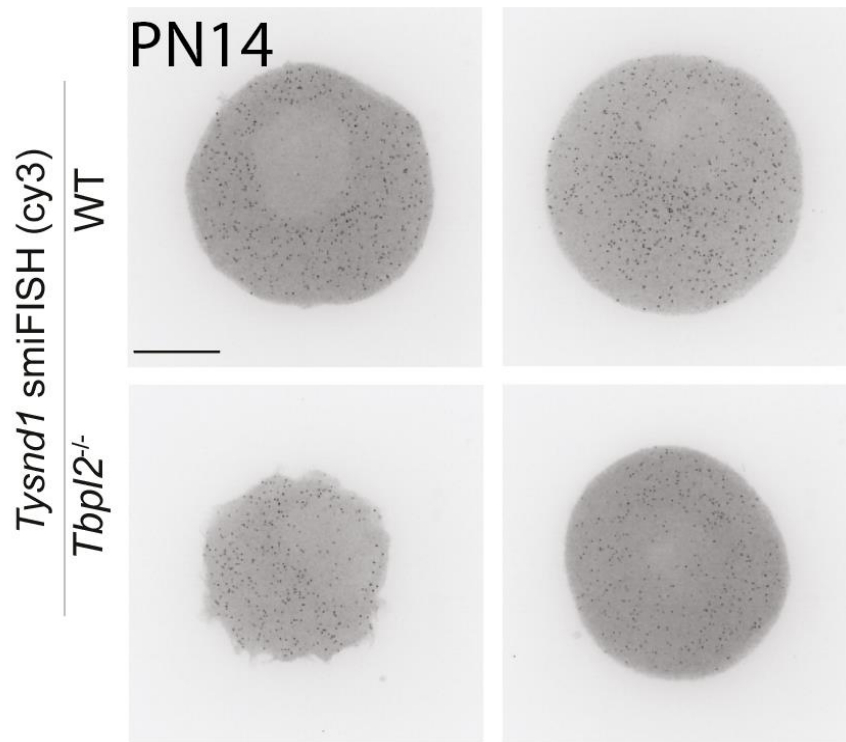


Figure 52 : smiFISH ciblant *Tysnd1*

$n \geq 5$ ovocytes analysés pour chaque condition. Barre d'échelle 25 μm .

III. Analyses préliminaires de l'activation en croissance, caractérisation du phénotype nucléaire et analyse de la transcription naissante

L'observation initiale est que les ovocytes *Tbpl2*^{-/-} grandissent quand même en taille suggérant qu'ils sont tout de même activés. Cette analyse a pour but de comprendre et de corroborer l'étude sur le devenir des ovocytes sans TBPL2. Ces données (figure 53) sont issues d'ovaires de 6 semaines d'âge, dans la période de reproduction, afin de comprendre si le nombre résiduel d'ovocytes dans le mutant s'active normalement pour la croissance. Comme énoncé dans le chapitre1, le facteur de transcription FOXO3a est impliqué dans l'activation de la croissance de l'ovocyte. En particulier, son exclusion nucléaire est le signe que l'ovocyte est engagé dans le processus de croissance. L'immunohistofluorescence de FOXO3a sur coupes histologiques montre un signal cytoplasmique dans le WT et le *Tbpl2*^{-/-} (figure 53) suggérant la viabilité et l'engagement normal en croissance des ovocytes *Tbpl2*^{-/-}.

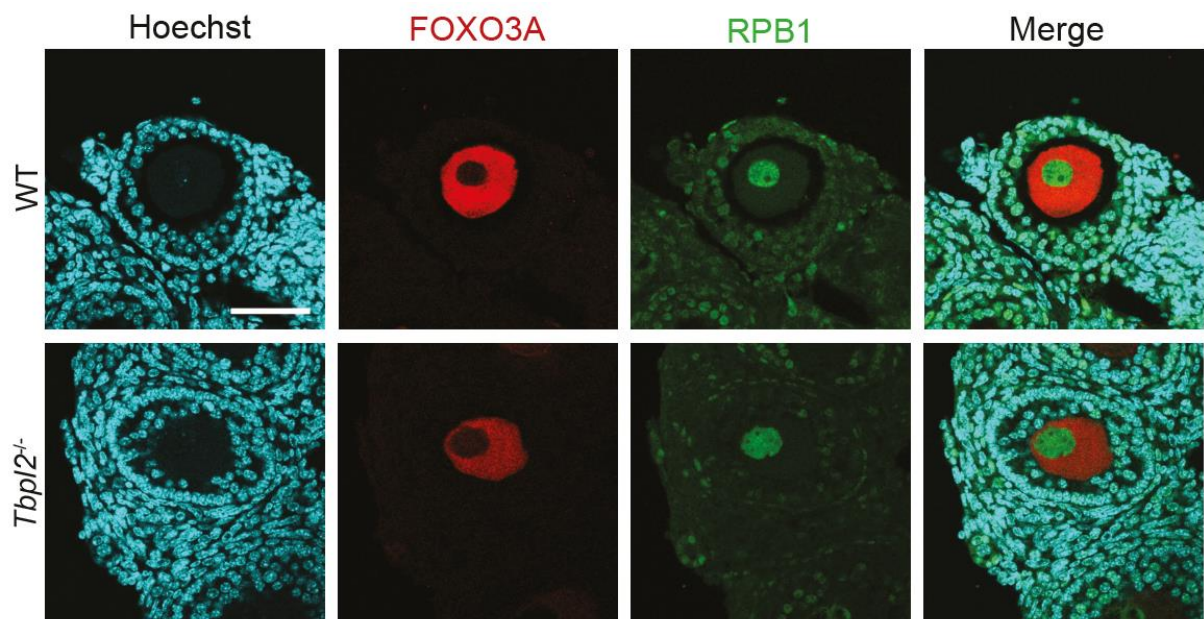


Figure 53: Etude de l'activation de croissance des ovocytes par immunohistologie ciblant FOXO3A durant la période de reproduction

Immunofluorescence sur tissu d'ovaire à 6 semaines ciblant FOXO3A et RPB1. Barre d'échelle : 50 μ m.

En parallèle, le marquage RPB1 à PN14 permet de visualiser que le noyau des ovocytes WT diminue en taille lorsque l'ovocyte croît alors que celui du mutant présente le phénotype nucléaire qui se caractérise par un noyau de plus en plus grand et par l'apparition de zones d'exclusion de RPB1 ou du moins par l'élargissement de foci nucléaires dans lesquels RPB1 est moins exprimé (**figure 54A**). De plus, chez le WT, RPB1 tend à être moins exprimé suivant la croissance de l'ovocyte, ce qui n'est pas le cas chez le mutant où le signal RPB1 persiste (**figure 54A**). En effet, l'expression de RPB1 tend à être plus élevée chez mutant que chez le WT (**figure 54B**).

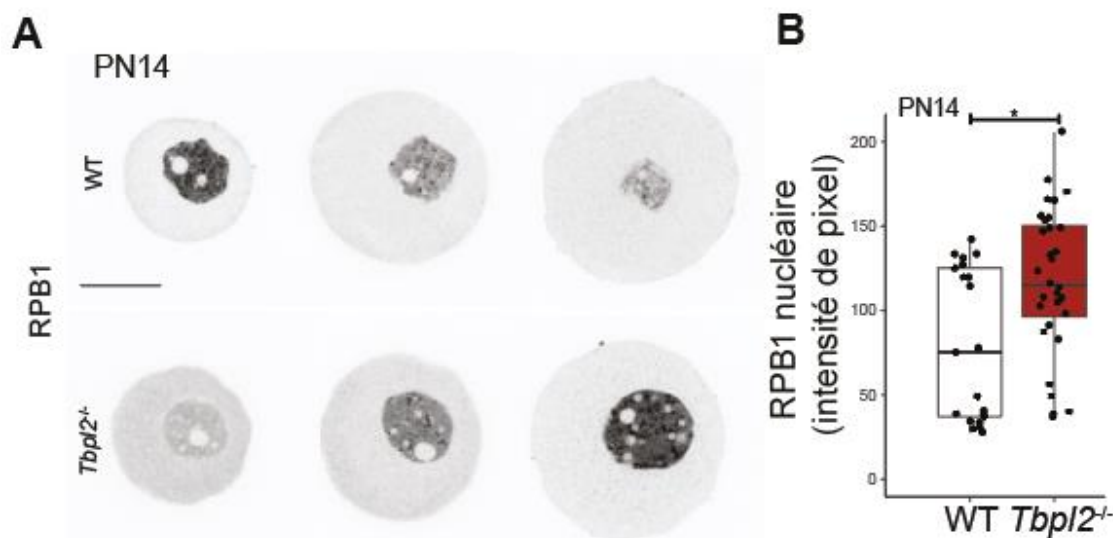


Figure 54: Immunolocalisation de RPB1 durant la croissance de l'ovocyte

(A) Immunofluorescence à PN14 chez le WT et le mutant *Tbpl2* ciblant la plus grande sous-unité de l'ARN Pol II. (B) Quantification du signal nucléaire d'immunofluorescence RPB1.

* : p-value < 0.05, Wilcoxon. Barres d'échelle : 25 μ m

D'autre part, de façon préliminaire et seulement dans les ovocytes PN7, j'ai recherché à savoir en immunofluorescence, si les foci nucléaires élargis chez le mutant pouvaient être impliqués dans l'épissage alternatif puisque les facteurs de *splicing* peuvent co-localiser avec les NPADs (Dai et al. 2022). Ainsi, j'ai pu étudier l'apparition des foci nucléaires dans un autre contexte avec un anticorps différent. Celui-ci est particulier car il reconnaît plusieurs facteurs d'épissage alternatif (au moins SC-35 et SRRM1/2) (Fu and Maniatis 1990; Ilk et al. 2020). Les

résultats (**figure 55A**) montrent que dans les ovocytes plus petits, il n'y a pas encore beaucoup de foci nucléaires positifs pour les facteurs d'épissage. Cependant, dans les ovocytes plus grands, on voit que les foci nucléaires apparaissent dans le WT et surtout dans le mutant et qu'ils sont enrichis en facteurs d'épissage. Je rappelle ici que ces foci sont visibles dans le noyau des ovocytes *Tbpl2*^{-/-} en croissance lorsque le cytoplasme présente des défauts d'organisation (**figure 55B**).

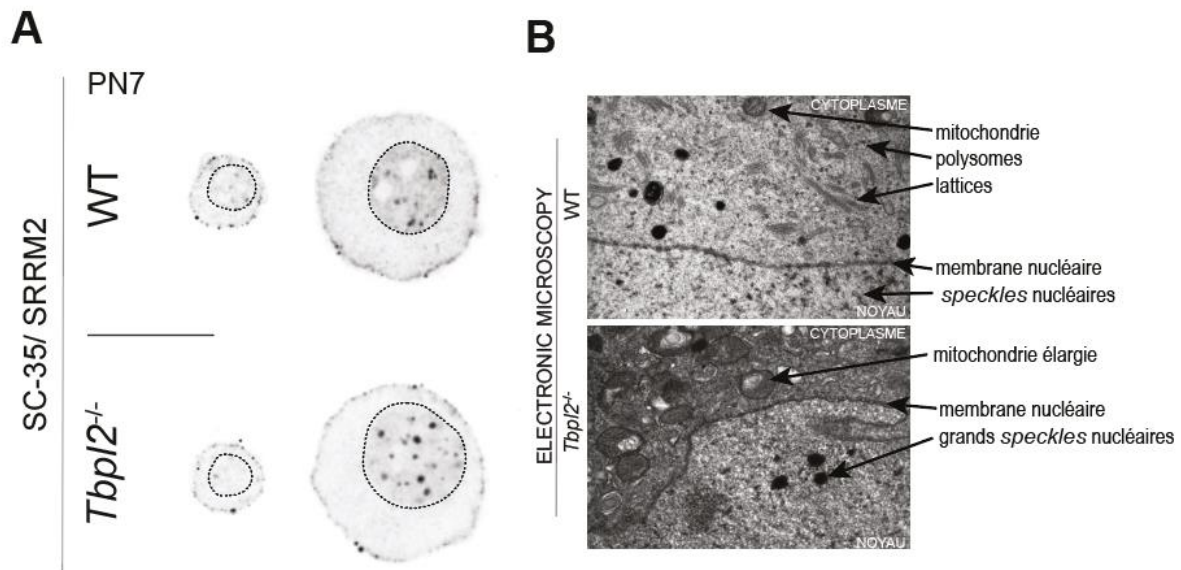


Figure 55 : Analyse complémentaire de l'apparition et l'élargissement des foci nucléaires chez le mutant (A) Immunofluorescence à PN7 chez le WT et le mutant *Tbpl2* ciblant les facteurs d'épissage alternatif SC-35/ SRRM2. $n \geq 8$ ovocytes analysés pour chaque condition. Barre d'échelle : 25 μm (B) Etude ultrastructurale par microscopie électronique comparant le WT et le mutant *Tbpl2*.

D'autre part, afin de vérifier la dynamique de transcription naissante, il a été nécessaire de démontrer la possibilité d'incorporer un analogue d'uridine dans le noyau des ovocytes en croissance. L'utilisation d'un l'inhibiteur de la transcription, le triptolide a été nécessaire afin de démontrer l'incorporation spécifique d'un analogue de nucléotide en transcription. L'incorporation d'Ethynyl Uridine (EU), a été testée suivie par une réaction de *Click-iT* couplé à un fluorophore. L'EU peut s'incorporer dans le noyau des cellules de mammifères et notamment le composé est capable de traverser la zone pellucide des embryons de poisson zèbre (Kuriya et al. 2016). Le triptolide est un composé diterpénoïde connu pour inhiber la

transcription (Wang et al. 2011). Les résultats dans les ovocytes en croissance (**figure 56**) montrent une incorporation dans le noyau. De plus, le traitement des ovocytes au triptolide bloque l'apparition du signal nucléaire suggérant que l'EU s'incorpore spécifiquement en transcription active (pas forcément dépendante de l'ARN Pol II).

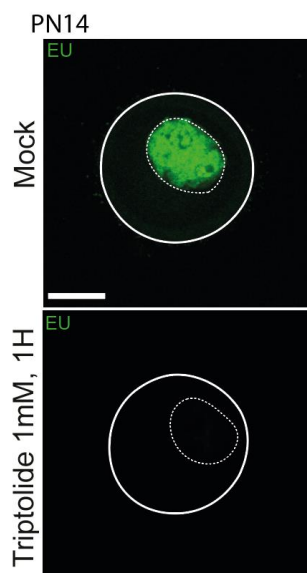


Figure 56: Validation du test d'incorporation d'Ethynyl Uridine (EU)

En absence (mock) et en présence de l'inhibiteur de la transcription (Triptolide) suivi d'une réaction de Click-It couplée à un fluorophore. $n \geq 8$ ovocytes analysés pour chaque condition. Barre d'échelle : 25 μm .

En revanche, (**figure 57A**) l'incorporation d'EU continue à se faire dans le noyau des ovocytes mutants *Tbpl2*^{-/-} suggérant que l'ovocyte en croissance peut continuer à transcrire en absence de TBPL2. De plus, l'immunofluorescence ciblant la marque d'initiation de la transcription (pSer5: phosphosérine 5) associée au CTD de l'ARN Pol II montre un signal nucléaire (**figure 57B**) et même dans l'ovocyte en croissance mutant *Tbpl2*. Cependant le signal tend à être

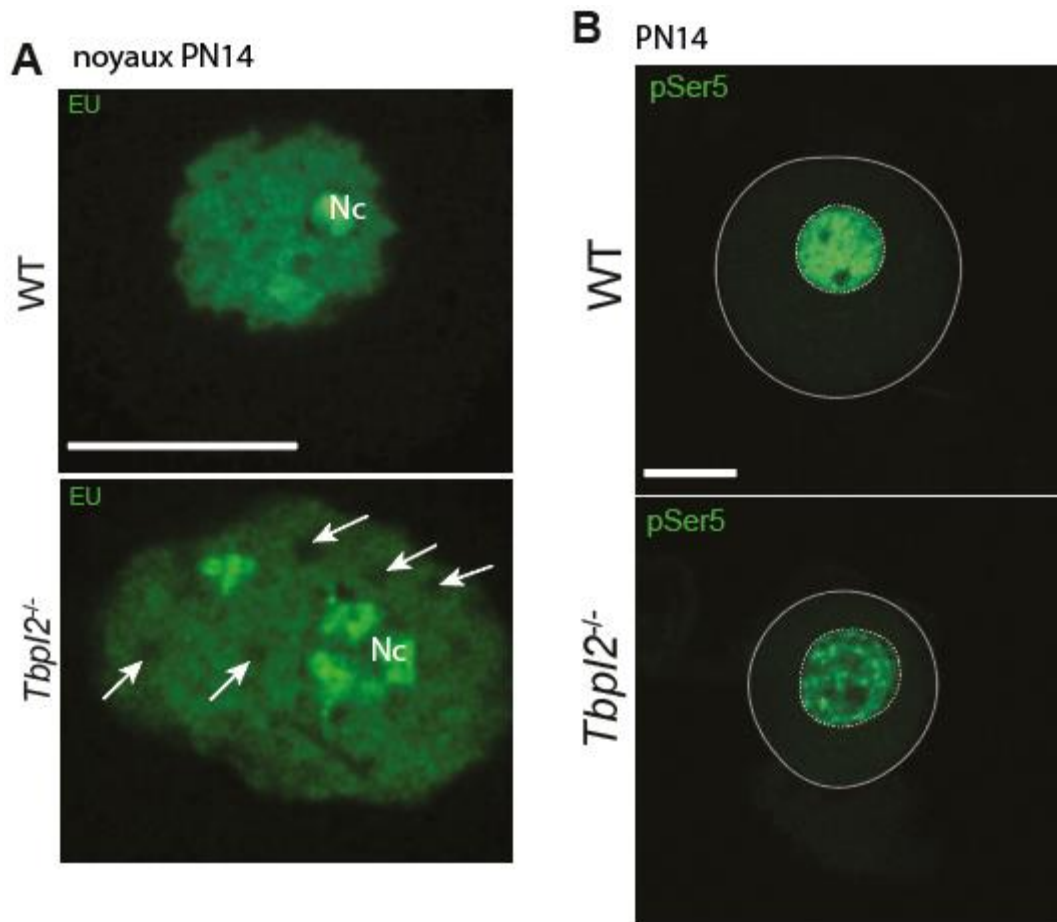


Figure 57: Etude de la transcription naissante des ovocytes en croissance déplétés pour TBPL2

(A) Test d'incorporation d'EU dans les ovocytes en croissance PN14 WT et mutants *Tbpl2*. Nc : nucléole. Flèches blanches : foci nucléaires élargis dépourvus d'incorporation d'EU. Barre d'échelle : 25 μ m. (B) Immunofluorescence à PN14 chez le WT et le mutant *Tbpl2* ciblant la phosphorylation en position 5 (pSer5) du CTD de RPB1, la plus grande sous-unité de l'ARN Pol II. $n \geq 8$ ovocytes analysés pour chaque condition. Barre d'échelle 25 μ m.

diminué mais il reste tout de même un signal non négligeable de pSer5 dans 86% des cas (21 ovocytes analysés). Dans les 14% restants le signal est complètement déplété. Les résultats EU et pSer5 ont été confirmés par Dylane Détilleux, la chercheuse post-doctorale de l'équipe, et ils nous surprennent compte tenu du rôle de TBPL2 dans l'initiation de la transcription par

l'ARN Pol II, surtout que dans (Gazdag et al. 2009) la pSer2 qui marque d'élongation de la transcription est complètement déplétée dans les noyaux des ovocytes mutants *Tbp12^{-/-}*. Peut-être que la déplétion pSer5 est progressive et qu'à des stades plus avancés on ne verrait plus aucun signal mais cela n'a pas encore été testé. Je discuterai dans la partie discussion d'autres hypothèses à cet égard.

IV. Est-ce que les TAFs ont un rôle lors de la croissance de l'ovocyte ?

IV.a) Etudes des profils d'expression des TAFs

Le profil d'expression des TAFs n'est pas connu durant la croissance de l'ovocyte. TBP n'est pas détecté pendant la croissance de l'ovocyte (Gazdag et al. 2007) et TBPL2 ne s'assemble pas dans un complexe similaire à TFIID dans l'ovocyte en croissance (Yu et al. 2020). Ainsi, l'hypothèse initiale était que les protéines TAFs n'étaient pas traduites, cependant les transcrits *Tafs* sont exprimés dans les ovocytes en croissance (à l'exception de *Taf7l* qui n'est pas présent) (Yu et al. 2020) ce qui suggère leur expression potentielle. Ainsi, avec Céline ZIEGLER-BIRLING, l'ingénieure de recherche de notre laboratoire, nous avons réalisé un screening des différentes protéines TAFs dans l'ovocyte en croissance. Les résultats montrent une expression nucléaire de TAF1, TAF7, TAF6, TAF8 (**figure 58**), mais aussi des sous-unités de SAGA comme TAF9 (sous-unité partagée avec TFIID) (**figure 58**), ATXN7L3 (SAGA), USP22 (SAGA) et KAT2A/GCN5 (sous-unité partagée avec ATAC) (**figure 65**, annexe). Ces données préliminaires suggèrent que le contrôle de la transcription est plus élaboré durant la croissance de l'ovocyte et mérite plus d'attention et des validations supplémentaires avec les mutants correspondants.

Même si la spécificité des anticorps peut être discutée, la détection de TAF7 s'est faite avec un anticorps validé avec une lignée cellulaire et des embryons dans lesquels TAF7 est conditionnellement déplété (Hisler et al. 2024; Yu et al. 2020). La détection s'est faite avec exactement la même fraction purifiée de cet anticorps. De plus, la détection de TAF1 s'est faite avec le même tube d'anticorps validé par si-RNA qui est aussi publié (Bernardini et al. 2023). Ensemble, ces données suggèrent que les TAFs pourraient être impliquées dans la croissance de l'ovocyte.

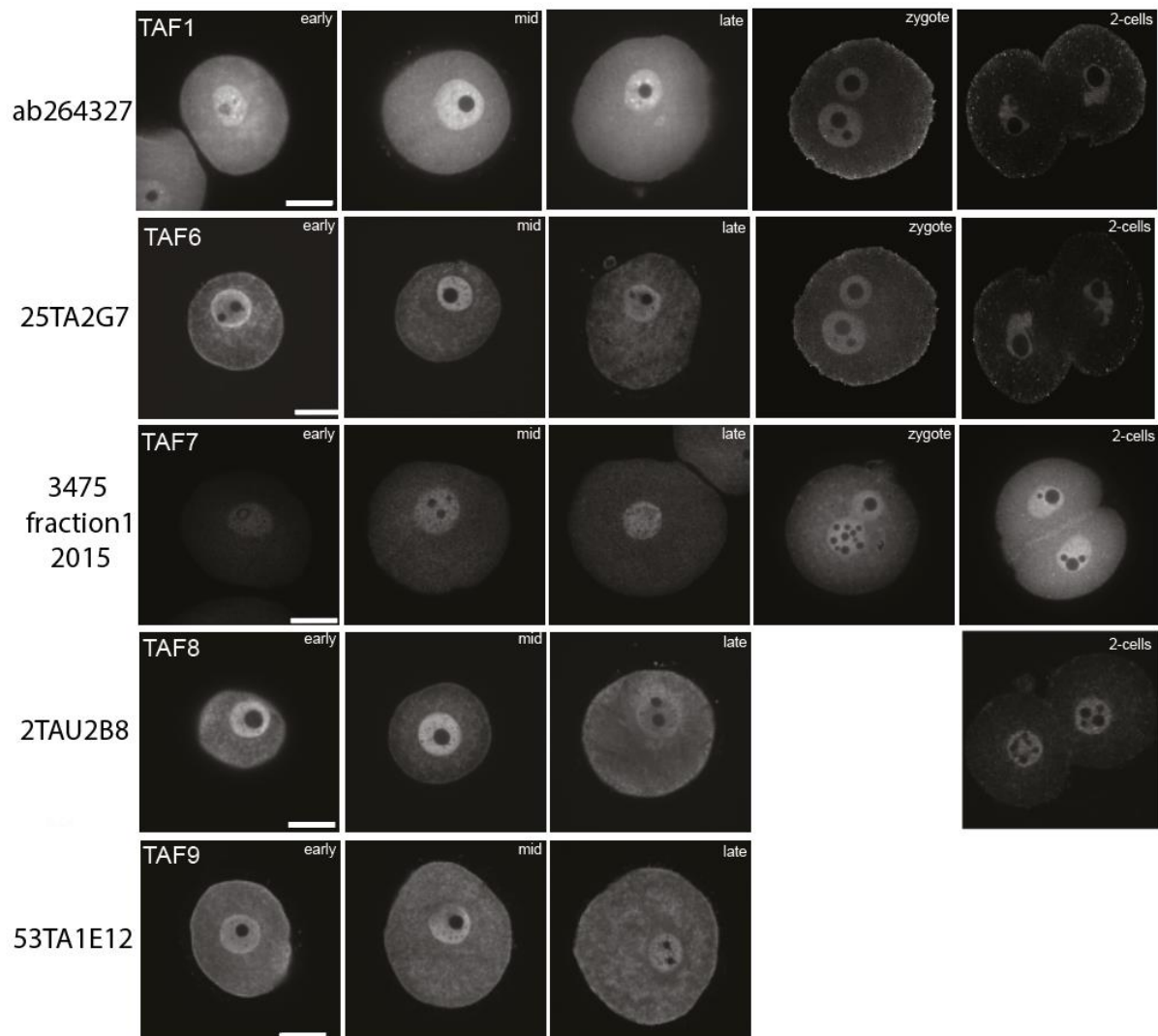


Figure 58 : Screening de l'expression des TAFs : de la croissance de l'ovocyte à l'embryon de deux cellules
Immunofluorescence ciblant différentes protéines TAFs. La référence de chaque anticorps testé est indiquée sur la gauche. Barre d'échelle : 25µm

IV.b) Délétions conditionnelles pendant la croissance de l'ovocyte

L'étude des délétions conditionnelles dans l'ovocyte en croissance soulève aussi des questionnements similaires (**figure 59**). Tandis que les délétions conditionnelles dans l'ovocyte en croissance de *Tbp* et *Taf7* n'altèrent pas la folliculogenèse (**figure 59A, B et C**), la délétion de *Taf10* et *Taf2*, mènent à une réduction de taille de l'ovaire, au blocage du follicule au stade primaire et à l'arrêt de croissance de l'ovocyte (**figure 59D et E**). Ces données suggèrent que certains TAFs sont importants pour la croissance de l'ovocyte. Même si TAF2 est spécifique à TFIID, TAF10 est aussi retrouvé dans SAGA. Ainsi, comme TBP n'est plus

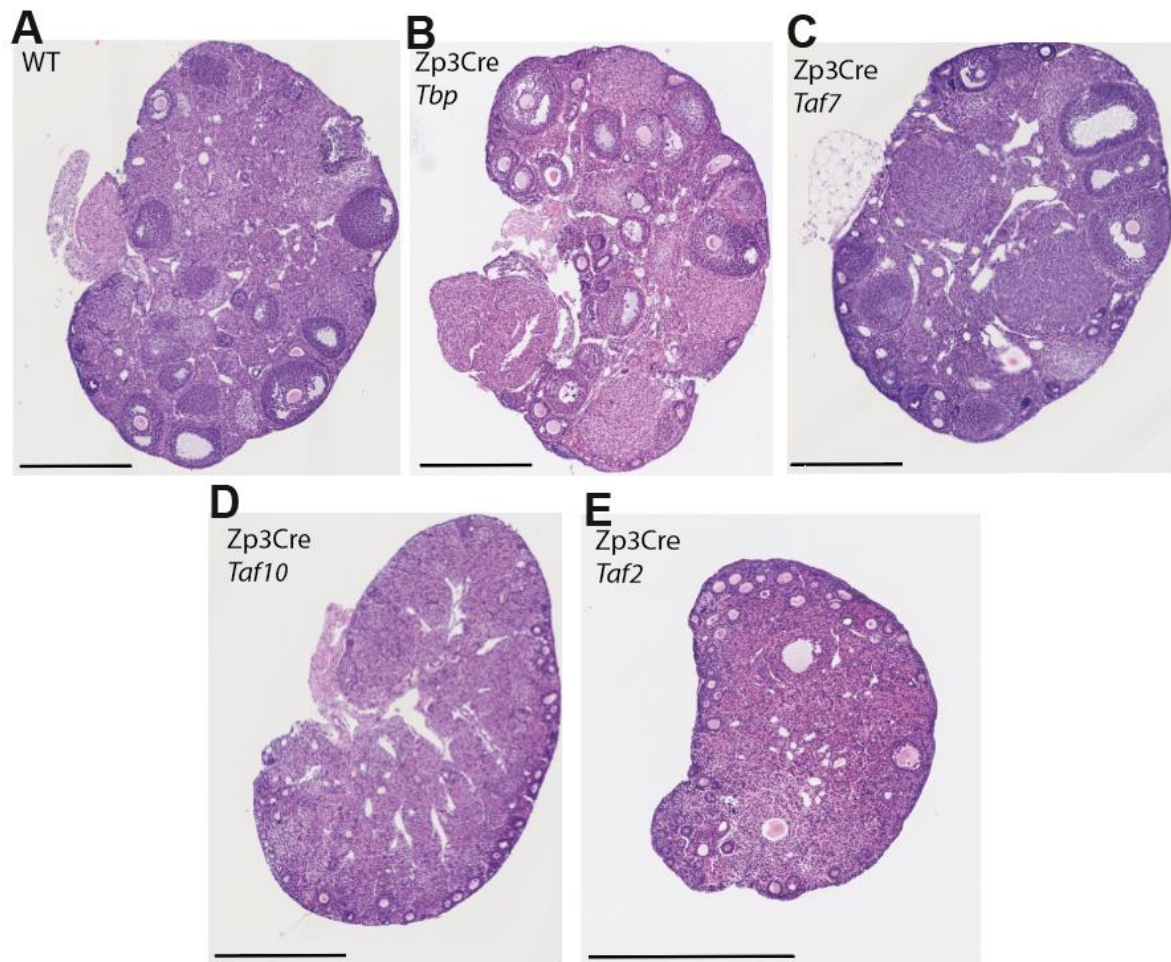


Figure 59 : Analyse préliminaire des délétions conditionnelles des *Tafs* pendant la croissance de l'ovocyte. Coupes d'ovaire pendant la période de reproduction colorées à l'hématoxyline-éosine. Barres d'échelle : 500 µm.

détecté, des complexes de TAFs, indépendamment de TBPL2, ou SAGA, pourraient avoir un

rôle durant la croissance de l'ovocyte. Notamment TAF2 pourrait avoir un rôle plus large dans l'initiation de la transcription et l'interface avec l'épissage alternatif par recrutement de SRRM2 à des sous-unités de TFIID (Bhuiyan et al. 2024).

V. Autres mises et points et résultats

V.a) Etude préliminaire du protéome

Le transcriptome de l'ovocyte est dérégulé en absence de *Tbpl2* (Yu et al. 2020). L'étude du protéome du mutant par rapport au WT permettrait de mettre en évidence les protéines impliqués dans la stabilisation des ARNm durant la croissance de l'ovocyte. En premier lieu, afin d'analyser l'état de traduction naissante des ovocytes mutants par rapport aux ovocytes WT, j'ai testé l'incorporation d'un analogue de méthionine, la L-homopropargylglycine (L-HPG). L'approche n'a pas permis de mettre en évidence des changements d'incorporation entre WT et mutant *Tbpl2*^{-/-} (**figure 60**). L'incorporation de HPG se fait partout dans le cytoplasme et proche du noyau.

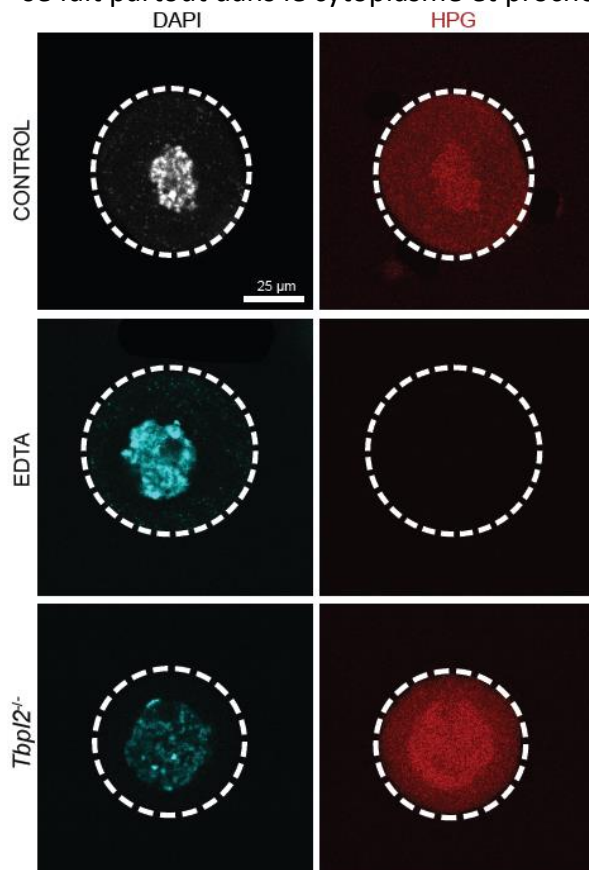


Figure 60 : Etude préliminaire de la traduction naissante de l'ovocyte en croissance PN14

(A) Test d'incorporation métabolique de L-homopropargylglycine (L-HPG) dans les ovocytes PN14 WT et mutant *Tbpl2*. $n \geq 6$ ovocytes analysés pour chaque condition. Barre d'échelle : 25 μ m.

Ensuite, en collaboration avec Pascal VERMEULEN et Michiel VERMEULEN de l'université Radboud, Nijmegen aux Pays-Bas, nous avons analysé des ovocytes WT et mutants *Tbpl2*^{-/-} par analyse en protéomique. L'approche de spectrométrie de masse sur 600 ovocytes WT et 600 ovocytes *Tbpl2*^{-/-} n'a pas révélé de grandes différences puisque les solutions, dans lesquelles les échantillons étaient récupérés et traités, étaient saturées en BSA ce qui brouille la détection de protéines faiblement exprimées. Bien que près de 1400 protéines aient été détectés, seulement 45 sont significativement différentes entre le WT et le mutant *Tbpl2*^{-/-} (figure 61). Aucune de ces protéines n'a de rôle caractérisé pour la stabilité du transcriptome

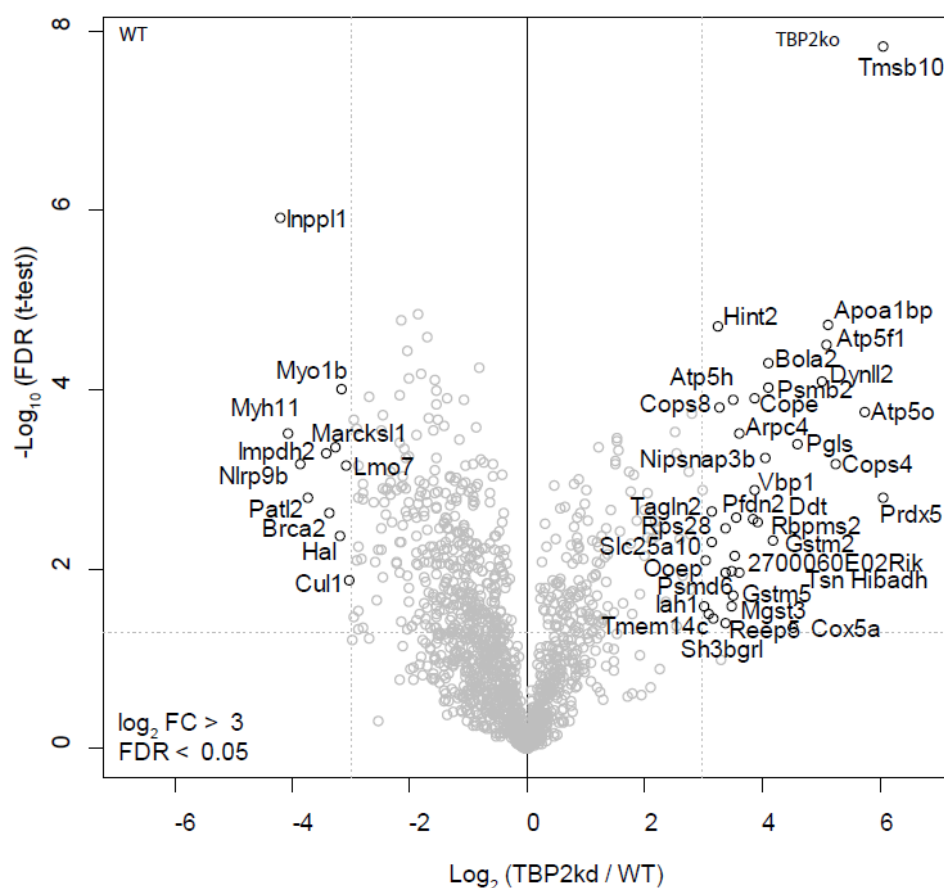


Figure 61 : VolcanoPlot mettant en évidence les protéines dont leur expression change dans le mutant *Tbpl2*^{-/-} par rapport au WT (analyse de protéome)

maternel lors de la croissance de l'ovocyte chez la souris sauf OOEP (aussi nommée FLOPPED) et qui est un composant du SCMC et par extension des *lattices* (chapitre 1). Les niveaux

d'expression de OOEP et de son ARNm ne coïncident pas : alors que l'expression de l'ARNm diminue de 80%, la protéine est régulée à la hausse.

D'autre part, même si les détections sont faibles, en faisant l'intersection entre les protéines et les ARNm correspondants (séquençage d'ARNs totaux, Yu et al. 2020), on peut apprécier que la majorité des transcrits régulés à la hausse (27), correspondent à la régulation à la hausse de leur niveau protéique comme pour DYNLL2, NIPSNAP3B, PFDN2, RPS28. En miroir, la correspondance entre transcrits régulés à la baisse (8) a permis d'identifier PATL2 dont sa déplétion cause la stérilité chez la souris et la femme (Christou-Kent et al. 2018). En tout cas, le nombre de protéines détectées ne permet pas de conclure ni d'identifier d'autres protéines candidates quant à la question de la stabilisation des ARNs messagers chez le mutant *Tbpl2*^{-/-}.

V.b) Validation d'anticorps ciblant TBPL2 humain

Le but de l'approche est de valider des anticorps générés par la plateforme IGBMC contre TBPL2 humain afin de pouvoir étudier les causes de stérilité chez la femme et notamment la conservation de fonction de TBPL2 sur des coupes histologiques en collaboration avec Stéphane VIVILLE et le laboratoire de Biologie de Reproduction situé dans le Centre médico-chirurgical et obstétrical (CMCO) des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Matthieu STIERLE, l'ingénieur de recherche de notre laboratoire a purifié les anticorps et nous les avons testés en ciblant TBPL2 humain dans une lignée cellulaire 293T/HEK exprimant transitoirement la protéine. Pour se faire, deux plasmides d'expression ont été utilisés (pCIG-GFP vide et pCIG-GFP contenant la séquence codante de TBPL2 humain). Dans chaque panel des résultats du screening (**figure 62**) on retrouve le DAPI (en haut à gauche), le contrôle GFP de l'expression de la construction contenant *TBPL2* (en vert, en haut à droite), la détection de la protéine (en rouge en bas à gauche) et la superposition des signaux (en bas à droite). Les anticorps validés sont mis en évidence en **figure 62**. Les anticorps validés seront très prochainement testés sur des coupes de fœtus humain qui ont été données aux hôpitaux pour

l'étude de la conservation fonctionnelle de la protéine TBPL2 durant la croissance de l'ovocyte humain.

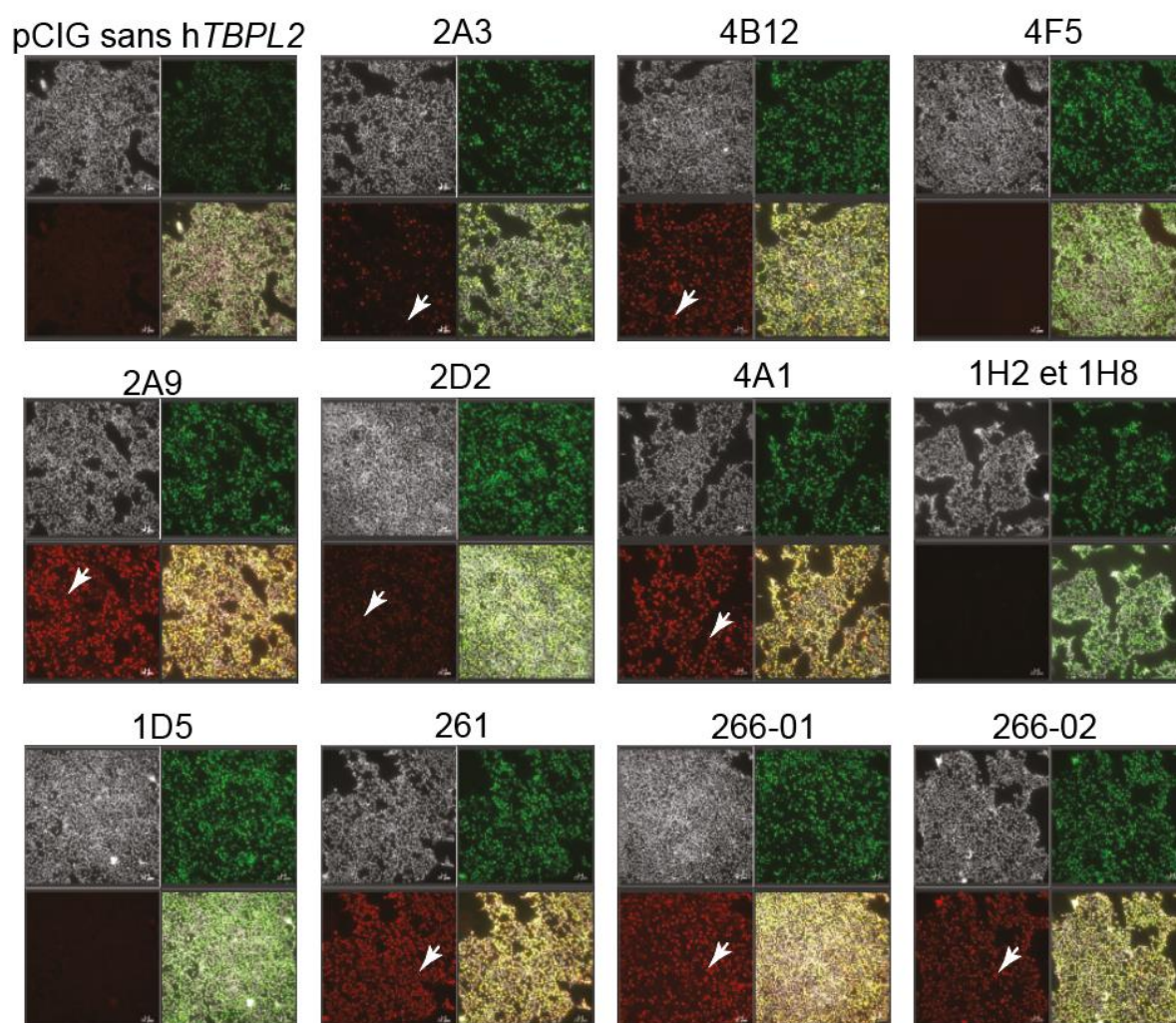


Figure 62 : Validation d'anticorps ciblant TBPL2 humain par screening par immunofluorescence de cellules 293T/HEK exprimant transitoirement la protéine.

Le nom des anticorps est écrit au-dessus de chaque expérience. Les anticorps 261, 266-01 et 266-02 sont polyclonaux et ont été générés chez le lapin. Tous les autres sont des anticorps monoclonaux de souris et proviennent de surnagent d'hybridome. Les anticorps validés par le screening sont mis en valeur par les flèches blanches. Ceux qui donnent le plus de signal pour TBPL2 humain sont les monoclonaux 4B12, 2A9 et 4A1 et les polyclonaux 261, 266-01 et 266-02. Ces derniers sont équivalents en termes de détection.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Mon projet de thèse s'est focalisé en la caractérisation du phénotype *Tbpl2* à plusieurs échelles dans lesquelles j'ai aussi exploré d'autres pistes de recherche. Cette discussion, en complément à mes résultats non publiés, a pour but d'intégrer les résultats obtenus, de les mettre en lien, d'exposer mes hypothèses et de donner de nouvelles pistes d'investigation. La discussion sera organisée du macroscopique au microscopique. C'est à dire de l'ovaire à la description de la folliculogénèse, en passant par la croissance de l'ovocyte puis à la mise en place et structuration subcellulaire en lien avec la stabilisation du transcriptome maternel. Puis, je terminerai par mes hypothèses concernant les phénotypes observés dans le noyau.

I. Le blocage de la folliculogénèse : une absence ou un retard d'activation de la croissance de l'ovocyte ?

Dans l'article, il a été mis en évidence l'altération de l'activation des vagues de la folliculogénèse (présentées au **chapitre 1**). Notamment, à PN14 chez le WT les deux vagues (médullaire et corticale) ont déjà commencé comme le prouvent les nombreux follicules secondaires au centre et en périphérie de l'ovaire. Chez le mutant *Tbpl2*^{-/-} à PN14 la vague médullaire vient tout juste de commencer comme le démontrent les nombreux follicules primaires au centre de l'ovaire. Cependant, la vague corticale n'a pas commencé, au niveau du cortex on retrouve beaucoup de follicules primordiaux dans lesquels, donc, l'ovocyte ne s'est pas engagé dans le processus de croissance. Or, les ovocytes mutants *Tbpl2*^{-/-} finissent tout de même par s'engager comme le montre FOXO3A cytoplasmique (résultats non publiés section III) sauf que leur croissance n'est jamais complète.

Premièrement, ces observations consolident le fait que l'absence de transcription médiée par TBPL2 bloque l'augmentation de taille de l'ovocyte puisqu'une partie des ressources en ARNm et protéines nécessaires à la mise en place du transcriptome maternel ne sont plus présentes. Deuxièmement, ces observations suggèrent que la transcription médiée par TBP au début de la croissance n'est pas suffisante vis-à-vis de la croissance. Ce qui est curieux est que TBPL2 et TBP partagent un 95% de conservation sur le domaine de liaison

à l'ADN (« *saddle-like* ») (Akhtar and Veenstra 2011). Or, TBP et TBPL2 ont une lecture différente des promoteurs (Yu et al. 2020) et les mécanismes d'exclusion de TBP ou TBPL2 ne sont pas connus. De plus, l'expression de TBPL2 est maintenue durant la croissance de l'ovocyte alors que TBP est seulement présent au début puis déplété dans le follicule primaire (Gazdag et al. 2007). Ainsi, il est tout à fait envisageable que la croissance de l'ovocyte nécessite une activation de la transcription à deux étapes. La première dépendante de la transcription TBP, la deuxième dépendante de TBPL2 et que ces deux étapes soient complémentaires et en synergie afin de permettre la synthèse des ARNm et la mise en place de la stabilité du transcriptome maternel. Le fait que les mutants *Zp3-Cre Tbp* ne présentent pas de phénotype de folliculogénèse va dans le même sens de l'hypothèse (résultats non publiés section IVb) puisque la délétion conditionnelle de *Tbp* commence dans le follicule primaire lorsque l'expression de la protéine TBP n'est que peu détectable. Un mutant conditionnel plus précoce (généré à partir de la lignée *Gdf9-Cre* ou même *Figla-Cre*) révélerait sûrement, si mon hypothèse d'activation en deux étapes est correcte, l'existence d'un phénotype de folliculogénèse et d'un blocage de croissance puisque l'expression de *Tbp* serait altérée dans le follicule primordial.

Cela dit, la folliculogénèse dans le mutant *Tbpl2^{-/-}* et quand même activée car follicules secondaires sont présents dans la zone corticale pendant la période de reproduction (Gazdag et al. 2009). Ce qui est étonnant, c'est de voir que la vague médullaire n'est que peu développée chez le mutant, alors que chez le WT à 6 semaines elle est finie (voir résultats de l'article). La réserve en follicules primordiaux est présente dans le WT et chez KO, mais les follicules primordiaux sont plus nombreux dans le KO alors que les follicules secondaires sont plus nombreux dans le WT (Gazdag et al. 2009). De plus, les ovaires mutants *Tbpl2^{-/-}* augmentent en taille selon l'âge des femelles mais pas autant que les ovaires WT (voir résultats de l'article), et les ovocytes mutants résiduels se trouvent dans des follicules dont la cohésion est perdue. Ensemble, ces données confortent au moins 3 éléments : 1) les follicules mutants *Tbpl2^{-/-}* s'engagent tout de même en développement mais tardivement, 2) la perte de cohésion du follicule chez le mutant est progressive et 3) est probablement la conséquence d'un défaut cellulaire autonome par l'absence de TBPL2 dans l'ovocyte en croissance. Ensemble ces données laissent entendre que ce que l'on appelle absence d'activation chez le

mutant pourrait bien être un retard d'activation pour la croissance de l'ovocyte puisque la synergie entre TBP et TBPL2 serait perdue. Toutefois, on ne peut pas exclure le fait que l'altération des communications réciproques entre les ovocytes et les cellules folliculaires soient aussi impliquées dans la perte de cohésion entre le stade primaire et secondaire du follicule mutant.

II. Perte de cohésion des follicules : un effet cellulaire autonome ?

L'hypothèse du retard d'activation est aussi soutenue par le fait que les ovocytes *Tbpl2*^{-/-} présentent des caractéristiques d'ovocytes non structurés par rapport aux WT. La caractéristique principale est la non-dispersion du Golgi lors de la croissance de l'ovocyte chez le mutant *Tbpl2*^{-/-} alors que chez le WT, les membranes Golgiennes dispersent et se positionnent à des loci discrets dans le cytoplasme (**figure 63A**). La spécificité du signal GM130 a été validée sur la lignée cellulaire 3T3 et révèle les dictyosomes et ses saccules golgiennes caractéristiques (**figure 63B**). Ce qui est surprenant chez le mutant *Tbpl2*^{-/-} c'est la ressemblance de cette structure cytoplasmique persistante avec le corps de Balbiani (*BB*, *Balbani's body*). Le *BB* est une « superorganelle » contenant des mitochondries, des membranes Golgiennes, du réticulum endoplasmique, caractéristique des ovocytes dormants, non engagés en croissance, et qui disperse après activation (Amin, Bukulmez, and Woodruff 2023). Cependant, même si le *BB* est retrouvé chez des espèces animales comme le poisson zèbre, le xénope et l'humain il n'est pas présent chez la souris puisque les mitochondries sont positionnées autour de l'appareil de Golgi (Dhandapani et al. 2022) (pour revue (Jamieson-Lucy and Mullins 2019)). De plus, chez le poisson zèbre et le xénope il a été montré l'implication du *BB* et de sa dispersion cytoplasmique dans la localisation d'ARNs (Heinrich and Deshler 2009; Kosaka et al. 2007).

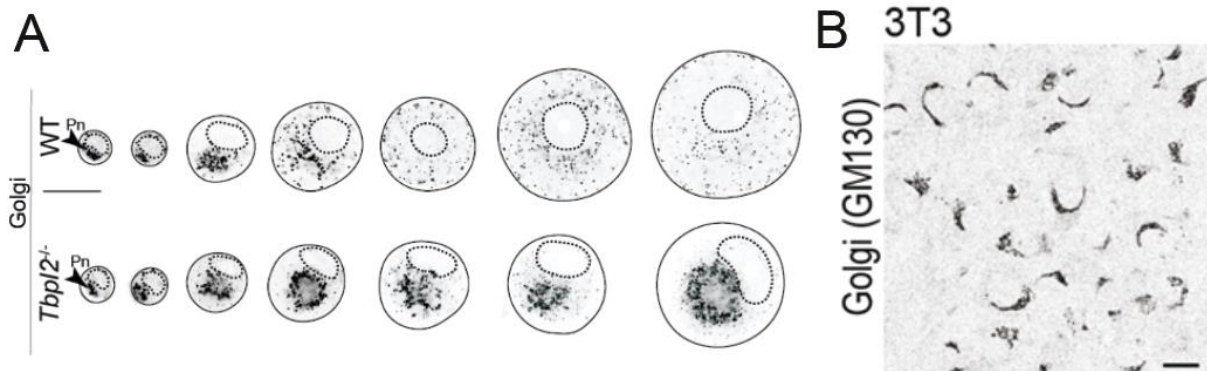


Figure 63 : Immunofluorescence de l'appareil de Golgi lors de la croissance de l'ovocyte

Barre d'échelle : 25 μm , (lignée cellulaire 3T3 : 10 μm), Pn : Structure paranucléaire, en apposition au noyau. Notez la décentralisation du noyau dans le mutant *Tbp12*^{-/-}.

La présence de cet amas de membranes Golgiennes en apposition persistante au noyau chez le mutant *Tbp12*^{-/-} et proche de rassemblements des mitochondries comme c'est le cas dans le MARDO (Cheng et al. 2022) laisse penser que les ARNm régulés à la hausse pourraient y être stabilisés dans la structure. Or mes expériences d'hybridation *in situ* sur des transcrits cibles ne détectent pas d'accumulation d'ARNm à ce niveau (résultats non publiés section II). Peut-être qu'en faisant varier le nombre de sondes ou en combinant différentes sondes de plusieurs transcrits candidats pour le *smiFISH*, il serait possible de voir une localisation spécifique. Il serait aussi possible de faire des microinjections d'ARNs fluorescents dans les ovocytes en croissance pour en voir la localisation spécifique au cours du temps.

Comme vu au (chapitre 1), suite à l'engagement en croissance de l'ovocyte, l'appareil de *Golgi* se fragmente, disperse et se répartit dans le cytoplasme en formant des « mini-golgis ». En parallèle, les mécanismes de formation des *lattices* ne sont pas connus et les mutants *Tbpl2*^{-/-} ne forment pas de *lattices*. Je me suis donc penché de manière préliminaire sur la question en interprétant des images prises en microscopie électronique (figure 64A, B). Il est intéressant d'observer que dans les ovocytes petits à PN7 mais engagés en croissance, les « mini-Golgis » sont présents dans le cytoplasme (figure 64A, B). En contraste, à PN14 ces « mini-Golgis » ne sont plus là lorsque les *lattices* sont bien formés (figure 64A, B). Ainsi, je

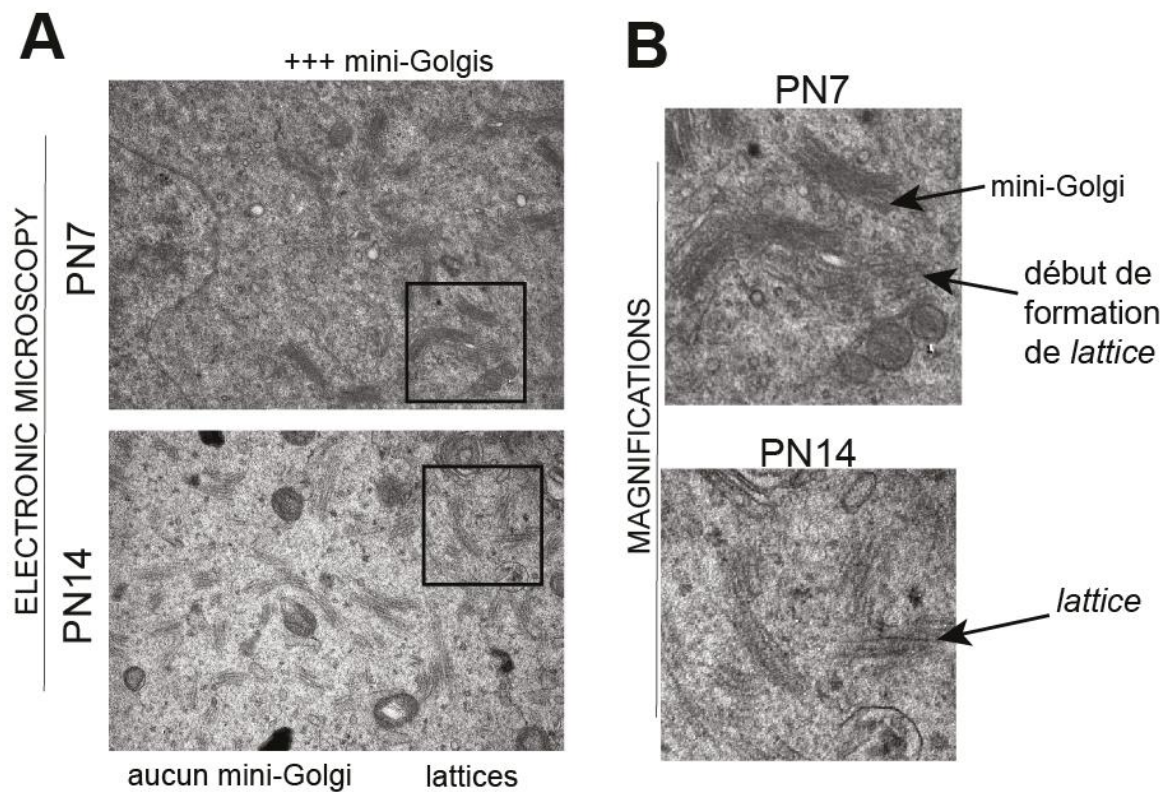


Figure 64: Etude préliminaire de l'origine des *lattices* par microscopie électronique à transmission

(A) Analyse comparative du cytoplasme des ovocytes WT à PN7 et PN14. (B) Agrandissement de la formation des *lattices*.

propose que les « mini-Golgis » sont impliqués dans la nucléation et structuration des *lattices* partout dans le cytoplasme. En effet, l'appareil de Golgi est associé à la nucléation et mise en place du cytosquelette dans d'autres types cellulaires (Sanders and Kaverina 2015; Vitali et al. 2023; Wu et al. 2016), (pour revue, (Egea, Lázaro-Diéguéz, and Vilella 2006)). Cela pourrait expliquer pourquoi dans le mutant *Tbpl2*^{-/-} aucun *lattice* n'est visible dans le cytoplasme

puisque l'appareil de Golgi ne fragmente pas et s'agglutine en apposition du noyau (voir article). Dans l'optique de comprendre l'origine et la formation des *lattices*, il serait intéressant de réaliser une analyse de la croissance de l'ovocyte en microscopie corrélative électronique dans le but de suivre précisément la structuration des organelles, la dispersion/fragmentation de l'appareil de Golgi et l'expression et la localisation par immunofluorescence des sous unités essentielles des *lattices* comme PADI6, YBX2 et LSM14B.

Rappelons ici que les *lattices* sont des structures cytoplasmiques nécessaires à la stabilisation du transcriptome maternel dans l'ovocyte par association avec la protéine de liaison non spécifique à l'ARNm, YBX2, et avec les amas de mitochondries qui créent une niche de stabilisation (MARDO) (Cheng et al. 2022; Liu et al. 2017). La structuration du cytoplasme ne se faisant pas dans le mutant *Tbpl2*^{-/-}, il n'est pas surprenant de voir que la protéine YBX2 n'est plus répartie de manière homogène dans le cytoplasme comme dans le WT mais au contraire se présente sous forme d'agrégats (voir article). Les ovocytes mutants *Tbpl2*^{-/-} ne structurent pas leur cytoplasme ni leur cytosquelette ce qui est sûrement la cause de son défaut de croissance, du détachement de l'ovocyte de la *corona radiata*, de la perte de cohésion du follicule secondaire et par conséquent de l'hypotrophie de l'ovaire qui est observé à tous les stades étudiés. En parallèle des défauts cytoplasmiques, des défauts nucléaires des ovocytes *Tbpl2*^{-/-} apparaissent au cours de la croissance.

III. Comment expliquer le phénotype nucléaire ?

Comme abordé (au chapitre 1), la structuration du cytoplasme peut influencer le positionnement du noyau de l'ovocyte (Almonacid et al. 2015) et faire varier de façon dynamique l'apparition de foci nucléaires (Al Jord et al. 2022). De plus, des foci nucléaires similaires contenant la PABPN1 et SC-35 ont été mis en évidence lors de la croissance de l'ovocyte et ont été nommés domaines poly(A) sans membrane (*NPADs* : *Nuclear Poly(A) Domains*) (Dai et al. 2022). Notamment, comme vu dans l'introduction, la formation et le maintien des *NPADs* nécessite l'interaction de la PABPN1 avec les queues poly(A) puisque la délétion des sites d'interaction à l'ARNm de la PABPN1 engendre leur disparition (Dai et al. 2022). De plus, leur nombre et leur diamètre dépend de l'activité de transcription (Dai et al. 2022). L'inhibition de la transcription, à l'alpha-amanitine, engendre la réduction du nombre

de NPADs et l'augmentation de diamètre des NPADs restants (Dai et al. 2022). En miroir, en enlevant l'inhibiteur de la transcription, la distribution subnucléaire des NPADs est restaurée (Dai et al. 2022). Il est intéressant de souligner que dans le mutant *Tbp12*^{-/-} les NPADs sont élargis de façon similaire aux ovocytes en croissance bloqués en transcription. Cependant, bien que les NPADs chez le mutant *Tbp12*^{-/-} soient élargis, leur nombre est aussi plus important ce qui suggère que d'autres mécanismes doivent être altérés comme un blocage de la dégradation de l'ARNm par exemple. Des études récentes dans les cellules somatiques (Weick and Lima 2021; Wu et al. 2020) mais aussi dans les ovocytes en croissance chez la souris (Wu et al. 2024) démontrent l'importance du contrôle qualité de l'ARNm dans le noyau par l'hélicase d'ARNs associée à l'exosome. Le complexe formé par la PABPN1, MTR4, ZFC3H1, l'ARN poly(A) et l'exosome est nommé le complexe *Poly(A) tail eXosome Targeting connexion* (PAXT) responsable de la dégradation d'ARNs poly(A) par le mécanisme de clivage précoce par CPSF et par la polyadénylation alternative (APA, *Alternative PolyAdenylation*) (Weick and Lima 2021; Wu et al. 2020). Ces mécanismes sont d'autant plus intéressants du point de vue fonctionnel puisque la PABPN1 est connue pour interagir avec les ARNs naissants, être capable dans des cellules somatiques de contrôler la polyadénylation par la PAP (Kerwitz et al. 2003) et de permettre la rétention nucléaire d'ARNs non épissés (Kwiatek et al. 2023).

Ainsi, je propose que dans les ovocytes mutants pour *Tbp12*, qui ne structurent pas leur cytoplasme et ne mettent pas en place des *lattices*, les NPADs élargis sont la conséquence d'un défaut initial de transcription et de non-dégradation de l'ARNm nucléaire. Il est intéressant d'observer que les NPADs disparaissent par la déplétion de MTR4 (Wu et al. 2024). De plus, l'accumulation d'*Uqcrc1*, l'un de nos transcrits candidats pour l'analyse des queues poly(A), dans le mutant *Mtr4* se fait dans le noyau et aucun changement dans le cytoplasme n'est détecté par séquençage des ARNs cytoplasmiques lors de la croissance de l'ovocyte (voir tables supplémentaires (Wu et al. 2024)). De plus, dans les mutants *Tbp12*^{-/-}, l'expression de *Mtr4* que l'on retrouve sous son autre nom, *Mtrex*, dans le séquençage d'ARNs (Yu et al. 2020), est *réduite de 30%* ainsi que les expressions de *Disl3* et *Exosc10* qui sont réduites respectivement de 60% et 30% en phase avec l'analyse GO catégorie qui détecte une déplétion de la fonction « Poly(A) ribonucléase » (Yu et al. 2020). Ainsi, je propose que les NPADs sont des centres de maturation et de contrôle qualité de l'ARNm avant l'export dans le cytoplasme. Il serait intéressant de regarder précisément et temporellement, durant la

croissance de l'ovocyte WT et mutant *Tbpl2*^{-/-}, le profil d'expression de MTR4, du complexe PAXT et des sous-unités de l'exosome. Par ailleurs, une question importante subsiste, si TBPL2 n'est plus là chez le mutant, d'où vient la source d'ARNs poly(A) enrichie dans les NPADs ? Ce qui revient à se demander : comment expliquer le signal de transcription en absence de TBPL2 ?

IV. Comment expliquer le signal de transcription en absence de TBPL2 ?

Nos résultats de l'article démontrent que les noyaux sont plus grands dans le mutant *Tbpl2*^{-/-}, plusieurs acteurs peuvent contribuer à cet effet : La décompaction de la chromatine par l'absence des marques d'histones de chromatine constitutive H3K9me3, l'élargissement des foci PABPN1 et l'absence d'acquisition de méthylation de novo. La méthylation de novo lors de la croissance de l'ovocyte dépend de la transcription active. Or, les résultats d'incorporation d'EU et de mise en évidence de la pSer5 dans le mutant *Tbpl2*^{-/-} (résultats non publiés section IV) suggèrent la présence de transcription sans TBPL2. De plus, la détection des protéines TAFs et la persistance du signal RPB1 dans le mutant *Tbpl2*^{-/-} (résultats non publiés section III) lors de la croissance de l'ovocyte suggèrent que la transcription pourrait être initiée différemment en absence de TBPL2.

Durant la croissance de l'ovocyte, aucun rôle fonctionnel pour l'initiation de la transcription des TAFs, tout comme des autres GTFs (autres que TFIIA et TFIIB) n'a été mis en évidence. En revanche, on sait déjà que TAF7 n'est pas important à la folliculogénèse (Yu et al. 2020) et que la délétion conditionnelle de *Taf2* et *Taf10* altère la croissance de l'ovocyte (résultats non publiés section IV.b). Ce sont des pistes qui nécessitent d'être explorées ainsi que l'analyse subcellulaire des ovocytes mutants conditionnels des *Tafs*. Notamment, afin d'aborder la question d'activation de l'ovocyte en deux étapes et l'implication des TAFs, on peut imaginer faire un double mutant combinant *Tbpl2* et les *Gdf9Cre* (permettant de dépléter efficacement et précocement les protéines TAFs dans l'ovocyte avant même l'engagement en croissance). Ces double mutants (*Tbpl2*, *Taf*) permettraient de savoir si le signal de transcription est toujours présent dans l'ovocyte en croissance en absence de plusieurs facteurs et de discerner l'implication de TAFs individuels pour la transcription en absence totale de TBPL2. Le profil d'expression de TAFs dans le mutant *Tbpl2* donnerait sûrement d'autres pistes. Dans

l'hypothèse que les TAFs puissent jouer un rôle dans l'initiation de la transcription en complément à TBPL2 durant la croissance de l'ovocyte, on peut penser qu'ils soient recrutés aux promoteurs via TBPL1. Or l'expression protéique de TBPL1 lors de la croissance de l'ovocyte n'est pas connue mais l'ARNm *Tbpl1* est détecté dans l'ovocyte en croissance (Yu et al. 2020). Il serait possible que l'absence de TBPL2 aux promoteurs mène à des défauts de lecture promoteurs et d'initiation de la transcription via les TAFs entraînant des cycles abortifs de l'ARN Pol II (par clivage précoce sur des sites de poly(A) alternatifs par exemple) ou l'accumulation d'ARNs non matures qui seraient retenus dans le noyau par les mécanismes de contrôle qualité comme le complexe PAXT. Mais ce ne sont là que des suggestions et hypothèses...Pour aborder à ces questions, il serait tout d'abord nécessaire de réaliser un séquençage d'ARN naissants par nanopore (Lee et al. 2024) et de vérifier dans le mutant *Tbpl2*^{-/-} l'entière des transcrits spécifiques régulés à la hausse et la longueur des queues poly(A) en les comparant au WT.

Conclusion

Durant ma thèse, j'ai exploré à différentes échelles le phénotype *Tbpl2*^{-/-} qui se caractérise par la dégénérescence progressive de l'ovocyte engagé en croissance. L'étude du cytosquelette et du positionnement des organelles a révélé l'absence de structuration cytoplasmique et de la mise en place des *lattices*. L'expression des sous-unités impliquées dans la stabilité de l'ARNm durant la croissance de l'ovocyte a été démontrée par immunofluorescence et a permis de révéler l'altération des profils dans le mutant *Tbpl2*^{-/-}. La distribution et l'abondance des ARNs poly(A) ont été évalués par hybridation *in situ*, cela a permis de mettre en évidence l'élargissements de foci nucléaires potentiellement associés avec le contrôle qualité et la rétention nucléaire d'ARNm. Ensemble, mes données suggèrent que la mise en place du transcriptome maternel est bloquée dans le mutant *Tbpl2*^{-/-}. L'absence de structuration cytoplasmique, la non-formation des *lattices*, l'agrégation de YBX2, la décentralisation du noyau, l'élargissement des NPADs et l'accumulation des ARNs poly(A) dans le noyau sous-tiennent l'hypothèse que la différenciation terminale de l'ovocyte est impactée par l'absence de la transcription médiée par TBPL2. Ainsi, cette étude rend compte de la complexité des mécanismes de contrôle de la stabilité du transcriptome maternel durant la croissance de l'ovocyte et dévoile quelques étapes nécessaires à son élaboration de l'initiation de la transcription à la stabilisation de l'ARN messager.

Références bibliographiques

- Abe, Ken Ichiro, Azusa Inoue, Masataka G. Suzuki, and Fugaku Aoki. 2010. “Global Gene Silencing Is Caused by the Dissociation of RNA Polymerase II from DNA in Mouse Oocytes.” *Journal of Reproduction and Development* 56(5):502–7. doi: 10.1262/jrd.10-068A.
- Abe, Ken-ichiro, Ryoma Yamamoto, Vedran Franke, Minjun Cao, Yutaka Suzuki, Masataka G. Suzuki, Kristian Vlahovicek, Petr Svoboda, Richard M. Schultz, and Fugaku Aoki. 2015. “The First Murine Zygotic Transcription Is Promiscuous and Uncoupled from Splicing and 3' Processing.” *The EMBO Journal* 34(11):1523–37. doi: 10.15252/embj.201490648.
- Abel, Cuevas-Bermúdez, Martínez-Fernández Verónica, Garrido-Godino Ana I., and Navarro Francisco. 2018. “Subunits Common to RNA Polymerases.” in *The Yeast Role in Medical Applications*. InTech.
- Absmeier, Eva, Viswanathan Chandrasekaran, Francis J. O'Reilly, James A. W. Stowell, Juri Rappsilber, and Lori A. Passmore. 2023. “Specific Recognition and Ubiquitination of Translating Ribosomes by Mammalian CCR4-NOT.” *Nature Structural & Molecular Biology* 30(9):1314–22. doi: 10.1038/S41594-023-01075-8.
- Ackert, Cheryl L., Joanne E. I. Gittens, Marilyn J. O'Brien, John J. Eppig, and Gerald M. Kidder. 2001. “Intercellular Communication via Connexin43 Gap Junctions Is Required for Ovarian Folliculogenesis in the Mouse.” *Developmental Biology* 233(2):258–70. doi: 10.1006/DBIO.2001.0216.
- Afonina, Elena, Roland Stauber, and George N. Pavlakis. 1998. “The Human Poly(A)-Binding Protein 1 Shuttles between the Nucleus and the Cytoplasm.” *Journal of Biological Chemistry* 273(21):13015–21. doi: 10.1074/JBC.273.21.13015.
- Akhtar, Waseem, and Gert Jan C. Veenstra. 2009. “TBP2 Is a Substitute for TBP in *Xenopus* Oocyte Transcription.” *BMC Biology* 7:45. doi: 10.1186/1741-7007-7-45.

BIBLIOGRAPHIE

- Akhtar, Waseem, and Gert Jan C. Veenstra. 2011. "TBP-Related Factors: A Paradigm of Diversity in Transcription Initiation." *Cell and Bioscience* 1(1).
- Albertini, David F., Catherine M. H. Combelles, Elizabeth Benecchi, and Mary Jo Carabatsos. 2001. "Cellular Basis for Paracrine Regulation of Ovarian Follicle Development." *Reproduction* 121(5):647–53. doi: 10.1530/REP.0.1210647.
- Almonacid, Maria, Wylie W. Ahmed, Matthias Bussonnier, Philippe Mailly, Timo Betz, Raphaël Voituriez, Nir S. Gov, and Marie Hélène Verlhac. 2015. "Active Diffusion Positions the Nucleus in Mouse Oocytes." *Nature Cell Biology* 17(4):470–79. doi: 10.1038/ncb3131.
- Amin, Ruchi, Orhan Bukulmez, and Jeffrey B. Woodruff. 2023. "Visualization of Balbiani Body Disassembly during Human Primordial Follicle Activation." *MicroPublication Biology* 2023. doi: 10.17912/MICROPUB.BIOLOGY.000989.
- Anandapadamanaban, Madhanagopal, Cecilia Andresen, Sara Helander, Yoshifumi Ohyama, Marina I. Siponen, Patrik Lundström, Tetsuro Kokubo, Mitsuhiko Ikura, Martin Moche, and Maria Sunnerhagen. 2013. "High-Resolution Structure of TBP with TAF1 Reveals Anchoring Patterns in Transcriptional Regulation." *Nature Structural and Molecular Biology* 20(8):1008–14. doi: 10.1038/nsmb.2611.
- Anderson, Robert, Reinhard Fässler, Elisabeth Georges-Labouesse, Richard O. Hynes, Bernhard L. Bader, Jordan A. Kreidberg, Kyle Schaible, Janet Heasman, and Christopher Wylie. 1999. "Mouse Primordial Germ Cells Lacking B1 Integrins Enter the Germline but Fail to Migrate Normally to the Gonads." *Development* 126(8):1655–64. doi: 10.1242/DEV.126.8.1655.
- Andreu-Vieyra, Claudia V., Ruihong Chen, Julio E. Agno, Stefan Glaser, Konstantinos Anastassiadis, A. Stewart Francis, and Martin M. Matzuk. 2010. "MLL2 Is Required in Oocytes for Bulk Histone 3 Lysine 4 Trimethylation and Transcriptional Silencing." *PLoS Biology* 8(8):53–54. doi: 10.1371/journal.pbio.1000453.
- Antonova, Simona V., Jeffrey Boeren, H. T. Marc Timmers, and Berend Snel. 2019. "Epigenetics and Transcription Regulation during Eukaryotic Diversification: The Saga of TFIID." *Genes & Development* 33(15–16):888–902. doi: 10.1101/GAD.300475.117.

- Arumugam, Karthik, Melanie C. Macnicol, and Angus M. Macnicol. 2012. "Autoregulation of Musashi1 mRNA Translation during *Xenopus* Oocyte Maturation." *Molecular Reproduction and Development* 79(8):553–63. doi: 10.1002/MRD.22060.
- Arumugam, Karthik, Melanie C. MacNicol, Yiyang Wang, Chad E. Cragle, Alan J. Tackett, Linda L. Hardys, and Angus M. MacNicol. 2012. "Ringo/Cyclin-Dependent Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways Regulate the Activity of the Cell Fate Determinant Musashi to Promote Cell Cycle Re-Entry in *Xenopus* Oocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 287(13):10639–49. doi: 10.1074/JBC.M111.300681.
- Bachvarova, Rosemary. 1974. "Incorporation of Tritiated Adenosine into Mouse Ovum RNA." *Developmental Biology* 40(1):52–58. doi: 10.1016/0012-1606(74)90106-7.
- Bachvarova, Rosemary, and Victor De Leon. 1980. "Polyadenylated RNA of Mouse Ova and Loss of Maternal RNA in Early Development." *Developmental Biology* 74(1):1–8. doi: 10.1016/0012-1606(80)90048-2.
- Bachvarova, Rosemary, Victor DE Leon, Andrew Johnson, Gail Kaplan, and Barbara V Paynton. 1985. *Changes in Total RNA, Polyadenylated RNA, and Actin mRNA during Meiotic Maturation of Mouse Oocytes*. Vol. 108.
- Baer, B. W., and R. D. Kornberg. 1983. "The Protein Responsible for the Repeating Structure of Cytoplasmic Poly(A)-Ribonucleoprotein." *The Journal of Cell Biology* 96(3):717–21. doi: 10.1083/JCB.96.3.717.
- Bahety, Devesh, Elvan Böke, and Aida Rodríguez-Nuevo. 2024. "Mitochondrial Morphology, Distribution and Activity during Oocyte Development." *Trends in Endocrinology and Metabolism*.
- Bai, Shun, Kaiqiang Fu, Huiqi Yin, Yiqiang Cui, Qiuling Yue, Wenbo Li, Le Cheng, Huanhuan Tan, Xiaofei Liu, Yueshuai Guo, Yingwen Zhang, Jie Xie, Wenxiu He, Yuanyuan Wang, Hua Feng, Changpeng Xin, Jinwen Zhang, Mingyan Lin, Bin Shen, Zheng Sun, Xuejiang Guo, Ke Zheng, and Lan Ye. 2019. "The Maternal-to-Zygotic Transition Revisited." *Development (Cambridge, England)* 146(11). doi: 10.1242/DEV.161471.
- Ball, Christopher B., Karina F. Rodriguez, Deborah J. Stumpo, Fernando Ribeiro-Neto, Kenneth S. Korach, Perry J. Blackshear, Lutz Birnbaumer, and Silvia B.

- V. Ramos. 2014. “The RNA-Binding Protein, ZFP36L2, Influences Ovulation and Oocyte Maturation.” *PLoS ONE* 9(5). doi: 10.1371/journal.pone.0097324.
- Balla, Agneta, Natalia Danilovich, Yinzhi Yang, and M. Ram Sairam. 2003. “Dynamics of Ovarian Development in the FORKO Immature Mouse: Structural and Functional Implications for Ovarian Reserve.” *Biology of Reproduction* 69(4):1281–93. doi: 10.1095/biolreprod.103.015552.
- Baptista, Tiago, Sebastian Grünberg, Nadège Minoungou, Maria J. E. Koster, H. T. Marc Timmers, Steve Hahn, Didier Devys, and László Tora. 2017. “SAGA Is a General Cofactor for RNA Polymerase II Transcription.” *Molecular Cell* 68(1):130–143.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.016.
- Bardot, Paul, Stéphane D. Vincent, Marjorie Fournier, Alexis Hubaud, Mathilde Joint, László Tora, and Olivier Pourquié. 2017. “The TAF10-Containing TFIID and SAGA Transcriptional Complexes Are Dispensable for Early Somitogenesis in the Mouse Embryo.” *Development (Cambridge)* 144(20):3808–18. doi: 10.1242/dev.146902.
- Barkoff, Aaron F., Kirsten S. Dickson, Nicola K. Gray, and Marvin Wickens. 2000. “Translational Control of Cyclin B1 mRNA during Meiotic Maturation: Coordinated Repression and Cytoplasmic Polyadenylation.” *Developmental Biology* 220(1):97–109. doi: 10.1006/DBIO.2000.9613.
- Barral, Amandine, and Kenneth S. Zaret. 2024. “Pioneer Factors: Roles and Their Regulation in Development.” *Trends in Genetics* 40(2):134–48. doi: 10.1016/J.TIG.2023.10.007.
- Bártfai, Richárd, Carolin Balduf, Traci Hilton, Yvonne Rathmann, Yavor Hadzhiev, László Tora, László Orbán, and Ferenc Müller. 2004. “TBP2, a Vertebrate-Specific Member of the TBP Family, Is Required in Embryonic Development of Zebrafish.” *Current Biology: CB* 14(7):593–98. doi: 10.1016/J.CUB.2004.03.034.
- Bartlam, Mark, and Tadashi Yamamoto. 2010. “The Structural Basis for Deadenylation by the CCR4-NOT Complex.” *Protein & Cell* 1(5):443. doi: 10.1007/S13238-010-0060-8.
- Bashkirov, Vladimir I., Harry Scherthan, Jachen A. Solinger, Jean Marie Buerstedde, and Wolf Dietrich Heyer. 1997. “A Mouse Cytoplasmic Exoribonuclease

- (MXRN1p) with Preference for G4 Tetraplex Substrates.” *The Journal of Cell Biology* 136(4):761. doi: 10.1083/JCB.136.4.761.
- Baumann, Kim. 2019. “Guardians of the Oocyte Methyloome.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 20(1):2–3. doi: 10.1038/S41580-018-0090-2.
- Bear, David G., Nathalie Fomproix, Teresa Soop, Birgitta Björkroth, Sergej Masich, and Bertil Daneholt. 2003. “Nuclear Poly(A)-Binding Protein PABPN1 Is Associated with RNA Polymerase II during Transcription and Accompanies the Released Transcript to the Nuclear Pore.” *Experimental Cell Research* 286(2):332–44. doi: 10.1016/S0014-4827(03)00123-X.
- Bebbere, D., L. Masala, D. F. Albertini, and S. Ledda. 2016. “The Subcortical Maternal Complex: Multiple Functions for One Biological Structure?” *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 33(11):1431–38.
- Becker, Peter B., and Jerry L. Workman. 2013. “Nucleosome Remodeling and Epigenetics.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(9). doi: 10.1101/cshperspect.a017905.
- Beilharz, Traude H., and Thomas Preiss. 2009. “Transcriptome-Wide Measurement of MRNA Polyadenylation State.” *Methods* 48(3):294–300. doi: 10.1016/j.ymeth.2009.02.003.
- Belloc, Eulàlia, Maria Piqué, and Raúl Méndez. 2008. “Sequential Waves of Polyadenylation and Deadenylation Define a Translation Circuit That Drives Meiotic Progression.” *Biochemical Society Transactions* 36(4). doi: 10.1042/BST0360665.
- Bernardini, Andrea, Pooja Mukherjee, Elisabeth Scheer, Ivanka Kamenova, Simona Antonova, Paulina Karen Mendoza Sanchez, Gizem Yayli, Bastien Morlet, H. T. Marc Timmers, and László Tora. 2023. “Hierarchical TAF1-Dependent Co-Translational Assembly of the Basal Transcription Factor TFIID.” *Nature Structural and Molecular Biology* 30(8):1141–52. doi: 10.1038/s41594-023-01026-3.
- Bhuiyan, Tanja, Paulina K. Mendoza Sanchez, Niccolò Arecco, Juhyeong Kim, Sheikh Nizamuddin, Andrea Prunotto, Mehmet Tekman, Martin L. Biniossek, Stefanie Koidl, Thorsten Hugel, and Sebastian J. Arnold. 2024. “TAF2 Condensation in Nuclear Speckles Links Basal Transcription Factor TFIID to RNA Splicing.” *BioRxiv* 2024.02.05.578926. doi: 10.1101/2024.02.05.578926.

BIBLIOGRAPHIE

- Biddie, Simon C., Sam John, Pete J. Sabo, Robert E. Thurman, Thomas A. Johnson, R. Louis Schiltz, Tina B. Miranda, Myong Hee Sung, Saskia Trump, Stafford L. Lightman, Charles Vinson, John A. Stamatoyannopoulos, and Gordon L. Hager. 2011. "Transcription Factor AP1 Potentiates Chromatin Accessibility and Glucocorticoid Receptor Binding." *Molecular Cell* 43(1):145–55. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.016.
- Blair, Rebecca H., James A. Goodrich, and Jennifer F. Kugel. 2012. "Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer Shows Uniformity in TATA Binding Protein-Induced DNA Bending and Heterogeneity in Bending Kinetics." *Biochemistry* 51(38):7444–55. doi: 10.1021/bi300491j.
- Blengini, Cecilia S., Patricia Ibrahimian, Michaela Vaskovicova, David Drutovic, Petr Solc, and Karen Schindler. 2021. "Aurora Kinase A Is Essential for Meiosis in Mouse Oocytes." *PLoS Genetics* 17(4 April 2021). doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1009327.
- Blengini, Cecilia S., Karen Schindler, Cecilia S. Blengini, Karen Schindler, Michaela Vaskovicova, David Drutovic, Michaela Vaskovicova, and Jan Schier. 2024. "Spatio-Temporal Requirements of Aurora Kinase A in Mouse Oocyte Meiotic Spindle Building." *IScience* 27(8). doi: 10.1016/j.isci.2024.110451.
- Bonnet-Garnier, Amelie, Prisca Feuerstein, Martine Chebrou, Renaud Fleurot, Habib Ullah Jan, Pascale Debey, and Nathalie Beaujean. 2012. "Genome Organization and Epigenetic Marks in Mouse Germinal Vesicle Oocytes." *International Journal of Developmental Biology* 56(10–12):877–87. doi: 10.1387/ijdb.120149ab.
- Bonnet-Garnier, Amelie, Prisca Feuerstein, Martine Chebrou, Renaud Fleurot, Habib Ullah Jan, Pascale Debey, and Nathalie Beaujean. 2013. "Genome Organization and Epigenetic Marks in Mouse Germinal Vesicle Oocytes." *The International Journal of Developmental Biology* 56(10-11–12):877–87. doi: 10.1387/IJDB.120149AB.
- Bostick, Magnolia, Kyong Kim Jong, Pierre Olivier Estève, Amander Clark, Sriharsa Pradhan, and Steven E. Jacobsen. 2007. "UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells." *Science (New York, N.Y.)* 317(5845):1760–64. doi: 10.1126/SCIENCE.1147939.

- Bouftas, Nora, and Katja Wassmann. 2019. "Cycling through Mammalian Meiosis: B-Type Cyclins in Oocytes." *Cell Cycle* 18(14):1537–48.
- Bourc'his, Déborah, and Timothy H. Bestor. 2004. "Meiotic Catastrophe and Retrotransposon Reactivation in Male Germ Cells Lacking Dnmt3L." *Nature* 2004 431:7004 431(7004):96–99. doi: 10.1038/nature02886.
- Bouveret, Emmanuelle, Guillaume Rigaut, Anna Shevchenko, Matthias Wilm, and Bertrand Séraphin. 2000. "A Sm-like Protein Complex That Participates in MRNA Degradation." *The EMBO Journal* 19(7):1661. doi: 10.1093/EMBOJ/19.7.1661.
- Bouvet, Philippe, and Alan P. Wolffe. 1994. "A Role for Transcription and FRGY2 in Masking Maternal MRNA within *Xenopus* Oocytes." *Cell* 77(6):931–41. doi: 10.1016/0092-8674(94)90141-4.
- Van Brabant, Anja J., Rodica Stan, and Nathan A. Ellis. 2000. *DNA HELICASES, GENOMIC INSTABILITY, AND HUMAN GENETIC DISEASE*. Vol. 1.
- Bracken, Adrian P., Gerard L. Brien, and C. Peter Verrijzer. 2019. "Dangerous Liaisons: Interplay between SWI/SNF, NURD, and Polycomb in Chromatin Regulation and Cancer." *Genes and Development* 33(15–16):936–59.
- Brand, Marjorie, Ken Yamamoto, Adrien Staub, and Laszlo Tora. 1999. "Identification of TATA-Binding Protein-Free TAF(II)-Containing Complex Subunits Suggests a Role in Nucleosome Acetylation and Signal Transduction." *Journal of Biological Chemistry* 274(26):18285–89. doi: 10.1074/jbc.274.26.18285.
- Bresson, Stefan M., Olga V. Hunter, Allyson C. Hunter, and Nicholas K. Conrad. 2015. "Canonical Poly(A) Polymerase Activity Promotes the Decay of a Wide Variety of Mammalian Nuclear RNAs." *PLoS Genetics* 11(10). doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1005610.
- Brower, Peter T., Elena Gizang, Stuart M. Boreen, and Richard M. Schultz. 1981. "Biochemical Studies of Mammalian Oogenesis: Synthesis and Stability of Various Classes of RNA during Growth of the Mouse Oocyte in Vitro." *Developmental Biology* 86(2):373–83. doi: 10.1016/0012-1606(81)90195-0.
- Brownell, J. E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D. G. Edmondson, S. Y. Roth, and C. D. Allis. 1996. "Tetrahymena Histone Acetyltransferase A: A Homolog to

- Yeast Gcn5p Linking Histone Acetylation to Gene Activation.” *Cell* 84(6):843–51. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81063-6.
- Burkholder, G. D., D. E. Comings, and T. A. Okada. 1971. “A Storage Form of Ribosomes in Mouse Oocytes.” *Experimental Cell Research* 69(2):361–71. doi: 10.1016/0014-4827(71)90236-9.
- Burton, Zachary F., Marie Killeen, Mary Sopta, Loris G. Ortolan, and Jack Greenblatt’. 1988. *RAP30/74: A General Initiation Factor That Binds to RNA Polymerase II*. Vol. 8.
- Calado, Angelo, and Maria Carmo-Fonseca. 2000. “Localization of Poly(A)-Binding Protein 2 (PABP2) in Nuclear Speckles Is Independent of Import into the Nucleus and Requires Binding to Poly(A) RNA.” *Journal of Cell Science* 113(12):2309–18. doi: 10.1242/JCS.113.12.2309.
- Cecconi, Sandra, Carmen Ciccarelli, Marzia Barberi, Guido Macchiarelli, and Rita Canipari. 2004. “Granulosa Cell-Oocyte Interactions.” *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 115(SUPPL.):S19–22. doi: 10.1016/J.EJOGRB.2004.01.010.
- Chang, Chung Te, Natalia Bercovich, Belinda Loh, Stefanie Jonas, and Elisa Izaurralde. 2014. “The Activation of the Decapping Enzyme DCP2 by DCP1 Occurs on the EDC4 Scaffold and Involves a Conserved Loop in DCP1.” *Nucleic Acids Research* 42(8):5217–33. doi: 10.1093/NAR/GKU129.
- Chang, Hyeshik, Jaechul Lim, Minju Ha, and V. Narry Kim. 2014. “TAIL-Seq: Genome-Wide Determination of Poly(A) Tail Length and 3’ End Modifications.” *Molecular Cell* 53(6):1044–52. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2014.02.007.
- Charenton, Clément, Valerio Taverniti, Claudine Gaudon-Plesse, Régis Back, Bertrand Séraphin, and Marc Graille. 2016. “Structure of the Active Form of Dcp1-Dcp2 Decapping Enzyme Bound to M7GDP and Its Edc3 Activator.” *Nature Structural & Molecular Biology* 23(11):982–86. doi: 10.1038/NSMB.3300.
- Charlesworth, Amanda, Anna Wilczynska, Prajitha Thampi, Linda L. Cox, and Angus M. MacNicol. 2006. “Musashi Regulates the Temporal Order of MRNA Translation during Xenopus Oocyte Maturation.” *The EMBO Journal* 25(12):2792–2801. doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7601159.

- Charlesworth, Amanda, Tomomi M. Yamamoto, Jonathan M. Cook, Kevin D. Silva, Cassandra V. Kotter, Gwendolyn S. Carter, Justin W. Holt, Heather F. Lavender, Angus M. MacNicol, Yi Ying Wang, and Anna Wilczynska. 2012. “Xenopus Laevis Zygote Arrest 2 (Zar2) Encodes a Zinc Finger RNA-Binding Protein That Binds to the Translational Control Sequence in the Maternal Wee1 mRNA and Regulates Translation.” *Developmental Biology* 369(2):177–90. doi: 10.1016/J.YDBIO.2012.06.012.
- Chassot, Anne-Amandine, Morgane Le Rolle, Geneviève Jolivet, Isabelle Stevant, Jean-Marie Guigonis, Fabio Da Silva, Serge Nef, Eric Pailhoux, Andreas Schedl, Norbert B. Ghyselinck, and Marie-Christine Chaboissier. 2020. *D E V E L O P M E N T A L B I O L O G Y*.
- Chen, Hung-Ta, and Steven Hahn. 2003. *Binding of TFIIB to RNA Polymerase II: Mapping the Binding Site for the TFIIB Zinc Ribbon Domain within the Preinitiation Complex Archaeal TFB and Eukaryotic TFIIB Likely Function by a Similar Mechanism in Directing the Initiation Process as Demonstrated by Biochemical and Structural Studies*. Vol. 12.
- Chen, Hung-Ta, Linda Warfield, and Steven Hahn. 2008. *The Positions of TFIIF and TFIIE in the RNA Polymerase II Transcription Preinitiation Complex*.
- Chen, Jing, Collin Melton, Nayoung Suh, Jeong Su Oh, Kathleen Horner, Fang Xie, Claudio Sette, Robert Blelloch, and Marco Conti. 2011. “Genome-Wide Analysis of Translation Reveals a Critical Role for Deleted in Azoospermia-like (Dazl) at the Oocyte-to-Zygote Transition.” *Genes & Development* 25(7):755–66. doi: 10.1101/GAD.2028911.
- Chen, Zheng, and James L. Manley. 2003. “In Vivo Functional Analysis of the Histone 3-like TAF9 and a TAF9-Related Factor, TAF9L.” *The Journal of Biological Chemistry* 278(37):35172–83. doi: 10.1074/JBC.M304241200.
- Chen, Zhuo Angel, Anass Jawhari, Lutz Fischer, Claudia Buchen, Salman Tahir, Tomislav Kamenski, Morten Rasmussen, Laurent Lariviere, Jimi Carlo Bukowski-Wills, Michael Nilges, Patrick Cramer, and Juri Rappsilber. 2010. “Architecture of the RNA Polymerase II-TFIIF Complex Revealed by Cross-Linking and Mass Spectrometry.” *EMBO Journal* 29(4):717–26. doi: 10.1038/emboj.2009.401.

- Cheng, Shiya, Gerrit Altmeyden, Chun So, Luisa M. Welp, Sarah Penir, Torben Ruhwedel, Katerina Menelaou, Katarina Harasimov, Alexandra Stützer, Martyn Blayney, Kay Elder, Wiebke Möbius, Henning Urlaub, and Melina Schuh. 2022. “Mammalian Oocytes Store MRNAs in a Mitochondria-Associated Membraneless Compartment.” *Science* 378(6617). doi: 10.1126/SCIENCE.ABQ4835/SUPPL_FILE/SCIENCE.ABQ4835_MDAR_REPRODUCIBILITY_CHECKLIST.PDF.
- Chiquoine, A. Duncan. 1954. “The Identification, Origin, and Migration of the Primordial Germ Cells in the Mouse Embryo.” *The Anatomical Record* 118(2):135–46. doi: 10.1002/ar.1091180202.
- Cho, Eun Jung, Toshimitsu Takagi, Christine R. Moore, and Stephen Buratowski. 1997. “MRNA Capping Enzyme Is Recruited to the Transcription Complex by Phosphorylation of the RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain.” *Genes & Development* 11(24):3319. doi: 10.1101/GAD.11.24.3319.
- Christou-Kent, Marie, Magali Dhellemmes, Emeline Lambert, Pierre F. Ray, and Christophe Arnoult. 2020. “Diversity of RNA-Binding Proteins Modulating Post-Transcriptional Regulation of Protein Expression in the Maturing Mammalian Oocyte.” *Cells* 9(3).
- Christou-Kent, Marie, Zine-Eddine Kherraf, Amir Amiri-Yekta, Emilie Le Blévec, Thomas Karaouzène, Béatrice Conne, Jessica Escoffier, Said Assou, Audrey Guttin, Emeline Lambert, Guillaume Martinez, Magalie Boguenet, Selima Fourati Ben Mustapha, Isabelle Cedrin Durnerin, Lazhar Halouani, Ouafi Marrakchi, Mounir Makni, Habib Latrous, Mahmoud Kharouf, Charles Coutton, Nicolas Thierry-Mieg, Serge Nef, Serge P. Bottari, Raoudha Zouari, Jean Paul Issartel, Pierre F. Ray, and Christophe Arnoult. 2018. “PATL 2 Is a Key Actor of Oocyte Maturation Whose Invalidation Causes Infertility in Women and Mice.” *EMBO Molecular Medicine* 10(5). doi: 10.15252/emmm.201708515.
- Clapier, Cedric R., Janet Iwasa, Bradley R. Cairns, and Craig L. Peterson. 2017. “Mechanisms of Action and Regulation of ATP-Dependent Chromatin-Remodelling Complexes.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(7):407–22.
- Clerici, Marcello, Marco Faini, Lena M. Muckenfuss, Ruedi Aebersold, and Martin Jinek. 2018. “Structural Basis of AAUAAA Polyadenylation Signal Recognition

- by the Human CPSF Complex.” *Nature Structural & Molecular Biology* 2018 25:2 25(2):135–38. doi: 10.1038/s41594-017-0020-6.
- Coin, Frédéric, Etienne Bergmann, Alexandre Tremeau-Bravard, and Jean Marc Egly. 1999. “Mutations in XPB and XPD Helicases Found in Xeroderma Pigmentosum Patients Impair the Transcription Function of TFIIH.” *The EMBO Journal* 18(5):1357–66. doi: 10.1093/EMBOJ/18.5.1357.
- Colin, Alexandra, Gaëlle Letort, Nitzan Razin, Maria Almonacid, Wylie Ahmed, Timo Betz, Marie Emilie Terret, Nir S. Gov, Raphaël Voituriez, Zoher Gueroui, and Marie Hélène Verlhac. 2020. “Active Diffusion in Oocytes Nonspecifically Centers Large Objects during Prophase I and Meiosis I.” *The Journal of Cell Biology* 219(3). doi: 10.1083/JCB.201908195.
- Collier, Brian, Barbara Gorgoni, Carolyn Loveridge, Howard J. Cooke, and Nicola K. Gray. 2005. “The DAZL Family Proteins Are PABP-Binding Proteins That Regulate Translation in Germ Cells.” *The EMBO Journal* 24(14):2656. doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7600738.
- Conaway, Ronald C., and Joan Weliky Conaway. 1989. *An RNA Polymerase II Transcription Factor Has an Associated DNA-Dependent ATPase (DATPase) Activity Strongly Stimulated by the TATA Region of Promoters (Messenger RNA Synthesis/Core Promoter/Run-off Transcription)*. Vol. 86.
- Connelly, S., and J. L. Manley. 1988. “A Functional mRNA Polyadenylation Signal Is Required for Transcription Termination by RNA Polymerase II.” *Genes & Development* 2(4):440–52. doi: 10.1101/GAD.2.4.440.
- Connors, Stephanie A., Mito Kanatsu-Shinohara, Richard M. Schultz, and Gregory S. Kopf. 1998. “Involvement of the Cytoskeleton in the Movement of Cortical Granules during Oocyte Maturation, and Cortical Granule Anchoring in Mouse Eggs.” *Developmental Biology* 200(1):103–15. doi: 10.1006/DBIO.1998.8945.
- Conti, Marco, Carsten B. Andersen, François J. Richard, Keiji Shitsukawa, and Alex Tsafiriri. 1998. “Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Resumption of Meiosis.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 145(1–2):9–14. doi: 10.1016/S0303-7207(98)00187-7.
- Cordeiro, Marília H., So Youn Kim, Katherine Ebbert, Francesca E. Duncan, João Ramalho-Santos, and Teresa K. Woodruff. 2015. “Geography of Follicle Formation in the Embryonic Mouse Ovary Impacts Activation Pattern during

- the First Wave of Folliculogenesis.” *Biology of Reproduction* 93(4). doi: 10.1095/biolreprod.115.131227.
- Cougot, Nicolas, Sylvie Babajko, and Bertrand Séraphin. 2004. “Cytoplasmic Foci Are Sites of mRNA Decay in Human Cells.” *The Journal of Cell Biology* 165(1):31. doi: 10.1083/JCB.200309008.
- Cragle, Chad E., Melanie C. MacNicol, Stephanie D. Byrum, Linda L. Hardy, Samuel G. Mackintosh, William A. Richardson, Nicola K. Gray, Gwen V. Childs, Alan J. Tackett, and Angus M. MacNicol. 2019. “Musashi Interaction with Poly(A)-Binding Protein Is Required for Activation of Target mRNA Translation.” *Journal of Biological Chemistry* 294(28):10969–86. doi: 10.1074/JBC.RA119.007220.
- Dahl, John Arne, Inkyung Jung, Håvard Aanes, Gareth D. Greggains, Adeel Manaf, Mads Lerdrup, Guoqiang Li, Samantha Kuan, Bin Li, Ah Young Lee, Sebastian Preissl, Ingunn Jermstad, Mads Haugland Haugen, Rajikala Suganthan, Magnar Bjørås, Klaus Hansen, Knut Tomas Dalen, Peter Fedorcsak, Bing Ren, and Arne Klungland. 2016. “Broad Histone H3K4me3 Domains in Mouse Oocytes Modulate Maternal-to-Zygotic Transition.” *Nature* 537(7621):548–52. doi: 10.1038/nature19360.
- Dai, Xing Xing, Jun Chao Jiang, Qian Qian Sha, Yu Jiang, Xiang Hong Ou, and Heng Yu Fan. 2019. “A Combinatorial Code for mRNA 3'-UTR-Mediated Translational Control in the Mouse Oocyte.” *Nucleic Acids Research* 47(1):328–40. doi: 10.1093/NAR/GKY971.
- Dai, Xing Xing, Shuai Bo Pi, Long Wen Zhao, Yun Wen Wu, Jing Ling Shen, Song Ying Zhang, Qian Qian Sha, and Heng Yu Fan. 2022. “PABPN1 Functions as a Hub in the Assembly of Nuclear Poly(A) Domains That Are Essential for Mouse Oocyte Development.” *Science Advances* 8(43). doi: 10.1126/SCIADV.ABN9016.
- Dankert, Debora, Hannah Demond, Tom Trapphoff, Martyna Heiligentag, Katrin Rademacher, Ursula Eichenlaub-Ritter, Bernhard Horsthemke, and Ruth Grü Mmer. 2014. “Pre-and Postovulatory Aging of Murine Oocytes Affect the Transcript Level and Poly(A) Tail Length of Maternal Effect Genes.” doi: 10.1371/journal.pone.0108907.

BIBLIOGRAPHIE

- Deato, Maria Divina E., Michael T. Marr, Theo Sottero, Carla Inouye, Ping Hu, and Robert Tjian. 2008. "MyoD Targets TAF3 /TRF3 to Activate Myogenin Transcription." *Molecular Cell* 32(1):96. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2008.09.009.
- Deato, Maria Divina E., and Robert Tjian. 2007. "Switching of the Core Transcription Machinery during Myogenesis." *Genes & Development* 21(17):2137. doi: 10.1101/GAD.1583407.
- Delgadillo, Roberto F., Jo Dell E. Whittington, Laura K. Parkhurst, and Lawrence J. Parkhurst. 2009. "The TATA-Binding Protein Core Domain in Solution Variably Bends TATA Sequences via a Three-Step Binding Mechanism." *Biochemistry* 48(8):1801–9. doi: 10.1021/bi8018724.
- Demini, Leïla, Christine Kervarrec, Laëtitia Guillot, Emmanuelle Com, Régis Lavigne, Pierre Yves Kernanec, Michael Primig, Charles Pineau, Fabrice G. Petit, and Soazik P. Jamin. 2023. "Inactivation of Exosc10 in the Oocyte Impairs Oocyte Development and Maturation, Leading to a Depletion of the Ovarian Reserve in Mice." *International Journal of Biological Sciences* 19(4):1080–93. doi: 10.7150/ijbs.72889.
- Deo, Rahul C., Jeffrey B. Bonanno, Nahum Sonenberg, and Stephen K. Burley. 1999. "Recognition of Polyadenylate RNA by the Poly(A)-Binding Protein." *Cell* 98(6):835–45. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81517-2.
- Dhandapani, Laasya, Marion C. Salzer, Juan M. Duran, Gabriele Zaffagnini, Cristian de Guirior, Maria Angeles Martinez-Zamora, and Elvan Böke. 2022. "Comparative Analysis of Vertebrates Reveals That Mouse Primordial Oocytes Do Not Contain a Balbiani Body." *Journal of Cell Science* 135(1). doi: 10.1242/JCS.259394/VIDEO-6.
- Van Dijk, Erwin, Nicolas Cougot, Sylke Meyer, Sylvie Babajko, Elmar Wahle, and Bertrand Séraphin. 2002. "Human Dcp2: A Catalytically Active mRNA Decapping Enzyme Located in Specific Cytoplasmic Structures." *The EMBO Journal* 21(24):6915–24. doi: 10.1093/EMBOJ/CDF678.
- Doidge, Rachel, Saloni Mittal, Akhmed Aslam, and G. Sebastiaan Winkler. 2012. "Deadenylation of Cytoplasmic mRNA by the Mammalian Ccr4-Not Complex." *Biochemical Society Transactions* 40(4):896–901. doi: 10.1042/BST20120074.

- Du, Hao, Ya Zhao, Jinqiu He, Yao Zhang, Hairui Xi, Mofang Liu, Jinbiao Ma, and Ligang Wu. 2016. “YTHDF2 Destabilizes M6A-Containing RNA through Direct Recruitment of the CCR4–NOT Deadenylase Complex.” *Nature Communications* 2016 7:1 7(1):1–11. doi: 10.1038/ncomms12626.
- Ducibella, T., P. Duffy, and J. Buetow. 1994. “Quantification and Localization of Cortical Granules during Oogenesis in the Mouse.” *Biology of Reproduction* 50(3):467–73. doi: 10.1095/BIOLREPROD50.3.467.
- Dumdie, Jennifer N., Kyuchool Cho, Madhuvanthi Ramaiah, David Skarbrevik, Sergio Mora-Castilla, Deborah J. Stumpo, Jens Lykke-Andersen, Louise C. Laurent, Perry J. Blackshear, Miles F. Wilkinson, and Heidi Cook-Andersen. 2018. “Chromatin Modification and Global Transcriptional Silencing in the Oocyte Mediated by the mRNA Decay Activator ZFP36L2.” *Developmental Cell* 44(3):392–402.e7. doi: 10.1016/j.devcel.2018.01.006.
- Duran-Arqué, Berta, Manuel Cañete, Chiara Lara Castellazzi, Anna Bartomeu, Anna Ferrer-Caelles, Oscar Reina, Adrià Caballé, Marina Gay, Gianluca Arauz-Garofalo, Eulalia Belloc, and Raúl Mendez. 2022. “Comparative Analyses of Vertebrate CPEB Proteins Define Two Subfamilies with Coordinated yet Distinct Functions in Post-Transcriptional Gene Regulation.” *Genome Biology* 23(1). doi: 10.1186/S13059-022-02759-Y.
- Eaton, Joshua D., Laura Francis, Lee Davidson, and Steven West. 2020. “A Unified Allosteric/Torpedo Mechanism for Transcriptional Termination on Human Protein-Coding Genes.” *Genes & Development* 34(1–2):132–45. doi: 10.1101/GAD.332833.119/-/DC1.
- Edery, I., and N. Sonenberg. 1985. “Cap-Dependent RNA Splicing in a HeLa Nuclear Extract.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(22):7590. doi: 10.1073/PNAS.82.22.7590.
- Egea, Gustavo, Francisco Lázaro-Diéguéz, and Montserrat Vilella. 2006. “Actin Dynamics at the Golgi Complex in Mammalian Cells.” *Current Opinion in Cell Biology* 18(2):168–78. doi: 10.1016/J.CEB.2006.02.007.
- Egloff, Sylvain, Martin Dienstbier, and Shona Murphy. 2012. “Updating the RNA Polymerase CTD Code: Adding Gene-Specific Layers.” *Trends in Genetics* 28(7):333–41.

- Eppig, John J., and Mary Ann Handel. 2012. “Origins of Granulosa Cells Clarified and Complexified by Waves.” *Biology of Reproduction* 86(2).
- Ermisch, Alison F., and Jennifer R. Wood. 2024. “Regulation of Oocyte mRNA Metabolism: A Key Determinant of Oocyte Developmental Competence.” *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology* 238:23–46. doi: 10.1007/978-3-031-55163-5_2.
- Ezzati, M. Max, Michael D. Baker, Hatice D. Saatcioglu, Gina M. Aloisio, Christopher G. Pena, Yuji Nakada, Ileana Cuevas, Bruce R. Carr, and Diego H. Castrillon. 2015. “Regulation of FOXO3 Subcellular Localization by Kit Ligand in the Neonatal Mouse Ovary.” *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32(12):1741–47. doi: 10.1007/s10815-015-0589-9.
- Falender, Allison E., Richard N. Freiman, Kenneth G. Geles, Kirk C. Lo, Keum Sil Hwang, Dolores J. Lamb, Patricia L. Morris, Robert Tjian, and Jo Anne S. Richards. 2005. “Maintenance of Spermatogenesis Requires TAF4b, a Gonad-Specific Subunit of TFIID.” *Genes and Development* 19(7):794–803. doi: 10.1101/gad.1290105.
- Falender, Allison E., Masayuki Shimada, Yuet K. Lo, and Jo Anne S. Richards. 2005. “TAF4b, a TBP Associated Factor, Is Required for Oocyte Development and Function.” *Developmental Biology* 288(2):405–19. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.09.038.
- Fang, Shi Min, and Zachary F. Burton. 1996. “RNA Polymerase II-Associated Protein (RAP) 74 Binds Transcription Factor (TF) IIB and Blocks TFIIB-RAP30 Binding.” *Journal of Biological Chemistry* 271(20):11703–9. doi: 10.1074/jbc.271.20.11703.
- Feaver, William 4., Jesper Q. Svejstrup, N. Lynn Henry, and Roger D. Kornberg. 1994. *Relationship of CDK-Activating Kinase and RNA Polymerase II CTD Kinase TFIIH/TFIIF*. Vol. 79.
- Fischer, Veronique, Vincent Hisler, Elisabeth Scheer, Elisabeth Lata, Bastien Morlet, Damien Plassard, Dominique Helmlinger, Didier Devys, László Tora, and Stephane D. Vincent. 2022. “SUPT3H-Less SAGA Coactivator Can Assemble and Function without Significantly Perturbing RNA Polymerase II Transcription in Mammalian Cells.” *Nucleic Acids Research* 50(14):7972–90. doi: 10.1093/nar/gkac637.

- Flemr, Matyas, Jun Ma, Richard M. Schultz, and Petr Svoboda. 2010. "P-Body Loss Is Concomitant with Formation of a Messenger RNA Storage Domain in Mouse Oocytes." *Biology of Reproduction* 82(5):1008–17. doi: 10.1095/biolreprod.109.082057.
- Flores, O., E. Maldonado, and D. Reinberg. 1989. "Factors Involved in Specific Transcription by Mammalian RNA Polymerase II." *Journal of Biological Chemistry* 264(15):8913–21. doi: 10.1016/s0021-9258(18)81880-4.
- Floress, Osvaldo, Ilho Ha, and Danny Reinbergg. 1990. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Factors Involved in Specific Transcription by Mammalian RNA Polymerase II PURIFICATION AND SUBUNIT COMPOSITION OF TRANSCRIPTION FACTOR IIF**. Vol. 265.
- Freiman, R. N., S. R. Albright, S. Zheng, W. C. Sha, R. E. Hammer, and R. Tjian. 2001. "Requirement of Tissue-Selective TBP-Associated Factor TAFII105 in Ovarian Development." *Science (New York, N.Y.)* 293(5537):2084–87. doi: 10.1126/SCIENCE.1061935.
- Freimann, Albright, Zheng. 2001. "Requirement of Tissue-Selective TBP-Associated Factor TAFII105 in Ovarian Development." *Science* 293(5537):4. doi: 10.1126.
- Frontini, Mattia, Evi Soutoglou, Manuela Argentini, Christine Bole-Feysot, Bernard Jost, Elisabeth Scheer, and László Tora. 2005. "TAF9b (Formerly TAF9L) Is a Bona Fide TAF That Has Unique and Overlapping Roles with TAF9." *Molecular and Cellular Biology* 25(11):4638–49. doi: 10.1128/MCB.25.11.4638-4649.2005.
- Frost, Emily R., Gönes Taylor, Mark A. Baker, Robin Lovell-Badge, and Jessie M. Sutherland. 2021. "Establishing and Maintaining Fertility: The Importance of Cell Cycle Arrest." *Genes and Development* 35(9–10):619–34. doi: 10.1101/GAD.348151.120.
- Fu, Xiang Dong, and Tom Maniatis. 1990. "Factor Required for Mammalian Spliceosome Assembly Is Localized to Discrete Regions in the Nucleus." *Nature* 1990 343:6257 343(6257):437–41. doi: 10.1038/343437a0.
- Fuda, Nicholas J., M. Behfar Ardehali, and John T. Lis. 2009. "Defining Mechanisms That Regulate RNA Polymerase II Transcription in Vivo." *Nature* 461(7261):186–92.

- Funakoshi, Yuji, Yusuke Doi, Nao Hosoda, Naoyuki Uchida, Masanori Osawa, Ichio Shimada, Masafumi Tsujimoto, Tsutomu Suzuki, Toshiaki Katada, and Shin Ichi Hoshino. 2007. "Mechanism of mRNA Deadenylation: Evidence for a Molecular Interplay between Translation Termination Factor ERF3 and mRNA Deadenylases." *Genes & Development* 21(23):3135–48. doi: 10.1101/GAD.1597707.
- Furuichi, Yasuhiro, Alba LaFiandra, and Aaron J. Shatkin. 1977. "5'-Terminal Structure and mRNA Stability." *Nature* 266(5599):235–39. doi: 10.1038/266235A0.
- Gaiser, Florian, Song Tan, and Timothy J. Richmond. 2000. "Novel Dimerization Fold of RAP30/RAP74 in Human TFIIF at 1.7 Å Resolution." *Journal of Molecular Biology* 302(5):1119–27. doi: 10.1006/jmbi.2000.4110.
- Gangloff, Yann Gaël, Christophe Romier, Sylvie Thuault, Sebastiaan Werten, and Irwin Davidson. 2001. "The Histone Fold Is a Key Structural Motif of Transcription Factor TFIID." *Trends in Biochemical Sciences* 26(4):250–57. doi: 10.1016/S0968-0004(00)01741-2.
- Gao, Fei, Sourindra Maiti, Nargis Alam, Zhen Zhang, Jian Min Deng, Richard R. Behringer, Charlotte Lécureuil, Florian Guillou, and Vicki Huff. 2006. "The Wilms Tumor Gene, Wt1, Is Required for Sox9 Expression and Maintenance of Tubular Architecture in the Developing Testis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(32):11987. doi: 10.1073/PNAS.0600994103.
- García-Castro, Martín I., Robert Anderson, Janet Heasman, and Christopher Wylie. 1997. "Interactions between Germ Cells and Extracellular Glycoproteins during Migration and Gonad in the Mouse Embryo." *The Journal of Cell Biology* 138(2):471. doi: 10.1083/JCB.138.2.471.
- Gazdag, Emese, Aleksandar Rajkovic, Maria Elena Torres-Padilla, and László Tora. 2007. "Analysis of TATA-Binding Protein 2 (TBP2) and TBP Expression Suggests Different Roles for the Two Proteins in Regulation of Gene Expression during Oogenesis and Early Mouse Development." *Reproduction* 134(1):51–62. doi: 10.1530/REP-06-0337.
- Gazdag, Emese, Angèle Santenard, Céline Ziegler-Birling, Gioia Altobelli, Olivier Poch, László Tora, and Maria Elena Torres-Padilla. 2009. "TBP2 Is Essential

- for Germ Cell Development by Regulating Transcription and Chromatin Condensation in the Oocyte.” *Genes and Development* 23(18):2210–23. doi: 10.1101/gad.535209.
- Gebauer, Fátima, and Joel D. Richter. 1997. “Synthesis and Function of Mos: The Control Switch of Vertebrate Oocyte Meiosis.” *BioEssays* 19(1):23–28. doi: 10.1002/BIES.950190106.
- Gegonne, A., X. Tai, J. Zhang, G. Wu, J. Zhu, A. Yoshimoto, J. Hanson, C. Cultraro, Q. R. Chen, T. Guinter, Z. Yang, K. Hathcock, A. Singer, J. Rodriguez-Canales, L. Tessarollo, S. Mackem, D. Meerzaman, K. Buetow, and D. S. Singer. 2012. “The General Transcription Factor TAF7 Is Essential for Embryonic Development but Not Essential for the Survival or Differentiation of Mature T Cells.” *Molecular and Cellular Biology* 32(10):1984–97. doi: 10.1128/mcb.06305-11.
- Geiger, James H., Steve Hahn, Sally Lee, and Paul B. Sigler. 1996. “Crystal Structure of the Yeast TFIIA/TBP/DNA Complex.” *Science* 272(5263):830–36. doi: 10.1126/science.272.5263.830.
- Ginsburg, Malka, Michael H. L. Snow, and Anne McLaren. 1990. “Primordial Germ Cells in the Mouse Embryo during Gastrulation.” *Development (Cambridge, England)* 110(2):521–28. doi: 10.1242/DEV.110.2.521.
- Girbig, Mathias, Agata D. Misiaszek, and Christoph W. Müller. 2022. “Structural Insights into Nuclear Transcription by Eukaryotic DNA-Dependent RNA Polymerases.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 23(9):603–22.
- Gordon, Jackson M., David V. Phizicky, Leonard Schärffen, Courtney L. Brown, Dahyana Arias Escayola, Jean Kanyo, TuKiet T. Lam, Matthew D. Simon, and Karla M. Neugebauer. 2024. “Phosphorylation of the Nuclear Poly(A) Binding Protein (PABPN1) during Mitosis Protects mRNA from Hyperadenylation and Maintains Transcriptome Dynamics.” *Nucleic Acids Research* 52(16):9886–9903. doi: 10.1093/NAR/GKAE562.
- Goudet, Ghylène, Sylvie Mugnier, Isabelle Callebaut, and Philippe Monget. 2008. “Phylogenetic Analysis and Identification of Pseudogenes Reveal a Progressive Loss of Zona Pellucida Genes During Evolution of Vertebrates.” *Biology of Reproduction* 78(5):796–806. doi: 10.1095/BIOLREPROD.107.064568.

- Gradwohl, Gérard, Andrée Dierich, Marianne LeMeur, and François Guillemot. 2000. "Neurogenin3 Is Required for the Development of the Four Endocrine Cell Lineages of the Pancreas." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(4):1607–11. doi: 10.1073/PNAS.97.4.1607.
- Griffith, Gillian J., Mary C. Trask, Jacob Hiller, Melanie Walentuk, John B. Pawlak, Kimberly D. Tremblay, and Jesse Mager. 2011. "Yin-Yang1 Is Required in the Mammalian Oocyte for Follicle Expansion." *Biology of Reproduction* 84(4):654–63. doi: 10.1095/BIOLREPROD.110.087213.
- Grinspon, Romina P., and Rodolfo A. Rey. 2019. "Molecular Characterization of XX Maleness." *International Journal of Molecular Sciences* 20(23).
- Grive, Kathryn J., Eric A. Gustafson, Kimberly A. Seymour, Melody Baddoo, Christoph Schorl, Kayla Golnoski, Aleksandar Rajkovic, Alexander S. Brodsky, and Richard N. Freiman. 2016. "TAF4b Regulates Oocyte-Specific Genes Essential for Meiosis." *PLoS Genetics* 12(6). doi: 10.1371/journal.pgen.1006128.
- Grive, Kathryn J., Kimberly A. Seymour, Rajvi Mehta, and Richard N. Freiman. 2014. "TAF4b Promotes Mouse Primordial Follicle Assembly and Oocyte Survival." *Developmental Biology* 392(1):42–51. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.05.001.
- Grünberg, Sebastian, Linda Warfield, and Steven Hahn. 2012. "Architecture of the RNA Polymerase II Preinitiation Complex and Mechanism of ATP-Dependent Promoter Opening." *Nature Structural and Molecular Biology* 19(8):788–96. doi: 10.1038/nsmb.2334.
- Gu, Wei, Seshadri Tekur, Rolland Reinbold, John J. Eppig, Young Chul Choi, Jenny Z. Zheng, Mary T. Murray, and Norman B. Hecht. 1998. "Mammalian Male and Female Germ Cells Express a Germ Cell-Specific Y-Box Protein, MSY2." *Biology of Reproduction* 59(5):1266–74. doi: 10.1095/BIOLREPROD59.5.1266.
- Gupta, Kapil, Duygu Sari-Ak, Matthias Haffke, Simon Trowitzsch, and Imre Berger. 2016a. "Zooming in on Transcription Preinitiation." *Journal of Molecular Biology* 428(12):2581–91.

- Gupta, Kapil, Duygu Sari-Ak, Matthias Haffke, Simon Trowitzsch, and Imre Berger. 2016b. “Zooming in on Transcription Preinitiation.” *Journal of Molecular Biology* 428(12):2581–91.
- Gupta, Kapil, Aleksandra A. Watson, Tiago Baptista, Elisabeth Scheer, Anna L. Chambers, Christine Koehler, Juan Zou, Ima Obong-Ebong, Eaazhisai Kandiah, Arturo Temblador, Adam Round, Eric Forest, Petr Man, Christoph Bieniossek, Ernest D. Laue, Edward A. Lemke, Juri Rappsilber, Carol V. Robinson, Didier Devys, László Tora, and Imre Berger. 2017. “Architecture of TAF11/TAF13/TBP Complex Suggests Novel Regulation Properties of General Transcription Factor TFIID.” *ELife* 6. doi: 10.7554/eLife.30395.
- Guraya, Sardul S. 1982. “Recent Progress in the Structure, Origin, Composition, and Function of Cortical Granules in Animal Egg.” *International Review of Cytology* 78(C):257–360. doi: 10.1016/S0074-7696(08)60108-4.
- Gurdon, J. B., R. A. Laskey, and O. R. Reeves. 1975. “The Developmental Capacity of Nuclei Transplanted from Keratinized Skin Cells of Adult Frogs.” *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 34(1):93–112. doi: 10.1242/dev.34.1.93.
- Guzeloglu-Kayisli, Ozlem, Samuel Pauli, Habibe Demir, Maria D. Lalioti, Denny Sakkas, and Emre Seli. 2008. “Identification and Characterization of Human Embryonic Poly(A) Binding Protein (EPAB).” *Molecular Human Reproduction* 14(10):581–88. doi: 10.1093/MOLEHR/GAN047.
- Hahn, Steven. 2004. “Structure and Mechanism of the RNA Polymerase II Transcription Machinery.” *Nature Structural and Molecular Biology* 11(5):394–403.
- Hake, Laura E., Raul Mendez, and Joel D. Richter. 1998. “Specificity of RNA Binding by CPEB: Requirement for RNA Recognition Motifs and a Novel Zinc Finger.” *Molecular and Cellular Biology* 18(2):685–93. doi: 10.1128/MCB.18.2.685.
- Hamazaki, Nobuhiko, Hirohisa Kyogoku, Hiromitsu Araki, Fumihito Miura, Chisako Horikawa, Norio Hamada, So Shimamoto, Orie Hikabe, Kinichi Nakashima, Tomoya S. Kitajima, Takashi Ito, Harry G. Leitch, and Katsuhiko Hayashi. 2021. “Reconstitution of the Oocyte Transcriptional Network with Transcription Factors.” 264 | *Nature* | 589. doi: 10.1038/s41586-020-3027-9.

- Hamilton, Keith, Yadong Sun, and Liang Tong. 2019. “Biophysical Characterizations of the Recognition of the AAUAAA Polyadenylation Signal.” *RNA* 25(12):1673–80. doi: 10.1261/RNA.070870.119/-/DC1.
- Hamm, Jörg, and Iain W. Mattaj. 1990. “Monomethylated Cap Structures Facilitate RNA Export from the Nucleus.” *Cell* 63(1):109–18. doi: 10.1016/0092-8674(90)90292-M.
- Hansen, Stig K., Shinako Takada, Raymond H. Jacobson, John T. Lis, and Robert Tjian. 1997. “Transcription Properties of a Cell Type–Specific TATA-Binding Protein, TRF.” *Cell* 91(1):71–83. doi: 10.1016/S0092-8674(01)80010-6.
- Hart, Daniel O., Tamal Raha, Nathan D. Lawson, and Michael R. Green. 2007. “Initiation of Zebrafish Haematopoiesis by the TATA-Box-Binding Protein-Related Factor Trf3.” *Nature* 450(7172):1082–85. doi: 10.1038/NATURE06349.
- Hawkes, Nicola A., and Stefan G. E. Roberts. 1999. *The Role of Human TFIIB in Transcription Start Site Selection in Vitro and in Vivo**. Vol. 274.
- He, Feng, and Allan Jacobson. 2023. “Eukaryotic mRNA Decapping Factors: Molecular Mechanisms and Activity.” *The FEBS Journal* 290(21):5057. doi: 10.1111/FEBS.16626.
- He, Wen Bin, Ya Xin Zhang, Chen Tan, Lan Lan Meng, Gang Liu, Yuan Li, Fei Gong, Bai Lin Wu, Guang Xiu Lu, Ge Lin, Juan Du, and Yue Qiu Tan. 2020. “A Recurrent Mutation in TBPL2 Causes Diminished Ovarian Reserve and Female Infertility.” *Journal of Genetics and Genomics* 47(12).
- He, Xinjian Doris, Shelby Phillips, Kaito Hioki, Prabin Dhangada Majhi, Courtney Babbitt, Kimberly D. Tremblay, Leonid A. Pobezinsky, and Jesse Mager. 2024. “TATA-Binding Associated Factors Have Distinct Roles during Early Mammalian Development.” *Developmental Biology* 511:53–62. doi: 10.1016/j.ydbio.2024.04.002.
- He, Yuan, Jie Fang, Dylan J. Taatjes, and Eva Nogales. 2013. “Structural Visualization of Key Steps in Human Transcription Initiation.” *Nature* 495(7442):481–86. doi: 10.1038/nature11991.
- Heinrich, Bianca, and James O. Deshler. 2009. “RNA Localization to the Balbiani Body in *Xenopus* Oocytes Is Regulated by the Energy State of the Cell and Is

- Facilitated by Kinesin II.” *RNA* (New York, N.Y.) 15(4):524–36. doi: 10.1261/RNA.975309.
- Helmlinger, Dominique, Gábor Papai, Didier Devys, and László Tora. 2021. “What Do the Structures of GCN5-Containing Complexes Teach Us about Their Function?” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1864(2).
- Helmlinger, Dominique, and László Tora. 2017. “Sharing the SAGA.” *Trends in Biochemical Sciences* 42(11):850–61. doi: 10.1016/j.tibs.2017.09.001.
- Hen, Gideon, and Dalit Sela-Donenfeld. 2019. “‘A Narrow Bridge Home’: The Dorsal Mesentery in Primordial Germ Cell Migration.” *Seminars in Cell and Developmental Biology* 92:97–104.
- Henriques, Telmo, Daniel A. Gilchrist, Sergei Nechaev, Michael Bern, Ginger W. Muse, Adam Burkholder, David C. Fargo, and Karen Adelman. 2013. “Stable Pausing by Rna Polymerase II Provides an Opportunity to Target and Integrate Regulatory Signals.” *Molecular Cell* 52(4):517–28. doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.001.
- Herrera, Francisco J., Teppei Yamaguchi, Henk Roelink, and Robert Tjian. 2014. “Core Promoter Factor TAF9B Regulates Neuronal Gene Expression.” *ELife* 3. doi: 10.7554/elif.02559.
- Hisler, Vincent, Paul Bardot, D. Vincent, Dylane Detilleux, Andrea Bernardini, Matthieu Stierle, Emmanuel Garcia Sanchez, Claire Richard, Lynda Hadj Arab, Cynthia Ehrhard, Bastien Morlet, Yavor Hadzhiev, Matthieu Jung, Sté Phanie, Le Gras, Luc Né, Ferenc M€, Lá Szló Tora, and Sté Phane. 2024. “RNA Polymerase II Transcription Initiation in Holo-TFIID-Depleted Mouse Embryonic Stem Cells.” *Cell Reports* 43(10):114791. doi: 10.1016/J.CELREP.2024.114791.
- Høiby, Torill, Dimitra J. Mitsiou, Huiqing Zhou, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, and Hendrik G. Stunnenberg. 2004. “Cleavage and Proteasome-Mediated Degradation of the Basal Transcription Factor TFIIA.” *EMBO Journal* 23(15):3083–91. doi: 10.1038/sj.emboj.7600304.
- Hosoda, Nao, Yuji Funakoshi, Masato Hirasawa, Ryota Yamagishi, Yukako Asano, Ryu Miyagawa, Koichi Ogami, Masafumi Tsujimoto, and Shin Ichi Hoshino. 2011. “Anti-Proliferative Protein Tob Negatively Regulates CPEB3 Target by

BIBLIOGRAPHIE

- Recruiting Caf1 DeadENylase.” *The EMBO Journal* 30(7):1311. doi: 10.1038/EMBOJ.2011.37.
- Hosoda, Nao, Fabrice Lejeune, and Lynne E. Maquat. 2006. “Evidence That Poly(A) Binding Protein C1 Binds Nuclear Pre-mRNA Poly(A) Tails.” *Molecular and Cellular Biology* 26(8):3085. doi: 10.1128/MCB.26.8.3085-3097.2006.
- Houston, Douglas W., and Mary Lou King. 2000. “A Critical Role for Xdazl, a Germ Plasm-Localized RNA, in the Differentiation of Primordial Germ Cells in *Xenopus*.” *Development (Cambridge, England)* 127(3):447–56. doi: 10.1242/DEV.127.3.447.
- Huang, Li, Guangnan Li, Chen Du, Yu Jia, Jiayi Yang, Weiliang Fan, Yong-Zhen Xu, Hong Cheng, and Yu Zhou. 2023. “The PolyA Tail Facilitates Splicing of Last Introns with Weak 3' Splice Sites via PABPN1 .” *EMBO Reports* 24(10). doi: 10.15252/EMBR.202357128/SUPPL_FILE/EMBR202357128-SUP-0006-SDATAEV.ZIP.
- Ilık, İbrahim Avşar, Michal Malszycki, Anna Katharina Lübke, Claudia Schade, David Meierhofer, and Tuğçe Aktaş. 2020. “SON and SRRM2 Are Essential for Nuclear Speckle Formation.” *ELife* 9:1–48. doi: 10.7554/ELIFE.60579.
- Indra, Arup Kumar, William S. Mohan, Mattia Frontini, Elisabeth Scheer, Nadia Messaddeq, Daniel Metzger, and László Tora. 2005. “TAF10 Is Required for the Establishment of Skin Barrier Function in Foetal, but Not in Adult Mouse Epidermis.” *Developmental Biology* 285(1):28–37. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.05.043.
- Ingelfinger, Dierk, Donna J. Arndt-Jovin, Reinhard Lührmann, and Tilmann Achsel. 2002. “The Human LSm1-7 Proteins Colocalize with the mRNA-Degrading Enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in Distinct Cytoplasmic Foci.” *RNA* 8(12):1489–1501. doi: 10.1017/S1355838202021726.
- Ivanova, Ivayla, Christian Much, Monica Di Giacomo, Chiara Azzi, Marcos Morgan, Pedro N. Moreira, Jack Monahan, Claudia Carrieri, Anton J. Enright, and Dónal O’Carroll. 2017. “The RNA M6A Reader YTHDF2 Is Essential for the Post-Transcriptional Regulation of the Maternal Transcriptome and Oocyte Competence.” *Molecular Cell* 67(6):1059-1067.e4. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2017.08.003.

- Iwafuchi-Doi, Makiko. 2019. "The Mechanistic Basis for Chromatin Regulation by Pioneer Transcription Factors." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 11(1).
- Jacobi, Ulrike G., Robert C. Akkers, Elisabeth S. Pierson, Daniel L. Weeks, John M. Dagle, and Gert Jan C. Veenstra. 2007. "TBP Paralogs Accommodate Metazoan- and Vertebrate-Specific Developmental Gene Regulation." *The EMBO Journal* 26(17):3900–3909. doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7601822.
- Jagarlamudi, Krishna, Pradeep Reddy, Deepak Adhikari, and Kui Liu. 2010. "Genetically Modified Mouse Models for Premature Ovarian Failure (POF)." *Molecular and Cellular Endocrinology* 315(1–2):1–10.
- Jallow, Zainab, Ulrike G. Jacobi, Daniel L. Weeks, Igor B. Dawid, and Gert Jan C. Veenstra. 2004. "Specialized and Redundant Roles of TBP and a Vertebrate-Specific TBP Paralog in Embryonic Gene Regulation in *Xenopus*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(37):13525–30. doi: 10.1073/PNAS.0405536101/ASSET/D246AA28-932F-44F2-876D-3693B366B3B2/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ0370459680005.JPEG.
- Jamieson-Lucy, Allison, and Mary C. Mullins. 2019. "The Vertebrate Balbiani Body, Germ Plasm, and Oocyte Polarity." *Current Topics in Developmental Biology* 135:1–34. doi: 10.1016/BS.CTDB.2019.04.003.
- Jänicke, Amrei, John Vancuylenberg, Peter R. Boag, Ana Traven, and Traude H. Beilharz. 2012a. "EPAT: A Simple Method to Tag Adenylated RNA to Measure Poly(A)-Tail Length and Other 3' RACE Applications." *RNA* 18(6). doi: 10.1261/rna.031898.111.
- Jänicke, Amrei, John Vancuylenberg, Peter R. Boag, Ana Traven, and Traude H. Beilharz. 2012b. "EPAT: A Simple Method to Tag Adenylated RNA to Measure Poly(A)-Tail Length and Other 3' RACE Applications." *RNA* 18(6):1289. doi: 10.1261/RNA.031898.111.
- Jansova, Denisa, Marketa Koncicka, Anna Tetkova, Renata Cerna, Radek Malik, Edgar del Llano, Michal Kubelka, and Andrej Susor. 2017. "Regulation of 4E-BP1 Activity in the Mammalian Oocyte." *Cell Cycle* 16(10):927. doi: 10.1080/15384101.2017.1295178.

- Jansova, Denisa, Anna Tetkova, Marketa Koncicka, Michal Kubelka, and Andrej Susor. 2018. "Localization of RNA and Translation in the Mammalian Oocyte and Embryo." *PLoS ONE* 13(3). doi: 10.1371/journal.pone.0192544.
- Jarred, Ellen G., Zhipeng Qu, Tesha Tsai, Ruby Oberin, Sigrid Petautschnig, Heidi Bildsoe, Stephen Pederson, Qing hua Zhang, Jessica M. Stringer, John Carroll, David K. Gardner, Maarten Van den Buuse, Natalie A. Sims, William T. Gibson, David L. Adelson, and Patrick S. Western. 2022. "Transient Polycomb Activity Represses Developmental Genes in Growing Oocytes." *Clinical Epigenetics* 14(1). doi: 10.1186/S13148-022-01400-W.
- Jenal, Mathias, Ran Elkon, Fabricio Loayza-Puch, Gijs Van Haaften, Uwe Kühn, Fiona M. Menzies, Joachim A. F. Oude Vrielink, Arnold J. Bos, Jarno Drost, Koos Rooijers, David C. Rubinsztein, and Reuven Agami. 2012. "The Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1 Suppresses Alternative Cleavage and Polyadenylation Sites." *Cell* 149(3):538–53. doi: 10.1016/J.CELL.2012.03.022/ATTACHMENT/3C33EDA8-A9C7-48A2-8C45-F60441BF9DE8/MMC7.PDF.
- Jentoft, Ida M. A., Felix J. B. Bäuerlein, Luisa M. Welp, Benjamin H. Cooper, Arsen Petrovic, Chun So, Sarah Mae Penir, Antonio Z. Politi, Yehor Horokhovskiy, Iina Takala, Heike Eckel, Rüdiger Moltrecht, Peter Lénárt, Tommaso Cavazza, Juliane Liepe, Nils Brose, Henning Urlaub, Rubén Fernández-Busnadiego, and Melina Schuh. 2023. "Mammalian Oocytes Store Proteins for the Early Embryo on Cytoplasmic Lattices." *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2023.10.003.
- Jia, Guifang, Ye Fu, Xu Zhao, Qing Dai, Guanqun Zheng, Ying Yang, Chengqi Yi, Tomas Lindahl, Tao Pan, Yun Gui Yang, and Chuan He. 2011. "N6-Methyladenosine in Nuclear RNA Is a Major Substrate of the Obesity-Associated FTO." *Nature Chemical Biology* 2011 7:12 7(12):885–87. doi: 10.1038/nchembio.687.
- Jia, Jia Lin, Young Hyun Han, Hak Cheol Kim, Mija Ahn, Jeong Woo Kwon, Yibo Luo, Pethaiah Gunasekaran, Soo Jae Lee, Kyung S. Lee, Jeong Kyu Bang, Nam Hyung Kim, and Suk Namgoong. 2015. "Structural Basis for Recognition of Emi2 by Polo-like Kinase 1 and Development of Peptidomimetics Blocking Oocyte Maturation and Fertilization." *Scientific Reports* 5. doi: 10.1038/SREP14626.

- Jiang, Jun Chao, Hua Zhang, Lan Rui Cao, Xing Xing Dai, Long Wen Zhao, Hong Bin Liu, and Heng Yu Fan. 2021. "Oocyte Meiosis-Coupled Poly(A) Polymerase α Phosphorylation and Activation Trigger Maternal mRNA Translation in Mice." *Nucleic Acids Research* 49(10):5867–80. doi: 10.1093/NAR/GKAB431.
- Jiang, Xue, Yu Cheng, Yuzhang Zhu, Caoling Xu, Qiaodan Li, Xuemei Xing, Wenqing Li, Jiaqi Zou, Lan Meng, Muhammad Azhar, Yuzhu Cao, Xianhong Tong, Weibing Qin, Xiaoli Zhu, and Jianqiang Bao. 2023. "Maternal NAT10 Orchestrates Oocyte Meiotic Cell-Cycle Progression and Maturation in Mice." *Nature Communications* 14(1). doi: 10.1038/s41467-023-39256-0.
- Jiang, Yanwen, Deepak Adhikari, Chunjin Li, and Xu Zhou. 2023. "Spatiotemporal Regulation of Maternal MRNAs during Vertebrate Oocyte Meiotic Maturation." *Biological Reviews* 98(3):900–930. doi: 10.1111/brv.12937.
- Jiang, Yonghui, Yue Liu, Feng Han, Jingjing Zhou, Xinze Zhang, Juntong Xu, Zhiheng Yu, Shigang Zhao, Fei Gao, and Han Zhao. 2020. "Loss of GM130 Does Not Impair Oocyte Meiosis and Embryo Development in Mice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 532(3):336–40. doi: 10.1016/J.BBRC.2020.08.055.
- Jiang, Zhi Yan, and Heng Yu Fan. 2022. "Five Questions toward mRNA Degradation in Oocytes and Preimplantation Embryos: When, Who, to Whom, How, and Why?" *Biology of Reproduction* 107(1):62–75. doi: 10.1093/biolre/ioac014.
- John, George B., Teresa D. Gallardo, Lane J. Shirley, and Diego H. Castrillon. 2008. "Foxo3 Is a PI3K-Dependent Molecular Switch Controlling the Initiation of Oocyte Growth." *Developmental Biology* 321(1):197–204. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.06.017.
- John, George B., Meredith J. Shidler, Peter Besmer, and Diego H. Castrillon. 2009. "Kit Signaling via PI3K Promotes Ovarian Follicle Maturation but Is Dispensable for Primordial Follicle Activation." *Developmental Biology* 331(2):292–99. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.05.546.
- Jones, Keith T. 2004. "Turning It on and off: M-Phase Promoting Factor during Meiotic Maturation and Fertilization." *Molecular Human Reproduction* 10(1):1–5. doi: 10.1093/MOLEHR/GAH009.

- Al Jord, Adel, Gaëlle Letort, Soline Chanet, Feng Ching Tsai, Christophe Antoniewski, Adrien Eichmuller, Christelle Da Silva, Jean René Huynh, Nir S. Gov, Raphaël Voituriez, Marie Émilie Terret, and Marie Hélène Verlhac. 2022. “Cytoplasmic Forces Functionally Reorganize Nuclear Condensates in Oocytes.” *Nature Communications* 13(1). doi: 10.1038/s41467-022-32675-5.
- Juven-Gershon, Tamar, and James T. Kadonaga. 2010. “Regulation of Gene Expression via the Core Promoter and the Basal Transcriptional Machinery.” *Developmental Biology* 339(2):225–29. doi: 10.1016/J.YDBIO.2009.08.009.
- Kageyama, S., W. Gunji, M. Nakasato, Y. Murakami, M. Nagata, and F. Aoki. 2007. “Analysis of Transcription Factor Expression during Oogenesis and Preimplantation Development in Mice.” *Zygote* 15(2):117–28. doi: 10.1017/S096719940700411X.
- Kahvejian, Avak, Yuri V. Svitkin, Rami Sukarieh, Marie Noël M’Boutchou, and Nahum Sonenberg. 2005. “Mammalian Poly(A)-Binding Protein Is a Eukaryotic Translation Initiation Factor, Which Acts via Multiple Mechanisms.” *Genes & Development* 19(1):104. doi: 10.1101/GAD.1262905.
- Kamenova, Ivanka, Pooja Mukherjee, Sascha Conic, Florian Mueller, Farrah El-Saafin, Paul Bardot, Jean Marie Garnier, Doulaye Dembele, Simona Capponi, H. T. Marc Timmers, Stéphane D. Vincent, and László Tora. 2019. “Co-Translational Assembly of Mammalian Nuclear Multisubunit Complexes.” *Nature Communications* 10(1). doi: 10.1038/s41467-019-09749-y.
- Kandiah, Eaazhisai, Simon Trowitzsch, Kapil Gupta, Matthias Haffke, and Imre Berger. 2014. “More Pieces to the Puzzle: Recent Structural Insights into Class II Transcription Initiation.” *Current Opinion in Structural Biology* 24(1).
- Kaneda, Masahiro, Masaki Okano, Kenichiro Hata, Takashi Sado, Haomi Tsujimoto, En Li, and Hiroyuki Sasaki. 2004. “Essential Role for de Novo DNA Methyltransferase Dnmt3a in Paternal and Maternal Imprinting.” *Nature* 429(6994):900–903. doi: 10.1038/NATURE02633.
- Kato, Yuzuru, Masahiro Kaneda, Kenichiro Hata, Kenji Kumaki, Mizue Hisano, Yuji Kohara, Masaki Okano, En Li, Masami Nozaki, and Hiroyuki Sasaki. 2007. “Role of the Dnmt3 Family in de Novo Methylation of Imprinted and Repetitive Sequences during Male Germ Cell Development in the Mouse.” *Human Molecular Genetics* 16(19):2272–80. doi: 10.1093/HMG/DDM179.

- Kerwitz, Yvonne, Uwe Kühn, Hauke Lilie, Anne Knoth, Till Scheuermann, Henning Friedrich, Elisabeth Schwarz, and Elmar Wahle. 2003. “Stimulation of Poly(A) Polymerase through a Direct Interaction with the Nuclear Poly(A) Binding Protein Allosterically Regulated by RNA.” *The EMBO Journal* 22(14):3705–14. doi: 10.1093/EMBOJ/CDG347.
- Kim, Nam Hyung, Billy N. Day, Hoon Taek Lee, and Kil Saeng Chung. 1996. “Microfilament Assembly and Cortical Granule Distribution during Maturation, Parthenogenetic Activation and Fertilisation in the Porcine Oocyte.” *Zygote (Cambridge, England)* 4(2):145–49. doi: 10.1017/S0967199400003026.
- King 2 Steinbach, Zoology: Briggs And, J. M. Ibid, H. Levi, and H. H. Ussing. 1951. *3 Lorente de No, R.* Vol. 167.
- Knowland, John, and Chris Graham. 1972. *RNA Synthesis at the Two-Cell Stage of Mouse Development.* Vol. 27.
- Konarska, Maria M., Richard A. Padgett, and Phillip A. Sharp. 1984. “Recognition of Cap Structure in Splicing in Vitro of mRNA Precursors.” *Cell* 38(3):731–36. doi: 10.1016/0092-8674(84)90268-X.
- Kosaka, Kyoko, Koichi Kawakami, Hiroshi Sakamoto, and Kunio Inoue. 2007. “Spatiotemporal Localization of Germ Plasm RNAs during Zebrafish Oogenesis.” *Mechanisms of Development* 124(4):279–89. doi: 10.1016/J.MOD.2007.01.003.
- Koster, Maria J. E., Berend Snel, and H. Th Marc Timmers. 2015. “Genesis of Chromatin and Transcription Dynamics in the Origin of Species.” *Cell* 161(4):724–36.
- Kostrewa, Dirk, Mirijam E. Zeller, Karim Jean Armache, Martin Seizl, Kristin Leike, Michael Thomm, and Patrick Cramer. 2009. “RNA Polymerase II-TFIIB Structure and Mechanism of Transcription Initiation.” *Nature* 462(7271):323–30. doi: 10.1038/nature08548.
- Kotani, Tomoya, Kaori Maehata, and Natsumi Takei. 2017. “Regulation of Translationally Repressed MRNAs in Zebrafish and Mouse Oocytes.” *Results and Problems in Cell Differentiation* 63:297–324. doi: 10.1007/978-3-319-60855-6_13.
- Krebs, Arnaud R., Krishanpal Karmodiya, Marianne Lindahl-Allen, Kevin Struhl, and László Tora. 2011. “SAGA and ATAC Histone Acetyl Transferase

- Complexes Regulate Distinct Sets of Genes and ATAC Defines a Class of P300-Independent Enhancers.” *Molecular Cell* 44(3). doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.037.
- Kühn, Uwe, Miriam Gündel, Anne Knoth, Yvonne Kerwitz, Sabine Rüdel, and Elmar Wahle. 2009. “Poly(A) Tail Length Is Controlled by the Nuclear Poly(A)-Binding Protein Regulating the Interaction between Poly(A) Polymerase and the Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor.” *The Journal of Biological Chemistry* 284(34):22803–14. doi: 10.1074/JBC.M109.018226.
- Kunitomi, Chisato, Mayra Romero, Enrico Maria Daldello, Karen Schindler, and Marco Conti. 2024. “Multiple Intersecting Pathways Are Involved in CPEB1 Phosphorylation and Regulation of Translation during Mouse Oocyte Meiosis.” *Development (Cambridge)* 151(11). doi: 10.1242/DEV.202712/352200/AM/MULTIPLE-INTERSECTING-PATHWAYS-ARE-INVOLVED-IN.
- Kuriya, Kenji, Eriko Higashiyama, Eriko Avşar-Ban, Nanami Okochi, Kaede Hattori, Shin Ogata, Shin Ichiro Takebayashi, Masato Ogata, Yutaka Tamaru, and Katsuzumi Okumura. 2016. “Direct Visualization of Replication Dynamics in Early Zebrafish Embryos.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80(5):945–48. doi: 10.1080/09168451.2016.1141039.
- Kwiatek, Lauren, Anne Marie Landry-Voyer, Mélodie Latour, Carlo Yague-Sanz, and Francois Bachand. 2023. “PABPN1 Prevents the Nuclear Export of an Unspliced RNA with a Constitutive Transport Element and Controls Human Gene Expression via Intron Retention.” *RNA (New York, N.Y.)* 29(5):644–62. doi: 10.1261/RNA.079294.122.
- De La Fuente, Rabindranath, Maria M. Viveiros, Kathleen H. Burns, Eli Y. Adashi, Martin M. Matzuk, and John J. Eppig. 2004. “Major Chromatin Remodeling in the Germinal Vesicle (GV) of Mammalian Oocytes Is Dispensable for Global Transcriptional Silencing but Required for Centromeric Heterochromatin Function.” *Developmental Biology* 275(2):447–58. doi: 10.1016/J.YDBIO.2004.08.028.
- Lamothe, Sophie, Valérie Bernard, and Sophie Christin-Maitre. 2020. “Gonad Differentiation toward Ovary.” *Annales d’Endocrinologie* 81(2–3):83–88. doi: 10.1016/j.ando.2020.04.004.

- Langer, Diana, Igor Martianov, Daniel Alpern, Muriel Rhinn, Céline Keime, Pascal Dollé, Gabrielle Mengus, and Irwin Davidson. 2016. “Essential Role of the TFIID Subunit TAF4 in Murine Embryogenesis and Embryonic Stem Cell Differentiation.” *Nature Communications* 7. doi: 10.1038/ncomms11063.
- Lau, Nga Chi, Annemieke Kolkman, Frederik M. A. van Schaik, Klaas W. Mulder, W. W. W. Pim Pijnappel, Albert J. R. Heck, and H. Th Marc Timmers. 2009. “Human Ccr4-Not Complexes Contain Variable Deadenylase Subunits.” *The Biochemical Journal* 422(3):443–53. doi: 10.1042/BJ20090500.
- Lawson, K. A., and W. J. Hage. 1994. “Clonal Analysis of the Origin of Primordial Germ Cells in the Mouse.” *Ciba Foundation Symposium* 182. doi: 10.1002/9780470514573.CH5.
- Lawson, Kirstie A., N. Ray Dunn, Bernard A. J. Roelen, Laura M. Zeinstra, Angela M. Davis, Christopher V. E. Wright, Jeroen P. W. F. M. Korving, and Brigid L. M. Hogan. 1999. “Bmp4 Is Required for the Generation of Primordial Germ Cells in the Mouse Embryo.” *Genes & Development* 13(4):424. doi: 10.1101/GAD.13.4.424.
- Lee, Eun B., V. Praveen Chakravarthi, Michael W. Wolfe, and M. A. Karim Rumi. 2021. “ER β Regulation of Gonadotropin Responses during Folliculogenesis.” *International Journal of Molecular Sciences* 22(19). doi: 10.3390/ijms221910348.
- Lee, Katherine, Kyucheol Cho, Robert Morey, and Heidi Cook-Andersen. 2024. “An Extended Wave of Global mRNA Deadenylation Sets up a Switch in Translation Regulation across the Mammalian Oocyte-to-Embryo Transition.” *Cell Reports* 43(2). doi: 10.1016/J.CELREP.2024.113710.
- Lemay, Jean François, Caroline Lemieux, Olivier St-André, and François Bachand. 2010. “Crossing the Borders: Poly(A)-Binding Proteins Working on Both Sides of the Fence.” *RNA Biology* 7(3). doi: 10.4161/RNA.7.3.11649.
- De Leon, Victor, Andrew Johnson, and Rosemary Bachvarova. 1983. “Half-Lives and Relative Amounts of Stored and Polysomal Ribosomes and Poly(A) + RNA in Mouse Oocytes.” *Developmental Biology* 98(2):400–408. doi: 10.1016/0012-1606(83)90369-X.
- Levine, Michael. 2011. “Paused RNA Polymerase II as a Developmental Checkpoint.” *Cell* 145(4):502–11.

- Levine, Michael, Claudia Cattoglio, and Robert Tjian. 2014. “Looping Back to Leap Forward: Transcription Enters a New Era.” *Cell* 157(1):13–25.
- Lewandoski, Mark, Karen Montzka Wassarman, and Gail R. Martin. 1997. “Zp3-Cre, a Transgenic Mouse Line for the Activation or Inactivation of LoxP-Flanked Target Genes Specifically in the Female Germ Line.” *Current Biology* 7:148–51.
- Li, Jian, and David S. Gilmour. 2011. “Promoter Proximal Pausing and the Control of Gene Expression.” *Current Opinion in Genetics and Development* 21(2):231–35.
- Li, Jianke, April N. Meyer, and Daniel J. Donoghue. 1995. “Requirement for Phosphorylation of Cyclin B1 for *Xenopus* Oocyte Maturation.” *Molecular Biology of the Cell* 6(9):1111–24. doi: 10.1091/MBC.6.9.1111.
- Li, Yingfeng, Zhuqiang Zhang, Jiayu Chen, Wenqiang Liu, Weiyi Lai, Baodong Liu, Xiang Li, Liping Liu, Shaohua Xu, Qiang Dong, Mingzhu Wang, Xiaoya Duan, Jiajun Tan, Yong Zheng, Pumin Zhang, Guoping Fan, Jiemin Wong, Guo Liang Xu, Zhigao Wang, Hailin Wang, Shaorong Gao, and Bing Zhu. 2018. “Stella Safeguards the Oocyte Methyome by Preventing de Novo Methylation Mediated by DNMT1.” *Nature* 564(7734):136–40. doi: 10.1038/S41586-018-0751-5.
- Lim, Jaechul, Minju Ha, Hyeshik Chang, S. Chul Kwon, Dhirendra K. Simanshu, Dinshaw J. Patel, and V. Narry Kim. 2014. “Uridylation by TUT4 and TUT7 Marks mRNA for Degradation.” *Cell* 159(6):1365. doi: 10.1016/J.CELL.2014.10.055.
- Lin, Shengrong, Gabriela Coutinho-Mansfield, Dong Wang, Shatakshi Pandit, and Xiang Dong Fu. 2008. “The Splicing Factor SC35 Has an Active Role in Transcriptional Elongation.” *Nature Structural & Molecular Biology* 2008 15:8 15(8):819–26. doi: 10.1038/nsmb.1461.
- Liu, Chia Feng, Nathan Bingham, Keith Parker, and Humphrey H. C. Yao. 2009. “Sex-Specific Roles of β -Catenin in Mouse Gonadal Development.” *Human Molecular Genetics* 18(3):405–17. doi: 10.1093/hmg/ddn362.
- Liu, Jianzhao, Yanan Yue, Dali Han, Xiao Wang, Y. Fu, Liang Zhang, Guifang Jia, Miao Yu, Zhike Lu, Xin Deng, Qing Dai, Weizhong Chen, and Chuan He. 2013. “A METTL3–METTL14 Complex Mediates Mammalian Nuclear RNA N6-

- Adenosine Methylation.” *Nature Chemical Biology* 2013 10:2 10(2):93–95. doi: 10.1038/nchembio.1432.
- Liu, Ruiqi, Jiajun Wu, Haiwei Guo, Weiping Yao, Shuang Li, Yanwei Lu, Yongshi Jia, Xiaodong Liang, Jianming Tang, and Haibo Zhang. 2023. “Post-Translational Modifications of Histones: Mechanisms, Biological Functions, and Therapeutic Targets.” *MedComm* 4(3).
- Liu, Shan, Yuan Li, Huai L. Feng, Jun H. Yan, Mei Li, Shui Y. Ma, and Zi J. Chen. 2010. “Dynamic Modulation of Cytoskeleton during in Vitro Maturation in Human Oocytes.” *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 203(2):151.e1-151.e7. doi: 10.1016/J.AJOG.2010.05.011.
- Liu, Wei Li, Robert A. Coleman, Patricia Grob, David S. King, Laurence Florens, Michael P. Washburn, Kenneth G. Geles, Joyce L. Yang, Vincent Ramey, Eva Nogales, and Robert Tjian. 2008. “Structural Changes in TAF4b-TFIID Correlate with Promoter Selectivity.” *Molecular Cell* 29(1):81–91. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2007.11.003.
- Liu, Xiaoqiu, Eric Morency, Tingting Li, Hao Qin, Xiaoqian Zhang, Xuesen Zhang, and Scott Coonrod. 2017. “Role for PADI6 in Securing the MRNA-MSY2 Complex to the Oocyte Cytoplasmic Lattices.” *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 16(4):360–66. doi: 10.1080/15384101.2016.1261225.
- Liu, Yusheng, Xukun Lu, Junchao Shi, Xingjiang Yu, Xiaoxin Zhang, Kai Zhu, Zhaohong Yi, Enkui Duan, and Lei Li. 2016. “BTG4 Is a Key Regulator for Maternal MRNA Clearance during Mouse Early Embryogenesis.” *Journal of Molecular Cell Biology* 8(4):366–68. doi: 10.1093/JMCB/MJW023.
- Liu, Yusheng, Han Zhao, Fanghong Shao, Yiwei Zhang, Hu Nie, Jingye Zhang, Cheng Li, Zhenzhen Hou, Zi Jiang Chen, Jiaqiang Wang, Bing Zhou, Keliang Wu, and Falong Lu. 2023. “Remodeling of Maternal MRNA through Poly(A) Tail Orchestrates Human Oocyte-to-Embryo Transition.” *Nature Structural & Molecular Biology* 2023 30:2 30(2):200–215. doi: 10.1038/s41594-022-00908-2.
- Long, Jennifer C., and Javier F. Caceres. 2009. “The SR Protein Family of Splicing Factors: Master Regulators of Gene Expression.” *The Biochemical Journal* 417(1):15–27. doi: 10.1042/BJ20081501.

- Lorenzo-Orts, Laura, and Andrea Pauli. 2024. "The Molecular Mechanisms Underpinning Maternal mRNA Dormancy." *Biochemical Society Transactions* 52(2):861. doi: 10.1042/BST20231122.
- Lovasco, Lindsay A., Eric A. Gustafson, Kimberly A. Seymour, Dirk G. De Rooij, and Richard N. Freiman. 2015. "TAF4b Is Required for Mouse Spermatogonial Stem Cell Development." *Stem Cells* 33(4):1267–76. doi: 10.1002/stem.1914.
- Luong, Xuan G., and Marco Conti. 2019. "RNA Binding Protein Networks and Translational Regulation in Oocytes." *Human Reproductive and Prenatal Genetics* 193–220. doi: 10.1016/B978-0-12-813570-9.00009-7.
- Ma, Jun, Matyas Flemr, Paula Stein, Philipp Berninger, Radek Malik, Mihaela Zavolan, Petr Svoboda, and Richard M. Schultz. 2010. "MicroRNA Activity Is Suppressed in Mouse Oocytes." *Current Biology: CB* 20(3):265–70. doi: 10.1016/J.CUB.2009.12.042.
- Ma, Jun, Matyas Flemr, Hynek Strnad, Petr Svoboda, and Richard M. Schultz. 2013. "Maternally Recruited DCP1A and DCP2 Contribute to Messenger RNA Degradation during Oocyte Maturation and Genome Activation in Mouse." *Biology of Reproduction* 88(1). doi: 10.1095/biolreprod.112.105312.
- Ma, Jun, Yusuke Fukuda, and Richard M. Schultz. 2015. "Mobilization of Dormant Cnot7 mRNA Promotes Deadenylation of Maternal Transcripts during Mouse Oocyte Maturation." *Biology of Reproduction* 93(2). doi: 10.1095/biolreprod.115.130344.
- Mak, Winifred, Caodi Fang, Tobias Holden, Milana Bockhur Dratver, and Haifan Lin. 2016. "An Important Role of Pumilio 1 in Regulating the Development of the Mammalian Female Germline." *Biology of Reproduction* 94(6). doi: 10.1095/BIOLREPROD.115.137497.
- Malecova, Barbora, Alessandra Dall'Agnese, Luca Madaro, Sole Gatto, Paula Coutinho Toto, Sonia Albini, Tammy Ryan, László Tora, and Pier Lorenzo Puri. 2016. "TBP/TFIID-Dependent Activation of MyoD Target Genes in Skeletal Muscle Cells." *ELife* 5(FEBRUARY2016). doi: 10.7554/ELIFE.12534.
- Mangus, David A., Matthew C. Evans, and Allan Jacobson. 2003. "Poly(A)-Binding Proteins: Multifunctional Scaffolds for the Post-Transcriptional Control of Gene Expression." *Genome Biology* 4(7):1–14. doi: 10.1186/GB-2003-4-7-223/FIGURES/4.

- Marasco, Michelle, Weiyi Li, Michael Lynch, and Craig S. Pikaard. 2017. "Catalytic Properties of RNA Polymerases IV and V: Accuracy, Nucleotide Incorporation and RNTP/DNTP Discrimination." *Nucleic Acids Research* 45(19):11315–26. doi: 10.1093/nar/gkx794.
- Martianov, Igor, Gian-Maria Fimia, André E. Dierich, Martti Parvinen, Paolo Sassone-Corsi, and Irwin Davidson. 2001. *Late Arrest of Spermiogenesis and Germ Cell Apoptosis in Mice Lacking the TBP-like TLF/TRF2 Gene TLF/TRF2/TLP/TRP Is a Second Protein with High Ho-Mology to the TBP Core Domain (Wieczorek et Al. Vol. 7. Maldonado.*
- Martianov, Igor, Amandine Velt, Guillaume Davidson, Mohamed Amin Choukrallah, and Irwin Davidson. 2016. "TRF2 Is Recruited to the Pre-Initiation Complex as a Testis-Specific Subunit of TFIIA/ALF to Promote Haploid Cell Gene Expression." *Scientific Reports* 6. doi: 10.1038/SREP32069.
- Martianov, Igor, Stephane Viville, and Irwin Davidson. 2002. "RNA Polymerase II Transcription in Murine Cells Lacking the TATA Binding Protein." *Science* 298(5595):1036–39. doi: 10.1126/SCIENCE.1076327/SUPPL_FILE/MARTIANOV.PDF.
- Martins, Joao P. Sousa, Xueqing Liu, Ashwini Oke, Ripla Arora, Federica Franciosi, Stephan Viville, Diana J. Laird, Jennifer C. Fung, and Marco Conti. 2016. "DAZL and CPEB1 Regulate mRNA Translation Synergistically during Oocyte Maturation." *Journal of Cell Science* 129(6):1271–82. doi: 10.1242/jcs.179218.
- Masui, Yoshio, and Clement L. Markert. 1971. "Cytoplasmic Control of Nuclear Behavior during Meiotic Maturation of Frog Oocytes." *Journal of Experimental Zoology* 177(2):129–45. doi: 10.1002/jez.1401770202.
- Matsui, Takashi, Jacqueline Segall, P. Anthony Weill, and Robert G. Roeder. 1980. *Multiple Factors Required for Accurate Initiation of Transcription by Purified RNA Polymerase II**. Vol. 255.
- Matsumoto, Ken, Kimio J. Tanaka, Kazuma Aoki, Masazumi Sameshima, and Masafumi Tsujimoto. 2003. "Visualization of the Reconstituted FRGY2-MRNA Complexes by Electron Microscopy." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306(1):53–58. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00909-4.

- Mauxion, Fabienne, Jérôme Basquin, Sevim Ozgur, Marion Rame, Jana Albrecht, Ingmar Schäfer, Bertrand Séraphin, and Elena Conti. 2023. "The Human CNOT1-CNOT10-CNOT11 Complex Forms a Structural Platform for Protein-Protein Interactions." *Cell Reports* 42(1). doi: 10.1016/J.CELREP.2022.111902.
- Mauxion, Fabienne, Brigitte Prève, and Bertrand Séraphin. 2013. "C2ORF29/CNOT11 and CNOT10 Form a New Module of the CCR4-NOT Complex." *RNA Biology* 10(2):267–76. doi: 10.4161/RNA.23065.
- Maxon, Mary E., James A. Goodrich, and Robert Tjian. 1994. *Transcription Factor HE Binds Preferentially to RNA Polymerase Ila and Recruits TFIIH: A Model for Promoter Clearance.*
- McCracken, Susan, Nova Fong, Krassimir Yankulov, Scott Ballantyne, Guohua Pan, Jack Greenblatt, Scott D. Patterson, Marvin Wickens, and David L. Bentley. 1997. "The C-Terminal Domain of RNA Polymerase II Couples MRNA Processing to Transcription." *Nature* 385(6614):357–60. doi: 10.1038/385357A0.
- McLaren, Anne. 2003. "Primordial Germ Cells in the Mouse." *Developmental Biology* 262(1):1–15.
- Medvedev, Sergey, Hua Pan, and Richard M. Schultz. 2011. "Absence of MSY2 in Mouse Oocytes Perturbs Oocyte Growth and Maturation, RNA Stability, and the Transcriptome." *Biology of Reproduction* 85(3):575–83. doi: 10.1095/biolreprod.111.091710.
- Medvedev, Sergey, Juxiang Yang, Norman B. Hecht, and Richard M. Schultz. 2008. "CDC2A (CDK1)-Mediated Phosphorylation of MSY2 Triggers Maternal MRNA Degradation during Mouse Oocyte Maturation." *Developmental Biology* 321(1):205–15. doi: 10.1016/J.YDBIO.2008.06.016.
- Meglicki, Maciej, Maciej Zientarski, and Ewa Borsuk. 2008. "Constitutive Heterochromatin during Mouse Oogenesis: The Pattern of Histone H3 Modifications and Localization of HP1alpha and HP1beta Proteins." *Molecular Reproduction and Development* 75(2):414–28. doi: 10.1002/MRD.20772.
- Mehlmann, Lisa M. 2013. "Losing Mom's Message: Requirement for DCP1A and DCP2 in the Degradation of Maternal Transcripts during Oocyte Maturation." *Biology of Reproduction* 88(1).

- Mei, Hailiang, Chisayo Kozuka, Ryoya Hayashi, Mami Kumon, Haruhiko Koseki, and Azusa Inoue. 2021. “H2AK119ub1 Guides Maternal Inheritance and Zygotic Deposition of H3K27me3 in Mouse Embryos.” *Nature Genetics* 53(4). doi: 10.1038/s41588-021-00820-3.
- Mendez, Raul, Kannenganti G. K. Murthy, Kevin Ryan, James L. Manley, and Joel D. Richter. 2000. “Phosphorylation of CPEB by Eg2 Mediates the Recruitment of CPSF into an Active Cytoplasmic Polyadenylation Complex.” *Molecular Cell* 6(5):1253–59. doi: 10.1016/S1097-2765(00)00121-0.
- Meola, Nicola, Michal Domanski, Evdoxia Karadoulama, Yun Chen, Coline Gentil, Dennis Pultz, Kristoffer Vitting-Seerup, Søren Lykke-Andersen, Jens S. Andersen, Albin Sandelin, and Torben Heick Jensen. 2016. “Identification of a Nuclear Exosome Decay Pathway for Processed Transcripts.” *Molecular Cell* 64(3):520–33. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2016.09.025.
- Mercer, Elinore M., Yin C. Lin, Christopher Benner, Suchit Jhunjunwala, Janusz Dutkowski, Martha Flores, Mikael Sigvardsson, Trey Ideker, Christopher K. Glass, and Cornelis Murre. 2011. “Multilineage Priming of Enhancer Repertoires Precedes Commitment to the B and Myeloid Cell Lineages in Hematopoietic Progenitors.” *Immunity* 35(3):413–25. doi: 10.1016/j.immuni.2011.06.013.
- Mitchell, Laura E. 2022. “Maternal Effect Genes: Update and Review of Evidence for a Link with Birth Defects.” *Human Genetics and Genomics Advances* 3(1). doi: 10.1016/J.XHGG.2021.100067.
- Miura, Kento, Chiharu Murata, Kyoko Harikae, Hitomi Suzuki, Masami Kanai-Azuma, Masamichi Kurohmaru, Naoki Tsunekawa, and Yoshiakira Kanai. 2017. “Defects in the First Wave of Folliculogenesis in Mouse XO Ovaries.” *Journal of Reproduction and Development* 63(3):333–38. doi: 10.1262/jrd.2017-033.
- Mohan, William S., Elisabeth Scheer, Olivia Wendling, Daniel Metzger, and László Tora. 2003. “TAF10 (TAF(II)30) Is Necessary for TFIID Stability and Early Embryogenesis in Mice.” *Molecular and Cellular Biology* 23(12):4307–18. doi: 10.1128/MCB.23.12.4307-4318.2003.

- Molyneaux, Kathleen A., Jim Stallock, Kyle Schaible, and Christopher Wylie. 2001. "Time-Lapse Analysis of Living Mouse Germ Cell Migration." *Developmental Biology* 240(2):488–98. doi: 10.1006/dbio.2001.0436.
- Mora, Jocelyn M., Mark A. Fenwick, Laura Castle, Marianne Baithun, Timothy A. Ryder, Margaret Mobberley, Raffaella Carzaniga, Stephen Franks, and Kate Hardy. 2012. "Characterization and Significance of Adhesion and Junction-Related Proteins in Mouse Ovarian Follicles." *Biology of Reproduction* 86(5). doi: 10.1095/BIOLREPROD.111.096156.
- Moreno, Ricardo D., Gerald Schatten, and João Ramalho-Santos. 2002. "Golgi Apparatus Dynamics During Mouse Oocyte In Vitro Maturation: Effect of the Membrane Trafficking Inhibitor Brefeldin A." *Biology of Reproduction* 66(5):1259–66. doi: 10.1095/BIOLREPROD66.5.1259.
- Morgan, Marcos, Christian Much, Monica DiGiacomo, Chiara Azzi, Ivayla Ivanova, Dimitrios M. Vitsios, Jelena Pistolic, Paul Collier, Pedro N. Moreira, Vladimir Benes, Anton J. Enright, and Dónal O'Carroll. 2017. "MRNA 3' Uridylation and Poly(A) Tail Length Sculpt the Mammalian Maternal Transcriptome." *Nature* 548(7667):347. doi: 10.1038/NATURE23318.
- Mork, Lindsey, Danielle M. Maatouk, Jill A. McMahon, Jin Jin Guo, Pumin Zhang, Andrew P. McMahon, and Blanche Capel. 2012. "Temporal Differences in Granulosa Cell Specification in the Ovary Reflect Distinct Follicle Fates in Mice." *Biology of Reproduction* 86(2). doi: 10.1095/biolreprod.111.095208.
- Moshkin, Yuri M., Gillian E. Chalkley, Tsung Wai Kan, B. Ashok Reddy, Zeliha Ozgur, Wilfred F. J. van Ijcken, Dick H. W. Dekkers, Jeroen A. Demmers, Andrew A. Travers, and C. Peter Verrijzer. 2012. "Remodelers Organize Cellular Chromatin by Counteracting Intrinsic Histone-DNA Sequence Preferences in a Class-Specific Manner." *Molecular and Cellular Biology* 32(3):675–88. doi: 10.1128/mcb.06365-11.
- Mu, Haiyuan, Ting Zhang, Ying Yang, Danru Zhang, Jie Gao, Junhong Li, Liang Yue, Dengfeng Gao, Bingbo Shi, Yue Han, Liang Zhong, Xinze Chen, Zhen Bo Wang, Zhen Lin, Ming Han Tong, Qing Yuan Sun, Yun Gui Yang, and Jianyong Han. 2021. "METTL3-Mediated MRNA N6-Methyladenosine Is Required for Oocyte and Follicle Development in Mice." *Cell Death & Disease* 2021 12:11 12(11):1–13. doi: 10.1038/s41419-021-04272-9.

- Mühlbacher, Wolfgang, Sarah Sainsbury, Matthias Hemann, Merle Hantsche, Simon Neyer, Franz Herzog, and Patrick Cramer. 2014. “Conserved Architecture of the Core RNA Polymerase II Initiation Complex.” *Nature Communications* 5. doi: 10.1038/ncomms5310.
- Müller, Ferenc, Lőrànt Lakatos, Jean Christophe Dantoni, Uwe Strähle, and László Tora. 2001. “TBP Is Not Universally Required for Zygotic RNA Polymerase II Transcription in Zebrafish.” *Current Biology: CB* 11(4):282–87. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00076-8.
- Müller, Ferenc, and László Tora. 2004. “The Multicoloured World of Promoter Recognition Complexes.” *EMBO Journal* 23(1):2–8.
- Müller, Ferenc, Andreas Zaucker, and László Tora. 2010. “Developmental Regulation of Transcription Initiation: More than Just Changing the Actors.” *Current Opinion in Genetics and Development* 20(5):533–40.
- Muraki, Keiko, Akira Nabetani, Atsuya Nishiyama, and Fuyuki Ishikawa. 2011. “Essential Roles of Xenopus TRF2 in Telomere End Protection and Replication.” *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 16(6):728–39. doi: 10.1111/J.1365-2443.2011.01520.X.
- Muthukrishnan, S., G. W. Both, Y. Furuichi, and A. J. Shatkin. 1975. “5'-Terminal 7-Methylguanosine in Eukaryotic mRNA Is Required for Translation.” *Nature* 1975 255:5503 255(5503):33–37. doi: 10.1038/255033a0.
- Nagy, Zita, Anne Riss, Sally Fujiyama, Arnaud Krebs, Meritxell Orpinell, Pascal Jansen, Adrian Cohen, Henk G. Stunnenberg, Shigeaki Kato, and László Tora. 2010. “The Metazoan ATAC and SAGA Coactivator HAT Complexes Regulate Different Sets of Inducible Target Genes.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(4). doi: 10.1007/s00018-009-0199-8.
- Nakamura, Takahisa, Ryoji Yao, Takehiko Ogawa, Toru Suzuki, Chizuru Ito, Naoki Tsunekawa, Kimiko Inoue, Rieko Ajima, Takashi Miyasaka, Yutaka Yoshida, Atsuo Ogura, Kiyotaka Toshimori, Toshiaki Noce, Tadashi Yamamoto, and Tetsuo Noda. 2004. “Oligo-Astheno-Teratozoospermia in Mice Lacking Cnot7, a Regulator of Retinoid X Receptor Beta.” *Nature Genetics* 36(5):528–33. doi: 10.1038/NG1344.
- Nakamura, Toshinobu, Yoshikazu Arai, Hiroki Umehara, Masaaki Masuhara, Tohru Kimura, Hisaaki Taniguchi, Toshihiro Sekimoto, Masahito Ikawa, Yoshihiro

- Yoneda, Masaru Okabe, Satoshi Tanaka, Kunio Shiota, and Toru Nakano. 2007. “PGC7/Stella Protects against DNA Demethylation in Early Embryogenesis.” *Nature Cell Biology* 9(1):64–71. doi: 10.1038/NCB1519.
- Nicholson-Shaw, Angela L., Eric R. Kofman, Gene W. Yeo, and Amy E. Pasquinelli. 2022. “Nuclear and Cytoplasmic Poly(A) Binding Proteins (PABPs) Favor Distinct Transcripts and Isoforms.” *Nucleic Acids Research* 50(8):4685. doi: 10.1093/NAR/GKAC263.
- Nikalayevich, Elvira, Gaëlle Letort, Ghislain de Labbey, Elena Todisco, Anastasia Shihabi, Hervé Turlier, Raphaël Voituriez, Mohamed Yahiatene, Xavier Pollet-Villard, Metello Innocenti, Melina Schuh, Marie Emilie Terret, and Marie Hélène Verlhac. 2024. “Aberrant Cortex Contractions Impact Mammalian Oocyte Quality.” *Developmental Cell* 59(7):841-852.e7. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2024.01.027.
- Nikolic, Aleksandar, Vladislav Volarevic, Lyle Armstrong, Majlinda Lako, and Miodrag Stojkovic. 2016. “Primordial Germ Cells: Current Knowledge and Perspectives.” *Stem Cells International* 2016. doi: 10.1155/2016/1741072.
- Nikolov, Dimitar B., Hua Chen, Elaine D. Halay, Anny A. Usheva, Koji Hisatake, Dong Kun Lee, Robert G. Roeder, and Stephen K. Burley. 1995. “Crystal Structure of a TFIIB–TBP–TATA-Element Ternary Complex.” *Nature* 377(6545):119–28. doi: 10.1038/377119a0.
- Nilsson, Eric Eugene. 2002. *Cell-Cell Interactions in Primordial Follicle Assembly and Development*.
- Nojima, Takayuki, Kenny Rebelo, Tomás Gomes, Ana Rita Grosso, Nicholas J. Proudfoot, and Maria Carmo-Fonseca. 2018. “RNA Polymerase II Phosphorylated on CTD Serine 5 Interacts with the Spliceosome during Co-Transcriptional Splicing.” *Molecular Cell* 72(2):369-379.e4. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2018.09.004.
- Norris, Rachael P., William J. Ratzan, Marina Freudzon, Lisa M. Mehlmann, Judith Krall, Matthew A. Movsesian, Huanchen Wang, Hengming Ke, Viacheslav O. Nikolaev, and Laurinda A. Jaffe. 2009. “Cyclic GMP from the Surrounding Somatic Cells Regulates Cyclic AMP and Meiosis in the Mouse Oocyte.” *Development (Cambridge, England)* 136(11):1869–78. doi: 10.1242/DEV.035238.

- Ogami, K., N. Hosoda, Y. Funakoshi, and S. Hoshino. 2012. “Antiproliferative Protein Tob Directly Regulates C-Myc Proto-Oncogene Expression through Cytoplasmic Polyadenylation Element-Binding Protein CPEB.” *Oncogene* 2014 33:1 33(1):55–64. doi: 10.1038/onc.2012.548.
- Ogawa, Takehiko, Chizuru Ito, Takahisa Nakamura, Yoichi Tamura, Tadashi Yamamoto, Tetsuo Noda, Yoshinobu Kubota, and Kiyotaka Toshimori. 2004. “Abnormal Sperm Morphology Caused by Defects in Sertoli Cells of Cnot7 Knockout Mice.” *Archives of Histology and Cytology* 67(4):307–14. doi: 10.1679/aohc.67.307.
- Ohkuma, Yoshiaki, Shigeru Hashimoto, C. Kathy Wang, Masami Horikoshi, and Robert G. Roeder. 1995. *Analysis of the Role of TFIIE in Basal Transcription and TFIIH-Mediated Carboxy-Terminal Domain Phosphorylation through Structure-Function Studies of TFIIE*. Vol. 15.
- Ohler, Uwe, and David A. Wassarman. 2010. “Promoting Developmental Transcription.” *Development* 137(1).
- Okuda, Masahiko, Junichi Higo, Tadashi Komatsu, Tsuyoshi Konuma, Kenji Sugase, and Yoshifumi Nishimura. 2016. “Dynamics of the Extended String-Like Interaction of TFIIE with the P62 Subunit of TFIIH.” *Biophysical Journal* 111(5):950–62. doi: 10.1016/j.bpj.2016.07.042.
- Okutman, Özlem, Ali Sami Gürbüz, Ahmet Salvarci, Umut Büyük, Halil Ruso, Timur Gürgan, Julien Tarabeux, Anne Sophie Leuvrey, Elsa Nourisson, Cécile Lang, Jean Muller, and Stephane Viville. 2024. “Evaluation of an Updated Gene Panel as a Diagnostic Tool for Both Male and Female Infertility.” *Reproductive Sciences* 31(8):2309–17. doi: 10.1007/S43032-024-01553-4.
- Olds, P. J., S. Stern, and J. D. Biggers. 1973. “Chemical Estimates of the RNA and DNA Contents of the Early Mouse Embryo.” *The Journal of Experimental Zoology* 186(1):39–45. doi: 10.1002/JEZ.1401860107.
- Ota, Ryoma, Tomoya Kotani, and Masakane Yamashita. 2011. “Biochemical Characterization of Pumilio1 and Pumilio2 in *Xenopus* Oocytes.” *The Journal of Biological Chemistry* 286(4):2853–63. doi: 10.1074/JBC.M110.155523.
- Oyama, Toshinao, Satoru Sasagawa, Shugaku Takeda, Rex A. Hess, Paul M. Lieberman, Emily H. Cheng, and James J. Hsieh. 2013. “Cleavage of TFIIA by

- Taspase1 Activates TRF2-Specified Mammalian Male Germ Cell Programs.” *Developmental Cell* 27(2):188–200. doi: 10.1016/j.devcel.2013.09.025.
- Ozturk, Saffet, Berna Sozen, and Necdet Demir. 2015. “Epab and Pabpc1 Are Differentially Expressed in the Postnatal Mouse Ovaries.” *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32(1):137–46. doi: 10.1007/S10815-014-0362-5.
- Ozturk, Saffet, and Fatma Uysal. 2017. “Poly(A)-Binding Proteins Are Required for Translational Regulation in Vertebrate Oocytes and Early Embryos.” *Reproduction, Fertility, and Development* 29(10):1890–1901. doi: 10.1071/RD16283.
- Padmanabhan, Kiran, and Joel D. Richter. 2006. “Regulated Pumilio-2 Binding Controls RINGO/Spy mRNA Translation and CPEB Activation.” *Genes & Development* 20(2):199–209. doi: 10.1101/GAD.1383106.
- Pan, Hsien An, Rui Wen Liao, Chia Ling Chung, Yen Ni Teng, Yung Ming Lin, and Pao Lin Kuo. 2008. “DAZL Protein Expression in Mouse Preimplantation Embryo.” *Fertility and Sterility* 89(5 SUPPL.):1324–27. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.03.041.
- Pardee, Timothy S., Chaitanya S. Bangur, and Alfred S. Ponticelli. 1998. *The N-Terminal Region of Yeast TFIIB Contains Two Adjacent Functional Domains Involved in Stable RNA Polymerase II Binding and Transcription Start Site Selection**. Vol. 273.
- Parker, Roy, and Ujwal Sheth. 2007. “P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation.” *Molecular Cell* 25(5):635–46. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2007.02.011.
- Passmore, Lori A., and Jeff Collier. 2021. “Roles of mRNA Poly(A) Tails in Regulation of Eukaryotic Gene Expression.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021 23:2 23(2):93–106. doi: 10.1038/s41580-021-00417-y.
- Pasternak, Michał, Sybille Pfender, Balaji Santhanam, and Melina Schuh. 2016. “The BTG4 and CAF1 Complex Prevents the Spontaneous Activation of Eggs by Deadenyating Maternal MRNAs.” *Open Biology* 6(9). doi: 10.1098/rsob.160184.
- Patel, Avinash B., Basil J. Greber, and Eva Nogales. 2020. “Recent Insights into the Structure of TFIID, Its Assembly, and Its Binding to Core Promoter.” *Current Opinion in Structural Biology* 61:17. doi: 10.1016/J.SBI.2019.10.001.

BIBLIOGRAPHIE

- Paulini, Fernanda, and Eduardo O. Melo. 2011. "The Role of Oocyte-Secreted Factors GDF9 and BMP15 in Follicular Development and Oogenesis." *Reproduction in Domestic Animals* 46(2):354–61.
- Paynton, Barbara V., Rachel Rempel, and Rosemary Bachvarova. 1988. "Changes in State of Adenylation and Time Course of Degradation of Maternal MRNAs during Oocyte Maturation and Early Embryonic Development in the Mouse." *Developmental Biology* 129(2):304–14. doi: 10.1016/0012-1606(88)90377-6.
- Pedersen, Torben, and Hannah Peters. 1968. *PROPOSAL FOR A CLASSIFICATION OF OOCYTES AND FOLLICLES IN THE MOUSE OVARY*.
- Pepling, Melissa E. 2006. "From Primordial Germ Cell to Primordial Follicle: Mammalian Female Germ Cell Development." *Genesis* 44(12):622–32.
- Pepling, Melissa E., and Allan C. Spradling. 1998. "Female Mouse Germ Cells Form Synchronously Dividing Cysts." *Development* 125(17):3323–28. doi: 10.1242/dev.125.17.3323.
- Pepling, Melissa E., and Allan C. Spradling. 2001. "Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles." *Developmental Biology* 234(2):339–51. doi: 10.1006/dbio.2001.0269.
- Pereda, Jaime, Telma Zorn, and Mauricio Soto-Suazo. 2006. "Primordial Germ Cells Migration: Morphological and Molecular Aspects." *Animal Reproduction* 2(3):147–60.
- Pestova, Tatyana V., Victoria G. Kolupaeva, Ivan B. Lomakin, Evgeny V. Pilipenko, Ivan N. Shatsky, Vadim I. Agol, and Christopher U. T. Hellen. 2001. "Molecular Mechanisms of Translation Initiation in Eukaryotes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(13):7029–36. doi: 10.1073/PNAS.111145798/ASSET/94B7CF20-1AE1-44BB-92AD-8954F63A70D9/ASSETS/GRAPHIC/PQ1111457004.JPEG.
- Di Pietro, Cinzia, Marco Ragusa, Laura Duro, Maria Rosa Guglielmino, Davide Barbagallo, Alisia Carnemolla, Alessandro Laganà, Pietro Buffa, Rosario Angelica, Antonella Rinaldi, Maria Stella Calafato, Ionella Milicia, Cinzia Caserta, Rosalba Giugno, Alfredo Pulvirenti, Veronica Giunta, Antonella Rapisarda, Valentina Di Pietro, Agata Grillo, Angelo Messina, Alfredo Ferro, Karl Heinz Grzeschik, and Michele Purrello. 2007. "Genomics, Evolution, and

- Expression of TBPL2, a Member of the TBP Family.” *DNA and Cell Biology* 26(6). doi: 10.1089/dna.2006.0527.
- Piko, Lajos, and Kerry B. Clegg. 1982. “Quantitative Changes in Total RNA, Total Poly(A), and Ribosomes in Early Mouse Embryos.” *Developmental Biology* 89(2). doi: 10.1016/0012-1606(82)90325-6.
- Piqué, Maria, José Manuel López, Sylvain Foissac, Roderic Guigó, and Raúl Méndez. 2008. “A Combinatorial Code for CPE-Mediated Translational Control.” *Cell* 132(3):434–48. doi: 10.1016/J.CELL.2007.12.038.
- Pointud, Jean Christophe, Gabrielle Mengus, Stefano Brancorsini, Lucia Monaco, Martti Parvinen, Paolo Sassone-Corsi, and Irwin Davidson. 2003. “The Intracellular Localisation of TAF7L, a Parologue of Transcription Factor TFIID Subunit TAF7, Is Developmentally Regulated during Male Germ-Cell Differentiation.” *Journal of Cell Science* 116(Pt 9):1847–58. doi: 10.1242/JCS.00391.
- Proudfoot, N. J. 1989. “How RNA Polymerase II Terminates Transcription in Higher Eukaryotes.” *Trends in Biochemical Sciences* 14(3):105–10. doi: 10.1016/0968-0004(89)90132-1.
- Rabenstein, Mark D., Sharleen Zhou, John T. Lis, and Robert Tjian. 1999. “TATA Box-Binding Protein (TBP)-Related Factor 2 (TRF2), a Third Member of the TBP Family.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(9):4791–96. doi: 10.1073/PNAS.96.9.4791.
- Racki, Waldemar J., and Joel D. Richter. 2006. “CPEB Controls Oocyte Growth and Follicle Development in the Mouse.” *Development* 133(22):4527–37. doi: 10.1242/DEV.02651.
- Rajkovic, Aleksandar, Stephanie A. Pangas, Daniel Ballow, Nobuhiro Suzumori, and Martin M. Matzuk. 2004. “NOBOX Deficiency Disrupts Early Folliculogenesis and Oocyte-Specific Gene Expression.” *Science* 305(5687):1157–59. doi: 10.1126/science.1099755.
- Ramanathan, Anand, G. Brett Robb, and Siu Hong Chan. 2016. “MRNA Capping: Biological Functions and Applications.” *Nucleic Acids Research* 44(16):7511–26.
- Reddy, Pradeep, Lian Liu, Deepak Adhikari, Krishna Jagarlamudi, Singareddy Rajareddy, Yan Shen, Chun Du, Wenli Tang, Tuula Hämäläinen, Stanford L.

BIBLIOGRAPHIE

- Peng, Zi Jian Lan, Austin J. Cooney, Ilpo Huhtaniemi, and Kui Liu. 2008. "Oocyte-Specific Deletion of Pten Causes Premature Activation of the Primordial Follicle Pool." *Science* 319(5863):611–13. doi: 10.1126/science.1152257.
- Ren, Yu, Hitomi Suzuki, Krishna Jagarlamudi, Kayla Golnoski, Megan McGuire, Rita Lopes, Vassilis Pachnis, and Aleksandar Rajkovic. 2015. "Lhx8 Regulates Primordial Follicle Activation and Postnatal Folliculogenesis." *BMC Biology* 13(1). doi: 10.1186/s12915-015-0151-3.
- Rimel, Jenna K., Zachary C. Poss, Benjamin Erickson, Zachary L. Maas, Christopher C. Ebmeier, Jared L. Johnson, Tim Michael Decker, Tomer M. Yaron, Michael J. Bradley, Kristin B. Hamman, Shanhu Hu, Goran Malojcic, Jason J. Marineau, Peter W. White, Martine Brault, Limei Tao, Patrick DeRoy, Christian Clavette, Shraddha Nayak, Leah J. Damon, Ines H. Kaltheuner, Heeyoun Bunch, Lewis C. Cantley, Matthias Geyer, Janet Iwasa, Robin D. Dowell, David L. Bentley, William M. Old, and Dylan J. Taatjes. 2020. "Selective Inhibition of CDK7 Reveals High-Confidence Targets and New Models for TFIIF Function in Transcription." *Genes and Development* 34(21–22):1452–73. doi: 10.1101/GAD.341545.120/-/DC1.
- Roeder, Robert G. 2019. "50+ Years of Eukaryotic Transcription: An Expanding Universe of Factors and Mechanisms." *Nature Structural and Molecular Biology* 26(9):783–91.
- Roeder, Robert G., and R G Roeder. 1996. *The Role of General Initiation Factors in Transcription by RNA Polymerase II Core-Promoter Elements and General Transcription Initiation Factors*.
- Rong, Yan, Shu Yan Ji, Ye Zhang Zhu, Yun Wen Wu, Li Shen, and Heng Yu Fan. 2019. "ZAR1 and ZAR2 Are Required for Oocyte Meiotic Maturation by Regulating the Maternal Transcriptome and mRNA Translational Activation." *Nucleic Acids Research* 47(21):11387–402. doi: 10.1093/nar/gkz863.
- Ruggiu, Matteo, Robert Speed, Mary Taggart, Stewart J. McKay, Fiona Kilanowski, Philippa Saunders, Julia Dorin, and Howard J. Cooke. 1997. "The Mouse Dazl Gene Encodes a Cytoplasmic Protein Essential for Gametogenesis." *Nature* 389(6646):73–77. doi: 10.1038/37987.

BIBLIOGRAPHIE

- Sainsbury, Sarah, Carrie Bernecky, and Patrick Cramer. 2015. "Structural Basis of Transcription Initiation by RNA Polymerase II." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16(3):129–43.
- Saitou, Mitinori, Saya Kagiwada, and Kazuki Kurimoto. 2011. "Epigenetic Reprogramming in Mouse Pre-Implantation Development and Primordial Germ Cells." *Development* 139(1):15–31.
- Sánchez, Flor, and Johan Smits. 2012. "Molecular Control of Oogenesis." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1822(12):1896–1912.
- Sanders, Anna A. W. M., and Irina Kaverina. 2015. "Nucleation and Dynamics of Golgi-Derived Microtubules." *Frontiers in Neuroscience* 9(NOV):166177. doi: 10.3389/FNINS.2015.00431/BIBTEX.
- Sanfins, Alexandra, Patrícia Rodrigues, and David F. Albertini. 2018. "GDF-9 and BMP-15 Direct the Follicle Symphony." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 35(10):1741. doi: 10.1007/S10815-018-1268-4.
- Sathananthan, A. Henry. 2013. "Ultrastructure of Human Gametes, Fertilization and Embryos in Assisted Reproduction: A Personal Survey." *Micron* 44(1):1–20. doi: 10.1016/J.MICRON.2012.05.002.
- Scheer, Elisabeth, Jie Luo, Andrea Bernardini, Frank Ruffenach, Jean Marie Garnier, Isabelle Kolb-Cheynel, Kapil Gupta, Imre Berger, Jeff Ranish, and László Tora. 2021. "TAF8 Regions Important for TFIID Lobe B Assembly or for TAF2 Interactions Are Required for Embryonic Stem Cell Survival." *Journal of Biological Chemistry* 297(5). doi: 10.1016/j.jbc.2021.101288.
- Schier, Allison C., and Dylan J. Taatjes. 2020. "Structure and Mechanism of the RNA Polymerase II Transcription Machinery." doi: 10.1101/gad.335679.
- Schulz, Katharine N., and Melissa M. Harrison. 2019. "Mechanisms Regulating Zygotic Genome Activation." *Nature Reviews Genetics* 20(4):221–34.
- Sedmíková, M., R. Rajmon, J. Petr, M. Vaňková, J. Rozinek, D. Řehák, and F. Jílek. 2003. "Ultrastructural Localisation of Calcium Deposits in the Mouse Ovary." *Reproduction, Fertility, and Development* 15(7–8):415–21. doi: 10.1071/RD03040.

- Sekido, Ryohei, and Robin Lovell-Badge. 2008. "Sex Determination Involves Synergistic Action of SRY and SF1 on a Specific Sox9 Enhancer." *Nature* 453(7197):930–34. doi: 10.1038/nature06944.
- Seli, Emre, Maria D. Lalioti, Sean M. Flaherty, Denny Sakkas, Nihal Terzi, and Joan A. Steitz. 2005. "An Embryonic Poly(A)-Binding Protein (EPAB) Is Expressed in Mouse Oocytes and Early Preimplantation Embryos." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(2):367–72. doi: 10.1073/PNAS.0408378102.
- Sha, Qian-Qian, Jia-Li Yu, Jing-Xin Guo, Xing-Xing Dai, Jun-Chao Jiang, Yin-Li Zhang, Chao Yu, Shu-Yan Ji, Yu Jiang, Song-Ying Zhang, Li Shen, Xiang-Hong Ou, and Heng-Yu Fan. 2018. "CNOT6L Couples the Selective Degradation of Maternal Transcripts to Meiotic Cell Cycle Progression in Mouse Oocyte." *The EMBO Journal* 37(24). doi: 10.15252/EMBJ.201899333.
- Shan, Li Ying, Yu Tian, Wen Xiang Liu, Hai Tao Fan, Feng Guo Li, Wen Juan Liu, Ang Li, Wei Shen, Qing Yuan Sun, Yong Bin Liu, Yang Zhou, and Teng Zhang. 2023. "LSM14B Controls Oocyte mRNA Storage and Stability to Ensure Female Fertility." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 80(9):247. doi: 10.1007/S00018-023-04898-2.
- Sharova, Lioudmila V., Alexei A. Sharov, Timur Nedorezov, Yulan Piao, Nabeebi Shaik, and Minoru S. H. Ko. 2009. "Database for mRNA Half-Life of 19 977 Genes Obtained by DNA Microarray Analysis of Pluripotent and Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells." *DNA Research* 16(1):45–58. doi: 10.1093/DNARES/DSN030.
- She, Meipei, Carolyn J. Decker, Dmitri I. Svergun, Adam Round, Nan Chen, Denise Muhlrads, Roy Parker, and Haiwei Song. 2008. "Structural Basis of Dcp2 Recognition and Activation by Dcp1." *Molecular Cell* 29(3):337–49. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2008.01.002.
- Shenasa, Hossein, and David L. Bentley. 2023. "Pre-mRNA Splicing and Its Co-Transcriptional Connections." *Trends in Genetics: TIG* 39(9):672. doi: 10.1016/J.TIG.2023.04.008.
- Shirai, Yo Taro, Toru Suzuki, Masahiro Morita, Akinori Takahashi, and Tadashi Yamamoto. 2014. "Multifunctional Roles of the Mammalian CCR4-NOT

- Complex in Physiological Phenomena.” *Frontiers in Genetics* 5(AUG):105847. doi: 10.3389/FGENE.2014.00286/BIBTEX.
- Shirane, Kenjiro, Hidehiro Toh, Hisato Kobayashi, Fumihito Miura, Hatsune Chiba, Takashi Ito, Tomohiro Kono, and Hiroyuki Sasaki. 2013. “Mouse Oocyte Methylomes at Base Resolution Reveal Genome-Wide Accumulation of Non-CpG Methylation and Role of DNA Methyltransferases.” *PLoS Genetics* 9(4). doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1003439.
- Singh, Amita, Emanuel Compe, Nicolas Le May, and Jean Marc Egly. 2015. “TFIIH Subunit Alterations Causing Xeroderma Pigmentosum and Trichothiodystrophy Specifically Disturb Several Steps during Transcription.” *American Journal of Human Genetics* 96(2):194–207. doi: 10.1016/J.AJHG.2014.12.012.
- Smallwood, Sébastien A., Shin Ichi Tomizawa, Felix Krueger, Nico Ruf, Natasha Carli, Anne Segonds-Pichon, Shun Sato, Kenichiro Hata, Simon R. Andrews, and Gavin Kelsey. 2011. “Dynamic CpG Island Methylation Landscape in Oocytes and Preimplantation Embryos.” *Nature Genetics* 43(8):811–14. doi: 10.1038/NG.864.
- Smith, Bettye L., Daniel R. Gallie, Hanh Le, and Paul K. Hansma. 1997. “Visualization of Poly(A)-Binding Protein Complex Formation with Poly(A) RNA Using Atomic Force Microscopy.” *Journal of Structural Biology* 119(2):109–17. doi: 10.1006/JSBI.1997.3864.
- Sonenberg, Nahum, and Alan G. Hinnebusch. 2009. “Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets.” *Cell* 136(4):731. doi: 10.1016/J.CELL.2009.01.042.
- Sopta, M., R. W. Carthew, and J. Greenblatt. 1985. “Isolation of Three Proteins That Bind to Mammalian RNA Polymerase II.” *Journal of Biological Chemistry* 260(18):10353–60. doi: 10.1016/s0021-9258(17)39255-4.
- Soto-Suazo, Mauricio, Sebastian San Martin, Emer S. Ferro, and Telma M. Zorn. 2002. “Differential Expression of Glycosaminoglycans and Proteoglycans in the Migratory Pathway of the Primordial Germ Cells of the Mouse.” *Histochemistry and Cell Biology* 118(1):69–78. doi: 10.1007/S00418-002-0414-2.
- Soyal, S. M., A. Amleh, and J. Dean. 2000. “FIG α , a Germ Cell-Specific Transcription Factor Required for Ovarian Follicle Formation.” *Development* 127(21):4645–54. doi: 10.1242/dev.127.21.4645.

- Soyer, Josselin, Lydie Flasse, Wolfgang Raffelsberger, Anthony Beucher, Christophe Orvain, Bernard Peers, Philippe Ravassard, Julien Vermot, Marianne L. Voz, Georg Mellitzer, and Gérard Gradwohl. 2010. “Rfx6 Is an Ngn3-Dependent Winged Helix Transcription Factor Required for Pancreatic Islet Cell Development.” *Development (Cambridge, England)* 137(2):203–12. doi: 10.1242/DEV.041673.
- Spiller, Cassy, and Josephine Bowles. 2019. “Sexually Dimorphic Germ Cell Identity in Mammals.” Pp. 253–88 in *Current Topics in Developmental Biology*. Vol. 134. Academic Press Inc.
- Spradling, Allan C., Wanbao Niu, Qi Yin, Madhulika Pathak, and Bhawana Maurya. 2022. “Conservation of Oocyte Development in Germline Cysts from *Drosophila* to Mouse.” *ELife* 11.
- Stäubli, Andrina, and Antoine HFM Peters. 2021. “Mechanisms of Maternal Intergenerational Epigenetic Inheritance.” *Current Opinion in Genetics and Development* 67:151–62. doi: 10.1016/j.gde.2021.01.008.
- Sternlicht, Andrew L., and Richard M. Schultz. 1981. “Biochemical Studies of Mammalian Oogenesis: Kinetics of Accumulation of Total and Poly(A)-Containing RNA during Growth of the Mouse Oocyte.” *Journal of Experimental Zoology* 215(2):191–200. doi: 10.1002/JEZ.1402150209.
- Stewart, Kathleen R., Lenka Veselovska, Jeesun Kim, Jiahao Huang, Heba Saadeh, Shin Ichi Tomizawa, Sébastien A. Smallwood, Taiping Chen, and Gavin Kelsey. 2015. “Dynamic Changes in Histone Modifications Precede de Novo DNA Methylation in Oocytes.” *Genes & Development* 29(23):2449–62. doi: 10.1101/GAD.271353.115.
- Strahl, Brian D., and C. David Allis. 2000. “The Language of Covalent Histone Modifications.” *Nature* 403(6765):41–45. doi: 10.1038/47412.
- Subtelny, Alexander O., Stephen W. Eichhorn, Grace R. Chen, Hazel Sive, and David P. Bartel. 2014. “Poly(A)-Tail Profiling Reveals an Embryonic Switch in Translational Control.” *Nature* 508(7494):66–71. doi: 10.1038/NATURE13007.
- Suh, Nayoung, Lauren Baehner, Felix Moltzahn, Collin Melton, Archana Shenoy, Jing Chen, and Robert Blelloch. 2010. “MicroRNA Function Is Globally

- Suppressed in Mouse Oocytes and Early Embryos.” *Current Biology* 20(3):271–77. doi: 10.1016/J.CUB.2009.12.044.
- Sun, Q. Y., L. Lai, K. W. Park, B. Kühholzer, R. S. Prather, and H. Schatten. 2001. “Dynamic Events Are Differently Mediated by Microfilaments, Microtubules, and Mitogen-Activated Protein Kinase during Porcine Oocyte Maturation and Fertilization in Vitro.” *Biology of Reproduction* 64(3):879–89. doi: 10.1095/BIOLREPROD64.3.879.
- Susor, Andrej, Denisa Jansova, Renata Cerna, Anna Danylevska, Martin Anger, Tereza Toralova, Radek Malik, Jaroslava Supolikova, Matthew S. Cook, Jeong Su Oh, and Michal Kubelka. 2015. “Temporal and Spatial Regulation of Translation in the Mammalian Oocyte via the MTOR–EIF4F Pathway.” *Nature Communications* 2015 6:1 6(1):1–12. doi: 10.1038/ncomms7078.
- Sutherland, Jessie M., Alexander P. Sobinoff, Kara M. Gunter, Barbara A. Fraser, Victoria Pye, Ilana R. Bernstein, Evan Boon, Nicole A. Siddall, Luisa I. De Andres, Gary R. Hime, Janet E. Holt, Thomas Graf, and Eileen A. McLaughlin. 2015. “Knockout of RNA Binding Protein MSI2 Impairs Follicle Development in the Mouse Ovary: Characterization of MSI1 and MSI2 during Folliculogenesis.” *Biomolecules* 5(3):1228–44. doi: 10.3390/BIOM5031228.
- Svoboda, Petr, Helena Fulka, and Radek Malik. 2017. “Clearance of Parental Products.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 953:489–535. doi: 10.1007/978-3-319-46095-6_10.
- Tadros, Wael, and Howard D. Lipshitz. 2009. “The Maternal-to-Zygotic Transition: A Play in Two Acts.” *Development* 136(18):3033–42. doi: 10.1242/dev.033183.
- Tafuri, Sherrie R., and Alan P. Wolffe. 1993. “Selective Recruitment of Masked Maternal mRNA from Messenger Ribonucleoprotein Particles Containing FRGY2 (MRNP4).” *Journal of Biological Chemistry* 268(32):24255–61. doi: 10.1016/S0021-9258(20)80518-3.
- Takeda, Yasuaki, Yuichiro Mishima, Toshinobu Fujiwara, Hiroshi Sakamoto, and Kunio Inoue. 2009. “DAZL Relieves MiRNA-Mediated Repression of Germline MRNAs by Controlling Poly(A) Tail Length in Zebrafish.” *PLOS ONE* 4(10):e7513. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0007513.
- Takei, Natsumi, Keisuke Sato, Yuki Takada, Rajan Iyyappan, Andrej Susor, Takehiro Yamamoto, and Tomoya Kotani. 2021. “Tdrd3 Regulates the Progression of

- Meiosis II through Translational Control of Emi2 mRNA in Mouse Oocytes.” *Current Research in Cell Biology* 2:100009. doi: 10.1016/J.CRCBIO.2021.100009.
- Tang, Peng, Jiayi Yang, Zonggui Chen, Chen Du, Yang Yang, Haiping Zhao, Li Huang, Guangnan Li, Feiyan Liu, Bei Dong, Ting Shan, Xichen Bao, and Yu Zhou. 2024. “Nuclear Retention Coupled with Sequential Polyadenylation Dictates Post-Transcriptional M6A Modification in the Nucleus.” *Molecular Cell* 84(19):3758-3774.e10. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2024.07.017/ATTACHMENT/B42F76ED-8D1F-4BC7-9C7C-D3B3511CE5AF/MMC4.XLSX.
- Tashiro, Fumi, Masami Kanai-Azuma, Satsuki Miyazaki, Masahiro Kato, Tomofumi Tanaka, Shuichi Toyoda, Eiji Yamato, Hayato Kawakami, Tatsushi Miyazaki, and Jun Ichi Miyazaki. 2010. “Maternal-Effect Gene *Ces5/Ooep/Moep19/Floped* Is Essential for Oocyte Cytoplasmic Lattice Formation and Embryonic Development at the Maternal-Zygotic Stage Transition.” *Genes to Cells* 15(8). doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01420.x.
- Tatarakis, Antonis, Thanasis Margaritis, Celia Pilar Martinez-Jimenez, Antigone Kouskouti, William S. Mohan, Anna Haroniti, Dimitris Kafetzopoulos, László Tora, and Iannis Talianidis. 2008. “Dominant and Redundant Functions of TFIID Involved in the Regulation of Hepatic Genes.” *Molecular Cell* 31(4):531–43. doi: 10.1016/j.molcel.2008.07.013.
- Tay, Joyce, Rebecca Hodgman, and Joel D. Richter. 2000. “The Control of Cyclin B1 mRNA Translation during Mouse Oocyte Maturation.” *Developmental Biology* 221(1):1–9. doi: 10.1006/DBIO.2000.9669.
- Tay, Joyce, and Joel D. Richter. 2001. “Germ Cell Differentiation and Synaptonemal Complex Formation Are Disrupted in CPEB Knockout Mice.” *Developmental Cell* 1(2):201–13. doi: 10.1016/S1534-5807(01)00025-9/ASSET/4B18F837-DA78-495D-8355-8153A9DCCBA1/MAIN.ASSETS/GR7.JPG.
- Teletin, Marius, Nadège Vernet, Norbert B. Ghyselinck, and Manuel Mark. 2017. “Roles of Retinoic Acid in Germ Cell Differentiation.” Pp. 191–225 in *Current Topics in Developmental Biology*. Vol. 125. Academic Press Inc.

- Tora, László. 2002. “A Unified Nomenclature for TATA Box Binding Protein (TBP)-Associated Factors (TAFs) Involved in RNA Polymerase II Transcription.” *Genes and Development* 16(6):673–75.
- Tora, László, and Stéphane D. Vincent. 2021. “What Defines the Maternal Transcriptome?” *Biochemical Society Transactions* 49(5):2051–62.
- Tsanov, Nikolay, Aubin Samacoits, Racha Chouaib, Abdel Meneem Traboulsi, Thierry Gostan, Christian Weber, Christophe Zimmer, Kazem Zibara, Thomas Walter, Marion Peter, Edouard Bertrand, and Florian Mueller. 2016. “SmiFISH and FISH-Quant - A Flexible Single RNA Detection Approach with Super-Resolution Capability.” *Nucleic Acids Research* 44(22). doi: 10.1093/nar/gkw784.
- Tunquist, Brian J., and James L. Maller. 2003. “Under Arrest: Cytostatic Factor (CSF)-Mediated Metaphase Arrest in Vertebrate Eggs.” *Genes & Development* 17(6):683–710. doi: 10.1101/GAD.1071303.
- Uysal, Fatma, and Saffet Ozturk. 2019. “Embryonic Poly(A)-Binding Protein Is Differently Expressed and Interacts with the Messenger RNAs in the Mouse Oocytes and Early Embryos.” *Journal of Cellular Biochemistry* 120(3):4694–4709. doi: 10.1002/JCB.27759.
- Vaccari, Sergio, James L. Weeks, Minnie Hsieh, Frank S. Menniti, and Marco Conti. 2009. “Cyclic GMP Signaling Is Involved in the Luteinizing Hormone-Dependent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes.” *Biology of Reproduction* 81(3):595–604. doi: 10.1095/BIOLREPROD.109.077768.
- Veenstra, G. J. C., D. L. Weeks, and A. P. Wolffe. 2000. “Distinct Roles for TBP and TBP-like Factor in Early Embryonic Gene Transcription in *Xenopus*.” *Science (New York, N.Y.)* 290(5500):2312–15. doi: 10.1126/SCIENCE.290.5500.2312.
- Vernet, Nadège, Diana Condrea, Chloé Mayere, Betty Féret, Muriel Klopfenstein, William Magnant, Violaine Alunni, Marius Telentin, Sirine Souali-Crespo, Serge Nef, Manuel Mark, and Norbert B. Ghyselinck. 2020. *Meiosis Occurs Normally in the Fetal Ovary of Mice Lacking All Retinoic Acid Receptors*.
- Vincent, Stéphane D., N. Ray Dunn, Roger Sciammas, Miriam Shapiro-Shalef, Mark M. Davis, Kathryn Calame, Elizabeth K. Bikoff, and Elizabeth J. Robertson. 2005. “The Zinc Finger Transcriptional Repressor Blimp1/Prdm1 Is Dispensable for Early Axis Formation but Is Required for Specification of

- Primordial Germ Cells in the Mouse.” *Development (Cambridge, England)* 132(6):1315–25. doi: 10.1242/DEV.01711.
- Vitali, Teresa, Rosa Sanchez-Alvarez, Tomasz M. Witkos, Ioannis Bantounas, Marie F. A. Cutiongco, Michal Dudek, Guanhua Yan, Alexander A. Mironov, Joe Swift, and Martin Lowe. 2023. “Vimentin Intermediate Filaments Provide Structural Stability to the Mammalian Golgi Complex.” *Journal of Cell Science* 136(20). doi: 10.1242/JCS.260577/VIDEO-6.
- Vogt, Edgar John, Keizo Tokuhira, Min Guo, Ryan Dale, Guanghui Yang, Maria Jimenez Movilla, Hari Shroff, and Jurrien Dean. 2019. “Anchoring Cortical Granules in the Cortex Ensures Trafficking to the Plasma Membrane for Post-Fertilization Exocytosis.” *Nature Communications* 2019 10:1 10(1):1–13. doi: 10.1038/s41467-019-10171-7.
- Vos, Seychelle M., Lucas Farnung, Henning Urlaub, and Patrick Cramer. 2018. “Structure of Paused Transcription Complex Pol II–DSIF–NELF.” *Nature* 560(7720):601–6. doi: 10.1038/s41586-018-0442-2.
- Voss, A. K., T. Thomas, P. Petrou, K. Anastasiadis, H. Schöler, and P. Gruss. 2000. “Taube Nuss Is a Novel Gene Essential for the Survival of Pluripotent Cells of Early Mouse Embryos.” *Development* 127(24):5449–61. doi: 10.1242/dev.127.24.5449.
- Vukovic, Ivana, Samantha M. Barnada, Jonathan W. Ruffin, Jon Karlin, Ravi Kumar Lokareddy, Gino Cingolani, and Steven B. McMahon. 2024. “Non-Redundant Roles for the Human mRNA Decapping Cofactor Paralog DCP1a and DCP1b.” *Life Science Alliance* 7(11):e202402938. doi: 10.26508/LSA.202402938.
- Wahle, Elmar, and G. Sebastiaan Winkler. 2013. “RNA Decay Machines: Deadenylation by the Ccr4-Not and Pan2-Pan3 Complexes.” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1829(6–7):561–70. doi: 10.1016/j.bbagrm.2013.01.003.
- Wan, Yanling, Shuang Yang, Tongtong Li, Yuling Cai, Xinyue Wu, Mingyu Zhang, Tahir Muhammad, Tao Huang, Yue Lv, Wai Yee Chan, Gang Lu, Jingxin Li, Qian Qian Sha, Zi Jiang Chen, and Hongbin Liu. 2023. “LSM14B Is Essential for Oocyte Meiotic Maturation by Regulating Maternal mRNA Storage and Clearance.” *Nucleic Acids Research* 51(21):11652–67. doi: 10.1093/NAR/GKAD919.

- Wang, Bo Qing, and Zachary F. Burton. 1995. *Functional Domains of Human RAP74 Including a Masked Polymerase Binding Domain**. Vol. 270.
- Wang, Chong, and Hui Liu. 2022. “Factors Influencing Degradation Kinetics of MRNAs and Half-Lives of MicroRNAs, CircRNAs, LncRNAs in Blood in Vitro Using Quantitative PCR.” *Scientific Reports* 2022 12:1 12(1):1–11. doi: 10.1038/s41598-022-11339-w.
- Wang, Fang, Farrah El-Saafin, Tao Ye, Matthieu Stierle, Luc Negroni, Matej Durik, Veronique Fischer, Didier Devys, Stéphane D. Vincent, and László Tora. 2021. “Histone H2Bub1 Deubiquitylation Is Essential for Mouse Development, but Does Not Regulate Global RNA Polymerase II Transcription.” *Cell Death and Differentiation* 28(8):2385–2403. doi: 10.1038/s41418-021-00759-2.
- Wang, P. Jeremy, and David C. Page. 2002. “Functional Substitution for TAF II 250 by a Retroposed Homolog That Is Expressed in Human Spermatogenesis.” *Human Molecular Genetics* 11(19):2341–46. doi: 10.1093/HMG/11.19.2341.
- Wang, Ying, Jin jian Lu, Li He, and Qiang Yu. 2011. “Triptolide (TPL) Inhibits Global Transcription by Inducing Proteasome-Dependent Degradation of RNA Polymerase II (Pol II).” *PloS One* 6(9). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0023993.
- Wang, Yu, Mingfei Xiang, Zhaojuan Yu, Yan Hao, Qianhua Xu, Shuai Kong, Fengsong Wang, Xuanming Shi, Gaojie Song, Yunxia Cao, Lingli Huang, and Fuxi Zhu. 2021. “A Homozygous Missense Mutation in TBPL2 Is Associated with Oocyte Maturation Arrest and Degeneration.” *Clinical Genetics* 100(3). doi: 10.1111/cge.13993.
- Wassarman, Paul M., and Eveline S. Litscher. 2022. “Female Fertility and the Zona Pellucida.” *ELife* 11.
- Weakley, Brenda S. 1968. “Comparison of Cytoplasmic Lamellae and Membranous Elements in the Oocytes of Five Mammalian Species.” *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948)* 85(1):109–23. doi: 10.1007/BF00330591.
- Weick, Eva Maria, and Christopher D. Lima. 2021. “RNA Helicases Are Hubs That Orchestrate Exosome-Dependent 3′–5′ Decay.” *Current Opinion in Structural Biology* 67:86. doi: 10.1016/J.SBI.2020.09.010.

- Weil, P. Anthony, Donal S. Luse, Jacqueline Segall, and Robert G. Roeder. 1979. *Selective and Accurate Initiation of Transcription at the Ad2 Major Late Promotor in a Soluble System Dependent on Purified RNA Polymerase II and DNA*. Vol. 8.
- Weill, Laure, Eulàlia Belloc, Chiara Lara Castellazzi, and Raúl Méndez. 2017. “Musashi 1 Regulates the Timing and Extent of Meiotic mRNA Translational Activation by Promoting the Use of Specific CPEs.” *Nature Structural and Molecular Biology* 24(8):672–81. doi: 10.1038/NSMB.3434.
- Wessel, Gary M., Sean D. Conner, and Linnea Berg. 2002. “Cortical Granule Translocation Is Microfilament Mediated and Linked to Meiotic Maturation in the Sea Urchin Oocyte.” *Development* 129(18):4315–25. doi: 10.1242/DEV.129.18.4315.
- West, Steven, Natalla Gromak, and Nick J. Proudfoot. 2004. “Human 5' --> 3' Exonuclease Xrn2 Promotes Transcription Termination at Co-Transcriptional Cleavage Sites.” *Nature* 432(7016):522–25. doi: 10.1038/NATURE03035.
- Wieczorek, E., M. Brand, X. Jacq, and L. Tora. 1998. “Function of TAF(II)-Containing Complex without TBP in Transcription by RNA Polymerase II.” *Nature* 393(6681). doi: 10.1038/30283.
- Wigglesworth, Karen, Kyung Bon Lee, Marilyn J. O'Brien, Jia Peng, Martin M. Matzuk, and John J. Eppig. 2013. “Bidirectional Communication between Oocytes and Ovarian Follicular Somatic Cells Is Required for Meiotic Arrest of Mammalian Oocytes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(39). doi: 10.1073/PNAS.1314829110.
- Winkler, G. Sebastiaan. 2010. “The Mammalian Anti-Proliferative BTG/Tob Protein Family.” *Journal of Cellular Physiology* 222(1):66–72. doi: 10.1002/JCP.21919.
- Wolf, D. P., and M. Hamada. 1977. “Induction of Zonal and Egg Plasma Membrane Blocks to Sperm Penetration in Mouse Eggs with Cortical Granule Exudate.” *Biology of Reproduction* 17(3):350–54. doi: 10.1095/BIOLREPROD17.3.350.
- Woods, Alison J., Marnie S. Roberts, Jyoti Choudhary, Simon T. Barry, Yuichi Mazaki, Hisataka Sabe, Simon J. Morley, David R. Critchley, and Jim C. Norman. 2002. “Paxillin Associates with Poly(A)-Binding Protein 1 at the Dense Endoplasmic Reticulum and the Leading Edge of Migrating Cells.” *The*

- Journal of Biological Chemistry* 277(8):6428–37. doi: 10.1074/JBC.M109446200.
- Wu, Di, and Jurrien Dean. 2020. “EXOSC10 Sculpts the Transcriptome during the Growth-to-Maturation Transition in Mouse Oocytes.” *Nucleic Acids Research* 48(10):5349–65. doi: 10.1093/nar/gkaa249.
- Wu, Di, Monique Pedroza, Jonathan Chang, and Jurrien Dean. 2023. “DIS3L2 Ribonuclease Degrades Terminal-Uridylated RNA to Ensure Oocyte Maturation and Female Fertility.” *Nucleic Acids Research* 51(7):3078. doi: 10.1093/NAR/GKAD061.
- Wu, Guifen, Manfred Schmid, Leonor Rib, Patrik Polak, Nicola Meola, Albin Sandelin, and Torben Heick Jensen. 2020. “A Two-Layered Targeting Mechanism Underlies Nuclear RNA Sorting by the Human Exosome.” *Cell Reports* 30(7):2387–2401.e5. doi: 10.1016/J.CELREP.2020.01.068.
- Wu, Jingchao, Cecilia de Heus, Qingyang Liu, Benjamin P. Bouchet, Ivar Noordstra, Kai Jiang, Shasha Hua, Maud Martin, Chao Yang, Ilya Grigoriev, Eugene A. Katrukha, A. F. Maarten Altelaar, Casper C. Hoogenraad, Robert Z. Qi, Judith Klumperman, and Anna Akhmanova. 2016. “Molecular Pathway of Microtubule Organization at the Golgi Apparatus.” *Developmental Cell* 39(1):44–60. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2016.08.009.
- Wu, Xuemei, Maria M. Viveiros, John J. Eppig, Yuchen Bai, Susan L. Fitzpatrick, and Martin M. Matzuk. 2003. “Zygote Arrest 1 (Zar1) Is a Novel Maternal-Effect Gene Critical for the Oocyte-to-Embryo Transition.” *Nature Genetics* 33(2):187–91. doi: 10.1038/NG1079.
- Wu, Yun-Wen, Zuo-Qi Deng, Yan Rong, Guo-Wei Bu, Yu-Ke Wu, Xuan Wu, Hong Cheng, and Heng-Yu Fan. 2024. “RNA Surveillance by the RNA Helicase MTR4 Determines Volume of Mouse Oocytes.” *Developmental Cell*. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2024.09.009.
- Xu, Qianhua, Yunlong Xiang, Qiujun Wang, Leyun Wang, Julie Brind’Amour, Aaron Blair Bogutz, Yu Zhang, Bingjie Zhang, Guang Yu, Weikun Xia, Zhenhai Du, Chunyi Huang, Jing Ma, Hui Zheng, Yuanyuan Li, Chao Liu, Cheryl Lyn Walker, Eric Jonasch, Louis Lefebvre, Min Wu, Matthew C. Lorincz, Wei Li, Li Li, and Wei Xie. 2019. “SETD2 Regulates the Maternal Epigenome,

- Genomic Imprinting and Embryonic Development.” *Nature Genetics* 2019 51:5 51(5):844–56. doi: 10.1038/S41588-019-0398-7.
- Xu, Shaohai, Soak Kuan Lai, Donald Yuhui Sim, Warren Shou Leong Ang, Hoi Yeung Li, and Xavier Roca. 2022. “SRRM2 Organizes Splicing Condensates to Regulate Alternative Splicing.” *Nucleic Acids Research* 50(15):8599–8614. doi: 10.1093/NAR/GKAC669.
- Yamashita, Akio, Tsung Cheng Chang, Yukiko Yamashita, Wenmiao Zhu, Zhenping Zhong, Chyi Ying A. Chen, and Ann Bin Shyu. 2005. “Concerted Action of Poly(A) Nucleases and Decapping Enzyme in Mammalian mRNA Turnover.” *Nature Structural & Molecular Biology* 12(12):1054–63. doi: 10.1038/NSMB1016.
- Yang, Cai Rong, Gabriel Rajkovic, Enrico Maria Daldello, Xuan G. Luong, Jing Chen, and Marco Conti. 2020. “The RNA-Binding Protein DAZL Functions as Repressor and Activator of mRNA Translation during Oocyte Maturation.” *Nature Communications* 11(1). doi: 10.1038/s41467-020-15209-9.
- Yang, Juxiang, Sergey Medvedev, Junying Yu, Linda C. Tang, Julio E. Agno, Martin M. Matzuk, Richard M. Schultz, and Norman B. Hecht. 2005. “Absence of the DNA-/RNA-Binding Protein MSY2 Results in Male and Female Infertility.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(16):5755–60. doi: 10.1073/PNAS.0408718102.
- Yang, Juxiang, Carlos R. Morales, Sergey Medvedev, Richard M. Schultz, and Norman B. Hecht. 2007. “In the Absence of the Mouse DNA/RNA-Binding Protein MSY2, Messenger RNA Instability Leads to Spermatogenic Arrest.” *Biology of Reproduction* 76(1):48–54. doi: 10.1095/BIOLREPROD.106.055095.
- Yang, Ping, Tailai Chen, Keliang Wu, Zhenzhen Hou, Yang Zou, Mei Li, Xin Ze Zhang, Juntong Xu, and Han Zhao. 2021. “A Homozygous Variant in TBPL2 Was Identified in Women with Oocyte Maturation Defects and Infertility.” *Human Reproduction (Oxford, England)* 36(7). doi: 10.1093/humrep/deab094.
- Yi, Hyerim, Joha Park, Minju Ha, Jaechul Lim, Hyeshik Chang, and V. Narry Kim. 2018. “PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay.” *Molecular Cell* 70(6):1081–1088.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.009.

BIBLIOGRAPHIE

- Yu, Changwei, Nevena Cvetic, Vincent Hisler, Kapil Gupta, Tao Ye, Emese Gazdag, Luc Negroni, Petra Hajkova, Imre Berger, Boris Lenhard, Ferenc Müller, Stéphane D. Vincent, and László Tora. 2020. “TBPL2/TFIIA Complex Establishes the Maternal Transcriptome through Oocyte-Specific Promoter Usage.” *Nature Communications* 11(1). doi: 10.1038/s41467-020-20239-4.
- Yu, Chao, Shu Yan Ji, Qian Qian Sha, Yujiao Dang, Jian Jie Zhou, Yin Li Zhang, Yang Liu, Zhong Wei Wang, Boqiang Hu, Qing Yuan Sun, Shao Chen Sun, Fuchou Tang, and Heng Yu Fan. 2016. “BTG4 Is a Meiotic Cell Cycle-Coupled Maternal-Zygotic-Transition Licensing Factor in Oocytes.” *Nature Structural and Molecular Biology* 23(5):387–94. doi: 10.1038/nsmb.3204.
- Yu, J., N. B. Hecht, and R. M. Schultz. 2001. “Expression of MSY2 in Mouse Oocytes and Preimplantation Embryos.” *Biology of Reproduction* 65(4):1260–70. doi: 10.1095/BIOLREPROD65.4.1260.
- Yu, Junying, Manqi Deng, Sergey Medvedev, Juxiang Yang, Norman B. Hecht, and Richard M. Schultz. 2004. “Transgenic RNAi-Mediated Reduction of MSY2 in Mouse Oocytes Results in Reduced Fertility.” *Developmental Biology* 268(1):195–206. doi: 10.1016/J.YDBIO.2003.12.020.
- Yu, Junying, Norman B. Hecht, and Richard M. Schultz. 2002. “RNA-Binding Properties and Translation Repression In Vitro by Germ Cell-Specific MSY2 Protein 1.” *1093 BIOLOGY OF REPRODUCTION* 67:1093–98. doi: 10.1095/biolreprod.102.005876.
- Yurttas, Piraye, Alejandra M. Vitale, Robert J. Fitzhenry, Leona Cohen-Gould, Wenzhu Wu, Jan A. Gossen, and Scott A. Coonrod. 2008. “Role for PADI6 and the CPLs in Ribosomal Storage in Oocytes and Translation in the Early Embryo.” *Development (Cambridge, England)* 135(15):2627. doi: 10.1242/DEV.016329.
- Zaret, Kenneth S., and Susan E. Mango. 2016. “Pioneer Transcription Factors, Chromatin Dynamics, and Cell Fate Control.” *Current Opinion in Genetics and Development* 37:76–81. doi: 10.1016/j.gde.2015.12.003.
- Zehavi, Yonathan, Adi Kedmi, Diana Ideses, and Tamar Juven-Gershon. 2015. “TRF2: TRansForming the View of General Transcription Factors.” *Transcription* 6(1).

- Zeng, Yang, and Taiping Chen. 2019. "DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development." *Genes* 10(4). doi: 10.3390/GENES10040257.
- Zhang, Di, Tarja Leena Penttilä, Patricia L. Morris, Martin Teichmann, and Robert G. Roeder. 2001. "Spermiogenesis Deficiency in Mice Lacking the Trf2 Gene." *Science (New York, N.Y.)* 292(5519):1153–55. doi: 10.1126/SCIENCE.1059188.
- Zhao, Long Wen, Ye Zhang Zhu, Yun Wen Wu, Shuai Bo Pi, Li Shen, and Heng Yu Fan. 2022. "Nuclear Poly(A) Binding Protein 1 (PABPN1) Mediates Zygotic Genome Activation-Dependent Maternal mRNA Clearance during Mouse Early Embryonic Development." *Nucleic Acids Research* 50(1):458–72. doi: 10.1093/NAR/GKAB1213.
- Zhao, Long-Wen, Ye-Zhang Zhu, Hao Chen, Yun-Wen Wu, Shuai-Bo Pi, Lu Chen, Li Shen, and Heng-Yu Fan. 2020. "PABPN1L Mediates Cytoplasmic mRNA Decay as a Placeholder during the Maternal-to-zygotic Transition." *EMBO Reports* 21(8). doi: 10.15252/EMBR.201949956/SUPPL_FILE/EMBR201949956-SUP-0013-SDATAEV.ZIP.
- Zheng, Guanqun, John Arne Dahl, Yamei Niu, Peter Fedorcsak, Chun Min Huang, Charles J. Li, Cathrine B. Vågbø, Yue Shi, Wen Ling Wang, Shu Hui Song, Zhike Lu, Ralph P. G. Bosmans, Qing Dai, Ya Juan Hao, Xin Yang, Wen Ming Zhao, Wei Min Tong, Xiu Jie Wang, Florian Bogdan, Kari Furu, Ye Fu, Guifang Jia, Xu Zhao, Jun Liu, Hans E. Krokan, Arne Klungland, Yun Gui Yang, and Chuan He. 2013. "ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase That Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility." *Molecular Cell* 49(1):18–29. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2012.10.015.
- Zheng, Wei, Zhou Zhou, Qianqian Sha, Xiangli Niu, Xiaoxi Sun, Juanzi Shi, Lei Zhao, Shuoping Zhang, Jing Dai, Sufen Cai, Fei Meng, Liang Hu, Fei Gong, Xiaoran Li, Jing Fu, Rong Shi, Guangxiu Lu, Biaobang Chen, Hengyu Fan, Lei Wang, Ge Lin, and Qing Sang. 2020. "Homozygous Mutations in BTG4 Cause Zygotic Cleavage Failure and Female Infertility." *American Journal of Human Genetics* 107(1):24–33. doi: 10.1016/J.AJHG.2020.05.010.
- Zheng, Wenjing, Hua Zhang, and Kui Liu. 2014. "The Two Classes of Primordial Follicles in the Mouse Ovary: Their Development, Physiological Functions and

- Implications for Future Research.” *Molecular Human Reproduction* 20(4):286–92. doi: 10.1093/MOLEHR/GAU007.
- Zhou, Haiying, Ivan Grubisic, Ke Zheng, Ying He, P. Jeremy Wang, Tommy Kaplan, and Robert Tjian. 2013. “Taf7l Cooperates with Trf2 to Regulate Spermiogenesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(42):16886–91. doi: 10.1073/pnas.1317034110.
- Zhou, Haiying, Tommy Kaplan, Yan Li, Ivan Grubisic, Zhengjian Zhang, P. Jeremy Wang, Michael B. Eisen, and Robert Tjian. 2013. “Dual Functions of TAF7L in Adipocyte Differentiation.” *ELife* 2013(2). doi: 10.7554/eLife.00170.
- Zuccotti, Maurizio, Valeria Merico, Martina Belli, Francesca Mulas, Lucia Sacchi, Blaz Zupan, Carlo Alberto Redi, Alessandro Prigione, James Adjaye, Riccardo Bellazzi, and Silvia Garagna. 2012. “OCT4 and the Acquisition of Oocyte Developmental Competence during Folliculogenesis.” *International Journal of Developmental Biology* 56(10–12):853–58. doi: 10.1387/ijdb.120174mz.

ANNEXES

Sous unités de SAGA et d'ATAC durant la croissance de l'ovocyte

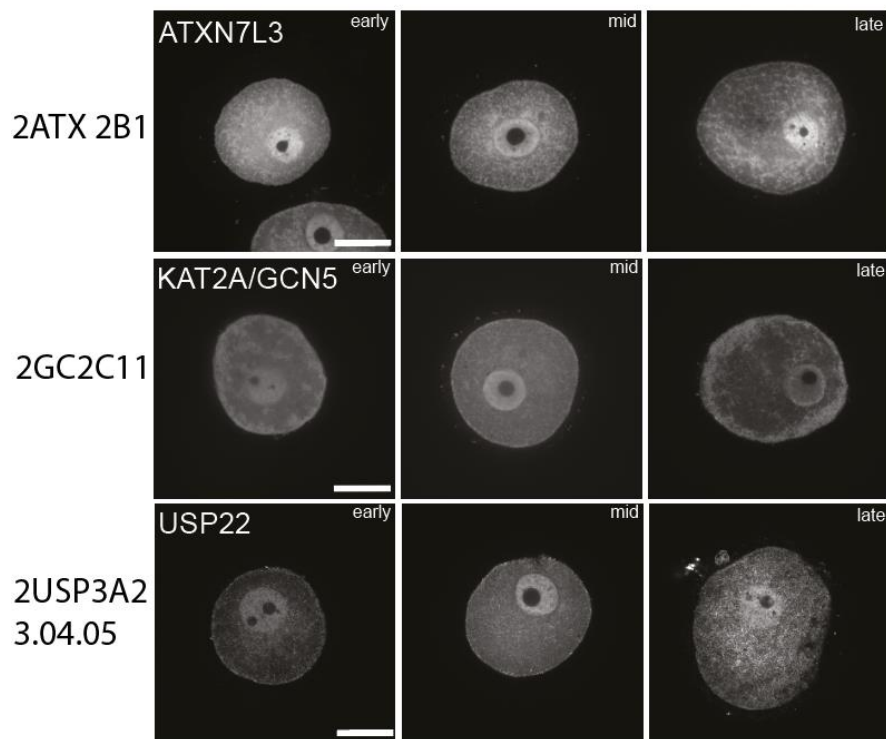


Figure 65: Screening additionnel de sous-unités de SAGA, ATAC durant la croissance de l'ovocyte

Immunofluorescence ciblant différentes sous-unités de SAGA. La référence de chaque anticorps testé est indiquée sur la gauche de chaque panel. Barre d'échelle : 25µm

Microscopie épiscopique à haute résolution (HREM)

Dans le cadre d'une collaboration avec Olivia WENDLING de la plateforme d'histopathologie et embryogenèse, j'ai donné des échantillons pour tester la mise au point de la nouvelle approche de visualisation HREM. Cela a permis de d'observer les ovaires PN14 WT et mutants *Tbpl2*. L'approche HREM permet de réaliser des coupes sériées au microtome et d'en visualiser l'avancement dans l'épaisseur du tissu. Les résultats montrent que la mise au point de l'approche par Olivia à très bien fonctionné (**figure 66**).

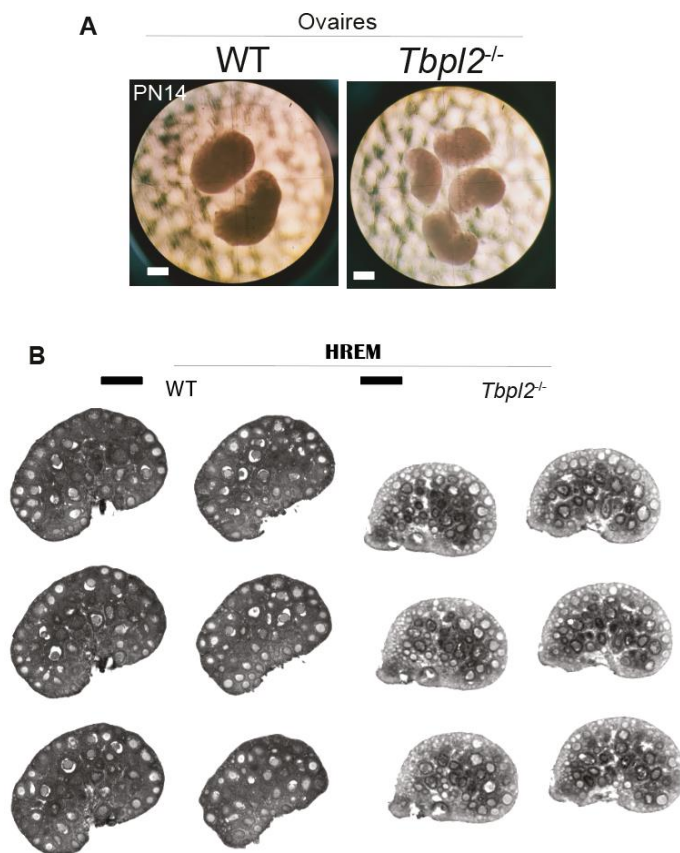


Figure 66 : : Etude complémentaire des ovaires à PN14 par l'approche de microscopie épiscopique à haute résolution (HREM)

(A) Ovaires PN14 WT et mutants *Tbpl2* observés sous binoculaire. (B)

Visualisation de coupes séquentielles par l'approche HREM d'ovaires PN14 WT et mutants *Tbpl2*. Barres d'échelle : 500 μ m

Publications

ARTICLE 1. Le développement embryonnaire pré-gastrulatoire humain : modèles d'avenir et enjeux sociétaux

Paris_Biologie Aujourd'hui 214 (3-4), 109-113 (2020) © Société de Biologie, 2020

<https://doi.org/10.1051/jbio/2020012>

Inès Jmel Boyer et **Emmanuel García Sánchez**

Dans cet article, en collaboration avec Inès Jmel Boyer, nous décrivons les modèles actuels en biologie de développement qui permettent l'étude et la modélisation de l'embryogenèse humaine. Nous discutons les avantages et limites de la recherche menée sur les lignées cellulaires, les gastruloïdes et autres modèles animaux. Nous abordons les règles d'éthique et les modifications dynamiques des recommandations et de la législation sur les années à venir qui sont basées principalement sur la loi de Bioéthique.

ARTICLE

Le développement embryonnaire pré-gastrulatoire humain : modèles d'avenir et enjeux sociétaux

Inès Jmel Boyer* et Emmanuel García Sánchez

Master Génétique Moléculaire du Développement et des Cellules Souches, Université de Strasbourg, 4 Rue Blaise Pascal, 67081 Strasbourg, France

Reçu le 7 septembre 2020

Résumé – L'infertilité, les fausses couches précoces et les malformations congénitales sont des problèmes majeurs de santé publique fréquents et relativement méconnus. Jusqu'à présent ce que l'on sait du développement précoce humain provient de deux sources principales : l'étude d'embryons humains et l'étude d'animaux modèles. Bien que certains mécanismes moléculaires soient conservés, il existe des spécificités liées à l'espèce humaine. Ainsi, il est important d'étudier les animaux modèles les plus proches possibles dans la classification phylogénétique, ce qui a mené à l'utilisation de lignées cellulaires de primates. De nos jours, les seuls embryons humains disponibles sont ceux issus de la Fécondation *In Vitro*, ils sont donc peu nombreux et doivent être détruits au bout de 14 jours. Cela a poussé les chercheurs à développer de nouvelles stratégies. Différentes équipes ont donc utilisé les cellules souches embryonnaires ou les cellules souches pluripotentes induites et leurs propriétés d'auto-organisation *in vitro* pour recréer des « embryons » et ainsi étudier leur développement. Ces nouvelles stratégies permettent de limiter l'utilisation d'embryons humains mais de nouvelles questions se posent désormais sur le statut légal de ces nouveaux « modèles ». À l'avenir, il sera important de mettre à jour les différentes législations et recommandations de l'*International Society for Stem Cell Research* (ISSCR) au fur et à mesure des avancées scientifiques pour éviter toute dérive. Un respect des recommandations et le maintien de discussions entre spécialistes et « grand public » permettront une meilleure compréhension du développement précoce humain et la mise en place de stratégies répondant à des enjeux sanitaires.

Mots clés : Développement embryonnaire humain, embryonoïde « type iPSC », lignée cellulaire de Primates, « Règle des 14 jours », loi de Bioéthique

Abstract – The pre-gastrulation embryonic human development: future models and societal concerns. Infertility, early miscarriages and congenital malformations are major public health issues that are frequent and poorly understood. Until now, what is known about early human development originates from two main sources: studies of human embryos and studies of model animals. Although some molecular mechanisms are conserved, there are specific human features. Thus, it is necessary to study model animals that are close to humans in the phylogenetic classification, which led to the use of pre-established primate cell lineages. Currently, the only human embryos available come from *In Vitro* Fertilization, which leads to important limitations: these embryos are relatively few and must be destroyed after 14 days. This has led researchers to develop new strategies. Several teams used Embryonic Stem Cells or Induced Pluripotent Stem Cells and their *in vitro* auto-organization properties to recreate "embryos" and thereby study their development. These new strategies allow a reduced use of human embryos but new questions arise about the legal status of these new research "models". In the future, it would be important to update the different legislations and recommendations of the *International Society for Stem Cell Research* as science progresses to avoid any falling drift. The respect of recommendations as well as the maintenance of discussions between specialists and the general public will allow a better understanding of early human development and the establishment of innovative strategies to target health challenges.

Keywords: Human embryonic development, ESC-like embryo, primate cell line, "14 days rule", bioethical law

*Auteur correspondant : ines.jmel-boyer@etu.unistra.fr

Abréviations

BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
ISSCR	<i>International Society for Stem Cell Research</i>
OCT4	<i>Octamer-binding Transcription factor 4</i>
NODAL	Protéine de la famille des TGF- β
NOGGIN	Protéine inhibitrice des protéines BMP
WNT	Famille de glycoprotéines
FIV	<i>Fécondation In Vitro</i>
ESC	<i>Embryonic Stem Cell</i>
iPSC	<i>induced Pluripotent Stem Cell</i>
EMRO	<i>Embryo Research Oversight</i>

Introduction

L'infertilité, les fausses couches précoces et les malformations congénitales sont des problèmes sanitaires majeurs, fréquents et relativement méconnus. Jusqu'à présent les grandes étapes du développement humain ont été modélisées par l'étude d'animaux plus ou moins proches dans la classification phylogénétique puisque des mécanismes sont conservés au cours de l'évolution. Cependant, il existe des aspects propres au développement humain qui rendent l'étude d'embryons humains nécessaire. Le développement embryonnaire humain s'étend sur une période plus longue que celle des animaux modèles mammifères. Des événements comme la gastrulation sont différents chez les humains (formation de la chorde notamment). L'amniogenèse et la placentation (formation d'annexes embryonnaires) présentent des particularités inter-espèces, l'amnios se forme par « cavitation » chez l'Homme mais par « plissement » chez la souris par exemple (Foucrier & Franquinet, 2013). Ces spécificités liées à l'espèce expliqueraient, en partie, des problèmes développementaux précoces qui demeurent encore incompris. Les enjeux techniques et éthiques ont amené les chercheurs à développer des stratégies alternatives pour pallier ce manque de connaissances. Nous aborderons trois d'entre elles : l'utilisation de lignées cellulaires de primates, le développement des blastuloïdes ou gastruloïdes basé sur l'utilisation des cellules souches embryonnaires murines ou humaines et enfin l'utilisation d'embryons humains.

Les embryons et lignées cellulaires de primates : modèles pour le développement humain

Chez les mammifères, les premières divisions du zygote ont lieu dans l'oviducte, l'implantation et la gastrulation de l'embryon dans l'utérus. De fait, les embryons post-implantatoires de mammifères sont difficilement accessibles. C'est pourquoi, jusqu'à présent, l'étude du développement précoce humain est fondée sur les travaux de recherche réalisés chez la souris et le lapin ou sur des

observations d'embryons de singes et d'humains (collections obtenues, longtemps avant l'établissement d'une réglementation sur l'étude et la récupération d'embryons humains, après diverses interventions chirurgicales, de nos jours interdites) qui ont permis d'établir que certaines étapes du développement ne sont pas transposables à toutes les espèces de mammifères. Par exemple, les embryons de souris forment un « œuf cylindre » alors que chez les primates, l'embryon est « aplati » pour former un disque bilaminaire, cette différence de morphologie influençant les relations spatiales entre les divers lignages cellulaires. De plus, de nombreuses différences découlent du fait que les embryons humains s'implantent dans la paroi utérine à 7 jours post-fécondation contre 5 chez la souris (Rossant, 2016). Les embryons de singes apparaissent comme un modèle d'étude adapté car ils présentent de nombreuses similitudes avec les embryons humains d'un point de vue génétique, physiologique et évolutif (Ma et al., 2019a).

Il est possible d'étudier les stades pré-implantatoires en extrayant les embryons, cependant il faut ensuite être en mesure de les maintenir en vie suffisamment longtemps pour pouvoir étudier les étapes de pré-gastrulation. Plusieurs équipes (Ma et al., 2019a; Niu et al., 2019) ont mis en place un protocole permettant la culture en trois dimensions d'embryons de singes *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) créés par Fécondation *in vitro* (FIV) et mis en culture jusqu'à 20 jours post-fécondation. Ces embryons présentaient plusieurs signes morphologiques typiques de la gastrulation comme la formation d'une ligne primitive et de divers précurseurs cellulaires ainsi que l'acquisition d'un axe antéro-postérieur. Les chercheurs ont pu confirmer, à l'aide de colorations à l'hématoxyline, à l'éosine et d'immunomarquages, que les embryons *in vitro* présentaient des types cellulaires et des profils d'expression de gènes similaires à ceux d'embryons extraits, tant au niveau spatial que temporel, même s'il existe encore quelques différences concernant tous les types cellulaires retrouvés dans ces embryons cultivés *in vitro* (certaines cellules ne correspondaient à aucun type cellulaire connu). De plus, ces équipes ont pu mettre en évidence une interaction entre les cellules amniotiques, les cellules germinales primordiales et les cellules de la ligne primitive, ce qui pourrait indiquer que les cellules amniotiques jouent un rôle dans la spéciation des cellules germinales primordiales et des cellules de la ligne primitive (Ma et al., 2019a, 2019b). Il est donc envisageable que ces modèles continuent à se développer et permettent des études plus approfondies sur les mécanismes moléculaires de l'embryogenèse chez les primates. Cependant, des différences existent aussi entre les embryons humains et ceux de macaques, c'est le cas par exemple du patron d'expression des BMP au niveau de l'épiblaste. Ces différences sont encore mal connues mais, de ce fait, l'étude d'embryons de macaques, bien qu'utile, ne permet pas de remplacer complètement les études sur des embryons humains (Vogt, 2020).

Utilisation d'embryons humains pour l'étude des premières étapes du développement

Des embryons non utilisés pour une FIV sont donnés par des couples à la recherche ce qui permet aux chercheurs de les étudier. Ces embryons peuvent être conservés pendant 14 jours maximum, après quoi ils doivent être détruits (*cf.* partie éthique). À l'origine, cette limite n'était pas réellement une contrainte puisqu'aucun embryon humain n'avait pu être conservé au-delà de 7 jours. Cependant, en 2016, deux équipes (A. Brivanlou et M. Zernicka-Goetz) ont réussi à développer des techniques de culture en 2D permettant de maintenir des embryons 12 à 13 jours après la fécondation (Deglincerti *et al.*, 2016 ; Shahbazi *et al.*, 2016). Ils ont également montré que ces embryons pouvaient mimer une implantation *in vitro* sans aucun apport maternel. Cette année, une nouvelle équipe a développé un système de culture en 3D capable de mieux récapituler le lignage cellulaire humain (formation des sacs vitellins primaire et secondaire, apparition d'un axe antéro-postérieur chez l'embryon, mais surtout séparation entre l'épithélium amniotique et les cellules épiblastiques), permettant notamment de montrer que, contrairement à ce qui est observé chez la souris, les cellules épiblastiques humaines d'embryon implanté maintiennent leurs potentialités transcriptionnelles de façon stable sur une période prolongée tout en acquérant des propriétés pour la différenciation neuronale et le développement de la vasculature (Xiang *et al.*, 2020).

En 2017, l'équipe de Kathy Niakan de l'Institut Francis Crick de Londres a reçu l'autorisation de modifier génétiquement des embryons humains. Ces chercheurs ont délété le gène *POU5F1* codant pour la protéine OCT4 chez l'humain et la souris et ont observé les conséquences sur le développement. Chez les souris déplétées pour OCT4, les embryons ne mouraient qu'après le stade blastocyste alors que les embryons humains modifiés étaient incapables de former des blastocystes. L'absence d'OCT4 a entraîné une baisse d'expression des gènes de l'épiblaste, du trophoblaste et de l'endoderme primitif, ce qui suggère que OCT4 a un rôle précoce dans le développement embryonnaire humain et met en évidence de façon irrévocable les différents patrons d'expression temporelle de gènes selon les espèces (Fogarty *et al.*, 2017 ; Ruzo & Brivanlou, 2017).

L'étude d'embryons humains reste cependant difficile car limitée par le nombre d'embryons disponibles. Les études transcriptomiques requièrent beaucoup de matériel, d'où le développement des cellules souches embryonnaires pour pallier ce besoin. Il reste néanmoins que l'étude d'embryons humains a permis de mettre en évidence plusieurs patrons d'expression temporelle très différents de ceux observés chez la souris.

Nouveaux modèles d'étude : cellules souches embryonnaires, blastuloïdes et gastruloïdes

Les cellules individualisées de mammifère ont le potentiel de se réorganiser *in vitro* en présence des facteurs

nécessaires à leur survie et à leur développement. Elles forment ainsi des amas de cellules qui peuvent s'auto-organiser en tissus complexes. En prenant appui sur ces observations, les chercheurs ont mis au point des techniques leur permettant de retracer et d'orienter le destin de nombreux types cellulaires. Ces derniers peuvent s'auto-assembler *in vitro*, en trois dimensions, pour mimer une étape du développement, ce qui permet l'étude de divers processus biologiques.

Deux modèles principaux sont générés en laboratoire : les blastuloïdes et les gastruloïdes. Ils rendent possible l'étude de stades développementaux successifs que sont, respectivement, la formation de la blastula et la gastrulation. Généralement, les deux modèles d'étude ont en commun leur origine : ils sont générés à partir de lignées cellulaires souches embryonnaires (ESC, *Embryonic Stem Cells*) ou de cellules souches pluripotentes induites (iPSC, *induced Pluripotent Stem Cells*). Les ESC issues de la masse cellulaire interne du blastocyste et les iPSC, cellules adultes reprogrammées, sont maintenues dans un état indifférencié *in vitro*. Par exemple Wang *et al.* ont réussi à reprogrammer des fibroblastes en iPSC « naïfs » (équivalent à un stade pré-implantatoire) qui pourraient permettre l'étude à la fois des problèmes liés à l'Activation du Génome Zygotique (AGZ) dans des étapes tardives et des mécanismes d'orientation dans un lignage cellulaire (Wang *et al.*, 2018). L'utilisation de ces modèles permet de réduire de l'expérimentation animale et rend accessible l'étude de stades du développement humain jusque-là inexplorés. Il est important de noter que l'altération de l'une de ces étapes-clés mène, chez les mammifères, à la létalité pré-implantatoire de l'embryon.

Bien que les cellules souches embryonnaires murines aient longtemps été utilisées pour générer des gastruloïdes « murins », le développement des cellules souches embryonnaires humaines permet de nos jours de générer des gastruloïdes « humains ». Martyn *et al.* ont confirmé la réceptivité des gastruloïdes aux principaux signaux développementaux connus. En effet, leurs modèles sont capables de former les territoires présomptifs des trois feuillets embryonnaires en réponse à BMP, NODAL et WNT. De plus, ils montrent la capacité des gastruloïdes à reproduire l'apparition de la ligne primitive. L'équipe montre ainsi que ces modèles sont utilisables pour de futures études du développement pré-implantatoire humain (Martyn *et al.*, 2019).

Plusieurs modèles utilisant des cellules souches humaines ont déjà été développés mais ils présentent des limites quant à leur efficacité et leur reproductibilité. De ce fait, les chercheurs ont commencé à utiliser des micropuits pour optimiser la culture de ces cellules et induire leur auto-organisation en 3D. Zheng *et al.* sont allés encore plus loin en développant un dispositif microfluidique modélisant un embryon humain bipolarisé et formant, à partir d'iPSC, une cavité pro-amniotique nommée sac embryonnaire (Zheng *et al.*, 2019). Ces auteurs ont notamment montré que la culture d'iPSC agrégées en milieu basal permettait la formation spontanée d'une cavité. L'ajout de BMP4 induit la postériorisa-

tion des sacs embryonnaires tandis que l'ajout de NOGGIN (un inhibiteur des BMP) et d'un inhibiteur de la sécrétion du ligand WNT antécédent les sacs embryonnaires. L'antécédentisation entraîne la différenciation des cellules souches humaines pluripotentes en cellules de type amniotique-ectodermique. La postécédentisation, quant à elle, entraîne la différenciation des cellules souches humaines pluripotentes en cellules de type épiblastique, précurseurs de la ligne primitive et en cellules de type germinatif-primordial. L'utilisation de ce modèle pourrait permettre l'étude plus approfondie et quantitative des mécanismes de différenciation des cellules embryonnaires en situation physiologique ou pathologique ce qui, à terme, pourrait amener à mieux comprendre les causes d'infertilités ou de maladies congénitales. À ce jour, ce modèle semble utilisable au regard des recommandations de l'ISSCR (ISSCR, 2016) car l'antécédentisation et la postécédentisation ne peuvent avoir lieu sur la même structure. Si l'on ajoute le fait que ces structures n'ont pas survécu plus de quelques jours, il semble clair qu'elles ne présentent pas de potentiel organisationnel propre (cf. partie éthique).

L'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines, appliquée à l'étude du développement précoce, demeure très limitée car fortement restreinte par la régulation éthique en vigueur et les questionnements moraux que cela suscite mais ce n'est pas le cas des cellules souches pluripotentes induites dont l'utilisation s'est beaucoup développée ces dernières années.

Question éthique : Utilisation d'embryons et de cellules souches humaines

Des études sont menées à partir d'embryons humains à des stades très précoces, ces derniers provenant d'embryons surnuméraires, donnés pour la recherche par les couples ayant eu recours à la FIV (European Society of Human Reproduction and Embryology, 2014). En France, la recherche sur des embryons humains est autorisée depuis 2011, après autorisation par l'Agence de Biomédecine (la question scientifique posée doit être jugée pertinente et la nécessité d'utilisation d'embryons humains doit être démontrée, le projet doit s'inscrire dans une finalité médicale et les protocoles pour la réalisation du projet doivent être validés). Quel que soit le pays, aucun embryon humain ne peut faire l'objet d'une implantation chez une mère porteuse d'une autre espèce. Tout embryon devra être détruit au bout du 14^e jour de développement ou au moment de la gastrulation. C'est la « règle » des 14 jours proposée en 1979 par l'« Ethics Advisory Board » du Département Américain de la Santé, de l'Éducation et du Bien-être. Cette règle est mise en place à la suite des premières procédures de FIV où la question du devenir des embryons surnuméraires non utilisés se pose rapidement et entraîne un débat entre les « pour » versus les « contre » l'utilisation de ces embryons pour la recherche. Des comités sont donc mis en place pour trouver un compromis permettant de soutenir la recherche et les potentiels bénéfices qu'elle pourrait apporter (y compris l'améliora-

tion des procédures de FIV) et d'accommoder les divers points de vue éthiques. La limite des 14 jours sera finalement choisie car elle coïncide avec la formation de la ligne primitive, un événement facilement identifiable qui correspond aussi à la limite après laquelle un embryon ne peut plus être clivé ou fusionné (Cavaliere, 2017). Au moins douze pays (y compris l'Espagne, le Royaume-Uni, les Pays-Bas, la Suède, la Slovaquie et la Suisse) l'ont même intégrée à leur législation (Hyun et al., 2016). Il sera à l'avenir nécessaire d'adapter cette « règle des 14 jours » à la situation actuelle, en effet plusieurs questions se posent : quel est le statut légal des « embryons humains » issus non pas d'une fécondation mais d'une différenciation ou de l'agrégation de cellules souches embryonnaires ? Doivent-ils être soumis à la « règle des 14 jours » ? Sinon, jusqu'à quel point est-il acceptable de laisser ces « embryons » se développer ? (Rivron et al., 2018 ; Shen, 2018).

En France, la loi de Bioéthique de 2011 (modifiée en (2013) prévoit une révision tous les sept ans. Ainsi, une nouvelle version de la loi de Bioéthique a été adoptée en première lecture par l'Assemblée Nationale le 15 octobre 2019 et le Sénat l'a adoptée avec modifications le 4 février 2020. Cependant, le texte doit être adopté dans des termes identiques dans chaque chambre. Le texte modifié par le Sénat devra donc repasser par l'Assemblée Nationale qui pourra l'adopter en l'état ou l'amender. Ce nouveau projet de loi de Bioéthique sépare les régimes juridiques de la recherche sur les cellules souches embryonnaires de la législation sur les embryons (formés par fusion de gamètes). Il rétablit l'interdiction de créer des embryons transgéniques ou chimériques et prévoit surtout la possibilité, à titre dérogatoire, d'étendre la limite de développement *in vitro* des embryons surnuméraires à 21 jours pour permettre l'étude de la gastrulation. Une extension de la limite de maintien *in vitro* d'embryons humains est également discutée au Royaume-Uni.

Conclusions

L'ISSCR publie des recommandations à suivre concernant la recherche sur les embryons humains (ISSCR, 2016). Toute recherche portant sur les stades de pré-implantation humains, les embryons humains, les cellules dérivées d'embryons humains, la production de gamètes humains et la production d'embryons humains doit faire l'objet d'une évaluation par un comité d'évaluation EMRO (Human Embryo Research Oversight) jugeant les aspects scientifiques et éthiques des projets de recherche. Ce dernier doit s'assurer de l'utilité de l'étude, de l'utilisation de méthodes adaptées à la question scientifique et de la formation adéquate des chercheurs impliqués. Ce comité doit être composé de spécialistes (scientifiques) non directement concernés par le projet, de scientifiques non spécialistes, impartiaux mais capables de comprendre les enjeux de la question scientifique, de spécialistes en éthique et de spécialistes du droit « scientifique » du pays concerné. L'ISSCR préconise l'interdiction des expériences suivantes : le maintien au-delà de 14 jours d'embryons humains ou de

toute structure « humaine » ayant un potentiel organisationnel, la culture *in vitro* d'embryon, la réimplantation d'embryons génétiquement modifiés, la formation d'embryons humains à partir de gamètes génétiquement modifiés et la création de chimère humaine. Ces recommandations sont susceptibles d'évoluer à chaque nouvelle avancée scientifique car ces techniques présentent toutes des avantages pour la recherche scientifique mais aussi des risques sanitaires ou éthiques et sont potentiellement toutes sujettes à des dérives. Un respect des recommandations, le maintien de discussions entre spécialistes et « grand public », l'évaluation des projets de recherche par différents comités, la transparence des chercheurs envers le public permettront une meilleure compréhension du développement précoce humain et le développement de stratégies répondant à des enjeux sanitaires.

Remerciements. Nous remercions les Dr. Stéphane D. Vincent et Vincent Leclerc pour leur aide précieuse dans la rédaction de cet article et d'un poster à l'occasion du Centenaire de la Société de Biologie de Strasbourg.

Références

- Cavaliere, G. (2017). A 14-day limit for bioethics: the debate over human embryo research. *BMC Med Ethics*, 18, 38.
- Deglinerti, A., Croft, G.F., Pietila, L.N., Zernicka-Goetz, M., Siggia, E.D., Brivanlou, A.H. (2016). Self-organization of the *in vitro* attached human embryo. *Nature*, 533, 251-254.
- European Society of Human Reproduction and Embryology. (2014). Statements by the Task Force Ethics and Law.
- Fogarty, N.M.E., McCarthy, A., Snijders, K.E., Powell, B.E., Kubikova, N., Blakeley, P., Lea, R., Elder, K., Wamaitha, S. E., Kim, D., Wells, D., Vallier, L., Bertero, A., Turner, J.M. A., Niakan, K.K. (2017). Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature*, 550, 67-73.
- Foucrier, J., Franquinet, R. (2013). Atlas d'Embryologie Descriptive, Dunod.
- Hyun, I., Wilkerson, A., Johnston, J. (2016). Embryology policy: Revisit the 14-day rule. *Nat News*, 533, 169.
- ISSCR. (2016). Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation.
- (2013). Loi n° 2013-715 du 6 août 2013 tendant à modifier la loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique en autorisant sous certaines conditions la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires.
- Ma, H., Zhai, J., Wan, H., Jiang, X., Wang, X., Wang, L., Xiang, Y., He, X., Zhao, Z.-A., Zhao, B., Wells, D., Vallier, L., Bertero, A., Turner, J.M.A., Niakan, K.K. (2019a). *In vitro* culture of cynomolgus monkey embryos beyond early gastrulation. *Science*, 366, eaax7890.
- Ma, H., Wang, H., Zheng, P., Li, L. (2019b). Comments on "In vitro culture of cynomolgus monkey embryos beyond early gastrulation". *J Mol Cell Biol*, 12, 400-402.
- Martyn, I., Siggia, E.D., Brivanlou, A.H. (2019). Mapping cell migrations and fates in a gastruloid model to the human primitive streak. *Development*, 146, dev179564.
- Niu, Y., Sun, N., Li, C., Lei, Y., Huang, Z., Wu, J., Si, C., Dai, X., Liu, C., Wei, J., Liu, L., Feng, S., Kang, Y., Si, W., Wang, H., Zhang, E., Zhao, L., Li, Z., Luo, X., Cui, G., Peng, G., Belmonte, J.C.I., Ji, W., Tan, T. (2019). Dissecting primate early post-implantation development using long-term *in vitro* embryo culture. *Science*, 366, eaaw5754.
- Rivron, N., Pera, M., Rossant, J., Arias, A.M., Zernicka-Goetz, M., Fu, J., Brink, S., van den Bredenoord, A., Dondorp, W., Wert, G. de, Hyun, I., Munsie, M., Isasi, R. (2018). Debate ethics of embryo models from stem cells. *Nature*, 564, 183-185.
- Rossant, J. (2016). Implantation barrier overcome. *Nature*, 533, 182-183.
- Ruzo, A., Brivanlou, A.H. (2017). At Last: Gene Editing in Human Embryos to Understand Human Development. *Cell Stem Cell*, 21, 564-565.
- Shahbazi, M.N., Jedrusik, A., Vuoristo, S., Recher, G., Hupalowska, A., Bolton, V., Fogarty, N.M.E., Campbell, A., Devito, L.G., Ilic, D., Khalaf, Y., Niakan, K.K., Fishel, S., Zernicka-Goetz, M. (2016). Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nat Cell Biol*, 18, 700-708.
- Shen, H. (2018). The labs growing human embryos for longer than ever before. *Nature*, 559, 19-22.
- Vogt, N. (2020). Human embryogenesis in a dish. *Nat Methods*, 17, 125-125.
- Wang, Y., Zhao, C., Hou, Z., Yang, Y., Bi, Y., Wang, H., Zhang, Y., Gao, S. (2018). Unique molecular events during reprogramming of human somatic cells to induced pluripotent stem cells (iPSCs) at naïve state. *Elife*, 7.
- Xiang, L., Yin, Y., Zheng, Y., Ma, Y., Li, Y., Zhao, Z., Guo, J., Ai, Z., Niu, Y., Duan, K., He, J., Ren, S., Wu, D., Bai, Y., Shang, Z., Xi, D., Ji, W., Li, T. (2020). A developmental landscape of 3D-cultured human pre-gastrulation embryos. *Nature*, 577, 537-542.
- Zheng, Y., Xue, X., Shao, Y., Wang, S., Esfahani, S.N., Li, Z., Muncie, J.M., Lakins, J.N., Weaver, V.M., Gumucio, D.L., Fu, J. (2019). Controlled modelling of human epiblast and amnion development using stem cells. *Nature*, 573, 421-425.

Citation de l'article : Jmel Boyer, I. et García Sánchez, E. (2020). Le développement embryonnaire pré-gastrulatoire humain : modèles d'avenir et enjeux sociétaux. *Biologie Aujourd'hui*, 214, 109-113

ARTICLE 2. Extensive NEUROG3 occupancy in the human pancreatic endocrine gene regulatory network

Molecular Metabolism Nov:53:101313 Epub 2021 Aug 3

<https://doi.org/10.1101/2021.04.14.439685>

Valérie Schreiber, Reuben Mercier, Sara Jiménez, Tao Ye, **Emmanuel GarcíaSánchez**, Annabelle Klein, Aline Meunier, Sabitri Ghimire, Catherine Birck, Bernard Jost, Kristian Honnens de Lichtenberg, Christian Honoré, Palle Serup, Gérard Gradwohl

L'expression de NEUROG3 est transitoire et contrôle la spécification du lignage endocrine durant le développement du pancréas (Gradwohl et al. 2000; Soyer et al. 2010). Les souris déplétées pour NEUROG3 ne développent pas d'îlots de *Langerhans* contenant les principales cellules progénitrices endocrines du pancréas (Gradwohl et al. 2000). Afin de comprendre l'implication fonctionnelle précise de NEUROG3, dans cet article, il est question d'identifier l'occupation par CUT and RUN, de NEUROG3 sur le génome dans des cellules pancréatiques de type progéniteurs endocrines dérivées de cellules humaines pluripotentes induites (*hiPSC*, *human induced Pluripotent Stem Cells*).

Dans cette étude, j'ai travaillé sous la direction de Valérie SCHREIBER dans la sélection clonale lors de la mise en place de la lignée cellulaire NEUROG3-HA-P2A-Vénus, dans le développement d'une approche de différenciation des progéniteurs et dans la détection de l'expression de facteurs spécifiant l'identité (PDX1, NKX2.2, INS) à différents temps par immunofluorescence.

Les résultats démontrent le rôle central de NEUROG3 dans la maintenance d'identité des progéniteurs endocrines mais aussi un rôle plus large dans l'orientation des cellules pancréatiques de type β . En effet, parmi les 1263 gènes ciblés par NEUROG3, 138 codent pour des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des îlots de *Langerhans* et 22% des transcrits régulés à la baisse dans les progéniteurs sont ciblés par NEUROG3. De plus, les analyses computationnelles et fonctionnelles montrent la capacité de NEUROG3 à interagir avec les promoteurs mais aussi à cibler les séquences consensus du facteur pionnier FOXA3 et les séquences des facteurs RFX (exprimés en aval de NEUROG3 dans les cellules β) nécessaires à la sécrétion d'insuline et de la fonction entéroendocrine de l'intestin.

Extensive NEUROG3 occupancy in the human pancreatic endocrine gene regulatory network



Valérie Schreiber^{1,2,3,4,*}, Reuben Mercier^{1,2,3,4}, Sara Jiménez^{1,2,3,4}, Tao Ye^{1,2,3,4}, Emmanuel García-Sánchez^{1,2,3,4}, Annabelle Klein^{1,2,3,4}, Aline Meunier^{1,2,3,4}, Sabitri Ghimire^{1,2,3,4}, Catherine Birck^{1,2,3,4}, Bernard Jost^{1,2,3,4}, Kristian Honnens de Lichtenberg⁵, Christian Honoré⁶, Palle Serup⁵, Gérard Gradwohl^{1,2,3,4,*}

ABSTRACT

Objective: Mice lacking the bHLH transcription factor (TF) Neurog3 do not form pancreatic islet cells, including insulin-secreting beta cells, the absence of which leads to diabetes. In humans, homozygous mutations of *NEUROG3* manifest with neonatal or childhood diabetes. Despite this critical role in islet cell development, the precise function of and downstream genetic programs regulated directly by NEUROG3 remain elusive. Therefore, we mapped genome-wide NEUROG3 occupancy in human induced pluripotent stem cell (hiPSC)—derived endocrine progenitors and determined NEUROG3 dependency of associated genes to uncover direct targets.

Methods: We generated a novel hiPSC line (NEUROG3-HA-P2A-Venus) where NEUROG3 is HA-tagged and fused to a self-cleaving fluorescent VENUS reporter. We used the CUT&RUN technique to map NEUROG3 occupancy and epigenetic marks in pancreatic endocrine progenitors (PEP) that were differentiated from this hiPSC line. We integrated NEUROG3 occupancy data with chromatin status and gene expression in PEPs as well as their NEUROG3-dependence. In addition, we investigated whether NEUROG3 binds type 2 diabetes mellitus (T2DM)—associated variants at the PEP stage.

Results: CUT&RUN revealed a total of 863 NEUROG3 binding sites assigned to 1263 unique genes. NEUROG3 occupancy was found at promoters as well as at distant cis-regulatory elements that frequently overlapped within PEP active enhancers. *De novo* motif analyses defined a NEUROG3 consensus binding motif and suggested potential co-regulation of NEUROG3 target genes by FOXA or RFX transcription factors. We found that 22% of the genes downregulated in *NEUROG3*^{-/-} PEPs, and 10% of genes enriched in NEUROG3-Venus positive endocrine cells were bound by NEUROG3 and thus likely to be directly regulated. NEUROG3 binds to 138 transcription factor genes, some with important roles in islet cell development or function, such as *NEUROD1*, *PAX4*, *NKX2-2*, *SOX4*, *MLXIP1*, *LMX1B*, *RFX3*, and *NEUROG3* itself, and many others with unknown islet function. Unexpectedly, we uncovered that NEUROG3 targets genes critical for insulin secretion in beta cells (e.g., *GCK*, *ABCC8/KCNJ11*, *CACNA1A*, *CHGA*, *SCG2*, *SLC30A8*, and *PCSK1*). Thus, analysis of NEUROG3 occupancy suggests that the transient expression of NEUROG3 not only promotes islet destiny in uncommitted pancreatic progenitors, but could also initiate endocrine programs essential for beta cell function. Lastly, we identified eight T2DM risk SNPs within NEUROG3-bound regions.

Conclusion: Mapping NEUROG3 genome occupancy in PEPs uncovered unexpectedly broad, direct control of the endocrine genes, raising novel hypotheses on how this master regulator controls islet and beta cell differentiation.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords NEUROG3; iPSC; Islet progenitors; CUT&RUN; T2DM; SNPs

1. INTRODUCTION

Diabetes results from either autoimmune destruction of beta cells (Type 1 diabetes) or defective insulin secretion combined with peripheral tissue resistance of insulin action (Type 2 diabetes). These forms of diabetes are considered polygenic. Mutations in single genes

can also lead to rare early-onset monogenic forms of diabetes, comprising approximately 2–5% of diabetes cases [1]. Monogenic diabetes' classification depends on the age of onset. Classifications include Neonatal Diabetes Mellitus (NDM) and Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY), in which diabetes occurs before 6 months or 25 years, respectively. These rare forms of diabetes result from mutations

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1258, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France ³Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) UMR7104, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France ⁴Université de Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France ⁵Novo Nordisk Foundation Center for Stem Cell Biology (DanStem), University of Copenhagen, Copenhagen N 2200, Denmark ⁶Department of Stem Cell Biology, Novo Nordisk A/S, DK-2760 Måløv, Denmark

*Corresponding author. 1 Rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France. Fax: +33 3 88 65 32 01. E-mail: gradwohl@igbmc.fr (G. Gradwohl).

**Corresponding author. 1 Rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France. Fax: +33 3 88 65 32 01. E-mail: schreibv@igbmc.fr (V. Schreiber).

Received April 14, 2021 • Revision received July 27, 2021 • Accepted July 28, 2021 • Available online 3 August 2021

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101313>

Original Article

in genes controlling beta cell development, function, or both, including genes encoding essential transcription factors such as *PTF1A*, *PDX1*, *HNF1B*, *NEUROG3*, *RFX6*, and *NEUROD1* [1].

The bHLH transcription factor NEUROG3 is the key regulator of the endocrine cell-fate decision in the embryonic pancreas. In the mouse, all pancreatic islet cells derive from Neurog3-expressing pancreatic endocrine progenitors (PEP) and depend on *Neurog3* [2,3]. *Neurog3*-deficient newborn mice die within a few days; they are diabetic, as they lack insulin-secreting beta cells as well as all other islet cells [3]. In humans, homozygous or compound heterozygous mutations in *NEUROG3* have been identified in patients who develop diabetes [4–7]. The pathology declares at various ages, from neonatal to childhood, likely reflecting differences in how severely NEUROG3 function is compromised. Notably, patients also developed rare forms of congenital malabsorptive diarrhea due to a lack of intestinal endocrine cells, which do not develop in the absence of NEUROG3 [4,8]. Moreover, endocrine cell development has been found to require *NEUROG3*, proven using pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells as a model [9,10].

Despite NEUROG3's key function in endocrine commitment, the direct genetic program implemented by NEUROG3 is largely unknown in both mice and humans. Genome-wide approaches have been performed to identify *Neurog3*-regulated genes in the mouse embryonic pancreas [11]. However, in the absence of *Neurog3*, the whole islet lineage is lost; thus, a comparison between transcriptomes of *Neurog3*-deficient and control embryos revealed the entire islet transcriptome, from endocrine progenitors to mature hormone-expressing cells, and not only *Neurog3*-regulated genes. Direct *Neurog3* target candidate genes such as *NeuroD*, *Nkx2-2*, *Insm1*, *Pax4*, *Neurog3*, and *Cdkn1a* have been characterized previously using *in vitro* EMSA, Chromatin Immunoprecipitation (ChIP), and transactivation assays [12–16]. Using EMSAs and ChIP-qPCR, direct binding of NEUROG3 to *NKX2-2* and *NEUROG3* regulatory regions in hES-derived pancreatic precursors were recently reported [17]. Nevertheless, genome-wide analysis to identify the entire panel of NEUROG3-bound regions has not been performed yet. The lack of sensitivity of the ChIP-Seq technique combined with the scarcity of NEUROG3-expressing endocrine progenitors has hampered this type of study.

Here, we generated a novel hiPSC cell line where endocrine progenitor cells can be purified and NEUROG3 is epitope-tagged. We used the cleavage under targets and release using nuclease (CUT&RUN) technique, which allows transcription factor profiling from a low cell number [18–20] to identify NEUROG3-bound regions across the genome in hiPSC-derived pancreatic cells. We confirmed previously known NEUROG3 targets, validating the experimental approach. Importantly, we identified many unreported NEUROG3 bound genes. Comparison with transcriptome data identified NEUROG3-bound genes enriched in human hiPSC-derived PEPs and regulated by NEUROG3. Our study has uncovered an unexpectedly large panel of potential direct NEUROG3 targets, offering a novel view on how NEUROG3 controls endocrinogenesis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Culturing of hiPSC lines

Wild type SB AD3.1 [21] and NEUROG3-HA-P2A-Venus lines were maintained as undifferentiated hiPSC in mTeSR1 medium (Stem Cell Technology) on 1:30 diluted Matrigel- (hESC grade, Corning) coated tissue culture surfaces, with daily medium change. Cells were seeded at $1.5\text{--}4 \times 10^5$ in a Matrigel-coated p35 plate containing $5 \mu\text{M}$

Y27632 (Stem Cell Technologies) (mTeSR+Y) and split every 3 or 4 days with TrypLE Select (Fisher).

2.2. Generation of the NEUROG3-HA-P2A-Venus line

The SB AD3.1 line [21] was co-transfected with a pX458-plasmid (Addgene) expressing the sg1 guide RNA (Suppl. Table 1) and the Cas9 fused to GFP, as well as the targeting vector pBSII-KS-hNEUROG3-3HA-2A-3NLS-Venus-pA (Suppl. Figure 1), both generated in the laboratory. Nucleofection was performed according to the manufacturer instructions (Amaxa), with 8×10^5 SB AD3.1 cells mixed with $2.5 \mu\text{g}$ of each plasmid DNA, and cells were seeded on a p35 containing mTeSR1+Y. The following day, cells were harvested with TrypLE Select (Invitrogen), resuspended in PBS containing 2% FCS, $10 \mu\text{M}$ Y27632, and 1% Penicillin/Streptomycin, sorted according to expression of GFP, and seeded in mTeSR1+Y. After 12 days, clones were picked by scratching and expanded for banking while genotyping.

2.3. Genotyping

DNA was extracted from collected cells using the Nucleospin Tissue XS kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer instructions and genotyped by nested PCR using primers described in Suppl. Figure 1 and Suppl. Table 1. PCR products were purified using the Nucleospin Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel) and sequenced with appropriated primers (Suppl. Table 1) at Eurofins Genomics (Ebergberg, Germany).

2.4. Differentiation of hiPSC cells to pancreatic endocrine progenitors

Cells were differentiated according to the protocol of Petersen et al. (2017) [21]. At 80–90% confluency, cells were harvested with TrypLE Select and seeded at 3×10^5 cells/cm² on Growth Factor Reduced Matrigel-coated 24-well or 6-well plates (CellBind Corning) in mTESR+Y. Differentiation was initiated 24 h after seeding. Cells were first rinsed with $1 \times$ PBS, then exposed daily to freshly prepared differentiation medium (Suppl. Table 1).

2.5. Flow cytometry analyses

Cells were harvested with TrypLE Select as described above, quenched with 3 volumes of MCDB131-3 medium containing 5 mM Y27632 (M3Y), washed once with PBS, and fixed with 4% formaldehyde in PBS for 20 min. After 2 washes with PBS, cells were permeabilized 30 min with PBS, Triton 0.2%, and 5% Donkey serum (permeabilization buffer), then incubated overnight at $+4^\circ\text{C}$ with primary antibodies (Suppl. Table 1) diluted in permeabilization buffer. After 2 washes with PBS-Triton 0.1% and 0.2% BSA (PBSTB), cells were incubated for 1–2 h at RT with fluorophore-conjugated secondary antibodies (Suppl. Table 1) diluted in permeabilization buffer. After 2 washes with PBSTB, cells were resuspended at 1 M/mL in PBS, 1% BSA, filtered on $85 \mu\text{m}$ nylon mesh, and analyzed on a BD Fortessa LSR II Cell analyser (BD Bioscience).

2.6. Immunofluorescence imaging

Cells were washed twice with PBS, fixed with 4% formaldehyde in PBS for 20 min, permeabilized for 30 min with PBS-Triton 0.5%, and blocked for 30 min in PBSTB. Cells were incubated with primary antibodies (Suppl. Table 1) diluted in PBSTB overnight at 4°C , washed $3 \times$ in PBS-Triton 0.1%, and incubated for 1–2 h at RT with fluorophore-conjugated secondary antibodies (Suppl. Table 1) diluted in PBSTB. Cells were washed twice in PBSTB and nuclei were stained with Dapi 50 ng/mL in PBST. Image acquisition was done on the Leica DMIRE2 inverted fluorescence microscope.

2.7. Flow cytometry sorting of Venus+ cells

Cells were harvested with TrypLE Select at day 13 of differentiation, quenched with 3 volumes of M3Y, centrifuged 4 min at 200 *g*, resuspended at 5 M/mL in M3Y, and sorted using a FACSAria Fusion cell sorter (BD) in M3Y at +4 °C. Venus+ cells were collected and either used immediately or cryoconserved in Cryostor10 (Stem Cell Technologies) at –80 °C.

2.8. RNA-seq libraries and data processing

Cells differentiated to day 13 in 24-well plates (*N* = 4, from 2 independent differentiations) were sorted according to Venus expression, and RNAs were prepared with the RNeasy Micro kit (Qiagen). Libraries were prepared using SMART-SeqX v4 UltraX Low Input RNA Kit for Sequencing (Takara Bio Europe) and the Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, USA), purified with SPRIselect beads (Beckman-Coulter, Villepinte, France), and sequenced on an Illumina HiSeq 4000 (single-end 50 bp reads). Reads were mapped onto the hg38 human genome using STAR version 2.7.5a [22]. Quantification of gene expression was performed using HTSeq version 0.6.1 [23] and gene annotations from Ensembl release 98. Normalization of read counts and differential expression analysis between Venus-negative and Venus-positive samples were performed using the method implemented in the DESeq2 Bioconductor library version 1.16.1 [24].

Differential expression analyses for comparing Venus-positive and Venus-negative samples as well as the *NEUROG3*^{–/–} hESC line differentiated to day 13 and its wild-type counterpart [25] were performed using a negative binomial GLM fit and Wald significance test implemented in the Bioconductor package DESeq2 version 1.16.1 [26]. The variables considered for the GLM model were condition (for the Venus-labeled cells) and batch and condition (in the *NEUROG3*^{–/–} comparison), in which batch corresponds to two differentiations (2 controls and 2 mutants per differentiation). Differentially expressed genes were defined as those having a Benjamini-Hochberg-adjusted Wald test with *P* < 0.05, and a log2 fold change greater than 1, in the case of Venus-labeled cells.

2.9. CUT&RUN

We followed the protocol of Hainer and Fazzio (2019) [27] with minor modifications. Cells (75,000 for anti *NEUROG3*, HA and CTRL donkey anti sheep (DASH) antibodies, 18,000 for H3K4me3 antibody, and 15,000 for H3K27me3 and Rabbit anti-Mouse control antibodies, one sample per antibody) were washed once with 1 mL cold PBS and resuspended in nuclear extraction buffer (NE, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.5 mM Spermidine, 0.1% Triton X-100, 20% glycerol, freshly added protease inhibitors). After 3 min spinning at 4 °C at 600*g*, cells were resuspended in 600 µL NE buffer. Concanavalin A beads (Polysciences, 25 µL bead slurry/sample) were washed twice with ice-cold Binding buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 10 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂) and resuspended in 300 µL Binding buffer. Nuclei were added to beads with gentle vortexing and incubated for 10 min at 4 °C with gentle rocking. Bead-bound nuclei were blocked with 1 mL cold Blocking buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM Spermidine, 0.1% BSA, 2 mM EDTA, freshly added protease inhibitors) by gentle pipetting, incubated 5 min at RT, washed in 1 mL cold Wash buffer (WB, 20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM Spermidine, 0.1% BSA, freshly added protease inhibitors), and resuspended in 250 µL cold WB. 250 µL of primary antibody (Suppl. Table 1) diluted 1:100 in cold WB were added with gentle vortexing, and samples were incubated overnight with gentle rocking at 4 °C. Samples were washed twice in 1 mL cold WB and

resuspended in 250 µL cold WB. When indicated, incubation with a secondary antibody (Donkey anti-Sheep IgG, 1:200) was performed for 1 h at 4 °C in WB under gentle rocking. After 2 washes with 1 mL WB and resuspension in 250 µL WB, 200 µL of pA–MN (diluted at 1.4 ng/mL in cold WB) was added with gentle vortexing, and samples were incubated with rotation at 4 °C for 1 h. The protein A–micrococcal nuclease recombinant protein (pA–MN) was produced in-house according to the protocol described by Schmid et al. [28] and using the pK19pA–MN plasmid, obtained from Ulrich Laemmli (RRID:Addgene_86973; <http://n2t.net/addgene:86973>). Samples were washed twice in 1 mL cold WB and resuspended in 150 µL cold WB. 3 µL of 100 mM CaCl₂ were added upon gentle vortexing to activate the MN. After 30 min of digestion, reactions were stopped by addition of 150 µL 2XSTOP buffer (200 mM NaCl, 20 mM EDTA, 4 mM EGTA, 50 µg/mL RNaseA, 40 µg/mL glycogen) and DNA fragments were released by passive diffusion during incubation at 37 °C for 20 min. After centrifugation for 5 min at 16,000*g* at +4 °C to pellet cells and beads, 3 µL 10% SDS and 2.5 µL Proteinase K 20 mg/mL were added to the supernatants, and samples were incubated 10 min at 70 °C. DNA purification was done with phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction followed by chloroform extraction using MaxTract tubes (Qiagen). DNA was precipitated with ethanol after addition of 20 µg glycogene and resuspended in 36.5 µL 0.1XTE.

2.10. High throughput sequencing of CUT&RUN samples

Illumina sequencing libraries were prepared at the Genomeast facility (IGBMC, Illkirch). CUT&RUN samples were purified using Agencourt SPRIselect beads (Beckman-Coulter). Libraries were prepared from 10 ng of double-stranded purified DNA using the MicroPlex Library Preparation kit v2 (Diagenode) following the manufacturer's protocol with some modifications. Illumina-compatible indexes were added through a PCR amplification (3 min at 72 °C, 2 min at 85 °C, 2 min at 98 °C; [20 s at 98 °C, 10 s at 60 °C] × 13 cycles). Amplified libraries were purified and size-selected using Agencourt SPRIselect beads (Beckman Coulter) by applying the following ratio: volume of beads/volume of libraries = 1.4/1. The libraries were sequenced on HiSeq 4000 as Paired-End 2 × 100 base reads following Illumina's instructions.

2.11. Bioinformatics analyses

2.11.1. Data processing

Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Reads were trimmed using cutadapt v1.9.1 with option: `-a AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC -A AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTGA -m 5 -e 0.1`. Paired-end reads were mapped to Homo Sapiens genome (assembly hg38) using Bowtie2 (release 2.3.4.3, parameter: `-N 1 -X 1000`). Reads overlapping with ENCODE hg38 blacklisted region V2 were removed using Bedtools. Reads were size selected to <120 bp and >150 bp, as it has been reported that small reads define more precisely TF binding sites, whereas larger reads (>150 bp) result from sites occupied by nucleosomes [18,19]. Bigwig tracks were generated using bamCoverage from deepTools for ≤120 bp and ≥150 bp fragments separately. Tracks were normalized with RPKM method. The bin size was 20. ≤120 bp fragments were used for samples obtained with anti-*NEUROG3* (VLSR28), HA (VLSR27) and the control Donkey anti-Sheep (DASH, thereafter named CTRL, VLSR29) antibodies and ≥150 bp fragments for samples obtained with anti-H3K4me3 (VLSR32), anti-H3K27me3 (VLSR44), and the Rabbit anti-Mouse control (RAM, VLSR41) antibodies. Bigwig tracks (reads ≤120 bp

Original Article

long for NEUROG3, HA, and CTRL samples and ≥ 150 pb for histone marks) were displayed on the reference genome *hg38* using the UCSC genome browser. For simplicity, only the DASH CTRL is illustrated throughout the manuscript. Heatmaps and K-means clustering was done using seqMINER v1.3.3g [29]. To compare with previously published data obtained from human *in vitro*-derived pancreatic endocrine progenitors [30], multipotent progenitors [31], and adult islets [32], we converted coordinates of bed and bigwig files to *hg19* coordinates using the UCSC Liftover and bigwigLiftover tools (<https://github.com/milospanjanic/bigWigLiftOver>), respectively. Genomic tracks were visualized using http://meltonlab.rc.fas.harvard.edu/data/UCSC/SCbetaCellDiff_ATAC_H3K4me1_H3K27ac_WGBS_tracks.txt.

2.11.2. Peak calling

Peak calling was performed with the Sparse Enrichment Analysis for CUT&RUN SEACR v1.3 tool [33] (<https://seacr.fredhutch.org>), using the norm and stringent modes on the ≤ 120 bp size selected reads and VLSR29 (DASH CTRL) as a control for VLSR27 (HA) and VLSR28 (NEUROG3) datasets. To identify overlapping genomic regions, peak coordinates were intersected using the BEDtools 2.22.0 command *intersect interval files* (<http://usegalaxy.org>).

2.11.3. Association of peaks with genomic features and genes

Genomic annotation was first performed using the HOMER v3.4 [34] *annotatePeaks.pl* script with the default settings (promoters-transcription start site (TSS) from -1 kb to $+100$ bp to the TSS and transcription termination sites (TTS) from -100 bp to $+1$ kb of the TTS). GREAT 4.0.4 [35] was used to assign NEUROG3/HA peaks to their nearest coding gene(s) using basal settings (each gene is assigned a basal regulatory domain of 5 kb upstream and 1 kb downstream of its TSS. The gene regulatory domain is extended in both directions to the nearest gene's basal domain, but no more than 1000 kb extension in one direction. Each peak is associated with all genes with whose regulatory domain it overlaps). The NEUROG3 peaks or the distal peaks defined by GREAT (>5 kb from TSS) were intersected with enhancers regions of hESC-derived endocrine progenitors (EN) lifted over to the *hg38* genome ([30], GSE139816).

2.11.4. Motifs identification and analyses

De novo motif discovery was performed using the HOMER v3.4 [34] *findMotifsGenome.pl* script with default settings (200-bp windows centered on peak summits, motif lengths set to 8, 10, and 12 bp, hypergeometric scoring). For enrichment of known motifs, the entire peak sequence was considered using the *-size given* option. For the 6 most significant *de novo* motifs identified, known best match motifs were associated if their Homer score was >0.85 . Known co-occurring motifs were manually curated to exclude redundant bHLH motifs. Co-occurrence of the *de novo*-identified NEUROG3 motif and known RFX6 or FOXA2 motifs was done on the entire peak sequences using the HOMER script *annotatePeaks.pl* with *-size given* and *-m <motifn.motif>* options.

2.11.5. Functional annotations

Gene functional annotation and clustering was carried out with DAVID v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>, [36]), using GO Biological Process, GO Cellular Component, and KEGG Pathways. Selected terms significantly enriched and sorted by $-\log(P\text{-value})$ are displayed. To identify NEUROG3 transcription factor target genes, the peaks-assigned gene names were intersected by Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) with a list of 1734 TF combining

the 1639 human TF identified by Lambert et al. [37] with the 1496 human TF taken from the human protein atlas (<https://www.proteinatlas.org>).

2.11.6. Overlap between bound genes and differentially expressed genes

The lists of the 312 genes downregulated in NEUROG3^{-/-} hESC cells and 3030 genes enriched in NEUROG3-HA-P2A-Venus hiPSC cells, differentiated to PEP, were intersected with the list of NEUROG3-bound genes by Venny 2.1.0. Expression of genes of interest in the human fetal pancreas and during *in vitro* differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic endocrine cells was examined using <https://descartes.brotmanbaty.org> [38] and <http://hiview.case.edu/public/BetaCellHub/differentiation.php> [39], respectively.

2.11.7. Overlap between NEUROG3 bound sites and cis-regulatory elements

NEUROG3-bound regions were intersected using Bedtools 2.29.2 with: (1) human *in vitro*-derived multipotent pancreatic progenitor enhancers (MPC Enhancers), cis-regulatory modules (MPC CRM), and transcription factor binding sites (ChIP-seq datasets) [31]; (2) *in vitro*-derived pancreatic endocrine progenitor enhancers (EN_enhancers) [30]; (3) adult islet regulatory elements (islet regulome) [32]; and (4) the 23,144 genetic variants associated with T2D and glycemic traits (T2D-FG) on 109 loci, compiled by Miguel-Escalada et al. [32]. When necessary, coordinates of bed files were converted to *hg19* or *hg38* coordinates using the UCSC Liftover tool. Enrichment *P*-values of overlapping regions were calculated using Bedtools v2.29.2 FisherBedtool or, when indicated, using CEAS (one-sided binomial test) [40].

2.11.8. Data availability

Raw data have been deposited in the GEO database under accession code GSE179264 for CUT&RUN data and RNA-seq data on NEUROG3-HA-P2A-Venus+ and Venus- PEP cells. hESC-derived NEUROG3^{-/-} [25] RNA-seq data are from E-MTAB-7185. hESC-derived endocrine progenitors (EN) data (enhancers, H3K27ac ChIP-seq and RNA-seq, Ref [30]) are from GSE139817.

2.12. Luciferase assays

Sequences encompassing NEUROG3-bound regions determined by CUT&RUN and assigned to *MLXIPL*, *ETS2*, and *ISX* genes were PCR amplified using primers listed in Suppl. Table 1 and cloned into pGL4.23 vector. Luciferase activity was assessed in HEK293T cells by co-transfection of reporter constructs with pcDNA3-NEUROG3-3HA-P2A-3NLS-Venus (+NEUROG3) or pcDNA3 empty vector (no NEUROG3) and Renilla luciferase expressing plasmid for normalization.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Identification of NEUROG3 targets in hiPSC-derived endocrine progenitors

To unveil the endocrinogenic program implemented by NEUROG3, we mapped NEUROG3 occupancy across the genome during directed differentiation of hiPSC into beta cells. We first generated an hiPSC line where NEUROG3 was tagged with 3 HA epitopes and fused to a cleavable nuclear VENUS fluorescent reporter (NEUROG3-HA-P2A-Venus) (Figure 1A and Suppl. Figure 1). Using the protocol described by Petersen et al. (2017) [21] and adapted from Rezanian et al. (2014) [41], we differentiated the NEUROG3-HA-P2A-VENUS hiPS cells along the pancreatic and islet lineage until the pancreatic endocrine progenitor

Original Article

long for NEUROG3, HA, and CTRL samples and ≥ 150 pb for histone marks) were displayed on the reference genome *hg38* using the UCSC genome browser. For simplicity, only the DASH CTRL is illustrated throughout the manuscript. Heatmaps and K-means clustering was done using seqMINER v1.3.3g [29]. To compare with previously published data obtained from human *in vitro*-derived pancreatic endocrine progenitors [30], multipotent progenitors [31], and adult islets [32], we converted coordinates of bed and bigwig files to *hg19* coordinates using the UCSC Liftover and bigwigLiftover tools (<https://github.com/milospanjanic/bigwigLiftover>), respectively. Genomic tracks were visualized using http://meltonlab.rc.fas.harvard.edu/data/UCSC/SCbetaCellDiff_ATAC_H3K4me1_H3K27ac_WGBS_tracks.txt.

2.11.2. Peak calling

Peak calling was performed with the Sparse Enrichment Analysis for CUT&RUN SEACRv1.3 tool [33] (<https://seacr.fredhutch.org>), using the norm and stringent modes on the ≤ 120 bp size selected reads and VLSR29 (DASH CTRL) as a control for VLSR27 (HA) and VLSR28 (NEUROG3) datasets. To identify overlapping genomic regions, peak coordinates were intersected using the BEDtools 2.22.0 command *intersect interval files* (<http://usegalaxy.org>).

2.11.3. Association of peaks with genomic features and genes

Genomic annotation was first performed using the HOMER v3.4 [34] *annotatePeaks.pl* script with the default settings (promoters-transcription start site (TSS) from -1 kb to $+100$ bp to the TSS and transcription termination sites (TTS) from -100 bp to $+1$ kb of the TTS). GREAT 4.0.4 [35] was used to assign NEUROG3/HA peaks to their nearest coding gene(s) using basal settings (each gene is assigned a basal regulatory domain of 5 kb upstream and 1 kb downstream of its TSS). The gene regulatory domain is extended in both directions to the nearest gene's basal domain, but no more than 1000 kb extension in one direction. Each peak is associated with all genes with whose regulatory domain it overlaps). The NEUROG3 peaks or the distal peaks defined by GREAT (>5 kb from TSS) were intersected with enhancers regions of hESC-derived endocrine progenitors (EN) lifted over to the *hg38* genome ([30], GSE139816).

2.11.4. Motifs identification and analyses

De novo motif discovery was performed using the HOMER v3.4 [34] *findMotifsGenome.pl* script with default settings (200-bp windows centered on peak summits, motif lengths set to 8, 10, and 12 bp, hypergeometric scoring). For enrichment of known motifs, the entire peak sequence was considered using the *-size given* option. For the 6 most significant *de novo* motifs identified, known best match motifs were associated if their Homer score was >0.85 . Known co-occurring motifs were manually curated to exclude redundant bHLH motifs. Co-occurrence of the *de novo*-identified NEUROG3 motif and known RFX6 or FOXA2 motifs was done on the entire peak sequences using the HOMER script *annotatePeaks.pl* with *-size given* and *-m <motifn.motif>* options.

2.11.5. Functional annotations

Gene functional annotation and clustering was carried out with DAVID v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>, [36]), using GO Biological Process, GO Cellular Component, and KEGG Pathways. Selected terms significantly enriched and sorted by $-\log(P\text{-value})$ are displayed. To identify NEUROG3 transcription factor target genes, the peaks-assigned gene names were intersected by Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) with a list of 1734 TF combining

the 1639 human TF identified by Lambert et al. [37] with the 1496 human TF taken from the human protein atlas (<https://www.proteinatlas.org>).

2.11.6. Overlap between bound genes and differentially expressed genes

The lists of the 312 genes downregulated in NEUROG3^{-/-} hESC cells and 3030 genes enriched in NEUROG3-HA-P2A-Venus hiPSC cells, differentiated to PEP, were intersected with the list of NEUROG3-bound genes by Venny 2.1.0. Expression of genes of interest in the human fetal pancreas and during *in vitro* differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic endocrine cells was examined using <https://descartes.brotmanbaty.org> [38] and <http://hiview.case.edu/public/BetaCellHub/differentiation.php> [39], respectively.

2.11.7. Overlap between NEUROG3 bound sites and cis-regulatory elements

NEUROG3-bound regions were intersected using Bedtools 2.29.2 with: (1) human *in vitro*-derived multipotent pancreatic progenitor enhancers (MPC Enhancers), cis-regulatory modules (MPC CRM), and transcription factor binding sites (ChIP-seq datasets) [31]; (2) *in vitro*-derived pancreatic endocrine progenitor enhancers (EN_enhancers) [30]; (3) adult islet regulatory elements (islet regulome) [32]; and (4) the 23,144 genetic variants associated with T2D and glycemic traits (T2D-FG) on 109 loci, compiled by Miguel-Escalada et al. [32]. When necessary, coordinates of bed files were converted to *hg19* or *hg38* coordinates using the UCSC Liftover tool. Enrichment *P*-values of overlapping regions were calculated using Bedtools v2.29.2 FisherBedtool or, when indicated, using CEAS (one-sided binomial test) [40].

2.11.8. Data availability

Raw data have been deposited in the GEO database under accession code GSE179264 for CUT&RUN data and RNA-seq data on NEUROG3-HA-P2A-Venus+ and Venus- PEP cells. hESC-derived NEUROG3^{-/-} [25] RNA-seq data are from E-MTAB-7185. hESC-derived endocrine progenitors (EN) data (enhancers, H3K27ac ChIP-seq and RNA-seq, Ref [30]) are from GSE139817.

2.12. Luciferase assays

Sequences encompassing NEUROG3-bound regions determined by CUT&RUN and assigned to *MLXIPL*, *ETS2*, and *ISX* genes were PCR amplified using primers listed in Suppl. Table 1 and cloned into pGL4.23 vector. Luciferase activity was assessed in HEK293T cells by co-transfection of reporter constructs with pcDNA3-NEUROG3-3HA-P2A-3NLS-Venus (+NEUROG3) or pcDNA3 empty vector (no NEUROG3) and Renilla luciferase expressing plasmid for normalization.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Identification of NEUROG3 targets in hiPSC-derived endocrine progenitors

To unveil the endocrinogenic program implemented by NEUROG3, we mapped NEUROG3 occupancy across the genome during directed differentiation of hiPSC into beta cells. We first generated an hiPSC line where NEUROG3 was tagged with 3 HA epitopes and fused to a cleavable nuclear VENUS fluorescent reporter (NEUROG3-HA-P2A-Venus) (Figure 1A and Suppl. Figure 1). Using the protocol described by Petersen et al. (2017) [21] and adapted from Rezania et al. (2014) [41], we differentiated the NEUROG3-HA-P2A-VENUS hiPS cells along the pancreatic and islet lineage until the pancreatic endocrine progenitor

Original Article

technique is based on the recruitment of micrococcal nuclease, fused to protein A (pA–MNase), to antibody-bound sites within the genome in intact nuclei (Figure 1A). The subsequently cleaved fragments are recovered and sequenced. Endocrine progenitors were purified at day 13 (d13) of differentiation (Suppl. Figure 2D), and CUT&RUN experiments were performed on Venus+ cells using anti-NEUROG3 and anti-HA antibodies. We also profiled active (H3K4me3) and repressive (H3K27me3) histone marks to map chromatin states.

We identified 1873 and 1428 peaks using NEUROG3 and HA antibodies, respectively (Figure 1B). To enhance the stringency of NEUROG3-bound regions, we intersected both datasets, defining NEUROG3 occupancy at 863 common sites (Figure 1B and Suppl. Table 2). These high-confidence NEUROG3 binding sites were found at promoters (35%), introns (30%), and intergenic regions (31%) (Figure 1C) and were assigned by GREAT to 1263 unique genes, with 573 peaks (66%) assigned to 2 or more genes (Suppl. Table 3). NEUROG3 binding to distal regions (located >5 kb from the TSS of their associated gene) was observed for 65% of sites (557 peaks for 1042 genes) (Figure 1D). Remarkably, 90.8% (506 peaks, $P = 4.9 \times 10^{-324}$) of these distal NEUROG3-bound regions were located within enhancer regions of hESC-derived endocrine progenitors (EN), as defined through their H3K27 acetylation by Alvarez-Dominguez et al. (2019) [30] (Figure 1E). In agreement, we found that H3K4me3 active histone marks were enriched at the NEUROG3 peaks compared to the H3K27me3 repressive marks (Figure 1F), indicating NEUROG3 binding at active promoters and enhancers. Taken together, we uncovered the NEUROG3 cisome in PEPs, suggesting that NEUROG3 activates gene transcription by binding both proximal and distal cis-regulatory elements.

3.2. CUT&RUN detects previously identified and novel binding sites in known NEUROG3 targets

To validate the CUT&RUN approach for identifying NEUROG3-bound regions in PEPs, we first examined previously characterized direct targets. As expected, we identified peaks in *NEUROD1*, *NKX2-2*, *PAX4*, *INSM1*, and *NEUROG3* [12,13,15–17], some of them at sites already mapped by ChIP-qPCR, EMSA, or luciferase assays (Figure 1G). Interestingly, we identified two unreported NEUROG3 binding sites upstream of the *NKX2-2* gene and upstream of *NEUROG3* TSS (purple arrowheads in Figure 1G). The sites identified for *NEUROG3* were distinct from the one reported previously by ChIP-qPCR [17], but overlapped with the conserved *Neurog3* enhancer region described in the mouse [42], supporting the idea that NEUROG3 regulates its own transcription [12]. The peak assigned to *INSM1* may be distantly located (>180 kb downstream of its TSS, within an intron of the *RALGAP2* gene), but the region has been identified as a super-enhancer directly linked to the *INSM1* gene using promoter capture HiC studies performed in adult pancreatic islets [32] (Figure 1G and Suppl. Figure 3), suggesting a role in the regulation of *INSM1* expression. Of note, we found no binding site for the *CDKN1A* gene, shown in the mouse to be directly regulated by NEUROG3 and promote cell cycle exit in PEP [14]. It is possible that the NEUROG3 target *NEUROD1* serves as an intermediate, since *NEUROD1* was shown to similarly inhibit cell proliferation by directly regulating *Cdkn1a* transcription [43]. Altogether, these data validate use of the CUT&RUN technique to unravel NEUROG3 binding sites genome-wide and suggest that the expected NEUROG3-driven endocrinogenic programs are activated in hiPSC-derived PEP.

3.3. Consensus NEUROG3 binding motif and co-binding of transcription factors

To determine the motifs enriched in the NEUROG3 binding regions, we performed a *de novo* motifs analysis [34] that revealed a strong

enrichment for the RCCATCTGBY E-box type motif (CANNTG) recognized by bHLH transcription factors (Figure 2A). The NEUROG3 recognition motif is similar to NEUROD1 and NEUROG2 binding motifs, in agreement with the strong homology of the bHLH DNA binding domains between NEUROD and NEUROG families. Several additional motifs were also significantly enriched in NEUROG3 binding regions, such as the motif recognized by NFY, FOX, SP/KLF, RFX, and PBX TFs (Figure 2A–C and Suppl. Figure 4). Some TFs of these families have been reported to regulate pancreas development and islet cell differentiation, such as Pbx1 [44], Rfx3, and Rfx6 [45,46]. Interestingly, the binding of the general NFY factors was reported biased towards regulatory elements with enhancer activity [47]. In agreement with our findings, KLF, FOXA1/A2, RFX, and MEIS1 (a PBX1 related homeobox gene) TFs were recently predicted to bind to PEP Super Enhancers in a model of Core transcriptional regulatory circuits (CRCs) in the human islet lineage [30]. Of particular interest are FOX and RFX motifs in NEUROG3-bound regions (Figure 2C and Suppl. Table 4). Indeed, FOXA1 and FOXA2 act as pioneer factors, facilitating chromatin access to other TFs at multiple stages during pancreas development [48]. We found that 28.27% of the NEUROG3 peaks harbor a FOXA2 motif (Figure 2B). Studies of *in vitro*-derived human multipotent progenitor cells (MPC) showed that FOXA2, ONECUT1, GATA6, HNF1b, PDX1, and TEAD1 define *cis*-regulatory modules (CRM) as active enhancers bound by at least 2 of these TFs, which are essential for early pancreas development [31]. Whereas all 6 TF binding sites showed a significant enrichment at NEUROG3 binding sites relative to their genomic frequency, FOXA2 was the most significantly enriched, with 189 (21.9%; $P = 1.4 \times 10^{-207}$) of NEUROG3 binding sites bound by FOXA2 in MPCs (Figure 2D) [31]. Furthermore, 41 NEUROG3 peaks (4.7%; $P = 1.93 \times 10^{-48}$) overlapped with a CRM, of which 36 were co-bound by FOXA2 (Figure 2D). The pioneer activity of FOXA2, also described during human *in vitro* pancreatic progenitor differentiation [49], could be required for the subsequent gene activation mediated by NEUROG3 at primed enhancers. The fact that FOXA2 regulates *NEUROG3* (as shown in mice [42]) together with our findings that NEUROG3 binds FOXA2 (Figure 2E) provides evidence towards a possible regulatory loop between these two TFs. Interestingly, we identified an RFX6 motif in 37.54% of NEUROG3 peaks (Figure 2B) and revealed the co-occurrence of the NEUROG3 motif with the RFX6 motif in one-fifth of the peaks, from which one-third had an additional FOXA2 motif (Figure 2C). Several NEUROG3-bound genes were previously identified as Rfx6 targets in a mouse beta-cell line [45] (Figure 2C and data not shown). Altogether, FOXA2, and RFX6 may be important coregulators of the transcription of NEUROG3 direct targets.

3.4. Integration of NEUROG3 occupancy and gene expression in the islet lineage

Gene ontology (GO) analyses revealed that NEUROG3-bound regions are associated with GO terms such as endocrine pancreas development and insulin secretion, in agreement with the expected pro-endocrine function of NEUROG3 (Figure 3A and Suppl. Table 5). Therefore, we scrutinized NEUROG3-bound genes expressed in the islet lineage: we reasoned that these genes should be downregulated in *NEUROG3*^{−/−} cells or upregulated in NEUROG3-enriched cells. To address this, we used RNA-seq data comparing the transcriptome of *NEUROG3*^{−/−} against a wild-type hESC line, differentiated to d13 [25]. From the 319 differentially expressed genes in *NEUROG3*^{−/−} cells, 312 were downregulated (Suppl. Table 6), and NEUROG3 directly bound 69 (22%) of them (Figure 3B–C). We also performed RNA-seq analyses on NEUROG3-HA-P2A-Venus hiPSC cells differentiated to d13 and sorted for Venus+ and Venus− expression. From the 3030 enriched

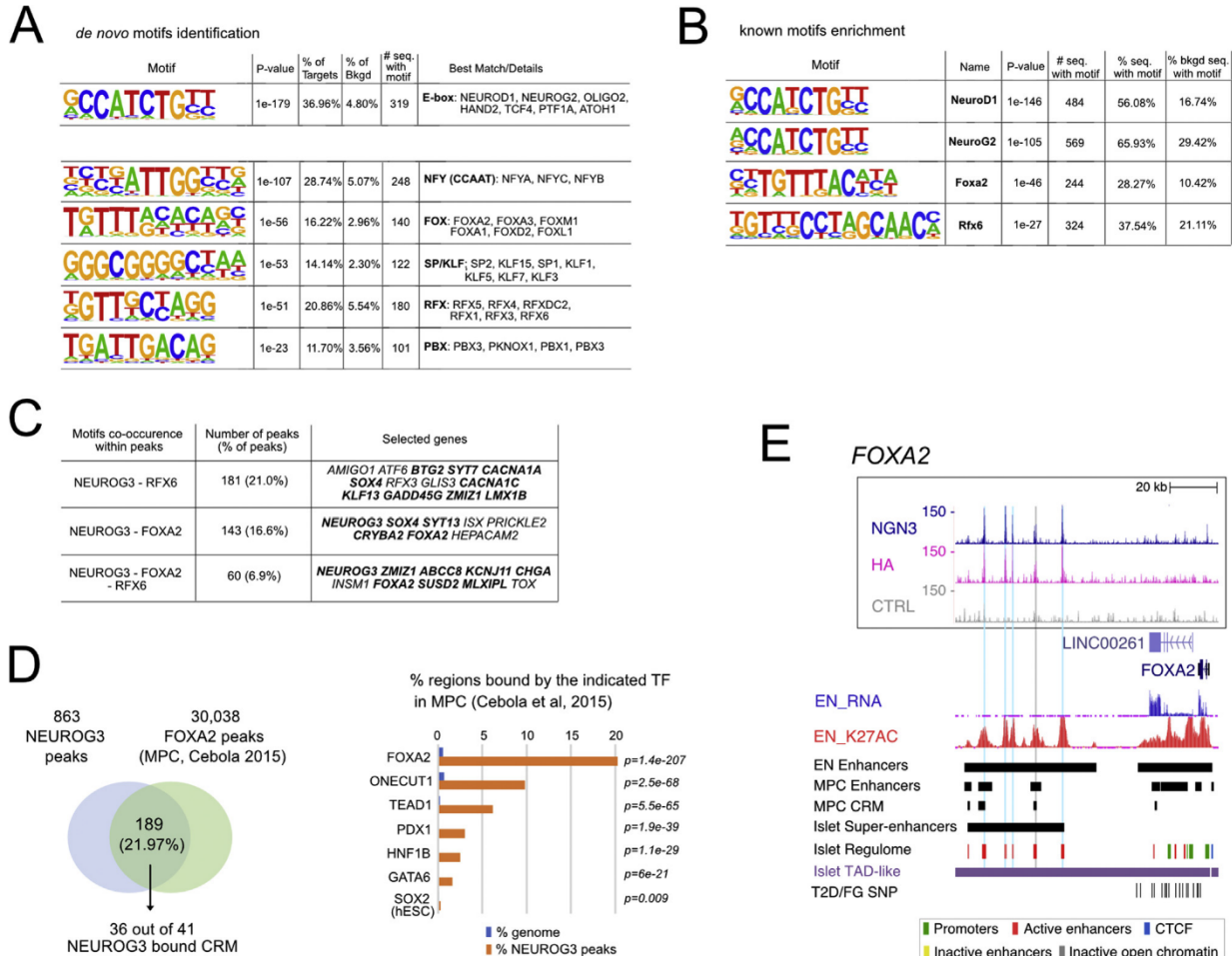


Figure 2: TF motifs discovery in NEUROG3 binding sites. (A). *De novo* motif discovery ranked by *P*-value, reflecting motif enrichment within peak summit ± 100 bp. Number (#) and % of target and background sequences harboring each motif is indicated for the 6 most significant motifs identified. Known best matching transcription factors were associated if their HOMER score was >0.85 . (B) Selection of known co-occurring motifs ranked by *P*-value within the entire peak sequences. The full list of the 50 most significantly enriched motifs is shown in Suppl Figure 4. (C) Co-occurrence of NEUROG3 *de novo*-identified motifs with motifs for RFX6 and/or FOXA2 on the entire peak sequences. Some selected GREAT assigned genes are indicated, in bold when identified as targets for Rfx6 in a mouse beta cell line [45]. (D) Regions bound by NEUROG3 at PEP stage that are bound by FOXA2 and indicated TFs at the MPC stage. NEUROG3 cistrome was intersected with that of FOXA2, ONECUT1, TEAD1, GATA6, PDX1, and HNF1b from *in vitro*-derived MPC and, as a control, with that of SOX2 from hESC cells, taken from Ref. [31]. *P*-value of enrichment at NEUROG3 binding sites relative to genomic distribution is calculated by CEAS. In the left panel, the number of NEUROG3-bound and NEUROG3/FOXA2-bound CRMs is indicated. (E) Genome browser tracks showing NEUROG3, HA, and the CTRL CUT&RUN data at the FOXA2 loci. Coordinates are from *hg19*. The positions of NEUROG3 binding sites are highlighted in light blue (or in gray, when identified in a single dataset). Data of RNA-seq (EN_RNA), H3K27ac ChIP-seq (EN_K27AC), and the position of enhancers (EN Enhancers) from hESC-differentiated to endocrine progenitors were taken from Ref. [30] and http://meltonlab.rc.fas.harvard.edu/data/UCSC/SCbetaCellDiff_ATAC_H3K4me1_H3K27ac_WGBS_tracks.txt. Position of hESC-derived multipotent progenitor cells (MPC) enhancers and cis-regulatory modules (CRM) are taken from Ref. [31]. Data from adult islets (Super-enhancers, Islet regulome, T2D/FG SNP and TAD-like regions) are taken from Ref. [32], isletregulome.org and <http://epigenomegateway.wustl.edu/>.

genes in NEUROG3-Venus⁺ cells, 295 were bound by NEUROG3, including 63 that were downregulated in the *NEUROG3*^{-/-} cells (Figure 3B–D, Suppl. Tables 7 and 8). Many of these genes encode for TFs or proteins known to regulate islet cell differentiation and function (see below). Thus, a total of 301 genes specifically expressed in the endocrine lineage (out of 3063) are bound by NEUROG3, suggesting that NEUROG3 directly regulates the expression of about 10% of islet enriched genes. In addition, we compared the NEUROG3 cistrome with the human pancreatic adult islet regulome [32]. We found that 782 (90.6%; $P = 4.9e-324$) NEUROG3 binding sites matched with at least one of the adult islet regulatory elements, with 655 (75.90%; $P = 4.9e-324$) localized within active enhancers or promoters

(Figure 3E and F). This suggests that most of the genes regulated by NEUROG3 are still active in the adult islets, supporting the hypothesis that the transient expression of NEUROG3 at the PEP stage is required to initiate the endocrinogenic program, while other transcription factors sustain the transcription of NEUROG3 targets in mature islets by binding to the same regulatory elements.

3.5. NEUROG3 binds to a subset of islet enriched transcription factor genes

To better understand how NEUROG3 drives islet cell differentiation, we first examined the TF genes bound by NEUROG3. Among the 1263 NEUROG3-bound genes, 138 encode for TFs (Figure 4A and

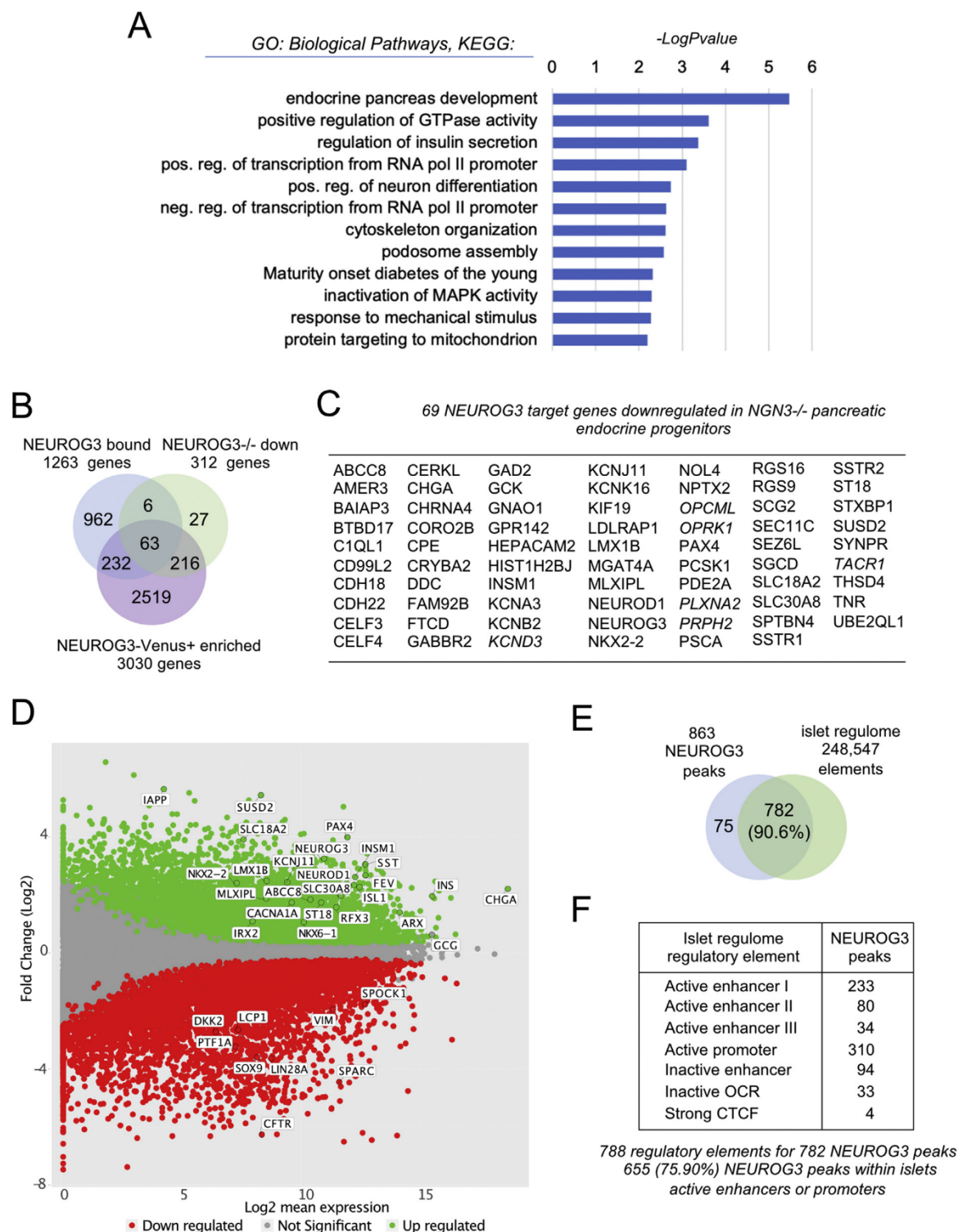


Figure 3: Integration of NEUROG3 occupancy and islet expression of target candidates. (A) Gene ontology analysis (biological process, KEGG pathways) showing selected significantly enriched terms ($\text{Log}_{10}[P\text{-value}] \geq 2$) related to the 1263 NEUROG3 bound genes. (B) Venn diagram illustrating the overlap of NEUROG3 bound genes and the 312 downregulated genes in NEUROG3^{-/-} hESC line differentiated to PEP stage (NEUROG3^{-/-} down; [25]) and the 3030 genes enriched in NEUROG3-HA-P2A-Venus⁺ compared to Venus⁻ cells differentiated to PEP stage (NEUROG3-Venus⁺ enriched). (C) List of the 69 NEUROG3 target genes downregulated in NEUROG3^{-/-} PEP. In italics, the 6 bound genes downregulated in NEUROG3^{-/-} PEP but not enriched in NEUROG3-Venus⁺ PEP. (D) MA-plot representing the estimated Log2 fold change as a function of the Log2 mean expression of genes enriched in NEUROG3-Venus⁺ (green) or NEUROG3-Venus⁻ (red) cells. (E–F) NEUROG3 binding sites matching with one or more islets regulatory element(s) (islet regulome; [32]). OCR, open chromatin regions, CTCF, CTCF binding sites.

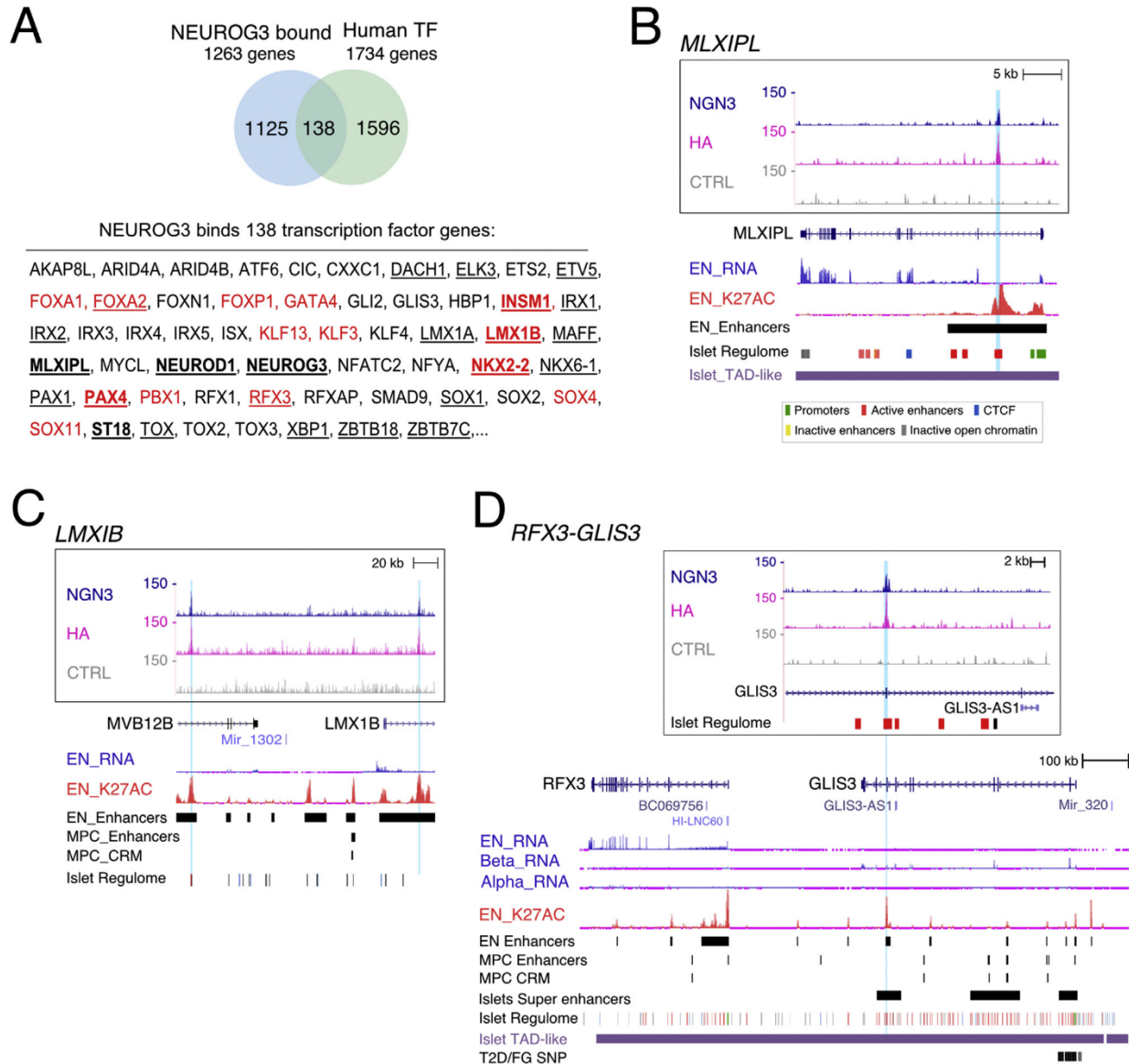


Figure 4: NEUROG3 binding to transcription factor genes. (A) NEUROG3 binds 138 genes encoding human TFs. A selection of TF genes is given. Complete list is given in [Suppl. Table 9](#), with the list of 1734 human TFs taken from Ref. [37] and <https://www.proteinatlas.org>. The 24 TFs enriched in NEUROG3-Venus+ pancreatic endocrine progenitors, among which 8 are downregulated in *NEUROG3*^{-/-} endocrine progenitors [25], are underlined and in bold, respectively. The 14 TFs belonging to Core Regulatory Circuits (CRCs) in endocrine progenitors as defined by Alvarez-Dominguez et al. [30] are in red. (B–D) NEUROG3 binding to the (B) *MLXIPL*, (C) *LMX1B*, and (D) *RFX3-GLIS3* loci. See [Figure 2E](#) for legend description. In (D), RNA-seq data from primary islet beta (Beta-RNA) and alpha (Alpha-RNA) cells are taken from Ref. [30].

[Suppl. Table 9](#)). Of those, 24 were enriched in NEUROG3-Venus⁺ hiPSC-derived endocrine progenitors, including 8 genes also downregulated in *NEUROG3*^{-/-} cells. Besides the TF genes already mentioned above (*NKX2-2*, *NEUROD1*, *NEUROG3*, *PAX4*, *INSM1*, and *FOXA2*), we unraveled several other TFs known to control islet cell development in the mouse or human, including *SOX4*, *RFX3*, *ST18* (*MYT3*), *MLXIPL*, *NKX6-1*, and *LMX1B* ([Figure 4A](#) and data not shown), suggesting that they could also be regulated directly by NEUROG3. For instance, NEUROG3 binds to a region in intron 1 of *MLXIPL* ([Figure 4B](#)) previously shown to be bound by Rfx6 and Nkx2-2 in the mouse [45,50]. Using Luciferase assays in HEK293T cells, we confirmed that this region effectively

mediates NEUROG3 transcriptional activation ([Suppl. Figure 5](#)). Interestingly, we found a NEUROG3 binding site 33 kb upstream of *SOX4* TSS and three additional peaks within the adjacent *CDKAL1* locus ([Suppl. Figure 6](#)). The latter region likely acts as a distant enhancer to regulate *SOX4* in islet cells, as suggested by promoter capture HiC data [32], and was found to be an activated enhancer (H3K27ac enriched) at the endocrine progenitor stage as well [30] ([Suppl. Figure 6](#)). Thus, while Sox4 has been shown to regulate *Neurog3* expression and be required downstream of *Neurog3* to regulate endocrine differentiation in the mouse [51], *SOX4* may, in turn, be a direct target of NEUROG3. Importantly, we found that NEUROG3 binds to intron 2 of *LMX1B*, a

Original Article

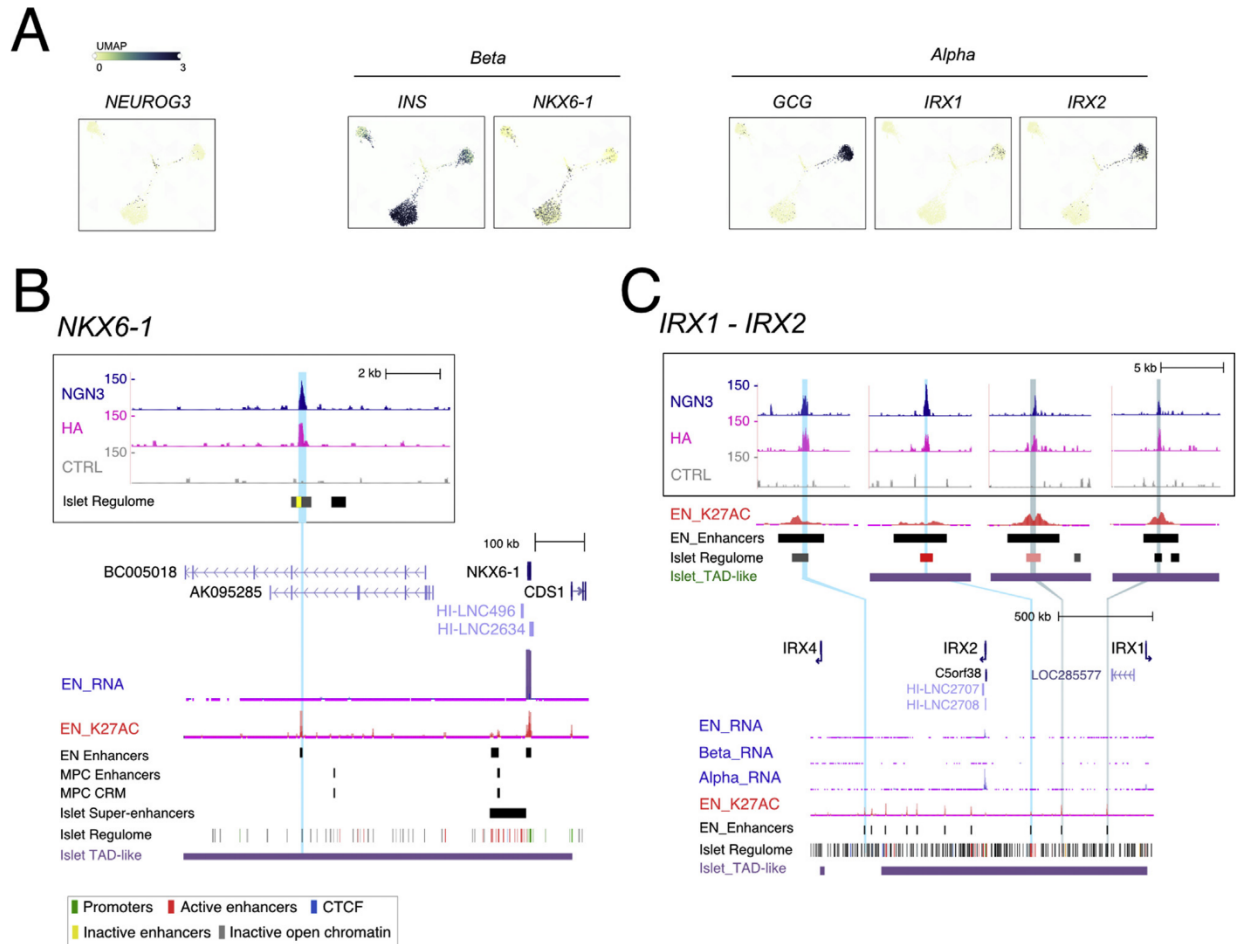


Figure 5: NEUROG3 binds to transcription factor genes enriched in islet cell types. (A) Enriched expression of transcriptional regulators in islet cell types, *NKX6-1* for beta cells and *IRX1*, *IRX2* for alpha cells, in the human fetal pancreas (taken from <https://descartes.brotmanbaty.org>). Expression of *INS* and *GCG* is provided to define developing beta and alpha cells, respectively. (B–C) NEUROG3 binding to *NKX6-1* (B) and *IRX1-IRX2* (C) loci. See Figure 2E for legend description.

transcription factor recently reported to be critical for generating human islet cells downstream of NEUROG3, suggesting direct transcriptional regulation of *LMX1B* by NEUROG3 (Figure 4C) [30]. Additionally, a NEUROG3 peak within the *GLIS3* coding region (exon 8) was assigned to both *GLIS3* and *RFX3* (Figure 4D). This peak nicely overlaps with an enhancer region at both endocrine progenitor and adult islets stages [30,32]. In the adult islets, HiC showed that the two genes are spatially linked [32]. Moreover, only *RFX3* is highly expressed at the endocrine progenitor stage (Figure 4D, [30]) and has recently been documented as a human endocrine fate switch gene regulator [39]. Taken together, these data suggest a possible regulation of *RFX3* by NEUROG3 at the endocrine progenitor stage.

In a recent study, Alvarez-Dominguez et al. [30] described Core transcriptional Regulatory Circuits (CRCs) for every stage of *in vitro* beta cell differentiation, based on interconnected autoregulatory loops between TFs. Strikingly, NEUROG3 binds 35% of the 40 TF genes defining the endocrine progenitors CRCs: *LMX1B*, *FOXA1*, *FOXA2*, *FOXP1*, *GATA4*, *INSM1*, *KLF3*, *KLF13*, *NKX2-2*, *RFX3*, *SOX4*, *SOX11*, *PAX4*, and *PBX1* (Figure 4A). Of note, since the definition of CRCs relied on TF recognition motifs, NEUROG3, whose motif was not yet known, could not be integrated into the endocrine progenitor

CRCs [30]. Our data provide novel mechanistic insights into the role of NEUROG3 as a possible direct regulator of many TFs of the endocrine CRCs.

We further scrutinized the TFs dataset to examine whether NEUROG3 binds to genes known to control islet cell type development and unveil novel candidates. We focused on transcription factor genes for which NEUROG3 binding site(s) coincided with endocrine progenitor active enhancer regions [30] and enriched in developing alpha, beta, or delta cells based on recent transcriptomic profiling of the human fetal pancreas [38] (Figure 5A and Suppl. Figure 7A). An essential role of NEUROG3 in promoting the beta cell fate is supported by its direct regulation of *Pax4* expression, a critical regulator of beta cell development [52]. In addition to *Pax4*, *Nkx6-1* is critical for endocrine progenitors to acquire a beta destiny in the mouse [53]. Supporting a possible direct regulation of *NKX6-1* by NEUROG3, we found a peak 466 kb downstream of *NKX6-1* TSS (Figure 5B). This region overlaps with an endocrine progenitor-specific active enhancer region, suggesting that this site may be important for NEUROG3-regulated expression of *NKX6-1* in human islet progenitors. NEUROG3 binding sites were also associated with genes encoding TFs previously reported as markers for beta cells based on their expression, but not yet

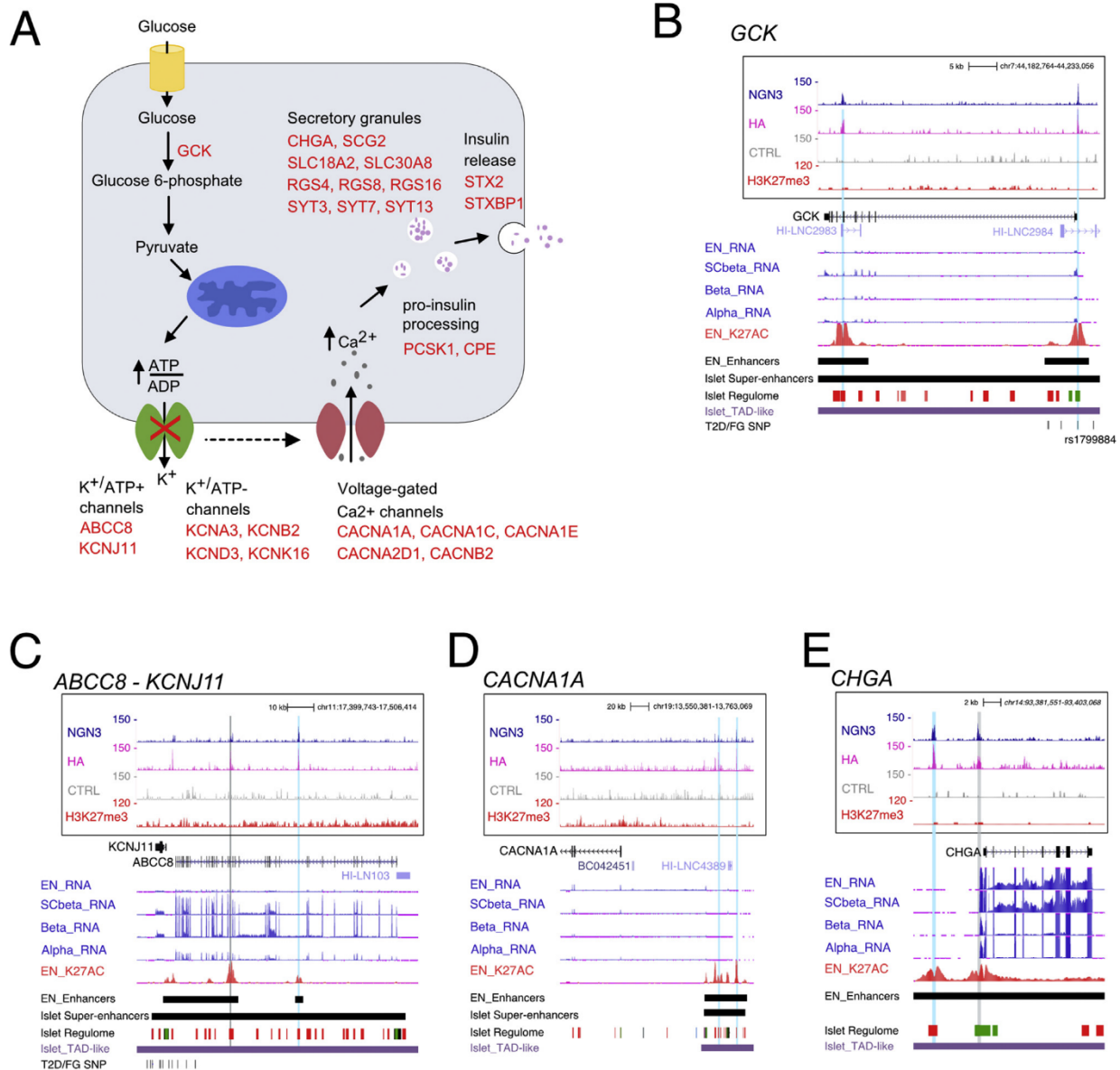


Figure 6: NEUROG3 binding to genes regulating glucose-dependent insulin secretion. (A) Schematic representation of insulin secretion upon glucose sensing in a beta cell. The NEUROG3-bound genes are indicated in red. (B–H) NEUROG3 binding to genes involved in glucose-stimulated insulin secretion: (B) *GSK*; (C) *ABCC8-KCNJ11*; (D) *CACNA1A*; (E) *CHGA*. See Figure 2E for legend description.

functionally addressed in endocrine cell development, such as *SMAD9* [54] and *TFCP2L1* [54] (Suppl. Figure 7). For *TFCP2L1*, however, the NEUROG3 binding region was not identified as an endocrine progenitor, but as an adult islet enhancer [32] (Suppl. Figure 7B). Of note, we additionally discovered *ETS2* and *ISX* as potential new NEUROG3-targeted TFs whose expression is enriched in human fetal beta cells, suggesting that they could play a role in human beta-cell development (Suppl. Figure 7B). For *ISX*, but not *ETS2*, we did validate the capacity of NEUROG3 to activate transcription via this region (Suppl. Figure 5). Regarding alpha destiny, no peaks were assigned to *ARX*, which is essential for alpha cell development in the mouse and human [52,55]. Of note, we found NEUROG3 binding regions associated with *IRX1* and *IRX2*, which are both enriched in human fetal (Figure 5A) and adult

(Figure 5C and [30,56]) alpha cells, as well as in the *in vitro*-derived NEUROG3-Venus+ PEP cells (Figure 4A). Interestingly, *Ir2* was induced by ectopic *Neurog3* expression in the chick endoderm [11] and downregulated in hPSC-derived human islet cells lacking *ARX* [55]. Thus, *IRX1/2* are attractive, alpha-specific, NEUROG3 direct targets, although their function in alpha cell development remains to be studied.

Compared to alpha and beta cells, less is known regarding the regulation of delta cell destiny. We did not find any binding of NEUROG3 associated with the delta transcription factor *HHEX* [57]. Nevertheless, our analysis pointed to possible NEUROG3-dependent candidate regulators of delta cell development. Indeed, we identified a NEUROG3 binding site within the first intron of the EGFR family member *ErbB2*

Original Article

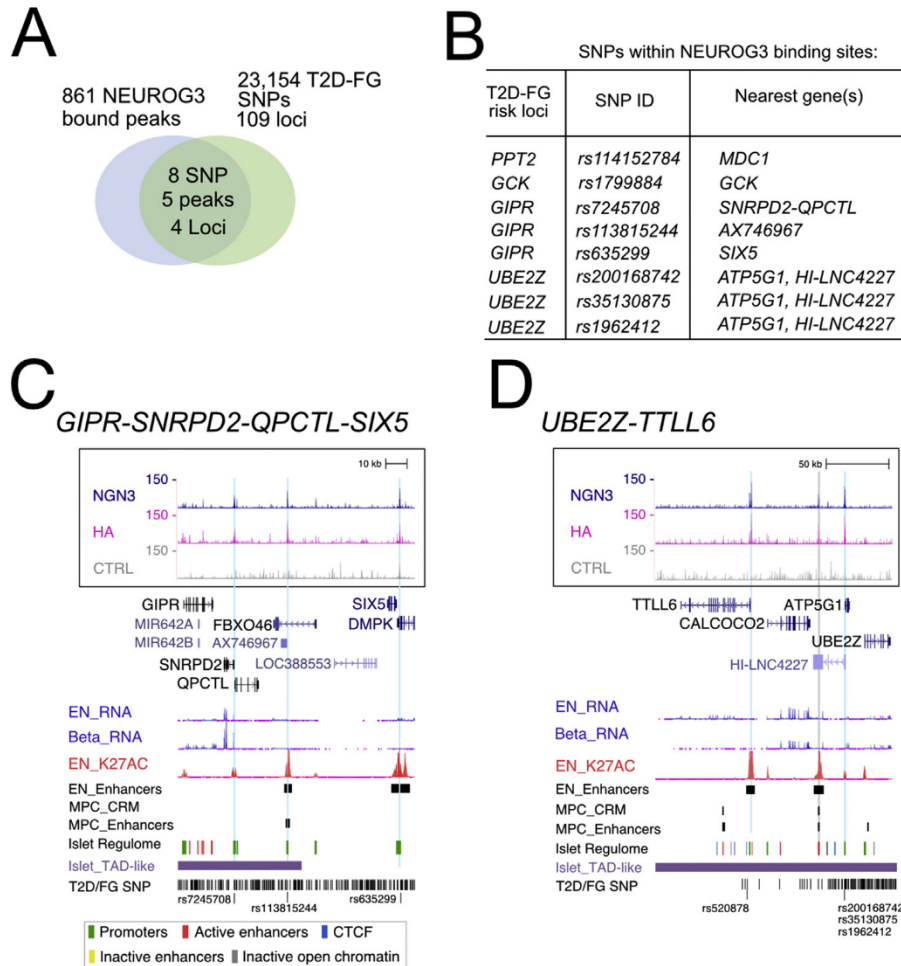


Figure 7: T2D and fasting glycemia (FG)-associated genetic variants located within NEUROG3-bound regions. (A) Venn diagram illustrating the overlap of NEUROG3-bound regions and the 23,154 T2D-FG SNPs distributed over 109 risk loci compiled by Miguel-Escalada et al. [32]. (B) The 8 SNPs within NEUROG3-bound regions, in the indicated 4 risk loci, and their nearest genes. (C–D) NEUROG3 binding to the *GIPR-SNRPD2-FBXO46-SIX5* (C) and *UBE2Z-TTLL6* (D) loci. See Figure 2E for legend description.

Receptor Tyrosine Kinase 4 (*ERBB4*) gene (Suppl. Figure 7C) that is highly and specifically expressed in human fetal (Suppl. Figure 7A) and adult [56] delta cells and whose ligand neuregulin-4 (NGR-4) was found to be essential for the determination of delta cells in mice [58]. Of note, *ERBB4* is cleaved by gamma-secretase to generate an intracellular domain endowed with TF regulatory activity [59]. Furthermore, during human *in vitro* beta cell differentiation, a gamma secretase inhibitor is added at the endocrine progenitor stage to inhibit Notch signaling and promote the beta lineage [41]. Whether the concomitant inhibition of *ERBB4*, impeding the delta destiny, could favor the beta destiny remains to be tested. Altogether, mapping NEUROG3 occupancy revealed an unexpectedly broad direct control of TFs in the endocrine gene regulatory network.

3.6. NEUROG3 binds to genes involved in islet cell function

As mentioned above, gene ontology analyses revealed that many NEUROG3-bound genes were associated with insulin secretion, suggesting that NEUROG3 could regulate the expression of genes of the hormone secretory machinery. Indeed, NEUROG3 bound to genes linking glucose metabolism to electrical activity in beta cells and subsequent insulin secretion [60], such as the glucose sensor *GCK*

and the subunits of the ATP-sensitive K⁺ channel, *ABCC8* or *KCNJ11* (Figure 6A–C). Interestingly, other K⁺ (ATP-independent) channel genes (e.g., *KCNA3*, *KCNB2*, *KCND3*, *KCNK16*, *KCNMA1*), which also contribute to glucose-stimulated insulin secretion and are expressed in human fetal islet cells [38], were bound by NEUROG3 (Figure 6A and Suppl. Table 3). In the same line, the voltage-dependent Ca²⁺ channels (e.g., *CACNA1A*, *CACNA1C*, *CACNA1E*, *CACNA2D1*, *CACNB2*) or genes involved in the formation, composition, or release of secretory granules (e.g., *CHGA*, *SCG2*, *SLC30A8/ZNT8*, *SLC18A2/VMAT2*, *RGS16*, *RGS4*, *SYT7*, *SYT13*, *SYT3*, *STX2*, *STXB1*) or pro-insulin processing (e.g., *PCSK1*, *CPE*) (Figure 6A, Suppl. Figure 8A, B and Suppl. Table 3) were associated with NEUROG3 binding sites. We did not find any binding of NEUROG3 to hormone genes. NEUROG3 binding was also identified in the somatostatin receptor genes *SSTR1*, *SSTR2*, and *SSTR5*, involved in the paracrine regulation of insulin and glucagon secretion [60] (Suppl. Figure 8C, and Suppl. Table 3).

These findings regarding NEUROG3-bound gene involvement in islet cell function were unexpected due to the transient expression of NEUROG3 in endocrine progenitors. Interestingly, several of these target genes, including *ABCC8/KCNJ11*, *CACNA1A*, *SLC30A8*, and

SLC18A2, are weakly or not expressed in endocrine progenitors compared to more-differentiated hESC-derived beta (SC-beta) or adult islet cells (Figure 6C, D and Suppl. Figure 8A, [30]). We noticed that some of these genes (e.g., *ABCC8* or *KCNJ11*, and *SLC18A2*) (Figure 6C and Suppl. Figure 8) are marked by H3K27me3 at or near their TSS, suggesting that *NEUROG3* could prime these genes at the endocrine progenitor stage, but subsequent binding by other TFs could be required for their full activation. Thus, *NEUROG3* might not only promote islet destiny in uncommitted pancreatic progenitors, but also control the initiation of later generic endocrine programs in maturing islet and beta cells.

3.7. *NEUROG3* binding at T2DM risk variants

Genome-wide association studies (GWAS) have identified hundreds of genetic variants associated with increased T2DM susceptibility [61]. It is essential to understand how these T2DM-linked SNPs contribute to the disease, which genes they affect and how, and whether it is by altering the protein sequence or, most frequently, distal cis-regulatory elements. Miguel-Escalada et al. [32] have compiled a list of 23,154 genetic variants associated with T2D and/or fasting glycemia (T2D/FG SNPs) within 109 loci. When comparing the disease-associated variants with *NEUROG3*-bound sites, we found eight SNPs within five *NEUROG3* binding sites ($P = 1.5e-3$), falling within four T2D/FG loci (Figure 7A, B and Suppl. Table 10). All eight risk alleles lie within *NEUROG3*-binding sites at a promoter region: rs1799884 for *GCK*; rs114152784 for *MDC1*; rs635299, rs113815244, and rs7245708 for *SIX5*, *AX746967* and *QPCTL* and/or *SNRPD2* at the *GLPR* locus, respectively; and rs200168742, rs35130875, and rs1962412 for *ATP5G1* and/or *HI-LNC4227* at the *UBE2Z* locus (Figures 6B and 7C–D). None of the eight SNPs overlap with a *NEUROG3*-binding motif; however, they still may alter *NEUROG3* binding indirectly, and thus also affect the expression of *NEUROG3* target genes. Similarly, SNPs located not directly within the *NEUROG3* binding site, but in the *NEUROG3*-bound enhancer, may influence *NEUROG3* binding on its sites. By intersecting the T2D/FG SNPs [32] with PEP enhancers, we found 1,445 SNPs ($P = 3.05e-215$) coinciding with a PEP enhancer [30], with 152 SNPs ($P = 2.95e-27$) within an enhancer bound by *NEUROG3* (Suppl. Table 10). Thus, T2D/FG SNPs are enriched in PEP enhancers bound by *NEUROG3*, suggesting that these mutations may alter the expression of genes co-regulated by *NEUROG3*.

4. CONCLUSION

Despite the major progress in generating functional beta cells from pluripotent stem cells for cell therapy in diabetes, directed differentiation protocols lack robustness, and obtaining glucose-responsive cells remains difficult. The overall strategy was to mimic pancreas and islet developmental programs identified mainly in rodents. While the successful production of insulin-producing cells from PSC *in vitro* attests that these programs are remarkably conserved, it is important to acquire additional insights into the gene regulatory networks controlling islet cell development in humans to optimize differentiation protocols. Notwithstanding the essential function of *NEUROG3* in islet cell development in mice and humans, its downstream direct targets that implement the endocrinogenic program are essentially unknown. Identifying *NEUROG3* binding sites in purified hiPSC-derived PEP, using the CUT&RUN technique, revealed over 1000 novel putative direct targets. Importantly, *NEUROG3* binding largely overlaps with PEP active enhancers (H3K27ac binding) as defined by others [30], underlining the importance of *NEUROG3* in promoting gene expression in PEPs. Our study revealed that *NEUROG3* binds to a high number of important islet

TF genes and novel possible transcriptional regulators of islet cell differentiation. Moreover, a plethora of genes involved at several key steps of the insulin secretion pathway are bound by *NEUROG3*. Finally, we revealed that *NEUROG3* binding regions overlap with a series of T2DM-associated SNPs. Altogether, our results suggest that *NEUROG3* controls the progression of islet cell differentiation and the setup of hormone secretory machinery. The pleiotropic functions of *NEUROG3* direct targets support the severity of *NEUROG3* mutations in mice and humans and the potential of *NEUROG3* to induce an endocrinogenic program when expressed ectopically. To our knowledge, this is the first genome-wide characterization of *NEUROG3* occupancy in hiPSC-derived PEPs.

AUTHOR CONTRIBUTION

V.S., R.M., E.G.S., A.K., A.M., and S.G. performed iPSC gene editing, differentiations and characterizations. V.S. and R.M. performed the CUT&RUN experiments, B.J. the Illumina sequencing, and T.Y., V.S., and S.J. the bioinformatics analyses. C.B. produced the pA–MN. C.H. provided the SB AD3.1 line and expertise for iPSC culture. K.H.L. and P.S. performed the RNA-seq data for *NEUROG3*^{−/−} iPSC line and participated in the manuscript redaction. V.S. and G.G. conceived the work, analyzed the data and wrote the manuscript. G.G. obtained financial support.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the members of the Gradwohl team and the Genomeast platform (particularly Christelle Thibault-Carpentier and David Rodriguez), Flow cytometry, and Cell culture facilities for the sequencing of the CUT&RUN samples, cell sorting, and hiPSC maintenance respectively. The authors are grateful to I. Cebola for providing ChIP-seq data and R. Scharfmann for helpful discussions. The Gradwohl lab is funded by the Novo Nordisk Foundation (Challenge Grant NNF140C0013655). Sequencing was performed by the Genomeast platform, a member of the ‘France Génomique’ consortium (ANR-10-INBS-0009). This work used the Integrated Structural Biology platform of the Strasbourg Instruct-ERIC center IGBMC-CBI supported by FRISBI (ANR-10-INBS-0005-001). IGBMC is supported by the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d’Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no competing interest.

APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101313>.

REFERENCES

- [1] Schwitzgebel, V.M., 2014. Many faces of monogenic diabetes. *Journal of Diabetes Investigation* 5(2):121–133.
- [2] Gu, G., Dubauskaite, J., Melton, D.A., 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129(10):2447–2457.
- [3] Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., Guillemot, F., 2000. *neurogenin3* is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(4):1607–1611.

Original Article

- [4] Wang, J., Cortina, G., Wu, S.V., Tran, R., Cho, J.H., Tsai, M.J., et al., 2006. Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea. *New England Journal of Medicine* 355(3):270–280.
- [5] Rubio-Cabezas, O., Jensen, J.N., Hodgson, M.I., Codner, E., Ellard, S., Serup, P., et al., 2011. Permanent neonatal diabetes and enteric anendocrinosis associated with biallelic mutations in *NEUROG3*. *Diabetes* 60(4):1349–1353.
- [6] Pinney, S.E., Oliver-Krasinski, J., Ernst, L., Hughes, N., Patel, P., Stoffers, D.A., et al., 2011. Neonatal diabetes and congenital malabsorptive diarrhea attributable to a novel mutation in the human neurogenin-3 gene coding sequence. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96(7):1960–1965.
- [7] Hancili, S., Bonnefond, A., Philippe, J., Vaillant, E., De Graeve, F., Sand, O., et al., 2017. A novel *NEUROG3* mutation in neonatal diabetes associated with a neuro-intestinal syndrome. *Pediatric Diabetes* 21:464.
- [8] Mellitzer, G., Beucher, A., Lobstein, V., Michel, P., Robine, S., Keding, M., et al., 2010. Loss of enteroendocrine cells in mice alters lipid absorption and glucose homeostasis and impairs postnatal survival. *The Journal of Clinical Investigation* 120(5):1708–1721.
- [9] McGrath, P.S., Watson, C.L., Ingram, C., Helmrath, M.A., Wells, J.M., 2015. The basic helix-loop-helix transcription factor *NEUROG3* is required for development of the human endocrine pancreas. *Diabetes* 64(7):2497–2505.
- [10] Zhu, Z., Li, Q.V., Lee, K., Rosen, B.P., González, F., Soh, C.-L., et al., 2016. Genome editing of lineage determinants in human pluripotent stem cells reveals mechanisms of pancreatic development and diabetes. *Stem Cell*, 1–53.
- [11] Petri, A., Ahnfelt-Ronne, J., Frederiksen, K.S., Edwards, D.G., Madsen, D., Serup, P., et al., 2006. The effect of neurogenin3 deficiency on pancreatic gene expression in embryonic mice. *Journal of Molecular Endocrinology* 37(2): 301–316.
- [12] Smith, S.B., Watada, H., German, M.S., 2004. Neurogenin3 activates the islet differentiation program while repressing its own expression. *Molecular Endocrinology* 18(1):142–149.
- [13] Mellitzer, G., Bonne, S., Lucio, R., Van de Casteele, M., Lenne-Samuel, N., Collombat, P., et al., 2006. *IA1* is *NGN3*-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *Embo Journal* 25(6):1344–1352.
- [14] Miyatsuka, T., Kosaka, Y., Kim, H., German, M.S., 2011. Neurogenin3 inhibits proliferation in endocrine progenitors by inducing *Cdkn1a*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(1):185–190.
- [15] Huang, H.P., Liu, M., El-Hodiri, H.M., Chu, K., Jamrich, M., Tsai, M.J., 2000. Regulation of the pancreatic islet-specific gene *BETA2* (*neuroD*) by neurogenin 3. *Molecular and Cellular Biology* 20(9):3292–3307.
- [16] Smith, S.B., Gasa, R., Watada, H., Wang, J., Griffen, S.C., German, M.S., 2003. Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of *Pax4*. *The Journal of Biological Chemistry* 278(40):38254–38259.
- [17] Zhang, X., McGrath, P.S., Salomone, J., Rahal, M., McCauley, H.A., Schweitzer, J., et al., 2019. A comprehensive structure-function study of Neurogenin3 disease-causing alleles during human pancreas and intestinal organoid development. *Developmental Cell* 50(3):367–380 e367.
- [18] Hainer, S.J., Bošković, A., McCannell, K.N., Rando, O.J., Fazio, T.G., 2019. Profiling of pluripotency factors in single cells and early embryos. *Cell* 177(5): 1319–1329 e1311.
- [19] Skene, P.J., Henikoff, S., 2017. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *eLife* 6:576.
- [20] Skene, P.J., Henikoff, J.G., Henikoff, S., 2018. Targeted in situ genome-wide profiling with high efficiency for low cell numbers. *Nature Protocols* 13(5): 1006–1019.
- [21] Petersen, M.B.K., Azad, A., Ingvorsen, C., Hess, K., Hansson, M., Grapin-Botton, A., et al., 2017. Single-cell gene expression analysis of a human ESC model of pancreatic endocrine development reveals different paths to β -cell differentiation. *Stem Cell Reports*, 1–37.
- [22] Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., et al., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29(1):15–21.
- [23] Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31(2):166–169.
- [24] Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15(12):550.
- [25] de Lichtenberg, K.H., Funa, N., Nakic, N., Ferrer, J., Zhu, Z., Huangfu, D., et al., 2018. Genome-wide identification of *HES1* target genes uncover novel roles for *HES1* in pancreatic development. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/335869>.
- [26] Anders, S., Huber, W., 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* 11(10):R106.
- [27] Hainer, S.J., Fazio, T.G., 2019. High-Resolution chromatin profiling using CUT&RUN. *Current Protocols in Molecular Biology* 126(1):e85.
- [28] Schmid, M., Durussel, T., Laemmli, U.K., 2004. ChIP and ChEC; genomic mapping of chromatin proteins. *Molecular Cell* 16(1):147–157.
- [29] Ye, T., Krebs, A.R., Choukrallah, M.A., Keime, C., Plewniak, F., Davidson, I., et al., 2011. seqMINER: an integrated ChIP-seq data interpretation platform. *Nucleic Acids Research* 39(6):e35.
- [30] Alvarez-Dominguez, J.R., Donaghey, J., Rasouli, N., Kenty, J.H.R., Helman, A., Charlton, J., et al., 2020. Circadian entrainment triggers maturation of human in vitro islets. *Cell Stem Cell* 26(1):108–122 e110.
- [31] Cebola, I., Rodríguez-Seguí, S.A., Cho, C.H.H., Bessa, J., Rovira, M., Luengo, M., et al., 2015. TEAD and YAP regulate the enhancer network of human embryonic pancreatic progenitors. *Nature Cell Biology* 17(5):615–626.
- [32] Miguel-Escalada, I., Bonas-Guarch, S., Cebola, I., Ponsa-Cobas, J., Mendieta-Esteban, J., Atla, G., et al., 2019. Human pancreatic islet three-dimensional chromatin architecture provides insights into the genetics of type 2 diabetes. *Nat Genetics* 51(7):1137–1148.
- [33] Meers, M.P., Tenenbaum, D., Henikoff, S., 2019. Peak calling by Sparse enrichment analysis for CUT&RUN chromatin profiling. *Epigenetics & Chromatin* 12(1):42.
- [34] Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., et al., 2010. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Molecular Cell* 38(4):576–589.
- [35] McLean, C.Y., Bristor, D., Hiller, M., Clarke, S.L., Schaar, B.T., Lowe, C.B., et al., 2010. GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nature Biotechnology* 28(5):495–501.
- [36] Huang da, W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 4(1):44–57.
- [37] Lambert, S.A., Jolma, A., Campitelli, L.F., Das, P.K., Yin, Y., Albu, M., et al., 2018. The human transcription factors. *Cell* 175(2):598–599.
- [38] Cao, J., O'Day, D.R., Pliner, H.A., Kingsley, P.D., Deng, M., Daza, R.M., et al., 2020. A human cell atlas of fetal gene expression. *Science* 370(6518).
- [39] Weng, C., Xi, J., Li, H., Cui, J., Gu, A., Lai, S., et al., 2020. Single-cell lineage analysis reveals extensive multimodal transcriptional control during directed beta-cell differentiation. *Nature Metabolism* 2(12):1443–1458.
- [40] Shin, H., Liu, T., Manrai, A.K., Liu, X.S., 2009. CEAS: cis-regulatory element annotation system. *Bioinformatics* 25(19):2605–2606.
- [41] Rezania, A., Bruin, J.E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., et al., 2014. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology* 32(11):1121–1133.
- [42] van Arensbergen, J., Dussaud, S., Pardanau-Glavieux, C., Garcia-Hurtado, J., Sauty, C., Guerci, A., et al., 2017. A distal intergenic region controls pancreatic endocrine differentiation by acting as a transcriptional enhancer and as a polycomb response element. *PLoS One* 12(2):e0171508.
- [43] Mutoh, H., Naya, F.J., Tsai, M.J., Leiter, A.B., 1998. The basic helix-loop-helix protein *BETA2* interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes & Development* 12(6):820–830.

- [44] Kim, S.K., Selleri, L., Lee, J.S., Zhang, A.Y., Gu, X., Jacobs, Y., et al., 2002. Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in *lpl1*-deficient mice promotes diabetes mellitus. *Nature Genetics* 30(4):430–435.
- [45] Piccand, J., Strasser, P., Hodson, D.J., Meunier, A., Ye, T., Keime, C., et al., 2014. Rfx6 maintains the functional identity of adult pancreatic β cells. *Cell Reports* 9(6):2219–2232.
- [46] Ait-Lounis, A., Bonal, C., Seguin-Estévez, Q., Schmid, C.D., Bucher, P., Herrera, P.L., et al., 2010. The transcription factor Rfx3 regulates beta-cell differentiation, function, and glucokinase expression. *Diabetes* 59(7):1674–1685.
- [47] Andersson, R., Sandelin, A., 2020. Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. *Nature Review Genetics* 21(2):71–87.
- [48] Gao, N., LeLay, J., Vatamaniuk, M.Z., Rieck, S., Friedman, J.R., Kaestner, K.H., 2008. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes & Development* 22(24):3435–3448.
- [49] Lee, K., Cho, H., Rickert, R.W., Li, Q.V., Pulecio, J., Leslie, C.S., et al., 2019. FOXA2 is required for enhancer priming during pancreatic differentiation. *Cell Reports* 28(2):382–393 e387.
- [50] Churchill, A.J., Gutiérrez, G.D., Singer, R.A., Lorberbaum, D.S., Fischer, K.A., Sussel, L., 2017. Genetic evidence that Nkx2.2 acts primarily downstream of Neurog3 in pancreatic endocrine lineage development. *eLife* 6.
- [51] Xu, E.E., Krentz, N.A.J., Tan, S., Chow, S.Z., Tang, M., Nian, C., et al., 2015. SOX4 cooperates with neurogenin 3 to regulate endocrine pancreas formation in mouse models. *Diabetologia* 58(5):1013–1023.
- [52] Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sorensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G., et al., 2003. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes & Development* 17(20):2591–2603.
- [53] Schaffer, A.E., Taylor, B.L., Benthuyssen, J.R., Liu, J., Thorel, F., Yuan, W., et al., 2013. Nkx6.1 controls a gene regulatory network required for establishing and maintaining pancreatic Beta cell identity. *PLoS Genetics* 9(1): e1003274.
- [54] Muraro, M.J., Dharmadhikari, G., Grun, D., Groen, N., Dielen, T., Jansen, E., et al., 2016. A single-cell transcriptome atlas of the human pancreas. *Cell Systems* 3(4):385–394 e383.
- [55] Gage, B.K., Asadi, A., Baker, R.K., Webber, T.D., Wang, R., Itoh, M., et al., 2015. The role of ARX in human pancreatic endocrine specification. *PLoS One* 10(12): e0144100-0144124.
- [56] Lawlor, N., Marquez, E.J., Orchard, P., Narisu, N., Shamim, M.S., Thibodeau, A., et al., 2019. Multiomic profiling identifies cis-regulatory networks underlying human pancreatic beta cell identity and function. *Cell Reports* 26(3):788–801 e786.
- [57] Zhang, J., McKenna, L.B., Bogue, C.W., Kaestner, K.H., 2014. The diabetes gene Hhex maintains delta-cell differentiation and islet function. *Genes & Development* 28(8):829–834.
- [58] Huotari, M.A., Miettinen, P.J., Palgi, J., Koivisto, T., Ustinov, J., Harari, D., et al., 2002. ErbB signaling regulates lineage determination of developing pancreatic islet cells in embryonic organ culture. *Endocrinology* 143(11):4437–4446.
- [59] Han, W., Sfendouris, M.E., Semmes, E.C., Meyer, A.M., Jones, F.E., 2016. Intrinsic HER4/4ICD transcriptional activation domains are required for STAT5A activated gene expression. *Gene* 592(1):221–226.
- [60] Rorsman, P., Ashcroft, F.M., 2018. Pancreatic beta-cell electrical activity and insulin secretion: of mice and men. *Physiological Reviews* 98(1):117–214.
- [61] Krentz, N.A.J., Gloyn, A.L., 2020. Insights into pancreatic islet cell dysfunction from type 2 diabetes mellitus genetics. *Nature Reviews Endocrinology* 16(4): 202–212.

ARTICLE 3. RNA polymerase II transcription initiation in holo-TFIID-depleted mouse embryonic stem cells

Cell reports Volume 43, Issue 10, 22 October 2024

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114791>

Vincent Hisler, Paul Bardot, Dylane Detilleux, Matthieu Stierle, **Emmanuel Garcia Sanchez**, Claire Richard, Lynda Hadj Arab, Cynthia Ehrhard, Bastien Morlet, Yavor Hadzhiev, Matthieu Jung, Stéphanie LeGras, Luc Négroni, Ferenc Müller, László Tora, Stéphane D. Vincent

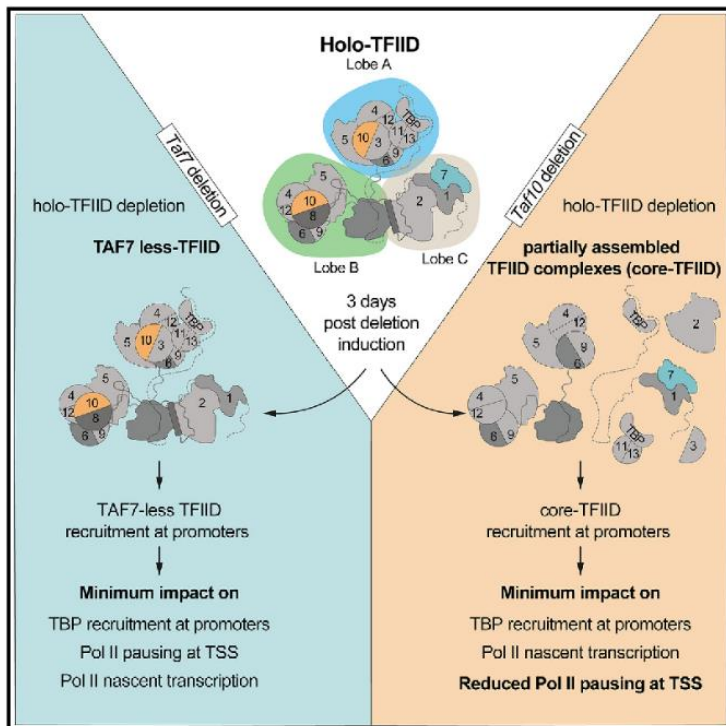
La composition et la nécessité de TFIID varie dans certains types cellulaires (Müller and Tora 2004). Cet article est focalisé en l'étude des complexes partiels de TFIID dans l'initiation de la transcription. Les lignées cellulaires embryonnaires de souris (mESC, *mouse Embryonic Stem Cells*) permettant de déléter conditionnellement *Taf10* ou *Taf7* ont été générées puis les effets sur les colonies, les déplétions protéiques, l'assemblage du complexe TFIID, la transcription naissante et la déposition de TBP sur la chromatine ont été examinés. Les résultats démontrent que la délétion de *Taf10* est plus sévère que la délétion de *Taf7* à différentes échelles. Alors que sans TAF7 TFIID s'assemble, sans TAF10 ce n'est majoritairement que le centre structural qui se forme. Cependant, dans les deux cas, le maintien de l'activité de transcription et la déposition de TBP ont été mis en évidence suggérant que certaines sous-unités TAFs sont dispensables pour l'initiation de la transcription. En effet, malgré l'absence de TAF7 et TAF10, une transcription naissante (4sU) significative a été observée ce qui indique que des complexes TFIID partiellement assemblés peuvent sous-tenir l'activité de l'ARN Pol II. Cependant, la survie des cellules à long terme est impactée dans les mutants et particulièrement pour *Taf10*. Ces résultats coïncident avec la sévérité des délétions conditionnelles dans l'embryon.

J'ai collaboré dans cette étude dans la caractérisation du phénotype cellulaire (formation de colonies), les analyses d'immunofluorescence et de la transcription naissante pour les colonies déplétées pour TAF7 ou TAF10.

Cell Reports

RNA polymerase II transcription initiation in holo-TFIID-depleted mouse embryonic stem cells

Graphical abstract



Authors

Vincent Hisler, Paul Bardot, Dylane Detilleux, ..., Ferenc Müller, László Tora, Stéphane D. Vincent

Correspondence

vincent@igbmc.fr

In brief

Hisler et al. reveal that TAF7 and TAF10 depletion affects holo-TFIID sequential assembly, leading to the formation of partial TFIID complexes. Transcription is active and TBP is recruited at promoters when holo-TFIID is depleted. Partial TFIID complexes may sustain active transcription but cannot replace holo-TFIID over several cell divisions and/or development.

Highlights

- TAF7 or TAF10 depletion leads to the formation of different partial TFIID complexes
- Nascent Pol II transcription is not strongly affected in holo-TFIID-depleted cells
- TBP is recruited at the promoter in holo-TFIID-depleted cells
- Pol II pausing is affected in the absence of TAF10



Article

RNA polymerase II transcription initiation in holo-TFIID-depleted mouse embryonic stem cells

Vincent Hisler,^{1,2,3,4} Paul Bardot,^{1,2,3,4,8} Dylane Detilleux,^{1,2,3,4,8} Andrea Bernardini,^{1,2,3,4} Matthieu Stierle,^{1,2,3,4} Emmanuel Garcia Sanchez,^{1,2,3,4} Claire Richard,^{1,2,3,4} Lynda Hadj Arab,^{1,2,3,4} Cynthia Ehrhard,^{1,2,3,4} Bastien Morlet,^{1,2,3,4,5} Yavor Hadzhiev,⁷ Matthieu Jung,^{1,2,3,4,6} Stéphanie Le Gras,^{1,2,3,4,6} Luc Négroni,^{1,2,3,4,5} Ferenc Müller,⁷ László Tora,^{1,2,3,4} and Stéphane D. Vincent^{1,2,3,4,9,*}

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 67400 Illkirch, France

²CNRS, UMR7104, 67400 Illkirch, France

³INSERM, U1258, 67400 Illkirch, France

⁴Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France

⁵Proteomics Platform (IGBMC), 67400 Illkirch, France

⁶GenomEast (IGBMC), 67400 Illkirch, France

⁷Institute of Cancer and Genomic Sciences, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, UK

⁸These authors contributed equally

⁹Lead contact

*Correspondence: vincent@igbmc.fr

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114791>

SUMMARY

The recognition of core promoter sequences by TFIID is the first step in RNA polymerase II (Pol II) transcription initiation. Metazoan holo-TFIID is a trilobular complex, composed of the TATA binding protein (TBP) and 13 TBP-associated factors (TAFs). Why and how TAFs are necessary for the formation of TFIID domains and how they contribute to transcription initiation remain unclear. Inducible TAF7 or TAF10 depletion, followed by comprehensive analysis of TFIID subcomplex formation, chromatin binding, and nascent transcription in mouse embryonic stem cells, result in the formation of a TAF7-lacking TFIID or a minimal core-TFIID complex, respectively. These partial complexes support TBP recruitment at promoters and nascent Pol II transcription at most genes early after depletion, but importantly, TAF10 is necessary for efficient Pol II pausing. We show that partially assembled TFIID complexes can sustain Pol II transcription initiation but cannot replace holo-TFIID over several cell divisions and/or development.

INTRODUCTION

RNA polymerase II (Pol II) is responsible for the transcription of all protein-coding genes and is regulated, allowing gene-by-gene variable expression levels depending on the cellular context (reviewed in Roeder¹). Consequently, Pol II transcription dysfunction is associated with pathologies such as developmental defects, cancer, and metabolic or neural diseases. Pol II transcription is first regulated by the binding of specific transcription factors to enhancers, which recruit different classes of transcriptional co-activators, creating a favorable context for transcription initiation. Pol II recruitment via the formation of the pre-initiation complex (PIC) on active promoters is the obligatory step for transcription initiation.

The PIC is composed of six general transcription factors (GTFs), TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, and TFIIH, and Pol II (reviewed in Roeder¹). TFIID is the first GTF to bind to the promoter, initiating the nucleation of the PIC. In metazoans, holo-TFIID is composed of the TATA binding protein (TBP) and 13 TBP-associated factors (TAFs)^{2,3} and is recruited to the promoter by multiple mechanisms. TFIID interacts with histone marks associated with open chromatin via TAF1

and TAF3.^{4,5} Moreover, TFIID interacts with DNA motifs such as the TATA box via TBP,⁶ but also with downstream elements (Motif Ten Element [MTE] and Downstream Promoter Element [DPE])⁷ which are crucial for the recognition of the large majority of mammalian promoters that lack a TATA box.

Holo-TFIID is composed of three lobes (Figure 1A).^{3,8} Lobes A and B contain TAFs sharing a conserved histone fold domain (HFD) allowing specific heterodimerization. The HEAT domains of the two copies of TAF6, with TAF1 and TAF8, connect lobes A and B and, with TAF2, constitute lobe C.^{3,8} Co-translational assembly of TFIID^{9,10} occurs in multiple steps and leads to the buildup of subcomplexes. The core-TFIID (TAF5, TAF4/TAF12, and TAF6/TAF9 in two copies) is the basic structure of lobes A and B.^{2,3,8} Addition of the 3-TAF submodule (TAF2, TAF8, and TAF10) to the core-TFIID results in the formation of the 8-TAF complex, which contains a full B lobe.¹¹ Then, the pre-assembled TFIID building blocks engage co-translationally with the nascent TAF1 polypeptide.¹⁰ TAF7 and TAF11/TAF13 interact in the cytoplasm,¹² and it was proposed that the biochemically reconstituted TAF1/TAF7/TAF11/TAF13/TBP subcomplex (S-TAF) could integrate with the 8-TAF complex to form the holo-TFIID.¹³



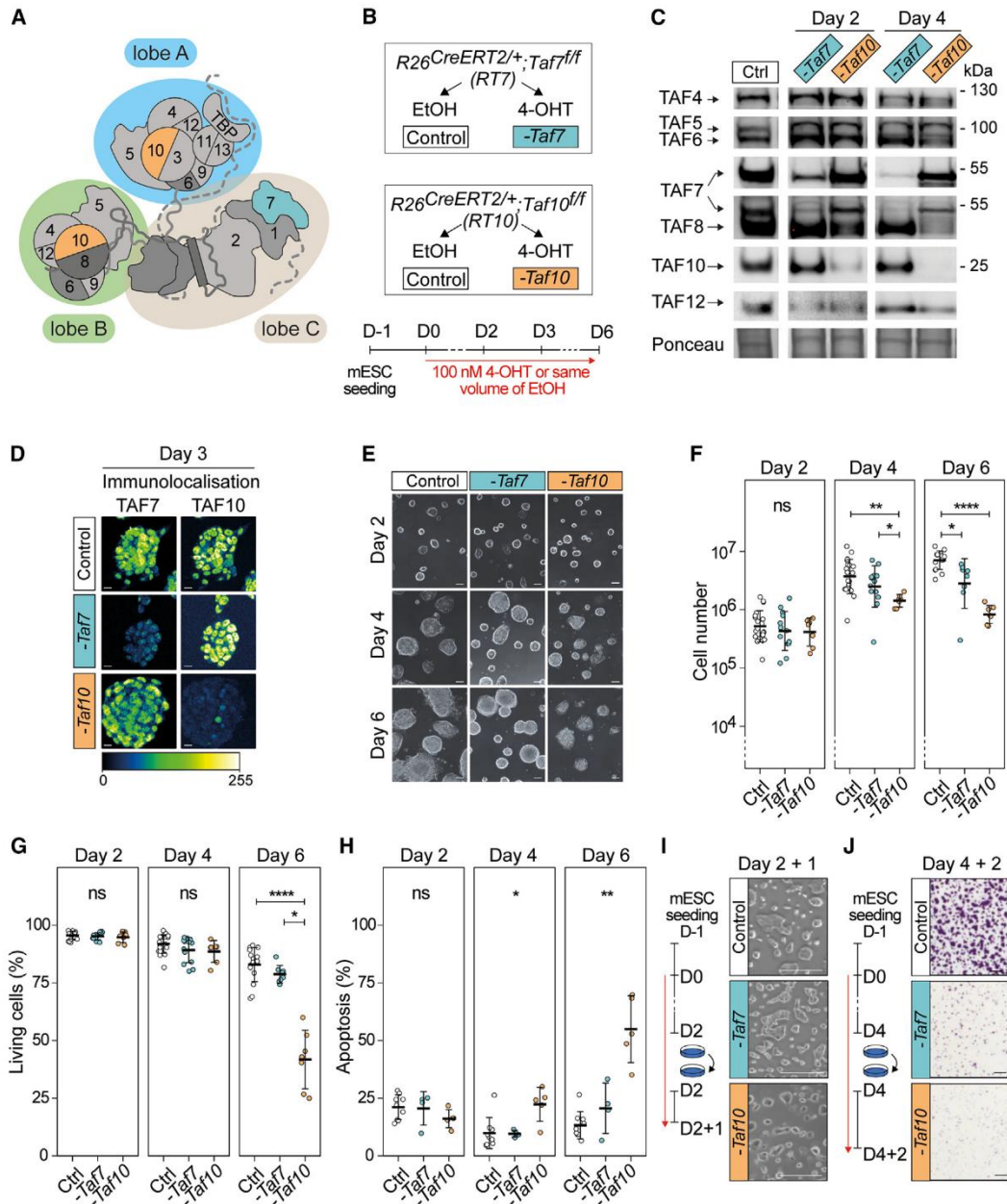


Figure 1. Phenotypic analysis of the conditional depletion of TAF7 or TAF10 in mESCs

(A) Trilobular structure of TFIID.
 (B) Deletion of *Taf7* ($-Taf7$) in $R26^{CreERT2/+};Taf7^{fl/fl}$ (RT7) and *Taf10* ($-Taf10$) in $R26^{CreERT2/+};Taf10^{fl/fl}$ (RT10) mESCs. Control cells were treated with EtOH.
 (C) Western blot analyses of TAF4, TAF5, TAF6, TAF7, TAF8, TAF10, and TAF12 protein expression after *Taf7* or *Taf10* deletion at day (D) 2 and D4. As a control (Ctrl), RT7 cells were treated for 2 days. The Ponceau staining is displayed at the bottom.
 (D) Immunolocalization of TAF7 and TAF10 in RT7 and RT10 cells at D3. As a control, RT10 cells were treated for 3 days. Color scale: Green Fire Blue LUT.
 (E) Colony growth at D2, D4, and D6.
 (F–H) Total number of cells (F), percentage of living cells (G), and percentage of apoptotic cells (H) at D2, D4, and D6. (E) Ctrl, $n = 5$; $-Taf7$, $n = 2$; D4: $-Taf10$, $n = 3$ biological replicates for each day. (F and G) Ctrl: D2, $n = 20$; D4, $n = 20$; D6, $n = 15$. $-Taf7$: D2, $n = 13$; D4, $n = 13$; D6, $n = 8$. $-Taf10$: D2, $n = 7$; D4, $n = 7$; D6, $n = 7$

(legend continued on next page)

How the three lobes formed by the TAF subcomplexes are required for transcription initiation has not been investigated. The variable composition of TFIID and variable phenotypes suggest both essential and redundant roles for TAFs forming TFIID variant complexes (reviewed in Levine et al.¹⁴). First, non-canonical TFIID complexes have been described in yeast, *Drosophila*, and human cells.^{15–18} Second, some TAFs, such as TAF4 and TAF9, have paralogs¹⁴ and are co-expressed with their relative paralog.^{19–21} As TAF4B and TAF9B are part of TFIID^{22,23} in two copies, this suggests the possible combination of these homologs within TFIID.

TFIID is important *in vivo*, as mutations in several *Taf* genes lead to peri-implantation lethality in the mouse.^{24–27} Interestingly, *Taf2*^{−/−}, *Taf5*^{−/−}, *Taf8*^{−/−}, and *Taf10*^{−/−} inner cell masses (ICMs) fail at outgrowth *in vitro*, while the trophectoderm is not affected,^{24,25,27} suggesting that these TAFs are not required in all cell types. Moreover, while TAF7 is important for early thymocyte proliferation and differentiation, it is not required for thymocyte final differentiation.²⁶ Similarly, conditional deletion of *Taf10* in various cellular contexts has different effects depending on the developmental stage and the cell type.^{23,28,29} Interestingly, TAF10 depletion severely affects TFIID assembly,^{23,25,29} whereas TAF7 depletion does not.²⁶ Overall, TFIID composition and requirements are variable depending on the cellular context; however, as the data have been gathered from different systems, it is not possible to draw comparative conclusions about the function of partial and/or holo-TFIID complexes in cellular homeostasis.

In this study, we investigated the biochemical and genetic functions of *Taf7* and *Taf10*, coding for subunits of distinct TFIID domains (TAF7 lobe C and TAF10 lobes A and B) and integrating the complex at different steps (TAF7 later, TAF10 earlier) in comparable conditions, in pluripotent mouse embryonic stem cells (mESCs) and in the embryonic mesoderm. We monitored the consequences of TAF7 or TAF10 depletion on holo-TFIID assembly and chromatin distribution, as well as on Pol II transcription, to test whether partial TFIID complexes can sustain Pol II transcription. Holo-TFIID is drastically depleted upon *Taf7* or *Taf10* deletion. TAF7 depletion resulted in the assembly of a TAF7-less TFIID, whereas TAF10 depletion led to the formation of a core-TFIID complex. Notably, TBP was still present on most promoters upon either TAF7 or TAF10 depletion, coupled with mostly intact Pol II transcription, 3 days after induction of the deletion. However, a small number of genes were affected in both depletions, with more severity in TAF10-depleted cells. Consistently, conditional deletion in the mesoderm led to more severe phenotype upon *Taf10* than *Taf7* loss. Altogether, our data suggest that in the absence of holo-TFIID, partial TFIID modules broadly support nascent transcription with distinct requirements on a subset of genes in mESCs.

RESULTS

Depletion of distinct TFIID subunits causes different phenotypic severities in mESCs

To get insight into the molecular consequences of deletion of *Taf7* or *Taf10* during stem cell maintenance, mESCs were derived from blastocysts carrying the inducible ubiquitously expressed *R26^{CreERT2}* allele³⁰ associated with *Taf7^{fl}* or *Taf10^{fl}* (*R26^{CreERT2}+/+*; *Taf7^{fl}/fl* and *R26^{CreERT2}+/+*; *Taf10^{fl}/fl*, hereafter called *RT7* and *RT10*, respectively). The deletion of *Taf7* (*−Taf7*) or *Taf10* (*−Taf10*) was induced by the addition of 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) at day 0 (Figure 1B). 4-OHT treatment did not induce secondary defects (Figures S1A and S1B). Deletion efficiency was monitored by western blot (WB) analyses, and depletion of TAF7 protein in *RT7* mESCs was observed as early as day 2 and almost complete at day 4 (Figures 1C, S1C, and S1D). Similarly, TAF10 depletion in *RT10* mESCs was observed as early as day 2 and no longer detectable at day 4 (Figures 1C, S1C, and S1D). In these conditions, the expression of TAF4, TAF5, TAF6, and TAF12 TFIID subunits was not affected, and in agreement with our earlier studies, depletion of TAF10 resulted in the destabilization of TAF8^{9,23} (Figures 1C and S1C). The depletion of TAF7 and TAF10 proteins is nearly homogeneous within the cellular population, as shown by immunolocalization (Figures 1D and S1E). Altogether, we have established an efficient cellular model to study the effects of the depletion of TAF7 or TAF10 proteins.

Next, we investigated the effect of the depletion on cell proliferation and viability. *RT7* and *RT10* mutant cells form smaller colonies compared to control cells (Figures 1E and S1F), indicating that both TAF7 and TAF10 are required for mESC maintenance, in agreement with the incapacity of *Taf7*^{−/−} and *Taf10*^{−/−} ICMs to grow *in vitro*.^{25,26}

We then evaluated cell growth in control and mutant conditions. There were no detectable differences in cell numbers between the control either mutant cell line at day 2 (Figure 1F). Depletion of TAF7 resulted in a minor decrease in cell number only at day 6. In contrast, TAF10 depletion resulted in a significant reduction in cell number already at day 4 (Figure 1F). To assess whether this effect is due to a cell proliferation decrease, we quantified cells in S phase. We observed a reduction tendency in a percentage of S-phase cells in both mutants from day 3 (Figure S1G), suggesting a minor impact of TAF7 and TAF10 depletion on cell-cycle progression. As decrease in cell growth might be due to reduced viability, we investigated cell viability (Figure 1G). No differences between control and *RT7* or *RT10* mutant cells were observed at days 2 and 4. However, at day 6, while depletion of TAF7 did not have any significant effect, depletion of TAF10 reduced viability 2-fold. Analysis of apoptosis showed that the percentage of apoptotic cells ranged from 10% to 25% from day 2 to day 6 in control and mutant *RT7*

biological replicates. (H) Ctrl, *n* = 9; *Taf7*, *n* = 4; *Taf10*, *n* = 5 biological replicates for each day). Two independent experiments were conducted. The bars correspond to the mean ± SD. Kruskal-Wallis test followed by Dunn *post hoc* test: ns, not significant; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, and *****p* < 0.0001.

(I) Cell density after passage at D2 and 1 day of extra culture.

(J) Cell density evaluated by crystal violet staining after passage at D4 and 2 days of culture. The control conditions correspond to *RT7* cells (E, I, and J). Scale bars, 15 μm (D), 50 μm (E), and 150 μm (I and J).

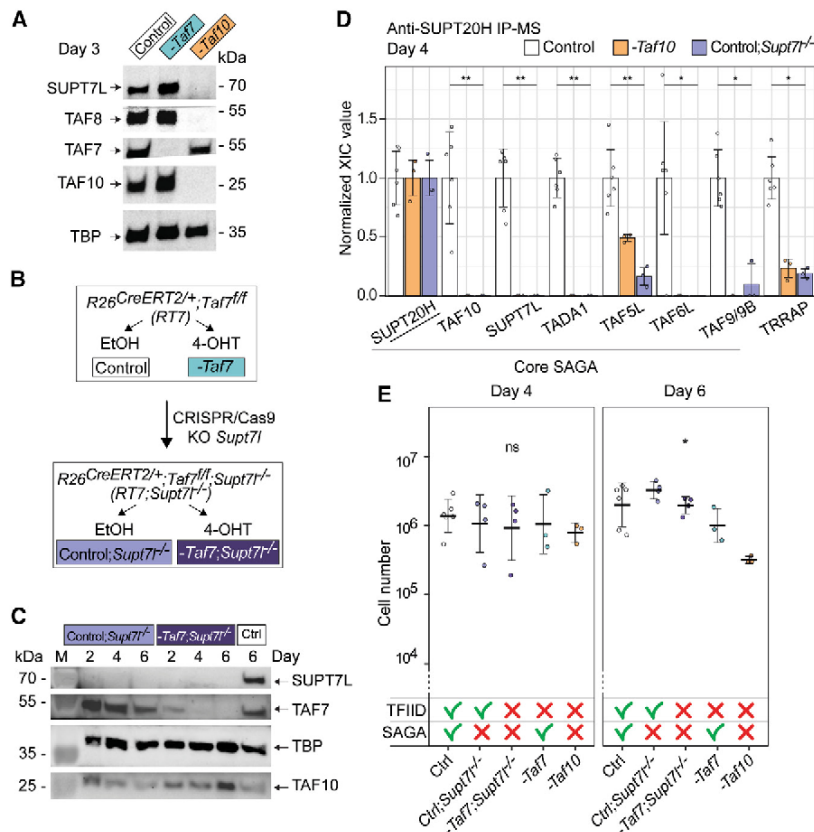


Figure 2. The more severe phenotype in TAF10-depleted mESCs is not due to SAGA assembly defect

(A) Western blot analyses of SUPT7L, TAF7, TAF8, TAF10, and TBP expression in TAF7- or TAF10-depleted cells after 3 days of treatment. Control *RT7* cells were treated with EtOH.

(B) Generation of the *R26^{CreERT2}+*; *Taf7^{fl/fl}*; *Supt7l^{-/-}* (*RT7*; *Supt7l^{-/-}*) mESCs.

(C) Western blot analyses of SUPT7L, TAF7, TBP, and TAF10 expression in *RT7*; *Supt7l^{-/-}* cells after 2, 4, and 6 days of treatment with EtOH (Control; *Supt7l^{-/-}*) or 4-OHT (-*Taf7*; *Supt7l^{-/-}*). Control *RT7* cells were treated 6 days. M, molecular weight marker.

(D) Anti-SUPT20H IP-MS analyses on nuclear-enriched lysates from *RT10* and *RT7* cells treated 4 days with EtOH (Control, *RT7*, and *RT10* data merged), *RT10* mESCs with 4-OHT (-*Taf10*), and *RT7*; *Supt7l^{-/-}* cells with EtOH (Control; *Supt7l^{-/-}*). For each protein, the XIC (extracted ion chromatograms) values of Control; *Supt7l^{-/-}* and -*Taf10* lysates were normalized to those of *RT7* and *RT10* control cells treated with EtOH, respectively. Control, *n* = 2 biological replicates $\times$ 3 technical replicates; -*Taf10*, *n* = 1 $\times$ 3; Control; *Supt7l^{-/-}*, *n* = 1 $\times$ 3.

(E) Total number of cells at day 4 and day 6. *RT7* and *RT10* cells treated with EtOH were merged as control (Ctrl). The impact on TFIID and SAGA assembly is indicated at the bottom. D4 and D6: Ctrl, *n* = 6; Ctrl; *Supt7l^{-/-}*, *n* = 4; -*Taf7*; *Supt7l^{-/-}*, *n* = 4; -*Taf7*, *n* = 3; -*Taf10*, *n* = 3 biological replicates. Kruskal-Wallis test: ns, not significant; **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 (D and E). Means $\pm$ SD are shown (D and E).

cells (Figure 1H), indicating that TAF7 depletion does not induce apoptosis. In contrast, while no significant increase in apoptosis could be observed in TAF10-depleted cells at days 2 and 4, at day 6, the apoptosis rate increased 2-fold (Figure 1H). Finally, we evaluated the ability of the cells to form colonies after replating. When the mutant cells were split on day 2 and analyzed 1 day later (D2 + 1), no significant difference was observed in colony size or number of living cells for the two mutants (Figures 1I and S1H). In contrast, when the mutant cells were split at day 4 and analyzed 2 days after (D4 + 2), their capacity to form colonies was severely impaired (Figures 1J and S1I), indicating that both TAF7 and TAF10 are required for mESC maintenance from day 4 onward.

Altogether, these data indicate that TAF10 is required for the growth and survival of mESCs, whereas TAF7 depletion only weakly impacts mESC growth and survival. Importantly, this difference is not the consequence of the expression of TAF7 paralogues, as they are not expressed in controls nor in the mutant cells (Figures S1J–S1L).

The severity of the TAF10-depletion phenotype is not caused by defects in SAGA assembly

While TAF7 is a TFIID-specific subunit, TAF10 is also shared with the Supt-Ada-Gcn5 acetyltransferase (SAGA) co-activator complex.³¹ SAGA assembly is defective in *Taf10* conditional mutant

embryos.²³ Therefore, the difference in phenotype severity between mutant *RT7* and *RT10* mESCs could be associated with an impairment in both TFIID and SAGA function in *RT10* cells. To test this hypothesis, we focused on SUPT7L, the HFD partner of TAF10 in SAGA.³² Importantly, *Supt7l* deletion in mESCs disrupts SAGA assembly.³³ WB analysis of SUPT7L expression in the *RT7* line indicated that TAF7 depletion does not affect SUPT7L levels as expected, but surprisingly, TAF10 depletion resulted in the loss of SUPT7L expression (Figure 2A), indicating that TAF10 is required for the stability of its two HFD partners, TAF8 and SUPT7L. These results indicate that loss of *Supt7l* or *Taf10* has similar effects on SAGA assembly. To deplete TAF7 in a context where SAGA assembly is impaired, we deleted *Supt7l* in the *RT7* line (hereafter called *RT7*; *Supt7l^{-/-}*) (Figure 2B). Co-depletion of SUPT7L and TAF7 in mutant *RT7*; *Supt7l^{-/-}* cells was validated by WB (Figure 2C). Immunoprecipitation coupled with mass spectrometry (IP-MS) using antibodies against SUPT20H, a core SAGA subunit, confirmed that SAGA is not assembled in the absence of TAF10 and/or SUPT7L^{23,33} (Figure 2D).

Supt7l loss of function results only in a slight growth defect in similar culture conditions,³³ and our data indicated that the growth and survival of 4-OHT-treated *RT7*; *Supt7l^{-/-}* mESCs are not affected (Figures 2E, S2A, and S2B). Depletion of TAF7 in the *Supt7l^{-/-}* background did not change significantly the cell

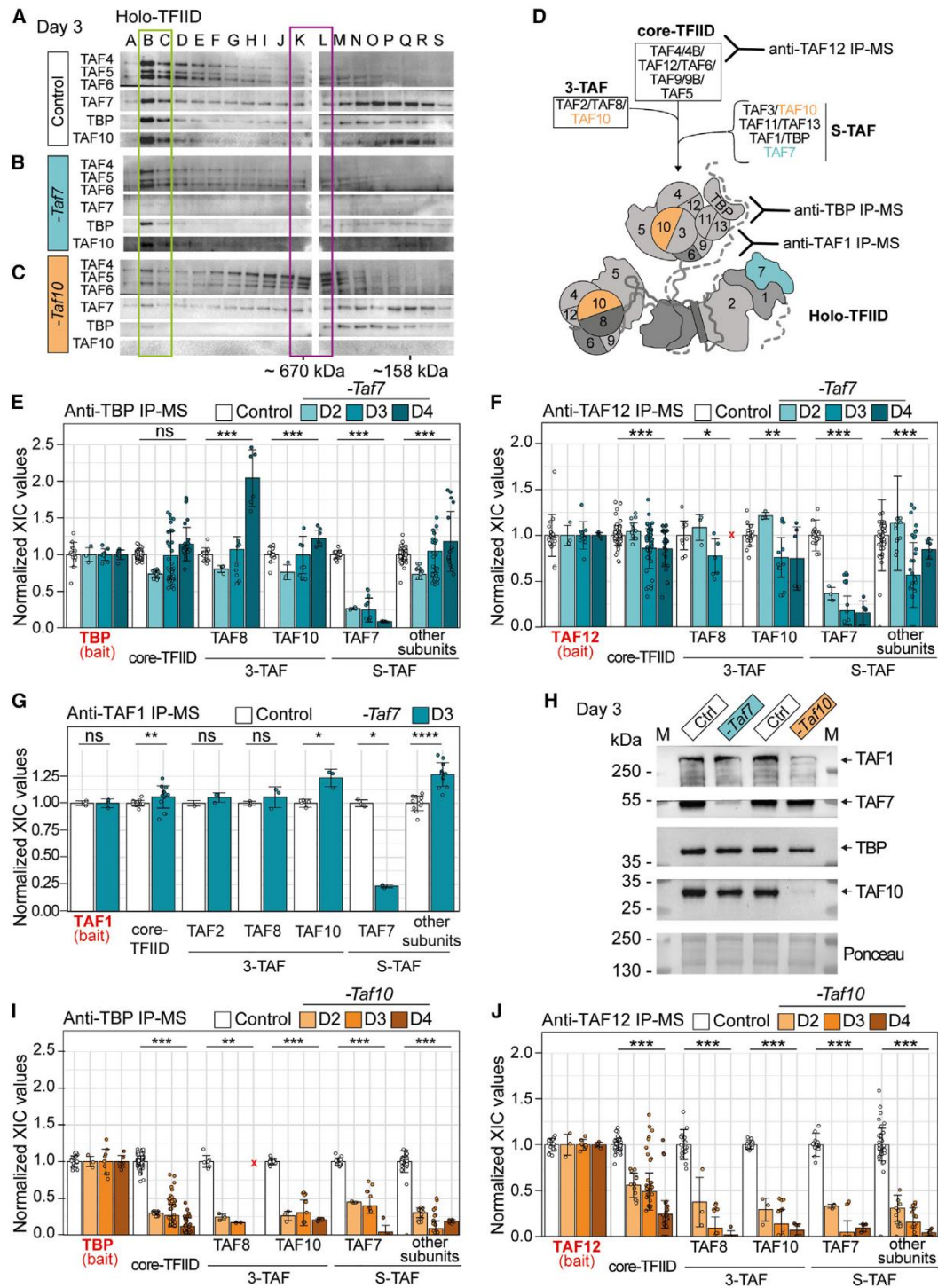


Figure 3. Depletion of TAF7 or TAF10 differentially affects TFIID assembly

(A–C) Gel filtration coupled to western blot analysis of TAF4, TAF5, TAF6, TAF7, TAF10, and TBP expression in *RT10* mESCs treated with EtOH (Control) (A) and TAF7- and TAF10-depleted mESCs treated with 4-OHT (B and C) for 3 days ($n = 1$). Letters on the top correspond to the fractions. Positions of the complexes are indicated by colored boxes.

(legend continued on next page)

number, cell viability, or cell death compared to TAF7 depletion alone (Figures 2E, S2A, and S2B). Therefore, SAGA disruption does not aggravate the phenotype of TAF7 loss, strongly suggesting that the difference in the observed severity between mutant *RT7* and mutant *RT10* mESCs is not caused by the disruption of SAGA in mutant *RT10* cells but by the different molecular consequences associated with the loss of TAF7 or TAF10 in TFIIID.

Depletion of TAF7 or TAF10 leads to the formation of distinct partial TFIIID complexes

To analyze the molecular changes occurring in TFIIID assembly following depletion of TAF7 or TAF10, we first performed gel filtration on *RT7* or *RT10* mESC nuclear-enriched whole-cell extracts (NWCEs) collected at day 3, in control and mutant conditions. In control cells, fractions B and C contained the TFIIID complex, as suggested by the molecular weight and the co-localization of TBP and all the tested TAFs (Figure 3A, green box). In mutant *RT7* extracts, the profile is very similar to that of the control lysate, except for the absence of TAF7, indicating that a TFIIID complex without TAF7 (hereafter called TAF7-less TFIIID) is present in these cells (Figure 3B, green box). In mutant *RT10* cells, however, very little high-molecular-weight TAF complex could be detected. Consequently, TAF4, TAF5, and TAF6 were relocated to lower-molecular-weight complexes, peaking at about 670 kDa fractions (Figure 3C, purple box), indicating that the holo-TFIIID complex assembly was perturbed after TAF10 depletion.

To explore the composition of the partial complexes after TAF7 or TAF10 depletion, we performed IP-MS using anti-TAF12 and anti-TBP antibodies on NWCEs after 2, 3, and 4 days of treatment. As TAF12 is part of the core-TFIIID and TBP is only part of the holo-TFIIID complex, anti-TAF12 IP detects all the intermediate partial TFIIID complexes assembling on core-TFIIID, whereas anti-TBP IP should immunoprecipitate only holo-TFIIID¹⁰ (Figure 3D). As TBP is also part of the SL1 and TFIIIB complexes, which are involved in Pol I and Pol III transcription initiation, respectively,³⁴ we tested whether TAF7 or TAF10 depletion affects the interaction between TBP and SL1 subunits or the BRF1 subunit of TFIIIB (Figures S3A and S3B). Remarkably, as in the *TCre;Taf10* mutant embryos,²³ TAF10 depletion resulted in increased interaction between TBP and its non-TFIIID partners, particularly BRF1 (Figure S3B). These data indicate that some TBP is relocated to these complexes when TAF10 is depleted, suggesting an impairment in TBP incorporation into TFIIID. This relocation was not observed when TAF7 was depleted (Figure S3A), suggesting that TBP incorporation into TFIIID is not affected under these conditions.

TAF7 depletion resulted in the loss of TAF7 in the anti-TBP or -TAF12 IP-ed complexes, without causing significant changes in the IP-ed subunits of TFIIID (Figures 3E, 3F, S3C, and S3D). In both IP-MSs, the signal detected for each of the TFIIID subunits remained relatively stable on each day of the treatment analyzed. In the anti-TBP IP at day 4, we observed an increase in the co-immunoprecipitation of TAF2 and TAF8, which do not interact directly with TAF7 but are localized in lobe C of holo-TFIIID. This indicates that TAF7 depletion has a limited effect on TFIIID assembly, resulting in a TAF7-less TFIIID complex, as suggested by the gel-filtration analysis (Figures 3A and 3B) and confirmed by the anti-TAF1 IP-MS in TAF7-depleted cells (Figures 3G and S3G). In contrast, TAF10 depletion caused a severe impairment of TFIIID assembly, as TAF1 levels are strongly decreased in TAF10-depleted cell lysates (Figure 3H). This is also supported by the changes in the TFIIID subunits detected in anti-TBP (Figures 3I, 3E, and S3E) or anti-TAF12 IPs (Figures 3J and S3F). First, the interaction between TBP and all the TAFs strongly decreased (about 4-fold already at day 2) in mutant *RT10* extracts (Figures 3I and S3E). Second, anti-TAF12 IP-MS showed that when TAF10 is depleted, TAF12 maintains a stronger interaction with TAF5, TAF6, TAF4/4B, and TAF9/9B core-TFIIID subunits, but interactions with the other TAFs or TBP are severely decreased (Figures 3J and S3F). In particular, the signals of the 3-TAF and S-TAF complex subunits decreased by about 4-fold at day 2 in the *RT10* mutant extracts compared to the control condition (Figure 3J). Signals of TAF5, TAF6, and TAF9/9B decreased by only 2-fold (Figure S3F) and gradually decreased on the following days, while TAF4/4B-TAF12 interaction was maintained up to day 3 (Figure S3F). Altogether, these data indicate that the core-TFIIID is the main remaining partial TFIIID complex present in the mutant *RT10* mESCs and confirm that TAF10 presence is important for the recruitment of other subunits on the core-TFIIID to assemble the holo-TFIIID.

Despite the efficient depletion of TAF7 and TAF10 at day 3 (Figure S1C), TAF7 and TAF10 could still be detected in the IP-MS performed on mutant *RT7* and mutant *RT10* cells, respectively, suggesting the presence of remaining holo-TFIIID. To estimate the potential fraction of stable holo-TFIIID, we reanalyzed the IP-MS and the gel-filtration data at day 3 (Figure 3, see STAR Methods). Altogether, we estimated that 31% and 24% of holo-TFIIID is still present in TAF7- and TAF10-depleted cells in the IP-MS experiments (Figures S3H and S3I). Using the gel-filtration data, we estimated that 18% and 28.5% of holo-TFIIID is detected in TAF7- and TAF10-depleted cells, respectively (Figures S3J and S3K). Therefore, we estimated that a maximum

(D) Detection of holo-TFIIID and TFIIID submodules by the different antibodies.

(E and F) Relative normalized XIC values of TFIIID subunits from anti-TBP (E) and anti-TAF12 (F) IP-MS from *RT7* mESCs at day (D) 2, D3, and D4 after EtOH (Control) or 4-OHT (–*Taf7*) treatment.

(G) Normalized relative XIC values for TFIIID subunits from anti-TAF1 IP-MS in control and TAF7-depleted cells at D3.

(H) Western blot analyses of TAF1, TAF7, TAF10, and TBP expression after TAF7 (–*Taf7*) or TAF10 (–*Taf10*) depletion at D3. M, molecular weight marker.

(I and J) Relative normalized XIC values of TFIIID subunits from anti-TBP (I) and anti-TAF12 (J) IP-MS from *RT10* mESCs at D2, D3, and D4 after EtOH (Control) or 4-OHT (–*Taf10*) treatment. In (E)–(G), (I), and (J), subunits of the same submodules (see D) were merged, except for the bait proteins and TAF2, TAF7, TAF8, and TAF10. TAF2 data were not taken into account because TAF2 was poorly detected in the IP-MS from controls. Core-TFIIID: TAF4/4B, TAF5, TAF6, TAF9/9B, and TAF12. S-TAF: TAF1, TAF3, TAF11, TAF13, and TBP. D2, $n = 1$ biological replicate $\times$ 3 technical replicates; D3, $n = 3 \times 3$; D4, $n = 2 \times 3$ (E, F, I, and J); $n = 3$ technical replicates (G). Each dot corresponds to one measure of one subunit. Red crosses indicate proteins not detected in the control condition. Means $\pm$ SD are shown, Kruskal-Wallis test: ns, not significant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$.

of 24.5% and 26% of remaining holo-TFIID persists in the TAF7- and TAF10-depleted cells, respectively, at day 3.

Altogether, these data demonstrate that TFIID assembly is differentially affected by TAF7 or TAF10 depletion. A TAF7-less TFIID persists in mutant *RT7* cells; however, in mutant *RT10* cells, the holo-TFIID complex is not assembled, and a partial core-TFIID-like complex containing TAF4/4B, TAF5, TAF6, TAF9/9B, and TAF12, but lacking TBP, remains.

TBP is recruited to the chromatin in TAF7- and TAF10-depleted mESCs

As at day 3 holo-TFIID depletion is well established without a major phenotype in both TAF7- and TAF10-depleted mESCs, we decided to focus our analyses at that stage to avoid potential secondary effects. As TAF7 or TAF10 depletion results in distinct partially assembled TAFs and incomplete TFIID complexes, either containing or lacking TBP, respectively, we investigated whether TBP would be recruited on promoters under these conditions. To this end, first we analyzed whole-cell extracts (WCEs), cytoplasmic-enriched extracts (CEs), nuclear-enriched extracts (NEs), and chromatin extracts (ChREs) from control mESCs at day 3.³⁵ Enrichment of H3 in ChRE and tubulin in CE confirmed the fractionation (Figure S4A). TAF4, TAF5, TAF6, and TBP were more intense in the control ChRE, indicating a tight association of these subunits with the chromatin. While TAF7 was strongly depleted in all the fractions, there was no obvious difference in the levels of the tested TAF proteins between control and 4-OHT-treated *RT7* cells at day 3 (Figure S4B), further reinforcing the presence of a TAF7-less TFIID complex in the TAF7-depleted cells. Interestingly, TBP levels appeared only mildly decreased in the TAF7-depleted condition, suggesting that the loading of TBP on the chromatin is only slightly affected in TAF7-depleted cells. Remarkably, when TAF10 was depleted, TAF8 was not detected as expected^{9,23} in all the fractions; however, no obvious differences could be observed in TAF4, TAF5, TAF6, and TAF7, as well as TBP, levels (Figure S4C), suggesting that TBP recruitment at the promoters may not be significantly affected in TAF10-depleted cells.

TAF7-less TFIID and partial core TAF complexes are recruited at the promoters in TAF7- and TAF10-depleted mESCs, respectively

To evaluate the distribution of TBP on promoters in control and TAF7- or TAF10-depleted mESCs, we conducted anti-TBP CUT&RUN analyses at day 3. Annotation analyses indicated that TBP peaks were primarily located in promoter regions, as expected (Figures S5A–S5D). Comparison of the accumulation of TBP at the positions of the TBP-bound regions in the control conditions showed that TBP is still present on most promoters in TAF7- (Figures 4A and S5E) and in TAF10-depleted cells (Figures 4B and S5F). Nevertheless, the mean profile of TBP indicated that in both conditions, there is a reduction in TBP levels present at all the TBP-bound regions (Figures 4C, 4G, S5G, and S5K); however, no significant differential peak could be detected in TAF7-depleted cells, and only 16 differential TBP peaks could be detected in TAF10-depleted cells (Figures 4K, 4L, S5O, and S5P).

We carried out anti-TAF7, anti-TAF10, and anti-TAF12 CUT&RUN to measure the impact of TAF7 or TAF10 depletion on the accumulation of TAF7, TAF10, and TAF12 at the positions of TBP-bound promoters in the controls. As expected, we observed a strong depletion of TAF7 in TAF7-depleted mESCs (Figures 4D and S5H), but no decrease of TAF10 or TAF12 was detected at these sites (Figures 4E, 4F, S5I, and S5J), further indicating that under TAF7 depletion, a TAF7-less TFIID is binding to these promoters. Moreover, we observed a decrease of TAF10 in TAF10-depleted mESCs at the TBP-bound sites together with a strong decrease of TAF7 at these promoters (Figures 4I, 4H, S5L, and S5M). Importantly, TAF12 accumulation was not affected in the TAF10-depleted cells (Figures 4J and S5N), suggesting that a core-TFIID-like complex containing TAF12 may bind to these sites, possibly together with TBP.

Global Pol II activity is maintained in TAF7- and TAF10-depleted mESCs

After TAF7 or TAF10 depletion, the amount of holo-TFIID drastically decreased in mESCs. We therefore investigated the impact of the remaining partial TAF-containing complexes on nascent Pol II transcription. No differences in the incorporation of 5-ethynyl uridine (EU) after 2 to 5 days of treatment could be observed between control and TAF7- or TAF10-depleted cells (Figure S6A). To assess active Pol II transcription, we investigated the phosphorylation status of the C-terminal domain of the Pol II subunit RPB1. WB analysis of RPB1 at day 3 indicated that the hypo- (Pol II-A) and hyper- (Pol II-O) phosphorylated RPB1 levels were comparable in both mutant and control conditions (Figure S6B). We then specifically analyzed the phosphorylation of the serine 5 (RPB1^{pSer5}, pSer5) and serine 2 (RPB1^{pSer2}, pSer2) associated with the initiation and elongation status of Pol II, respectively (reviewed in Harlen and Churchman³⁶) by immunofluorescence (IF) and WB. Similarly, no obvious difference in RPB1^{pSer2} or RPB1^{pSer5} phosphorylation signal could be observed between control and mutant *RT7* and *RT10* cells (Figures 5A–5D), indicating that Pol II transcription initiation and elongation are active and are not obviously affected after TAF7 or TAF10 depletion.

To further understand the effect of TAF7 or TAF10 depletion on Pol II transcription, we carried out anti-Pol II chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) experiments at day 3. No significant differences could be observed in the TAF7-depleted cells at the transcription start site (TSS), in the gene body region, or at the transcription end site (TES) (Figures 5E and 5F). However, surprisingly, a significant strong decrease in Pol II accumulation could be observed in the TAF10-depleted cells at the TSS (Figures 5G and 5H), while on the metagene profiles of Pol II, detection in the gene body and TES region was less impacted (Figure 5H). Furthermore, analyses of the pausing ratios indicated a reduction in Pol II pausing at the TSS region compared to the gene body in both mutant cells; however, the pausing effect was more pronounced in TAF10-depleted cells (Figures 5I, 5J, S6C, and S6D).

Altogether, these data suggest that despite a dramatic decrease in the amount of holo-TFIID and a decreased enrichment of Pol II in TAF10-depleted cells at TSSs, the global activity of the Pol II is maintained in TAF7- or TAF10-depleted mESCs.

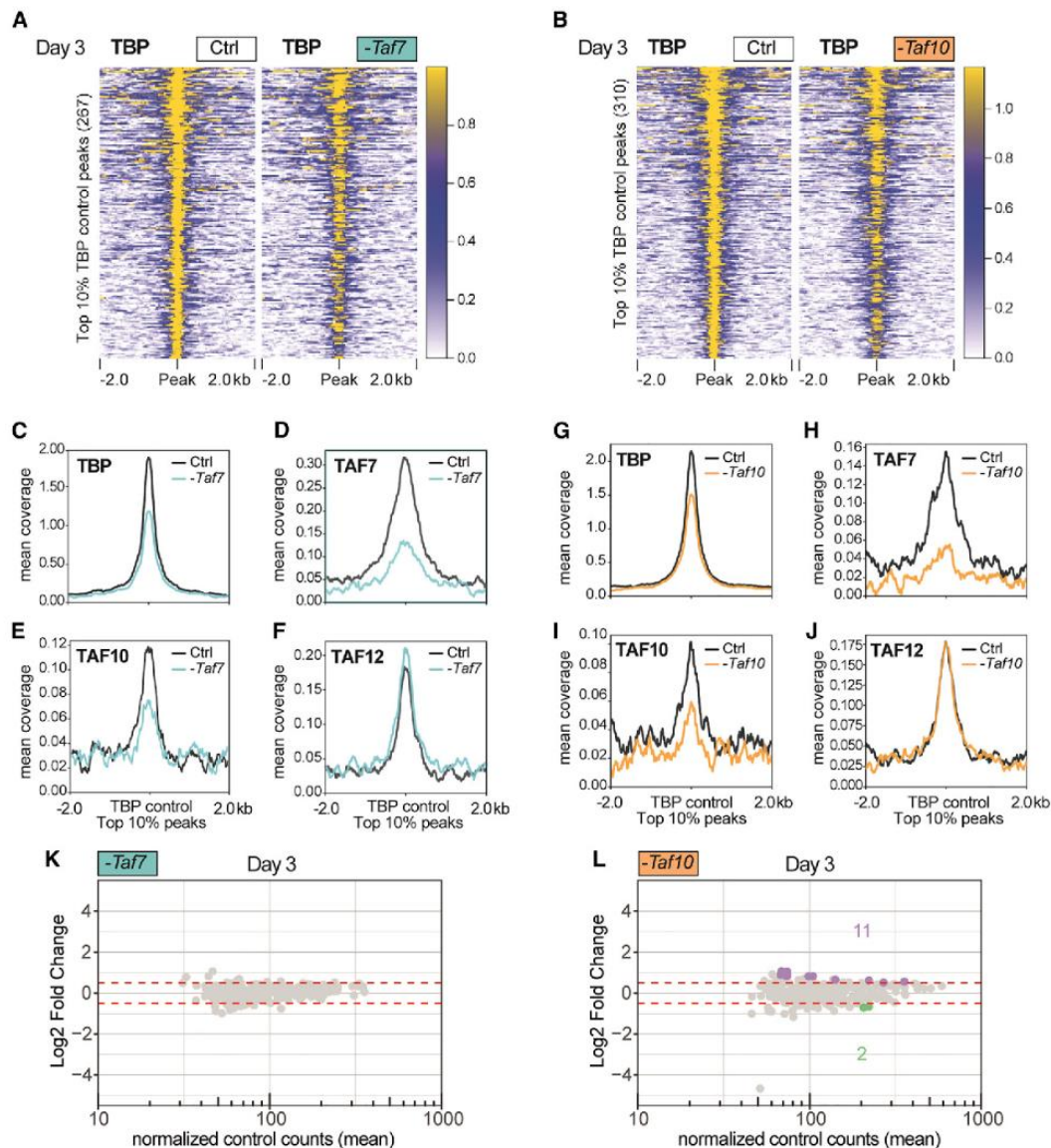


Figure 4. TBP is recruited at promoters in TAF7- or TAF10-depleted mESCs

(A and B) TBP distribution at the position of the top 10% (fold enrichment) anti-TBP CUT&RUN peaks (± 2 kb) detected in the control condition and in *RT7* control and TAF7-depleted (A) and *RT10* control and TAF10-depleted (B) mESCs at D3.

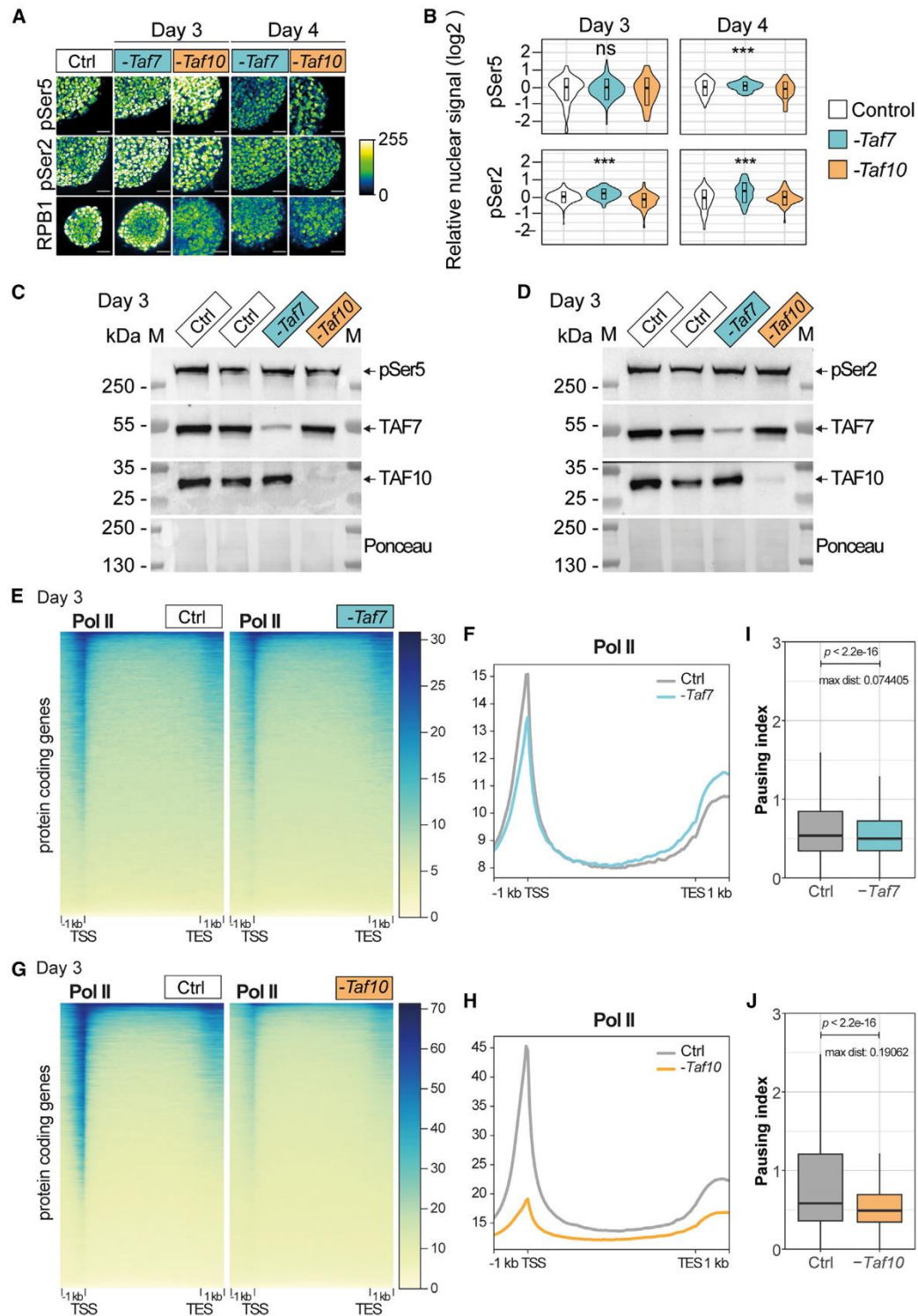
(C–J) Mean profiles of TBP (C and G), TAF7 (D and H), TAF10 (E and I), and TAF12 (F and J) protein accumulation at the TBP control peaks in control (black line) and TAF7-depleted (blue line) (C–F) and in control (black line) and TAF10-depleted (orange line) (G–J) mESCs.

(K and L) MA plots of differential peak analyses in TAF7-depleted (K) and TAF10-depleted (L) mESCs at D3, with the number of significantly down- (green) or upregulated (purple) TBP peaks (adjusted $p \leq 0.05$, $|\log_2$ fold change ≥ 0.5). No significant peaks were detected in the TAF7-depleted cells.

TAF7 or TAF10 depletion has a limited impact on nascent Pol II transcription

As global Pol II transcription is maintained in the TAF7- and TAF10-depleted mESCs, we investigated whether TAF7 or TAF10 depletion would specifically impact Pol II active transcription in mESCs by analysis of nascent RNA using 4-Thiouridine (4-sU) at day 3 (Figure 6A). As spikes, we added unlabeled yeast

as well as *Drosophila* S2 4-sU-labeled RNA. Only reads from 4-sU-labeling experiments could be mapped on the *Drosophila* and mouse genomes, while no reads could be mapped on the yeast genome, confirming the enrichment of newly synthesized RNAs (Figure 6B). Principal-component (PCA) analyses indicated that in both mESC lines, depleted and control condition samples were well separated (Figures 6C and 6D).



(legend on next page)

Differential expression analyses confirmed that TAF7 and TAF10 depletion is not accompanied by a global reduction in Pol II transcription, as only a small fraction of the nascent transcripts is affected (Figures 6E and 6F). In TAF7-depleted mESCs, 0.40% of transcripts were significantly downregulated versus 0.14% upregulated (Figure 6E), while in TAF10-depleted mESCs, 1.34% of transcripts were significantly downregulated versus 0.08% upregulated (Figure 6F) in the 4-OHT-treated compared to the control conditions, with a threshold of $-0.5 \log_2$ fold change and an adjusted p value of 0.05. While there is no obvious difference in the ratio of down- versus upregulated transcripts in TAF7-depleted mESCs, there are more downregulated transcripts in TAF10-depleted cells (Figures 6E and 6F), suggesting a more pronounced decrease in global transcription in these cells (Figure 6G), which could be explained by the more affected Pol II chromatin distribution observed in TAF10-depleted cells (Figures 5G and 5H). Comparison of the fold changes (Figure 6H) indicates that there is a correlation between the *RT7* and the *RT10* data (Pearson correlation coefficient: 0.519). However, there is only a partial overlap of commonly differentially regulated transcripts (Figure S6E), and overall, only GO categories related to translation were significantly enriched in mutant *RT10* cells (Figures S6F–S6H).

The intersection of our genomic data analyses suggested that when nascent transcription is not significantly affected by TAF7 or TAF10 depletion, the TBP peaks were not affected, as seen at different loci on UCSC genome browser snapshots (Figures 6I, 6J, S6I, and S6J). However, while Pol II chromatin distribution is not obviously affected in TAF7-depleted cells, it is severely affected in TAF10-depleted cells, with an important decrease at the TSS and only a slight reduction in the gene body (Figures 6I, S6I, and S6J). In contrast, in the case of the *Hes1* gene, which is significantly downregulated in TAF10-depleted mESCs (Figure 6J), Pol II was barely detectable, and TBP was evicted from the *Hes1* promoter, indicating that genes that are downregulated following TAF10 depletion seem to have lost TBP as well as Pol II recruitment and elongation. As the *Hes1* promoter contains a TATA box, we investigated whether TATA-like motifs were enriched in the promoters of downregulated transcripts in TAF10-depleted cells but could not detect a significant difference with non-affected promoters (Figure S6K).

In conclusion, our data indicate that Pol II global transcription is not seriously affected in conditions where holo-TFIID is depleted in either TAF7- or TAF10-depleted mESCs. As in our biochemical analyses of TFIID and TFIID-like complexes,

TAF10 depletion has a stronger effect than TAF7 depletion on the transcription of a subset of genes. This suggests that the TAF7-less TFIID complex allows efficient recruitment of Pol II on promoters and that the partial TAF assemblies detected in the TAF10-depleted cells, while also being globally sufficient to sustain Pol II transcription, but not pausing, fail to do so for a subset of genes.

Embryonic deletion of *Taf7* or *Taf10* induces different embryonic phenotypes with distinct severities

Our experiments indicate that Pol II transcription is not majorly affected at day 3 in steady-state conditions (Figures 5 and 6). However, at day 6, the mutant mESCs are affected, especially the TAF10-depleted cells (Figure 1), suggesting that, while no major defects are detected initially, Pol II transcription is actually affected on a longer term. To analyze the effect of the TAF7 and TAF10 depletion in a more dynamic and *in vivo* transcriptional context, we compared the conditional deletion of *Taf10* or *Taf7* using the *T-Cre* transgenic line, which is active in the early posterior mesoderm.³⁷ We had previously shown that depletion of TAF10 in the early mesoderm results in a growth arrest, while cyclic transcription in the pre-somitic mesoderm associated with somitogenesis is not initially affected.²³ The efficiency of TAF7 depletion was assessed by IF (Figures S7A and S7B). *Tg(T-Cre/+);Taf7^{fl/fl}* and *Tg(T-Cre/+);Taf10^{fl/fl}* mutant embryos (hereafter called *TCre;Taf7* and *TCre;Taf10*, respectively) are similar at E9.5 and display a similar reduction in the somite index (Figures 7A–7C and S7C). While no limb buds are present in *TCre;Taf10* mutant embryos,²³ *TCre;Taf7* embryos displayed forelimb buds, although smaller compared to the control (Figures 7A and 7B). At E10.5, both *TCre;Taf10* and *TCre;Taf7* mutant embryos display a growth arrest in the trunk and tail regions (Figures 7D–7F). After E10.5, more differences could be observed between the two mutants. First, enlarged pericardia are observed in all the *TCre;Taf7* mutant embryos (Figure 7E) suggesting that *Taf7* deletion leads to cardiovascular defects not observed in *TCre;Taf10* mutant or control embryos (Figures 7D and 7F). Second, while *TCre;Taf10* mutants could not be retrieved after E11.5 due to placenta and allantois degeneration,²³ *TCre;Taf7* mutant embryos are still detected at E12.5 (Figure 7H). Third, the presence of blood cells is obvious in the vasculature of controls and *TCre;Taf7* mutant embryos (Figures 7J and 7K), but not of *TCre;Taf10* mutant embryos (Figure 7L). Altogether, these data indicate that *Taf7* or *Taf10* conditional deletion in the same genetic context leads to similar growth arrest phenotypes, but different outcomes. *Taf10*

Figure 5. Depletion of holo-TFIID in the absence of TAF7 or TAF10 has only limited defects on Pol II global transcription

(A) Representative views of immunofluorescence using anti-RPB1, anti-RPB1^{pSer2}, and anti-RPB1^{pSer5} antibodies on *RT7* and *RT10* mESCs treated with 4-OHT (–*Taf7* or –*Taf10*) and with EtOH (Ctrl) at day (D) 3 and D4. Color scale: Green Fire Blue LUT. Scale bars: 50 μ m.
 (B) Quantification of RPB1^{pSer5} and RPB1^{pSer2} nuclear signal represented as violin plots. D3 and D4, $n = 1$ biological replicate. Kruskal-Wallis test: ns, not significant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.
 (C and D) Western blot analyses of TAF7, TAF10, and RPB1^{pSer5} (C) and RPB1^{pSer2} (D) expression in *RT7* and *RT10* mESCs treated with EtOH (Ctrl) and TAF7- (–*Taf7*) and TAF10- (–*Taf10*) depleted mESCs at D3. The Ponceau staining is displayed at the bottom. M, molecular weight marker.
 (E–H) Heatmaps (E and G) and mean profiles (F and H) of Pol II distribution on protein-coding genes (from -1 kb upstream of the TSS to $+1$ kb downstream of the TES) in *RT7* control (Ctrl) and TAF7-depleted (–*Taf7*) (E and F) and *RT10* control (Ctrl) and TAF10-depleted (–*Taf10*) (G and H) mESCs at D3. TSS, transcription start site; TES, transcription end site.
 (I and J) Pausing index calculated in *RT7* control (Ctrl) and TAF7-depleted (–*Taf7*) mESCs (I) and in *RT10* control (Ctrl) and TAF10-depleted (–*Taf10*) mESCs (J) at D3. Kolmogorov-Smirnov test. The p values and maximal distances (max dist) are indicated.

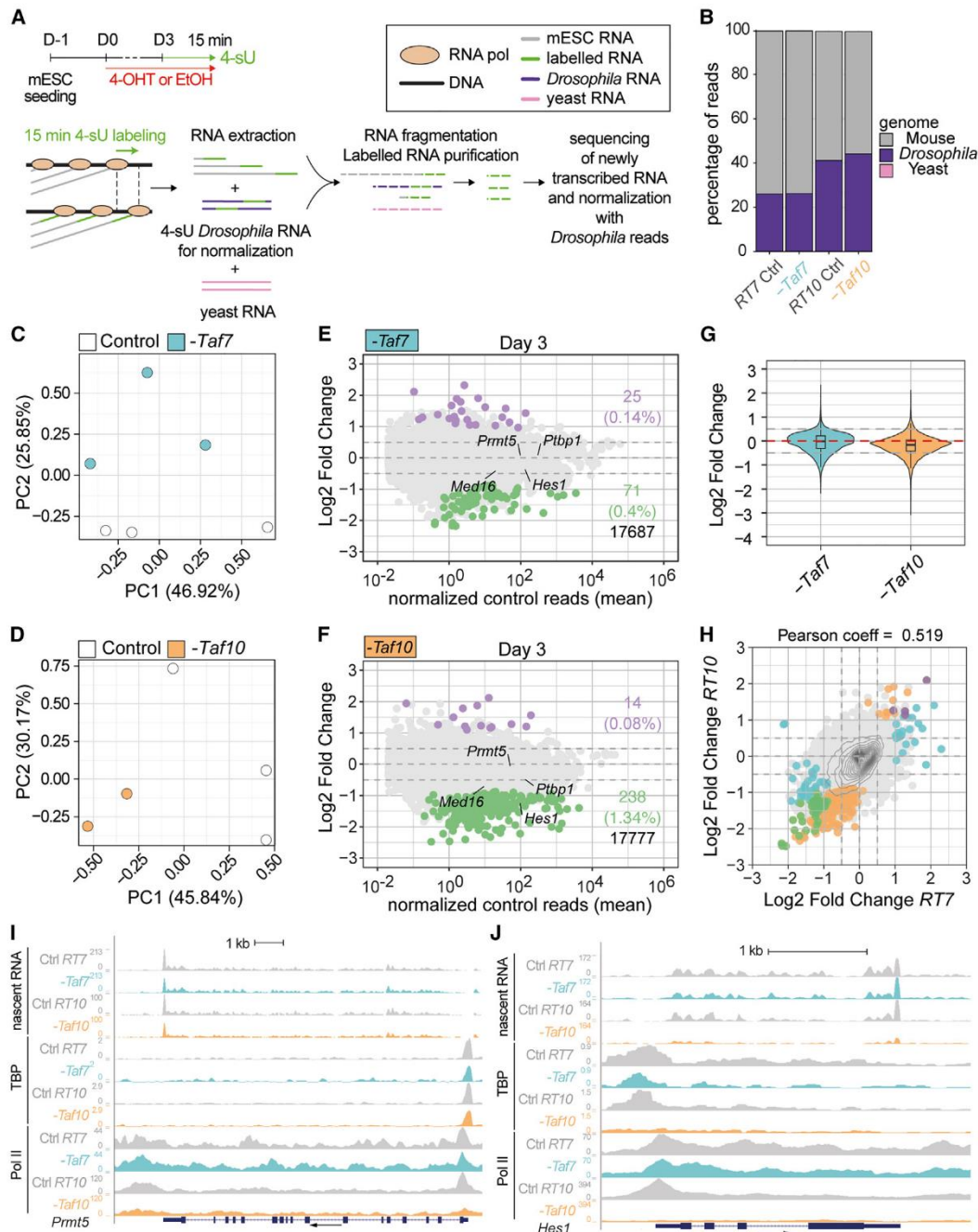


Figure 6. TAF7 loss has a milder impact on RNA Pol II gene transcription than TAF10 loss after 3 days of treatment

(A) Experimental strategy.

(B) Percentage of mouse (gray), *Drosophila* (purple), and yeast (pink) reads.

(C and D) Principal-component analysis (PCA) of RT7 (C) and RT10 (D) control (white dot) and mutant (colored dot) mESC nascent transcriptomes.

(E and F) MA plots of mutant versus control RT7 (E) and RT10 (F) mESCs, with the numbers and percentages of significantly down- (green) or upregulated (purple) protein-coding transcripts displayed on the right and total transcripts shown at the bottom (20 normalized reads per gene length in kilobases threshold, adjusted $p \leq 0.05$ (FDR-corrected Wald test) and $|\log_2$ fold change ≥ 1).

(G) Global log2 fold change comparisons in TAF7- and TAF10-depleted mESCs.

(legend continued on next page)

conditional deletion leads to a more severe phenotype associated with lack of forelimbs and red blood cells, while *Taf7* conditional deletion leads to a milder phenotype and is associated with cardiovascular defects. These data confirm the difference in phenotype severity observed in TAF7- versus TAF10-depleted mESCs and further support that TAF10 depletion has a stronger impact on TFIIID assembly compared to TAF7-depletion.

In conclusion, our *in vivo* results demonstrate that embryonic deletion of either *Taf7* or *Taf10* induces different phenotypes with distinct severities. Thus, while our *in vitro* data demonstrated that partial TFIIID modules are able to sustain nascent Pol II transcription in mESCs, these partial TFIIID assemblies cause embryonic lethality over time, as they do not support all active gene regulatory changes during development.

DISCUSSION

Different requirements for TAF7 and TAF10 during development

We observed a difference in phenotype severity between TAF7 and TAF10 depletion. TAF10 is important for mESC survival, as observed in *Taf10* mutant F9 cells and in the ICM of *Taf10*^{-/-} mutant blastocysts.^{25,38} In contrast, TAF7 is not essential for mESC survival, in agreement with the survival of *Taf7*^{-/-} blastocysts until hatching at E4.5.²⁶ Importantly, as TAF10 is also part of the transcriptional co-activator complex SAGA, we confirmed that the difference in phenotype in the *RT10* mESCs cells was not a consequence of a defect in SAGA assembly, and remarkably, we observed that TAF10 was required for the stability of SUPT7L, as it is for TAF8.^{9,23} It is tempting to speculate that TAF10 is also required for the stability of its other HFD partner in lobe A, TAF3. As a consequence, destabilization of TAF8 would lead to the loss of TAF2 from lobe B, and loss of TAF3 is predicted to impair integration of TAF11/TAF13 in lobe A, thus preventing TBP integration. The severity of this domino effect in the absence of TAF10 potentially explains the stronger phenotype observed in TAF10-depleted mESCs and *TCre;Taf10* embryos.

We interpret the increased severity in TAF10-depleted cells compared to TAF7-depleted cells to be from different impacts on holo-TFIIID assembly (see below). However, in the *Taf7* and *Taf10* conditional mutant embryos, we observed two striking phenotypes specific to each TAF: enlarged pericardium in the *TCre;Taf7* embryos and a lack of blood cells in the *TCre;Taf10* embryos. This suggests that TAF7 and TAF10 are associated with specific regulatory functions despite the fact that TAF7 and TAF10 are both subunits of holo-TFIIID. This might also suggest that TAF7-less TFIIID cannot regulate genes necessary for cardiovascular development, while red blood cell differentiation is more dependent on TAF10-regulated pathways, as supported by the direct TAF10/GATA1 interaction during erythropoiesis.³⁹ Importantly, the lack of TAF10 seriously affects both holo-TFIIID and holo-SAGA assemblies, but does not affect many gene reg-

ulatory pathways important for other developmental processes. This observation is in line with our finding that partial TFIIID complexes can still regulate Pol II gene expression from many developmental gene promoters.

Sequential assembly of holo-TFIIID

Assembly of holo-TFIIID is the result of the sequential incorporation of different TFIIID submodules on the TAF1 nascent scaffold.^{2,10–12} Our data support this model, as holo-TFIIID formation is arrested at different steps in our TAF7- or TAF10-depleted cells. Indeed, our IP-MS analyses indicate that in the absence of TAF7, a TAF7-less TFIIID complex containing TBP is formed, in agreement with TAF7 being the last subunit to be recruited on TAF1 during TFIIID assembly.¹⁰ In contrast, in TAF10-depleted cells, we could detect only the core-TFIIID complex. In normal conditions, the next step after core-TFIIID assembly is the recruitment of the 3-TAF module.^{2,11} In the absence of TAF10, as it is required for the stability of its HFD partners (this study, Kamenova et al.,⁹ and Bardot et al.²³), there is no 3-TAF complex formed. Altogether, our data confirm that *in vivo*, the holo-TFIIID complex is sequentially assembled from different building blocks.

Active Pol II transcription in TAF7- and TAF10-depleted mESCs

A striking observation from our study is that despite an obvious impact on TFIIID assembly, no major impact on nascent Pol II transcription could be observed. Conditional deletion of *Taf10* during somitogenesis did not impact the active transcription of cyclic genes associated with the formation of the somites.²³ In this precedent study, we showed a limited effect on the steady-state transcriptome, but we could not exclude a compensation of transcription initiation defects by a buffering of RNA decay.^{40,41} In the present study, we showed a lack of obvious impact on active transcription. Only a very limited proportion of expressed transcripts were significantly and differentially affected in TAF7- or TAF10-depleted cells after 3 days of treatment, when our IP-MS data showed that the assembly of TFIIID is impaired. Surprisingly, while no obvious difference could be observed in Pol II chromatin distribution in TAF7-depleted cells, the lack of TAF10 resulted in a massive decrease in Pol II recruitment at TSSs, with only a minor decrease in gene bodies. These data suggest that despite the limited effect of TAF10 depletion on active Pol II transcription in steady-state conditions, the Pol II transcription initiation process is nevertheless affected on all genes, as indicated by the slight global downregulation shift of log2 fold change distribution when TAF10 is depleted, correlating with the more severe phenotype observed in TAF10-depleted cells. We also showed that, while TAF7 or TAF10 depletion did not affect cell viability when passaged at day 2 of treatment, clonal growth was affected when the depleted cells were passaged at day 4 of treatment (Figures 1I and 1J). These data indicate that TAF7 and TAF10 depletion is

(H) Correlation plot of the log2 fold changes in TAF7- and TAF10-depleted mESCs. Significantly differentially regulated transcripts are highlighted as follows: only in TAF7-depleted cells (blue), only in TAF10-depleted cells (orange), and downregulated (green) or upregulated (purple) in both depleted mESCs.

(I) and (J) UCSC genome browser views of nascent RNA, TBP distribution, and Pol II at *Prmt5* (I) and *Hes1* (J) loci between control (Ctrl *RT7* and Ctrl *RT10*), TAF7-depleted (–*Taf7*), and TAF10-depleted (–*Taf10*) mESCs. The y axes indicate the genomic coverage, and arrows indicate direction of transcription.

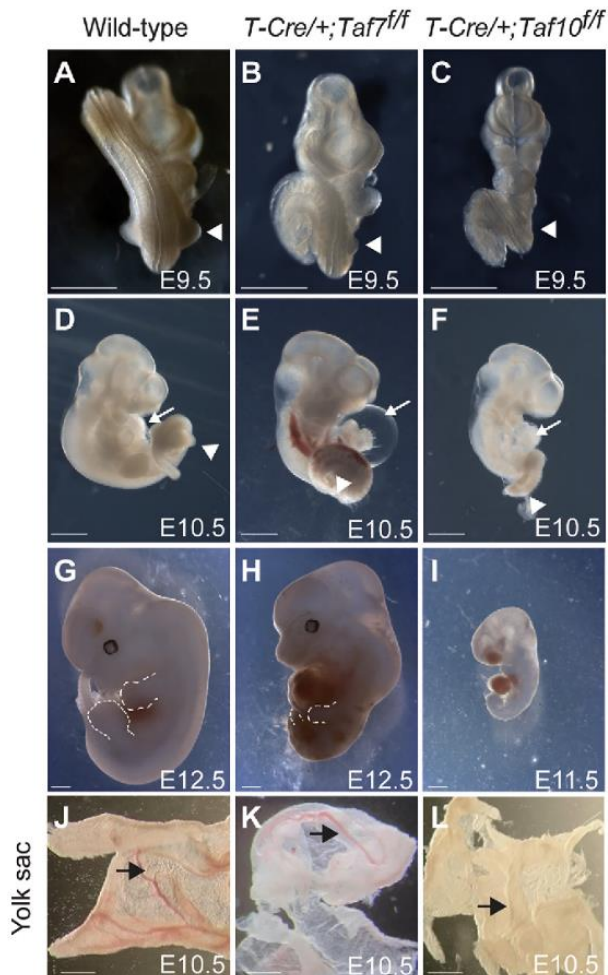


Figure 7. Conditional deletion of *Taf7* or *Taf10* in the early mesoderm results in similar yet different phenotypes

(A–I) Whole-mount views of wild-type (A, D, and G) and *Tg(T-Cre/+);Taf7^{fl/fl}* (B, E, and H) and *Tg(T-Cre/+);Taf10^{fl/fl}* (C, F, and I) mutant embryos at E9.5 (A–C, $n > 4$), E10.5 (D–F, $n > 4$), and E12.5 (G and H, $n > 2$). As no *Tg(T-Cre/+);Taf10^{fl/fl}* mutant embryos could be recovered at E12.5, an E11.5 *Tg(T-Cre/+);Taf10^{fl/fl}* mutant embryo is shown (I). White arrowheads, forelimbs (A–C) and hindlimbs (D–F); white arrows, heart (D–F); dashed lines, limb buds (G and H). (J–L) Whole-mount views of wild-type (J), *Tg(T-Cre/+);Taf7^{fl/fl}* (K), and *Tg(T-Cre/+);Taf10^{fl/fl}* (L) embryo yolk sacs ($n > 3$). Black arrows, blood vessels. Scale bars, 1 mm.

actually damaging for the mESCs but that during a window of time, the cells are able to compensate.

These surprising observations can be explained by several mutually non-exclusive hypotheses. A first hypothesis is that residual holo-TFIID complexes in TAF7- or TAF10-depleted cells are responsible for the maintenance of active transcription. Using our gel-filtration and IP-MS data, we estimated that at day 3, the holo-TFIID fraction remaining is 24.5% and 26% in TAF7- and TAF10-depleted cells, respectively. These numbers are actually overestimations, as they are indirect measurements;

however, they reflect the reality of the persistence of holo-TFIID already observed in E9.5 mouse *TCre;Taf10* embryos.²³ It is conceivable that chromatin-bound holo-TFIID has a longer half-life and is very difficult to destroy in the time frame of our studies. This would suggest that only a very minimal amount of holo-TFIID may be required to maintain active transcription in a steady-state situation. However, TBP has a short residence time at promoters of seconds,⁴² and as the mESCs are still dividing, especially in the TAF7-depleted cells, which are almost indistinguishable from the control *RT7* cells up to 6 days of treatment, remaining chromatin-bound TFIID complexes or TBP would be dislodged during DNA synthesis and diluted out in the cell population. Thus, this hypothesis cannot solely explain our observations.

A second hypothesis is that mESCs are not using a holo-TFIID complex. It has been proposed that human ESCs (hESCs) have a non-canonical TBP-containing TAF complex, as expression of several TAF proteins, including TAF7, but not TAF10, was not detected.⁴³ However, as shown in the same study and in our present data, this is not the case in mESCs. Differential requirements for TAF4, TAF8, and TAF12 have been reported, as *Taf4* deletion does not impact mESC growth, in contrast to *Taf8* conditional deletion and TAF12 depletion.^{19,44,45} Interestingly, depletion of TAF8 and TAF12 leads to a strong defect in holo-TFIID assembly.^{44,45} Our data are in favor of a TAF7-less TFIID complex almost as active as the holo-TFIID, as we did not observe major difference in the proportion in TAF proteins, except TAF7, in our IP-MS or in our CUT&RUN analyses. These data are in agreement with the observation that TAF7 is not required for mature T cell survival and differentiation and that in these conditions, an apparent TAF7-less TFIID was observed, although depletion efficiency of TAF7 was only about 50%.²⁶

A third hypothesis is that holo-TFIID is not required to maintain active transcription reinitiation, as proposed in Tatarakis et al.²⁹ During the very first round of Pol II transcription initiation, holo-TFIID would be required to create a scaffold, a PIC, that would allow some GTFs to remain at the promoter facilitating reinitiation and the recruitment of a new Pol II.^{46,47} Genes that have been already transcribed once would not necessarily require holo-TFIID, maybe only TBP and/or some partial TAF complexes, for the reinitiation of transcription. To further test this hypothesis, it would be interesting to differentiate our *RT7* and *RT10* mESCs to evaluate the impact of the depletion of TAF7 or TAF10 on the activation of a specific new gene expression program. It would be important to test differentiation in various cell types, as the loss of TAF10 has a differential effect depending on the cellular context.^{23,25,28,29}

Transcription initiation by partial TFIID complexes

Recent structural studies have proposed that holo-TFIID plays a major role in PIC assembly and deposition of TBP on core promoters.^{3,7,8} In this model, TBP acts as an anchor on the DNA, allowing the positioning of the PIC independent of the sequence of the core promoter.⁴⁸ Therefore, holo-TFIID and TBP appear central to the process of Pol II transcription initiation. However, evidence suggests that Pol II transcription initiation does not always require TBP or holo-TFIID. *In vitro* transcription initiation can be mediated by the TBP-free TAF complex (TFTC), a mixture of

SAGA and other TAF10-containing TAF complexes.^{49,50} The snRNA activating protein complex (SNAPC) recruits TBP on Pol II small nuclear (snRNA) coding genes.⁵¹ In *Drosophila*, a non-TFIID complex containing the TBP paralog TBPL1 controls *H1* and ribosomal protein-coding gene transcription initiation,^{52–55} and different PIC complexes not containing TBP and associated with different classes of promoters have also been described recently.⁵⁶ In the mouse, a complex containing the TBP paralog TBPL2, lacking TBP and TAF proteins, mediates transcription during oocyte growth.⁵⁷ More strikingly, transcription initiation independent of TBP and its paralogs has been described for a subset of genes during *Xenopus* development,⁵⁸ and two recent studies have shown that acute depletion of TBP has no major impact on Pol II transcription without compensation by a TBP paralog.^{59,60}

Our data are in favor of transcription initiation mediated by partially assembled TFIID complexes in the mESCs in steady-state conditions. On one hand, our data support the idea that the TAF7-less TFIID complex is able to mediate transcription initiation, at least up to a certain degree, as the TAF7-depleted mESCs are sensitive to late replating and the *TCre;Taf7* embryos display a phenotype. On the other hand, a partially assembled TFIID-like complex is present in TAF10-depleted cells, and while Pol II enrichment at the TSS is severely affected, the transcription activity of many genes is not majorly affected. It is not clear how the core-TFIID could mediate transcription initiation. It has been recently shown that the *in vitro*-assembled S-TAF complex promotes transcription initiation *in vitro*.¹³ However, the interaction of TBP with all the TAFs decreases in our anti-TBP IP-MS, suggesting that the S-TAF complex does not exist *in vivo* in TAF10-depleted cells. These data, in addition to TBP relocation to Pol III and Pol I machineries (Figures S3A and S3B), confirm the structural data indicating that the core-TFIID does not interact strongly with TBP.^{3,7,8,12,61,62} Moreover, it is not clear how the core-TFIID could be imported in the nucleus, as the nuclear localization signal (NLS) of TAF8, incorporated in the 8-TAF complex, is important for this import.^{2,11,32} Alternatively, the TAF1 nascent protein, which already interacts with TBP, could recruit the core-TFIID and be imported into the nucleus. As TAF1 interacts structurally with TAF6,^{8,10} such a complex could interact with DNA via TAF4 and TAF1, as well as TBP, as observed in the holo-TFIID/PIC structure.⁸ The apparent size of 670 kDa of the partial TFIID complex in our gel-filtration experiment supports the existence of such a complex. However, this interaction might be weak, as it could not be detected in our IP-MS experiments. This could be explained by the absence of TAF8, but also by the destabilization of TAF1 in TAF10-depleted cells (Figure 3H), suggesting that incomplete holo-TFIID assembly on TAF1 nascent protein leads to a destabilization of the latter.

In conclusion, our study supports the vision of a much more dynamic and flexible Pol II transcription initiation machinery. Interestingly, this flexibility has some impact on human physiopathology, as a growing number of mutations have been identified in *TAF1*, *TAF2*, *TAF4*, *TAF6*, *TAF8*, and *TAF13* genes in patients associated with neurodevelopmental defects and intellectual disabilities.^{44,63,64} Surprisingly, these mutations mainly affect the brain development and function but without any major effect on the other organs, clearly suggesting that

the transcription initiation machinery has a certain degree of adaptability but that the cellular context is a main constraint.

Limitations of the study

In our study, we tested the functional importance of TAF7 and TAF10 using an inducible *CRE/LoxP* approach. While the genomic deletion is very efficient and fast, this approach does not target the proteins that have already been translated. However, we evaluated the potential persistence of some TAF7 or TAF10 protein at different time points, by IF, WB, and IP-MS. Moreover, we analyzed the status of the TFIID complex to confirm the impact of the depletion of TAF7 or TAF10.

As our study is more long term compared to an acute depletion approach, we decided to perform our transcriptomic and genomic analyses at day 3, which corresponds to an efficient depletion of the targeted proteins and to a stage where no important cellular phenotype could be observed. However, as our cells were depleted of TAF7 or TAF10 for days, we cannot rule out any secondary effects, although, as we show, there were no major defects in transcription. This does not rule out the total absence of phenotype, as cells became affected in the longer term, but our study does not allow the analysis of the longer-term defects.

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Requests for further information and resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Stéphane D. Vincent (vincent@igbmc.fr).

Materials availability

Cell lines generated in this study are available upon request with MTA completion.

Data and code availability

- Nascent RNA sequencing, CUT&RUN, and ChIP-seq data have been deposited at GEO⁶⁵ GEO: GSE245196. The mass spectrometry proteomics data have been deposited with the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE⁶⁶ partner repository PRIDE: PXD046459. Raw data for the WB and cell counting experiments were deposited on Mendeley, Mendeley Data: <https://doi.org/10.17632/m66wgwv7sm.2>. All datasets are publicly available as of the date of publication and accession numbers are listed in the [key resources table](#).
- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this study is available from the [lead contact](#) (Stéphane D. Vincent, vincent@igbmc.fr) upon request.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all members of the Tora lab for protocols, thoughtful discussions, and suggestions; C. Ebel and M. Philipps for help with FACS sorting; S. Falcone, M. Gendron, and the IGBMC animal facility for animal caretaking; and the PluriCell East platform for cell culture services. We thank E. Compe for the anti-PSer2 and anti-PSer5 antibodies. This work was supported by funds from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE11-0003-02, ANR-19-CE12-0029-01, ANR-20-CE12-0017-03, and ANR-22-CE11-0013-01 to L.T.; ANR-23-CE12-0034 to S.D.V.), NIH MIRA (R35GM139564) and NSF (award no. 1933344) to L.T., and Fondation pour la Recherche Médicale (EQU-2021-03012631) to S.D.V. and L.T. This work, as part of the ITI 2021–2028 program of the University of Strasbourg, was also supported by IdEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002), SFRI-STRATUS project (ANR-20-SFRI-0012), and EUR

IMCBio (ANR-17-EURE-0023) under the framework of the French Investments for the Future Program. Sequencing was performed by the GenomEast Platform, a member of the France Génomique consortium (ANR-10-INBS-0009). V.H. was a recipient of a fellowship from the University of Strasbourg Doctoral School ED414.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.H., P.B., D.D., A.B., E.G.S., C.R., M.S., Y.H., C.E., and L.H.A. performed experiments. B.M. and L.N. performed the mass spectrometry analyses; M.J., S.L.G., V.H., Y.H., and S.D.V. performed the bioinformatic analyses; and V.H., L.T., and S.D.V. designed the experiments with the help of F.M. S.D.V. conceived and supervised the project and wrote the paper with support from F.M., V.H., and L.T.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- **KEY RESOURCES TABLE**
- **EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS**
 - Mice
 - Generation and maintenance of mESCs
- **METHOD DETAILS**
 - Collection of mouse embryos
 - Calculation of the somite index
 - Embryo sectioning and immunolocalization
 - Genotyping and screening
 - 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) treatment
 - mESC phenotypic analysis
 - Depletion analysis
 - TFIIID complex composition analysis
 - Transcription analysis
 - Cleavage under targets and release using nuclease (CUT&RUN) and library preparation
 - Pol II ChIP-seq
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**
 - Immunofluorescence and EdU signal quantification
 - IP-MS data analysis
 - Nascent 4-sU RNA sequencing data analysis
 - CUT&RUN data analysis
 - Pol II ChIP-seq data analysis

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114791>.

Received: January 9, 2024

Revised: July 9, 2024

Accepted: September 7, 2024

REFERENCES

1. Roeder, R.G. (2019). 50+ years of eukaryotic transcription: an expanding universe of factors and mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, 783–791. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0287-x>.
2. Bieniossek, C., Papai, G., Schaffitzel, C., Garzoni, F., Chaillet, M., Scheer, E., Papadopoulos, P., Tora, L., Schultz, P., and Berger, I. (2013). The archi-

ture of human general transcription factor TFIIID core complex. *Nature* 493, 699–702. <https://doi.org/10.1038/nature11791>.

3. Patel, A.B., Louder, R.K., Greber, B.J., Grünberg, S., Luo, J., Fang, J., Liu, Y., Ranish, J., Hahn, S., and Nogales, E. (2018). Structure of human TFIIID and mechanism of TBP loading onto promoter DNA. *Science* 362, eaau8872. <https://doi.org/10.1126/science.aau8872>.
4. Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S., and Tjian, R. (2000). Structure and Function of a Human TAFII250 Double Bromodomain Module. *Science* 288, 1422–1425. <https://doi.org/10.1126/science.288.5470.1422>.
5. Vermeulen, M., Mulder, K.W., Denissov, S., Pijnappel, W.W.M.P., van Schaik, F.M.A., Varier, R.A., Baltissen, M.P.A., Stunnenberg, H.G., Mann, M., and Timmers, H.T.M. (2007). Selective anchoring of TFIIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* 131, 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.016>.
6. Buratowski, S., Hahn, S., Sharp, P.A., and Guarente, L. (1988). Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system. *Nature* 334, 37–42. <https://doi.org/10.1038/334037a0>.
7. Louder, R.K., He, Y., López-Blanco, J.R., Fang, J., Chacón, P., and Nogales, E. (2016). Structure of promoter-bound TFIIID and model of human pre-initiation complex assembly. *Nature* 531, 604–609. <https://doi.org/10.1038/nature17394>.
8. Chen, X., Qi, Y., Wu, Z., Wang, X., Li, J., Zhao, D., Hou, H., Li, Y., Yu, Z., Liu, W., et al. (2021). Structural insights into preinitiation complex assembly on core promoters. *Science* 372, eaba8490. <https://doi.org/10.1126/science.aba8490>.
9. Kamenova, I., Mukherjee, P., Conic, S., Mueller, F., El-Saafin, F., Bardot, P., Garnier, J.-M., Dembélé, D., Capponi, S., Timmers, H.T.M., et al. (2019). Co-translational assembly of mammalian nuclear multisubunit complexes. *Nat. Commun.* 10, 1740. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09749-y>.
10. Bernardini, A., Mukherjee, P., Scheer, E., Kamenova, I., Antonova, S., Mendoza Sanchez, P.K., Yayli, G., Morlet, B., Timmers, H.T.M., and Tora, L. (2023). Hierarchical TAF1-dependent co-translational assembly of the basal transcription factor TFIIID. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 30, 1141–1152. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01026-3>.
11. Trowitzsch, S., Viola, C., Scheer, E., Conic, S., Chavant, V., Fournier, M., Papai, G., Ebong, I.-O., Schaffitzel, C., Zou, J., et al. (2015). Cytoplasmic TAF2-TAF8-TAF10 complex provides evidence for nuclear holo-TFIIID assembly from preformed submodules. *Nat. Commun.* 6, 6011. <https://doi.org/10.1038/ncomms7011>.
12. Gupta, K., Watson, A.A., Baptista, T., Scheer, E., Chambers, A.L., Koehler, C., Zou, J., Obong-Ebong, I., Kandiah, E., Temblador, A., et al. (2017). Architecture of TAF11/TAF13/TBP complex suggests novel regulation properties of general transcription factor TFIIID. *Elife* 6, e30395. <https://doi.org/10.7554/elife.30395>.
13. Fant, C.B., Levandowski, C.B., Gupta, K., Maas, Z.L., Moir, J., Rubin, J.D., Sawyer, A., Esbin, M.N., Rimel, J.K., Luyties, O., et al. (2020). TFIIID Enables RNA Polymerase II Promoter-Proximal Pausing. *Mol. Cell* 78, 785–793.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.008>.
14. Levine, M., Cattoglio, C., and Tjian, R. (2014). Looping back to leap forward: transcription enters a new era. *Cell* 157, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.009>.
15. Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P., and Tora, L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* 79, 107–117.
16. Kaufmann, J., Verrijzer, C.P., Shao, J., and Smale, S.T. (1996). CTF, an essential cofactor for TFIIID-dependent initiator function. *Gene Dev.* 10, 873–886. <https://doi.org/10.1101/gad.10.7.873>.
17. Martin, J., Halenbeck, R., and Kaufmann, J. (1999). Human Transcription Factor hTAFII150 (CTF150) Is Involved in Transcriptional Regulation of Cell Cycle Progression. *Mol. Cell Biol.* 19, 5548–5556. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.8.5548>.

18. Papai, G., Tripathi, M.K., Ruhlmann, C., Werten, S., Crucifix, C., Weil, P.A., and Schultz, P. (2009). Mapping the initiator binding Taf2 subunit in the structure of hydrated yeast TFIID. *Structure* (London, England : 1993) 17, 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.01.006>.
19. Langer, D., Martianov, I., Alpern, D., Rhinn, M., Keime, C., Dollé, P., Mengus, G., and Davidson, I. (2016). Essential role of the TFIID subunit TAF4 in murine embryogenesis and embryonic stem cell differentiation. *Nat. Commun.* 7, 11063–11116. <https://doi.org/10.1038/ncomms11063>.
20. Gura, M.A., Mikedis, M.M., Seymour, K.A., de Rooij, D.G., Page, D.C., and Freiman, R.N. (2020). Dynamic and regulated TAF gene expression during mouse embryonic germ cell development. *PLoS Genet.* 16, e1008515. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008515>.
21. Herrera, F.J., Yamaguchi, T., Roelink, H., and Tjian, R. (2014). Core promoter factor TAF9B regulates neuronal gene expression. *Elife* 3, e02559. <https://doi.org/10.7554/elife.02559>.
22. Liu, W.-L., Coleman, R.A., Grob, P., King, D.S., Florens, L., Washburn, M.P., Geles, K.G., Yang, J.L., Ramey, V., Nogales, E., and Tjian, R. (2008). Structural Changes in TAF4b-TFIID Correlate with Promoter Selectivity. *Mol. Cell* 29, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.003>.
23. Bardot, P., Vincent, S.D., Fournier, M., Hubaud, A., Joint, M., Tora, L., and Pourqu  , O. (2017). The TAF10-containing TFIID and SAGA transcriptional complexes are dispensable for early somitogenesis in the mouse embryo. *Development* 144, 3808–3818. <https://doi.org/10.1242/dev.146902>.
24. Voss, A.K., Thomas, T., Petrou, P., Anastasiadis, K., Sch  ler, H., and Gruss, P. (2000). Taube nuss is a novel gene essential for the survival of pluripotent cells of early mouse embryos. *Development* 127, 5449–5461. <https://doi.org/10.1242/dev.127.24.5449>.
25. Mohan, W.S., Scheer, E., Wendling, O., Metzger, D., and Tora, L. (2003). TAF10 (TAFII30) Is Necessary for TFIID Stability and Early Embryogenesis in Mice. *Mol. Cell Biol.* 23, 4307–4318. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.12.4307-4318.2003>.
26. Gegonne, A., Tai, X., Zhang, J., Wu, G., Zhu, J., Yoshimoto, A., Hanson, J., Cultraro, C., Chen, Q.-R., Guinter, T., et al. (2012). The General Transcription Factor TAF7 Is Essential for Embryonic Development but Not Essential for the Survival or Differentiation of Mature T Cells. *Mol. Cell Biol.* 32, 1984–1997. <https://doi.org/10.1128/mcb.06305-11>.
27. He, X.D., Phillips, S., Hioki, K., Majhi, P.D., Babbitt, C., Tremblay, K.D., Po-bezinsky, L.A., and Mager, J. (2024). TATA-binding associated factors have distinct roles during early mammalian development. *Dev. Biol.* 517, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2024.04.002>.
28. Indra, A.K., Mohan, W.S., Frontini, M., Scheer, E., Messaddeq, N., Metzger, D., and Tora, L. (2005). TAF10 is required for the establishment of skin barrier function in foetal, but not in adult mouse epidermis. *Dev. Biol.* 285, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.05.043>.
29. Tatarakis, A., Margaritis, T., Martinez-Jimenez, C.P., Kouskouti, A., Mohan, W.S., Haroniti, A., Kafetzopoulos, D., Tora, L., and Talianidis, I. (2008). Dominant and redundant functions of TFIID involved in the regulation of hepatic genes. *Mol. Cell* 31, 531–543. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.013>.
30. Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lin-tault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., and Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445, 661–665. <https://doi.org/10.1038/nature05541>.
31. Helmlinger, D., and Tora, L. (2017). Sharing the SAGA. *Trends Biochem. Sci.* 42, 850–861. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.09.001>.
32. Soutoglou, E., Dem  ny, M.A., Scheer, E., Fien-ga, G., Sassone-Corsi, P., and Tora, L. (2005). The nuclear import of TAF10 is regulated by one of its three histone fold domain-containing interaction partners. *Mol. Cell Biol.* 25, 4092–4104. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.10.4092-4104.2005>.
33. Fischer, V., Plassard, D., Ye, T., Reina-San-Martin, B., Stierle, M., Tora, L., and Devys, D. (2021). The related coactivator complexes SAGA and ATAC control embryonic stem cell self-renewal through acetyltransferase-inde-pendent mechanisms. *Cell Rep.* 36, 109598. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109598>.
34. Vannini, A., and Cramer, P. (2012). Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Mol. Cell* 45, 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.023>.
35. Gillotin, S. (2018). Isolation of Chromatin-bound Proteins from Subcellular Fractions for Biochemical Analysis. *Bio. Protoc.* 8, e3035. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3035>.
36. Harlen, K.M., and Churchman, L.S. (2017). The code and beyond: trans-cription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 263–273. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.10>.
37. Perantoni, A.O., Timofeeva, O., Naillat, F., Richman, C., Pajni-Underwood, S., Wilson, C., Vainio, S., Dove, L.F., and Lewandoski, M. (2005). Inactivation of FGF8 in early mesoderm reveals an essential role in kidney develop-ment. *Development* 132, 3859–3871. <https://doi.org/10.1242/dev.01945>.
38. Metzger, D., Scheer, E., Soldatov, A., and Tora, L. (1999). Mammalian TAF(II)30 is required for cell cycle progression and specific cellular differ-entiation programmes. *EMBO J.* 18, 4823–4834. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.17.4823>.
39. Papadopoulos, P., Gutiérrez, L., Demmers, J., Scheer, E., Pourfarzad, F., Papageorgiou, D.N., Karkoulia, E., Strouboulis, J., van de Werken, H.J.G., van der Linden, R., et al. (2015). TAF10 interacts with the GATA1 Tran-scription Factor and Controls Mouse Erythropoiesis. *Mol. Cell Biol.* 35, 2103–2118. <https://doi.org/10.1128/mcb.01370-14>.
40. Sun, M., Schwalb, B., Schulz, D., Pirkil, N., Etzold, S., Larivière, L., Maier, K.C., Seizl, M., Tresch, A., and Cramer, P. (2012). Comparative dynamic transcriptome analysis (cDTA) reveals mutual feedback between mRNA synthesis and degradation. *Genome Res.* 22, 1350–1359. <https://doi.org/10.1101/gr.130161.111>.
41. Timmers, H.T.M., and Tora, L. (2018). Transcript Buffering: A Balancing Act between mRNA Synthesis and mRNA Degradation. *Mol. Cell* 72, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.023>.
42. Patange, S., Ball, D.A., Wan, Y., Karpova, T.S., Girvan, M., Levens, D., and Larson, D.R. (2022). MYC amplifies gene expression through global changes in transcription factor dynamics. *Cell Rep.* 38, 110292. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110292>.
43. Maston, G.A., Zhu, L.J., Chamberlain, L., Lin, L., Fang, M., and Green, M.R. (2012). Non-canonical TAF complexes regulate active promoters in human embryonic stem cells. *Elife* 7, e00068. <https://doi.org/10.7554/elife.00068>.
44. El-Saafin, F., Curry, C., Ye, T., Garnier, J.-M., Kolb-Cheynel, I., Stierle, M., Downer, N.L., Dixon, M.P., Negroni, L., Berger, I., et al. (2018). Homozygous TAF8 mutation in a patient with intellectual disability results in unde-tectable TAF8 protein, but preserved RNA polymerase II transcription. *Hum. Mol. Genet.* 27, 2171–2186. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy126>.
45. Sun, F., Sun, T., Kronenberg, M., Tan, X., Huang, C., and Carey, M.F. (2021). The Pol II preinitiation complex (PIC) influences Mediator binding but not promoter-enhancer looping. *Gene Dev.* 35, 1175–1189. <https://doi.org/10.1101/gad.348471.121>.
46. Hawley, D.K., and Roeder, R.G. (1987). Functional steps in transcription initiation and reinitiation from the major late promoter in a HeLa nuclear extract. *J. Biol. Chem.* 262, 3452–3461. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)61372-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)61372-9).
47. Zawal, L., Kumar, K.P., and Reinberg, D. (1995). Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Gene Dev.* 9, 1479–1490. <https://doi.org/10.1101/gad.9.12.1479>.
48. Bernardini, A., Hollinger, C., Willgens, D., Müller, F., Devys, D., and Tora, L. (2023). Transcription factor IID parks and drives preinitiation complexes at sharp or broad promoters. *Trends Biochem. Sci.* 48, 839–848. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.07.009>.

49. Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X., and Tora, L. (1998). Function of TAFII-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 393, 187–191. <https://doi.org/10.1038/30283>.
50. Demény, M.A., Soutoglou, E., Nagy, Z., Scheer, E., Jánosvári, A., Richardot, M., Argenti, M., Kessler, P., and Tora, L. (2007). Identification of a Small TAF Complex and Its Role in the Assembly of TAF-Containing Complexes. *PLoS One* 2, e316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000316>.
51. Rengachari, S., Schilbach, S., Kaliyappan, T., Gouge, J., Zumer, K., Schwarz, J., Urlaub, H., Dienemann, C., Vannini, A., and Cramer, P. (2022). Structural basis of SNAPc-dependent snRNA transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 29, 1159–1169. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00857-w>.
52. Isogai, Y., Keleş, S., Prestel, M., Hochheimer, A., and Tjian, R. (2007). Transcription of histone gene cluster by differential core-promoter factors. *Genes Dev.* 21, 2936–2949. <https://doi.org/10.1101/gad.1608807>.
53. Parry, T.J., Theisen, J.W.M., Hsu, J.-Y., Wang, Y.-L., Corcoran, D.L., Eustice, M., Ohler, U., and Kadonaga, J.T. (2010). The TCT motif, a key component of an RNA polymerase II transcription system for the translational machinery. *Genes Dev.* 24, 2013–2018. <https://doi.org/10.1101/gad.1951110>.
54. Wang, Y.L., Duttke, S.H.C., Chen, K., Johnston, J., Kassavetis, G.A., Zeitlinger, J., and Kadonaga, J.T. (2014). TRF2, but not TBP, mediates the transcription of ribosomal protein genes. *Genes Dev.* 28, 1550–1555. <https://doi.org/10.1101/gad.245662.114>.
55. Baumann, D.G., and Gilmour, D.S. (2017). A sequence-specific core promoter-binding transcription factor recruits TRF2 to coordinately transcribe ribosomal protein genes. *Nucleic Acids Res.* 45, 10481–10491. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx676>.
56. Serebreni, L., Pleyer, L.M., Haberle, V., Hendy, O., Vlasova, A., Loubiere, V., Nemčko, F., Bergauer, K., Roitinger, E., Mechtler, K., and Stark, A. (2023). Functionally distinct promoter classes initiate transcription via different mechanisms reflected in focused versus dispersed initiation patterns. *EMBO J.* 42, e113519. <https://doi.org/10.15252/embj.2023113519>.
57. Yu, C., Cvetic, N., Hisler, V., Gupta, K., Ye, T., Gazdag, E., Negroni, L., Hajkova, P., Berger, I., Lenhard, B., et al. (2020). TBPL2/TFIIA complex establishes the maternal transcriptome through oocyte-specific promoter usage. *Nat. Commun.* 11, 6439. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20239-4>.
58. Gazdag, E., Jacobi, U.G., van Kruijsbergen, I., Weeks, D.L., and Veenstra, G.J.C. (2016). Activation of a T-box-Otx2-Gsc gene network independent of TBP and TBP-related factors. *Development (Cambridge, England)* 143, 1340–1350. <https://doi.org/10.1242/dev.127936>.
59. Santana, J.F., Collins, G.S., Parida, M., Luse, D.S., and Price, D.H. (2022). Differential dependencies of human RNA polymerase II promoters on TBP, TAF1, TFIIB and XPB. *Nucleic Acids Res.* 50, 9127–9148. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac678>.
60. Kwan, J.Z.J., Nguyen, T.F., Uzozie, A.C., Budzynski, M.A., Cui, J., Lee, J.M.C., Van Petegem, F., Lange, P.F., and Teves, S.S. (2023). RNA Polymerase II transcription independent of TBP in murine embryonic stem cells. *Elife* 12, e83810. <https://doi.org/10.7554/elife.83810>.
61. Kokubo, T., Yamashita, S., Horikoshi, M., Roeder, R.G., and Nakatani, Y. (1994). Interaction between the N-terminal domain of the 230-kDa subunit and the TATA box-binding subunit of TFIID negatively regulates TATA-box binding. *Proc National Acad Sci* 91, 3520–3524. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3520>.
62. Anandapadamanaban, M., Andresen, C., Helander, S., Ohshima, Y., Siponen, M.J., Lundström, P., Kokubo, T., Ikura, M., Moche, M., and Sunnerhagen, M. (2013). High-resolution structure of TBP with TAF1 reveals anchoring patterns in transcriptional regulation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1008–1014. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2611>.
63. Wong, K.M., Jepsen, W.M., Efthymiou, S., Salpietro, V., Sanchez-Castillo, M., Yip, J., Kriouile, Y., Diegmann, S., Dreha-Kulaczewski, S., Altmüller, J., et al. (2022). Mutations in TAF8 cause a neurodegenerative disorder. *Brain* 145, 3022–3034. <https://doi.org/10.1093/brain/awac154>.
64. Janssen, B.D.E., van den Boogaard, M.J.H., Lichtenbelt, K., Seaby, E.G., Stals, K., Ellard, S., Newbury-Ecob, R., Dixit, A., Roht, L., Pajusalu, S., et al. (2022). De novo putative loss-of-function variants in TAF4 are associated with a neuro-developmental disorder. *Hum. Mutat.* 43, 1844–1851. <https://doi.org/10.1002/humu.24444>.
65. Edgar, R., Domrachev, M., and Lash, A.E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 30, 207–210. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.207>.
66. Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Linares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D.J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., et al. (2019). The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* 47, D442–D450. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1106>.
67. Martianov, I., Velt, A., Davidson, G., Choukralah, M.-A., and Davidson, I. (2016). TRF2 is recruited to the pre-initiation complex as a testis-specific subunit of TFIIA/ALF to promote haploid cell gene expression. *Sci. Rep.* 6, 32069. <https://doi.org/10.1038/srep32069>.
68. Brou, C., Chaudhary, S., Davidson, I., Lutz, Y., Wu, J., Egly, J.M., Tora, L., and Chambon, P. (1993). Distinct TFIID complexes mediate the effect of different transcriptional activators. *EMBO J.* 12, 489–499. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05681.x>.
69. Dubois, M.-F., Vincent, M., Vigneron, M., Adamczewski, J., Egly, J.-M., and Bensaude, O. (1997). Heat-shock inactivation of the TFIID-associated kinase and change in the phosphorylation sites on the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res.* 25, 694–700. <https://doi.org/10.1093/nar/25.4.694>.
70. Gyenis, Á., Umlauf, D., Újfaludi, Z., Boros, I., Ye, T., and Tora, L. (2014). UVB Induces a Genome-Wide Acting Negative Regulatory Mechanism That Operates at the Level of Transcription Initiation in Human Cells. *PLoS Genet.* 10, e1004483. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004483>.
71. Chapman, R.D., Heidemann, M., Albert, T.K., Mailhammer, R., Flatley, A., Meisterernst, M., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). Transcribing RNA Polymerase II Is Phosphorylated at CTD Residue Serine-7. *Science* 318, 1780–1782. <https://doi.org/10.1126/science.1145977>.
72. Nagy, Z., Riss, A., Fujiyama, S., Krebs, A., Orpinell, M., Jansen, P., Cohen, A., Stunnenberg, H.G., Kato, S., and Tora, L. (2010). The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 611–628. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0199-8>.
73. Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
74. Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* 17, 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
75. Ramírez, F., Ryan, D.P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A.S., Heyne, S., Dündar, F., and Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, W160–W165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw257>.
76. Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
77. Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
78. Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., Cheng, J.X., Murre, C., Singh, H., and Glass, C.K. (2010). Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol. Cell* 38, 576–589. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.004>.

79. Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>.
80. Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., and Liu, X.S. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* 9, R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>.
81. Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
82. Meers, M.P., Bryson, T., and Henikoff, S. (2019). A streamlined protocol and analysis pipeline for CUT&RUN chromatin profiling. Preprint at bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/569129>.
83. Smith, R., and Tostengard, A.R. (2020). Quantitative Evaluation of Ion Chromatogram Extraction Algorithms. *J. Proteome Res.* 19, 1953–1964. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00768>.
84. Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11, R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>.
85. Quinlan, A.R., and Hall, I.M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26, 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>.
86. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
87. Amemiya, H.M., Kundaje, A., and Boyle, A.P. (2019). The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic Regions of the Genome. *Sci. Rep.* 9, 9354. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45839-z>.
88. Durinck, S., Moreau, Y., Kasprzyk, A., Davis, S., De Moor, B., Brazma, A., and Huber, W. (2005). BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis. *Bioinformatics* 21, 3439–3440. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti525>.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
rabbit polyclonal anti-TAF1 (WB, IP)	Abcam	Cat# ab264327
mouse monoclonal anti-TAF4 (WB)	in house	32TA-2B9; Mohan et al. ²⁵
mouse monoclonal anti-TAF5 (WB)	in house	1TA-1C2; Jacq et al. ¹⁵
mouse monoclonal anti-TAF6 (WB)	in house	25TA-2G7; Langer et al. ¹⁹
abbit polyclonal anti-TAF7 (WB, IF)	in house	19TA-2C7; Langer et al. ¹⁹
rabbit polyclonal anti-TAF7 (WB, IF, CUT&RUN)	in house	3407; Bardot & Vincent et al. ²³
mouse monoclonal anti-TAF7L (WB)	in house	46TA-2D5; Martianov et al. ⁶⁷
mouse monoclonal anti-TAF8 (WB)	in house	3478; Bardot & Vincent et al. ²³
mouse monoclonal anti-TAF10 (WB, IF, CUT&RUN)	in house	6TA-2B11; Mohan et al. ²⁵
mouse monoclonal anti-TAF12 (WB, IP, CUT&RUN)	in house	22TA-2A1; Langer et al. ¹⁹
mouse monoclonal anti-TBP (WB, IP)	in house	3TF1-3G3; Brou et al. ⁶⁸
rabbit polyclonal anti-TBP (CUT&RUN)	Abcam	Cat# ab2817
mouse monoclonal anti-SUPT7L (WB)	Bethyl laboratories	Cat# A302-803A
mouse monoclonal anti-RPB1(CTD) (WB)	in house	1PB-7C2; Dubois et al. ⁶⁹
mouse monoclonal anti-RPB1(CTD) (ChIP-seq)	in house	CTD-7G5; Gyenis et al. ⁷⁰
rat monoclonal anti-RPB1pSer5 (IF, WB)	GmbH antibody service	CTD4-3E8; Chapman et al. ⁷¹
rat monoclonal anti-RPB1pSer2 (IF, WB)	GmbH antibody service	CTD4-3E10; Chapman et al. ⁷¹
mouse monoclonal anti-GST (IP)	in house	15TF2-1D10; Nagy et al. ⁷²
Alexa Fluor® 488-labelled goat anti-rabbit IgG	Life Technologies	Cat# A-11008; RRID: AB_143165
Alexa Fluor® 546-labelled goat anti-mouse IgG	Life Technologies	Cat# A-11003; RRID: AB_2534071
Alexa Fluor® 488-labelled goat anti-rat IgG	Life Technologies	Cat# A-11006; RRID: AB_2534074
Peroxydase AffiniPure™ goat anti-rabbit IgG(H+L)	Jackson ImmunoResearch	Cat# 111-035-144; RRID: AB_2307391
Peroxydase AffiniPure™ F(ab') ₂ Fragment goat anti-mouse IgG, Fc _γ fragment specific	Jackson ImmunoResearch	Cat# 111-036-071; RRID: AB_2338524
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Molecular Probes	Cat# D1306
4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)	Sigma Aldrich	Cat# H7904
4-Thiouridine (4-sU)	Glentham Life Science	Cat# GN6085
5-Ethynyl Uridine (5-EU)	Thermo Fisher Scientific	Cat# E13045
BlueTrypan Staining 0.4%	Invitrogen T10288	Cat# T10288
CHIR99021	Axon Medchem	Cat# 1386
Crystal Violet	Sigma Aldrich	Cat# C3886-25G
Complete Protease Inhibitor Cocktail (cComplete), EDTA free	Roche	Cat# 11873580001
EZ-link™ HPDP-Biotin	Thermo Fisher Scientific	Cat# 21341
Leukemia inhibitory factor (LIF)	in house	N/A
Protein G Sepharose	GE healthcare	Cat# 17-0618-05
Dynabeads™ Protein G	Invitrogen	Cat# 10003D
Random hexamer primer	Thermo Fisher Scientific	Cat# SO142
RNasin	Promega	Cat# N2111
RiboPure – Yeast Kit	Invitrogen	Cat# AM1926
TRI® Reagent (Trizol)	Molecular Research Center Inc.	Cat# TR188
VECTASHIELD® Mounting Media without DAPI	VectorLabs	Cat# H-1000

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Critical commercial assays		
AMPure XP beads	Beckman-Coulter	Cat# A63882
Click-it RNA Imaging Kits	Invitrogen	Cat# C10329
EdU Staining Proliferation kit	Abcam	Cat# ac222421
LightCycler® 480 SYBR® Green 2x PCR Master Mix I	Roche	Cat# 4887352001
MicroPlex library preparation kit v3	Diagenode	Cat# C05010001
NucleoSpin RNA XS, RNA extraction kit	Machery-Nagel	Cat# 740902.50
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific	Cat# 32109
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen	Cat# 205311
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad	Cat# 5000006
RiboPure – Yeast Kit	Invitrogen	Cat# AM1926
SPRIselect beads	Beckman-Coulter	Cat# B23319
SuperScript IV Reverse Transcriptase	Invitrogen	Cat# 18090050
TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit with Ribo-Zero Gold	Illumina	Cat# RS-122-2301
μMACS Streptavidin Kit	Miltenyi Biotec	Cat# 130-074-101
Deposited data		
Mass-spectrometry proteomics TFIID complex anti-TAF12 IPs from control and TAF7 or TAF10 depleted mESCs	This study	PRIDE: PXD046459
Mass-spectrometry proteomics TFIID complex anti-TBP IPs from control and TAF7 or TAF10 depleted mESCs	This study	PRIDE: PXD046459
Nascent transcriptomic data from control and TAF7 or TAF10 depleted mESCs	This study	GEO: GSE245196
CUT&RUN from control and TAF7 or TAF10 depleted mESCs	This study	GEO: GSE245196
Anti-Pol II ChIP-seq from control and TAF7 or TAF10 depleted mESCs	This study	GEO: GSE245196
Western blots and cell counting raw data	This study	Mendeley Data: https://doi.org/10.17632/m66wgwv7sm.2
Experimental models: Cell lines		
R26 ^{CreERT2/+} ;Taf7 ^{fl/fl} mouse ES cells	This study	N/A
R26 ^{CreERT2/+} ;Taf10 ^{fl/fl} mouse ES cells	Bardot & Vincent et al. ²³	N/A
R26 ^{CreERT2/+} ;Taf7 ^{fl/fl} ;Sup71 ^{-/-} mouse ES cells	This study	N/A
E14tg2a.4 mouse ES cells	BayGenomics	N/A
CD1 WT mouse fibroblasts	IGBMC PluriCell East platform	N/A
S2 Drosophila cells	IGBMC PluriCell East platform	N/A
Experimental models: Organisms/strains		
Tg(T-Cre)	Perantoni et al. ³⁷	N/A
R26 ^{CreERT2}	Ventura et al. ³⁰	MGI: 3699244
Taf10 ^{fl}	Mohan et al. ²⁵	MGI: 3606185
Taf7 ^{fl}	Gegone et al. ²⁶	MGI: 5430373
Tg(T-Cre/+);Taf7 ^{fl/fl}	This study	N/A
Tg(T-Cre/+);Taf10 ^{fl/fl}	Bardot & Vincent et al. ²³	N/A
Oligonucleotides		
For sgRNA sequences, see Table S1	This study	N/A
For primer sequences, see Table S2	This study	N/A

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Software and algorithms		
Adobe Illustrator 28.5	Adobe	https://www.adobe.com
Bowtie2	Langemead et al. ⁷³	http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml
Cutadapt	Martin et al. ⁷⁴	https://cutadapt.readthedocs.io/en/v1.10/
deepTools	Ramirez et al. ⁷⁵	https://github.com/deeptools/deepTools
DESeq2	Love et al. ⁷⁶	https://bioconductor.org/packages/
ImageJ	Schneider et al. ⁷⁷	https://imagej.net/software/imagej/
Image Lab Software	Bio Rad	https://www.bio-rad.com/fr-fr/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z
Homer	Heinz et al. ⁷⁸	http://homer.ucsd.edu/homer/
htseq-count	Anders et al. ⁷⁹	https://htseq.readthedocs.io/en/master/
MACS2	Zhang et al. ⁸⁰	https://hbbctraining.github.io/
Proteome Discoverer 2.2	Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-software/multi-omics-data-analysis/proteome-discoverer-software.html
R	R-project	https://CRAN.R-project.org/
RStudio	RStudio	https://www.rstudio.com/categories/rstudio-ide/
STAR	Dobin et al. ⁸¹	https://github.com/alexdobin/STAR

EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS

Mice

Animal experimentation was carried out according to animal welfare regulation and guidelines of the French Ministry of Agriculture and Ministry of Higher Education, Research, and Innovation. The original mouse lines (*Taf7^{fl}*, *Taf10^{fl}*, *R26^{CreERT2}*, *Tg(T-Cre)*) have already been described^{25,26,30,37}. Adult mice (8-weeks old) were bred to produce E9.5 to E12.5 embryos. The sex of the embryos was not determined.

Generation and maintenance of mESCs

E3.5 blastocysts were collected from *R26^{CreERT2/+};Taf7^{fl/fl} X Taf7^{fl/fl}* or *R26^{CreERT2/+};Taf10^{fl/fl} X Taf10^{fl/fl}* mating. Uteruses were collected, embryos were flushed out with M2 medium (37°C) and placed in 96 well plates coated with mouse embryonic fibroblast (MEF) feeders in 2i+LIF medium (DMEM medium supplemented with 15% fetal calf serum ES-tested, 2 mM L-glutamine, 0.1% β-mercaptoethanol, 100 UI/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin, 0.1 mM non-essential amino acids, 100 μL/50 mL of leukemia inhibitory factor (LIF), 3 μM CHIR99021 and 1 mM PD0325901) at 37°C under 5% CO₂. For initial amplification, mESCs were maintained on feeders until frozen in DMEM medium supplemented with 30% fetal calf serum and 20% DMSO. For experiment, mESCs were grown on gelatin. All the clones established were mycoplasma-free and were used for experiments before passage 35.

R26^{CreERT2/+};Taf7^{fl/fl};Supt7^{1/-} mESCs were generated from the clone RT7#13. These cells were transfected at 70% confluence with plasmid constructs containing *Cas9-EGFP* and gRNA (Table S1) using Lipofectamine 2000 kit. Two days after, single EGFP⁺ cells were isolated in 96 well plates using the BD FACS Aria TM II (BD Biosciences), amplified and frozen.

Mouse ES E14 cells (BayGenomics) were cultured on plates coated with 0.1% gelatine solution in 1x PBS (Dutcher, Cat# P06-20410) using DMEM medium supplemented with 15% foetal calf serum ES-tested (Thermo Fisher Scientific, Cat# 10270-106), 2 mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific, Cat# 25030-024), 0.1% β-mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific, Cat#31350-010), 100 UI/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Cat# 15140-122), 0.1 mM non-essential amino acids (Thermo Fisher Scientific, Cat# 11140-035) and 1,500 U/mL home made LIF, 3 μM CHIR99021 (axon medchem, Cat# 1386) and 1 μM PD0325901 (axon medchem, Cat#1408). Cells were grown at 37°C with 5% CO₂ levels. Cells were passaged every second day.

Drosophila melanogaster Schneider S2 cells were grown in Schneider's *Drosophila* Medium (Invitrogen Cat#21720-24) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma Amdrich Cat# F7524), 50 UI/mL penicillin and 50 μg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Cat# 15140-122) at 22°C in normal air conditions.

METHOD DETAILS

Collection of mouse embryos

Embryos were collected in PBS, fixed in 4% PFA/PBS for 1 hour at 4°C under agitation and rinsed three times in PBS. The embryos were imaged using a Leica MZ16 macroscope coupled to a CoolSnap-Pro color camera (RS Photometrics).

Calculation of the somite index

Somite index was calculated by subtracting the mean of the somite number of a litter from the somite number of each littermate.

Embryo sectioning and immunolocalization

Fixed embryos were equilibrated in 30% sucrose/PBS (3 h, 4°C), embedded in Cryomatrix (Thermo Fischer) and stored at -80°C. Fifteen micrometers-sections were cut on a Leica cryostat.

Sections were rehydrated in PBS, permeabilized in 0.5% Triton X-100/PBS (Sigma-Aldrich) for 40 min at RT (room temperature), blocked in AB buffer (3% Bovine Serum Albumin (BSA), 1% goat serum, 0.1% Tween 20 in PBS) for 40 min at RT and rewashed in 0.1% Triton X-100/PBS. Primary antibodies listed in [key resources table](#) were diluted 1/1000 in AB buffer and incubated overnight at 4°C. Sections were then washed three times in 0.1% Triton X-100/PBS for 40 min each. Secondary antibody ([key resources table](#)) was diluted 1/1000 in 1 µg/mL DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)/AB buffer and incubated for 1 h at RT. The sections were then washed in 0.1% Triton X-100/PBS several times. The slides were mounted in Vectashield® and imaged with a TCS SP5 (Leica) laser-scanning microscope (20x Plan APO objective). The pictures are shown with the LUT “Green Fire Blue” scale.

Genotyping and screening

Mouse tail tips were digested in 300 µL of 200 µg/mL of proteinase K in tail digestion buffer (10 mM Tris pH 7, 200 mM NaCl, 5 µM EDTA, 0.2% SDS). Embryonic yolk sacs and mESCs were digested in 100 µL of 200 µg/mL of proteinase K in 1X PCR buffer. 0.6 µL of lysate was used in 25 µL of PCR reaction with Taq DNA polymerase kit. Primers are listed in [Table S2](#).

4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) treatment

5x10⁴ or 8x10⁵ cells were seeded in 6 well plates or in one P100 petri dish, respectively, at day -1 (D-1). At D0, cells were treated with 100 nM of 4-OHT in a final volume of 2 mL or 12 mL, respectively. Control cells were treated with ethanol (0.1% EtOH final) in the same final volume. The experiments were performed at D2, D4 or D6. The 6 well plates were used for phenotypic analyses, and the P100 petri dishes for proteomic and transcriptomic analyses.

mESC phenotypic analysis

Cell counting

Trypsinized cells were resuspended in a dozen to hundreds of µL of PBS according to the size of the cell pellet. Cells were stained with Trypan Blue and counted on a Countess II Automated Cell Counter (Thermo Fischer Scientific). Different clones were used: *RT7*: 5 clones (#5, #7, #8, #13, #15), *RT10*: 5 clones (#3, #6, #9, #15, #41), *RT7*; *Supt7l*^{-/-}: 3 clones (#45, #71, #72).

Apoptosis assay

Dead floating and attached cells were collected and stained with the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit and counterstained with propidium iodide PI (Thermo Fischer Scientific) and analyzed using BD FACS Celesta (BD Bioscience). A minimum of 10,000 events were recorded. Different independent clones were used: *RT7*: 4 clones (#5, #7, #8, #13), *RT10*: 6 clones (#3, #6, #9, #15, #19, #41), *RT7*; *Supt7l*^{-/-}: 3 clones (#3, #71, #72).

Measuring of surface area of colonies

Cells were rinsed with PBS, fixed with 4% PFA for 30 min at 4°C, washed with PBS, stained for 30 min with 0.1% crystal violet dye and rewashed with PBS. Pictures were taken with a macroscope M420 (Leica) coupled with a CoolSNAP camera (RS Photometrics). Different independent clones were used: *RT7*: 2 clones (#5, #13), *RT10*: 3 clones (#3, #6, #9).

Cell cycle analysis by EdU

Cells were plated on gelatinized round glass slides. They were incubated with 10 µM of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, Thermo Fischer Scientific) for 3 h and then fixed with 4% PFA for 15 min at RT. They were then stained with the EdU Staining Proliferation Kit (Abcam, Cat# ab222421). Slides were mounted, cells were imaged with a TCS SP5 (Leica) laser-scanning microscope (20x Plan APO objective).

Depletion analysis

Whole cell extract

Cells were pelleted, rinsed, resuspended in one equivalent volume of WCE buffer (50 mM Tris HCl pH7.9, 25% Glycerol, 0.2mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 600 mM KCl, 0.5% NP40, 1 mM DTT, 1X cOmplete) and incubated for 30 min on ice. Then, 3 volumes of IP0 (25mM Tris HCl pH7.9, 5% Glycerol, 0.1% NP40, 1 mM DTT, 1X PIC) were added and incubated for 30 min on ice. Proteins presented in the supernatant were recovered after high-speed centrifugation.

Cytoplasmic, nuclear, chromatin extract

This method was previously published in³⁵. One volume of cell pellet is lysed in 2 volumes of ice-cold E1 buffer (50 mM HEPES-KOH, pH7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH8, 10% glycerol, 0.5% NP40, 0.25% Triton-X-100, 1 mM DTT, 1X cOmplete protease inhibitor (PIC)) by up-and-down pipetting. The suspension is centrifugated at 1100 g at 4°C for 2 min. The supernatant is collected as the cytoplasmic extract (CE). The pellet is resuspended and incubated 10 min on 5 volumes of ice-cold E1 buffer. After 2 min of centrifugation at 1100 g, the pellet is resuspended in 1 volume of ice-cold E2 buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA pH8.0, 1 mM EGTA pH8.0, 1xPIC). The suspension is centrifugated at 1100 g at 4°C for 2 min. The supernatant is collected as the nuclear extract (NE). The pellet is resuspended and incubated 10 min on 2 volumes of ice-cold E2 buffer. After 2 min of centrifugation at 1100 g, the pellet is resuspended in 1 volume of ice-cold E3 buffer (50 mM Tris-HCl pH6.8, 20 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% NP-40, 1xPIC) and transferred in a new clean tube. 1/1000 of benzonase (Sigma, Cat# E1014) is added and chromatin digestion is achieved during 30 min at RT under agitation. The suspension is centrifugated at 16000 g at 4°C for 10 min. The supernatant is collected as the chromatin extract (ChrE).

Western blot (WB)

Protein concentrations were measured by Bradford method. Twenty µg of WCE or 15 µg of CE, NE or ChrE were boiled for 5 min in 100 mM Tris HCl pH 6.8, 30% glycerol, 4% SDS, 0.2% Bromophenol Blue, 100 mM DTT, resolved in 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Protran, Amersham). After blocking in 3% milk/PBS, primary antibodies diluted 1/1000 in 0.3% milk/PBS (key resources table) were incubated overnight at 4°C. After 3 washes in 0.05% Tween 20/PBS, HRP-coupled secondary antibodies (key resources table) diluted 1/10000 in 0.3% milk/PBS were incubated 2 h at RT followed by ECL detection (Thermo Fisher Scientific) in a ChemiDoc Touch Imaging System (Bio Ras). Western blot images were processed on Bio Rad Image Lab Software (version 5.2.1).

Immunofluorescence (IF) on mESC

Cells plated on gelatinized round glass slides were rinsed, fixed with 4% PFA/PBS for 10 min at RT, rinsed again and then permeabilized in 0.1% Triton X-100/PBS for 20 min at RT. After PBS washes, primary antibodies (key resources table) diluted in 10% fetal calf serum (FCS)/PBS were incubated for 1 h at RT. Cells were rinsed twice with 0.02% Triton X-100/PBS for 5 min. Secondary antibodies (key resources table) were diluted 1/1000 in 1 µg/mL DAPI/10% FCS/PBS and incubated for 1 h at RT. Cells were then washed twice for 5 min in 0.02% Triton X-100/PBS. Slides were mounted, cells were imaged with a TCS SP5 (Leica) laser-scanning microscope (20x Plan APO objective).

RT-qPCR

RNAs were extracted using TRI® Reagent (Molecular Research Center Inc), precipitated in isopropanol, washed with 75% EtOH, resuspended in RNase-free water and quantified with a Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). For RNA extraction from testis, tissues were stocked with a B pestle in a glass dounce grinder (Kimble) followed by high-speed centrifugation.

Reverse Transcription (RT) was performed using with 1 µg of total RNA using QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) in T100 Bio-Rad machine. For qPCR, cDNAs were diluted 5 times and amplified using LightCycler 480 SYBR Green 2x PCR Master Mix I with 0.6 mM of forward and reverse primers (Sigma Aldrich, Table S2) in 8 µL of reaction volume. qPCR reaction was realized using a LightCycler 480 machine (Roche). Normalized values correspond to $(1 + \text{efficiency})^{-\Delta\Delta C_t}$.

TFIID complex composition analysis**Nuclear enriched whole cell extracts**

Cells (RT7#13 or RT10#41) were pelleted, rinsed, and resuspended in one volume of ice-cold Hypotonic Buffer (1 mL for 1 g of cells) (10 mM Tris pH8, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl supplemented with cOmplete protease inhibitor mix 1x (Roche)). Cells were then lysed by 10 gentle strokes with a B pestle in a glass Dounce grinder (Kimble). After 10 min of centrifugation at 9000 g, the pellet, which contains nuclei, was resuspended in one volume of High Salt Buffer (20 mM Tris pH8, 1.5 mM MgCl₂, 450 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 0.5% NP40, supplemented with cOmplete protease inhibitor mix 1x). Nuclei were lysed by 10 gentle strokes and incubated on ice for 30 min. After 10 min of centrifugation at 9000 g, the supernatant was recovered as nuclear enriched whole cell extract (NWCE).

IP-MS analysis

Immunoprecipitation (IP). One mg of NWCE was first incubated for 1 h with 120 µL of Protein-G Sepharose beads (GE healthcare) in 1 mL of IP100 buffer (25 mM Tris HCl pH7.9, 10% Glycerol, 0.1% NP40, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1X cOmplete) at 4°C under gentle agitation. NWCE was isolated and incubated with 10 to 30 µL of antibodies (key resources table) during 2 h at 4°C under gentle agitation and then incubated with fresh 120 µL of Protein-G Sepharose beads overnight. Beads were then washed at 4°C twice with IP500 buffer (25 mM Tris HCl pH 7.9, 10% Glycerol, 0.1% NP40, 5 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1X cOmplete) under gentle agitation and then three times with IP100 buffer, each time for 10 min. Immunoprecipitated proteins were eluted with 50 µL of acid Glycine buffer (0.1 M glycine pH2.8) directly buffered with 1 µL of 10 mM Tris HCl pH8. Each immunoprecipitation was verified by western blot by loading 20 µL of input and of supernatant and 15 µL of eluted proteins.

Liquid digestion. Eluted proteins were TCA-precipitated overnight at 4°C. Samples were then centrifuged at 16000g for 30 min at 4°C. Pellets were washed twice with 500 µL cold acetone, centrifuged at 16000g for 10 min at 4°C, denatured with 8 M urea in Tris-HCl 0.1 mM, reduced with 5 mM TCEP for 30 min, then alkylated with 10 mM iodoacetamide for 30 minutes in the dark. Both reduction and alkylation were performed at room temperature and under agitation (100g). Double digestion was performed with endoproteinase Lys-C (Wako) at a ratio of 1/100 (enzyme/proteins) in 8 M urea for 4 h, followed by an overnight modified trypsin

digestion (Promega) at a ratio of 1/100 (enzyme/proteins) in 2 M urea. Both LysC and Trypsin digestions were performed at 37°C. Peptide mixtures were then desalted on C18 spin-columns and dried on Speed-Vacuum before LC-MS/MS analysis.

LC-MS/MS analysis. Each sample was analyzed in triplicate (experimental triplicate) using an Ultimate 3000 nano-RSLC (Thermo Scientific, San Jose California) coupled in line with a LTQ-Orbitrap ELITE mass spectrometer via a nano-electrospray ionization source (Thermo Scientific, San Jose California).

Peptide mixtures were loaded on a C18 Acclaim PepMap100 trap-column (75 μ m ID x 2 cm, 3 μ m, 100Å, Thermo Fisher Scientific) for 3.5 minutes at 5 μ L/min with 2% ACN, 0.1% FA in H₂O and then separated on a C18 Accucore nano-column (75 μ m ID x 50 cm, 2.6 μ m, 150Å, Thermo Fisher Scientific) with a 100 min linear gradient from 5% to 50% buffer B (A: 0.1% FA in H₂O / B: 99% ACN, 0.1% FA in H₂O), then a 20 min linear gradient from 50% to 70% buffer B, followed with 10 min at 99% B and 10 min of regeneration at 5% B. The total duration was set to 140 min at a flow rate of 200 nL/min. The oven temperature was kept constant at 40°C.

The mass spectrometer was operated in positive ionization mode, in data-dependent mode with survey scans from m/z 300–1600 acquired in the Orbitrap at a resolution of 240,000 at m/z 400. The 20 most intense peaks (TOP20) from survey scans were selected for further fragmentation in the Linear Ion Trap with an isolation window of 2.0 Da and were fragmented by CID with normalized collision energy of 35%. Unassigned and single charged states were rejected.

The Ion Target Value for the survey scans (in the Orbitrap) and the MS2 mode (in the Linear Ion Trap) were set to 1E6 and 5E3 respectively and the maximum injection time was set to 100 ms for both scan modes. Dynamic exclusion was used. Exclusion duration was set to 30 s, repeat count was set to 1 and exclusion mass width was $\pm$ 10 ppm.

Gel filtration (GF)

One mg of NWCE was diluted twice in the GF buffer (20 mM Tris pH8, 1.5 mM MgCl₂, 450 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% NP40), centrifuged for 10 min at 16000 rpm then passed at 0.4 mL/min through a Superose 6 GL 10/300 column (Sigma Aldrich) previously equilibrated with GF buffer. About 60 fractions of 250 μ L were collected and 27 μ L of each fraction were analyzed by western blot.

Estimation of remaining holo-TFIID in the IP-MS and gel filtration

IP-MS. In the TAF7 depleted cells, the detection of TAF7 in the 2 IPs is a direct indication of the remaining holo-TFIID as TAF7 does not interact directly with TAF12 or TBP. To estimate the fraction of remaining holo-TFIID in the TAF7-depleted cells, we used the normalized XIC values of TAF7.

TAF10 is present in different intermediates of the TFIID assembly but is also part of the SAGA complex. As the anti-TAF12 IP-MS detect all the intermediates from the core-TFIID to the holo-TFIID, the remaining fraction of holo-TFIID in the TAF10-depleted cells in this experiment was assessed by averaging the normalized XIC values of the S-TAF subunits (TAF1, TAF7, TAF11, TAF13 and TBP), as the S-TAF does not directly interact with TAF12. To estimate the remaining fraction of holo-TFIID in the anti-TBP IP-MS, we used the average of the normalized XIC values of the core-TFIID complex subunits, as it does not directly interact with TBP. These estimations were performed from day 0 to day 4 and plotted as a regression curve using ggplot2 version 3.4.0.

Gel filtration. As the intensity on the blots were not identical between the different conditions, we normalized the data. For TAF10-depleted cells, for each protein, we normalized the signal intensity per fraction to the total signal intensity over all the fractions. We used the added normalized signal intensities of TAF4, TAF5 and TAF6 in control and TAF10-depleted fractions to calculate the ratio of the signal in depleted over control conditions in each fraction. As holo-TFIID is contained in the high molecular weight fractions, the values of fractions B to D were used as a proxy for the quantification of holo-TFIID.

For TAF7 depleted cells, as there is no major difference between the control and the *-Taf7* condition, except for the depletion of TAF7, we only focused on fractions B to D where the majority of the signal is present. Similarly, we normalized the signal intensity of fraction B, C or D to the total signal intensity over all fractions B to D. We then used the added normalized signal intensities of TAF4, TAF5 and TAF6 in control and TAF7 depleted fractions to normalize the signal intensity detected for TAF7, in each fraction and each condition. We used the normalized intensity of TAF7 in fractions B to D as a proxy of the remaining holo-TFIID in depleted cells.

Transcription analysis

Analysis of newly synthesized RNA by EU labelling

Cells (RT7#13 or RT10#41) plated on gelatinized round glass slides were incubated with 1 mM of 5-ethynyl-uridine (EU, Thermo Fisher Scientific, E10345) for 1 h, fixed with 4% PFA for 15 min at RT and rinsed. They were then stained using the Click-it RNA Imaging Kits (Invitrogen, C10329) according to the manufacturer's guidelines. Cells were imaged with a TCS SP5 (Leica) laser-scanning microscope (20x Plan APO objective).

Newly synthesized 4-sU RNA sequencing

4-sU RNA labeling and purification. The protocol for newly synthesized RNA sequencing is based on published protocols³³. Briefly, mESCs were seeded at D-1, treated with either EtOH (control) or 4-OHT (mutant) from D0 to D3 with a reseeded/amplification step at D2. On D3, cells were labelled with 500 μ M 4-sU for 15 min. In parallel, drosophila S2 cells were also labelled with 500 μ M 4-sU for 15 min. RNAs were extracted with Trizol, precipitated with isopropanol, washed with 75% ethanol, and resuspended in DEPC-treated water. DNase treatment was performed using the TURBO DNA-free kit. Non labelled *S.cerevisiae* RNAs were isolated using the RiboPure - Yeast kit (Invitrogen). RNAs were measured with the Qbit machine using the Quant-it RNA Broad Range kit. 200 μ g of mESC RNAs were mixed with 25 μ g of S2 RNAs and 25 μ g of yeast RNAs. The mixture was precipitated again, resuspended in 130 μ L of DEPC-treated water and then fragmented with Covaris E220 sonicator. One μ L of RNA were collected before and after

sonication to check fragmentation on a 1% agarose gel and on bioanalyzer. The fragmented RNA is expected to have an average size of 1.5 kb. To isolate newly synthesized 4-sU labelled RNA fragments, RNAs were first biotinylated with Biotin-HPDP molecules, then combined with streptavidin magnetic beads and finally isolated on column (μ MACS streptavidin beads and kit, Miltenyi). RNAs from flowthrough and elution are then precipitated in absolute EtOH with 0.1 mg/mL glycogen and 300 mM NaOAc (pH 5.2) overnight at -20°C , washed with 75% EtOH and resuspended in respectively 150 μL and 15 μL of DEPC-treated water.

The quality of 4-sU labelled RNA fragment purification was checked by RT-qPCR prior sequencing. Two μL of eluted RNAs and 7.5 μL of RNAs from the flowthrough were collected into respectively 12 μL and 2.5 μL of DEPC-treated water. RT was carried out using Superscript IV kit and qPCR by 480 SYBR green I Master kit. Primers are listed in Table S2. Good purification is characterized by a lower amount of yeast RNA and a higher amount of mouse intronic sequence in the purified sample than in the flowthrough sample after normalization to *Drosophila* RNAs (ΔCt) and RNA from EtOH flowthrough sample ($-\Delta\Delta\text{Ct}$).

Library preparation. Fifteen to 50 ng of eluted RNA was used for the library preparation using TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Gold Kit (Illumina, RS-122-230) according to the Illumina protocol with the following modifications. Four-thiouridine-labelled RNA was cleaned up using 1.8 $\times$ RNA Clean AMPure XP beads (A63882, Beckman-Coulter) and fragmented using divalent cations at 94°C for 1 min without depletion of rRNA. While double stranded cDNA synthesis and adapter ligation were performed according to manufacturer instructions, the number of PCR cycles for library amplification was reduced to 10 cycles. After purification using SPRIselect beads (B23319, Beckman-Coulter), libraries were sequenced with 1 $\times$ 50 bp on a HiSeq4000 System (Illumina).

Cleavage under targets and release using nuclease (CUT&RUN) and library preparation

CUT&RUN experiments were performed in biological duplicate as described in ⁸². Briefly, mESC (RT7#13 or RT10#41) were treated with EtOH or 4-OHT for 3 days and 250,000 cells were used per CUT&RUN sample. Cells were washed and resuspended in wash buffer and incubated for 10 min at room temperature with 10 μL of concanavalin A-coated beads (Bangs Laboratories, BP531). Cells bound to beads were permeabilized using 0.05% digitonin and incubated with the appropriate antibody at 4°C overnight. Protein A-MNase (pA-MN) was added to a final concentration of 700 ng/mL and incubated at 4°C for 1 h on a tube rotator. After washing, pA-MN was activated with 2 μL of 100 mM CaCl_2 and digestion was performed for 30 min at 0°C . The reaction was stopped with 100 μL of stop buffer containing 2 pg/mL of heterologous spike-in DNA from yeast. Release of the DNA fragments was achieved by incubating samples at 37°C during 15 min. DNA was extracted using NucleoSpin columns (Macherey-Nagel) and eluted in 30 μL of NE buffer.

CUT&RUN-seq libraries were generated using the MicroPlex library preparation kit v3 (Diagenode), following the manufacturer's instructions, except that the stage 4 of the library amplification PCR was performed with a combined annealing-extension step for 10 s at 60°C , and stage 5 with an extension step for 10 s at 60°C for 7 cycles. Yield and size distribution were quantified on a 2100 Bioanalyzer instrument (Agilent). Sequencing was performed by the GenomEast platform (IGBMC) on an Illumina NextSeq 2000 (PE-50, 20 million reads).

Pol II ChIP-seq

Duplicates of RT10 mESCs were treated with EtOH or 4-OHT for 3 days, then cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min and quenched with 125 mM glycine for 5 min at room temperature with gentle shaking. Cells were quickly rinsed in cold PBS twice then scraped on ice and centrifuged at 4°C at 1250 g for 3 min. After a rinse in cold PBS, cells were centrifuged at 4°C at 1250 g for 3 min and snap-frozen in liquid nitrogen. Cell pellets were thawed on ice and resuspended in 1 mL lysis buffer 1 (50 mM HEPES-KOH pH 7.5 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% NP40, 0.25% Triton X-100) supplemented with protease inhibitors and incubated at 4°C on a rocker for 10 min. Lysates were centrifuged at 100 g at 4°C for 5 min. Pellets were resuspended with 1 mL lysis buffer 2 (10 mM Tris pH 8.0 1 mM EDTA 0.5 mM EGTA 200 mM NaCl) supplemented with protease inhibitors and incubated at 4°C on a rocker for 10 min, then centrifuged at 100 g at 4°C for 5 min. Pellets were resuspended in 1 mL shearing buffer (0.1% SDS, 1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl pH 8.0) supplemented with protease inhibitors, then centrifuged at 100 g at 4°C for 5 min. Pellets were resuspended in 500 μL shearing buffer, transferred in a 1 mL covaris milliTUBE and sonicated with a Covaris E220 sonicator for 8 min with 5% duty, 140 peak incident power and 200 cycles per burst. The sonicated lysates were centrifuged at 16000 g for 15 min at 4°C to pellet cellular debris. Sonicated extracts were pre-cleared at 4°C with 25 μL Dynabeads Protein G, in the meantime 25 μL Dynabeads Protein G were pre-bound with 3 μg of anti-Pol II antibody (7G5) at 4°C for 6 h. Pre-cleared extracts were incubated with antibody/beads mix overnight at 4°C on a rotating wheel. Beads were washed for 10 min at 4°C on a rotating wheel with, successively, low-salt buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS), high-salt buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS), LiCl buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet-P40, 1% Na-deoxycholate), and twice with TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). DNA was recovered using 2 $\times$ 100 μL of elution buffer (0.1 M NaHCO_3 , 1% SDS). Crosslinks were reversed by adding 8 μL of 5 M NaCl, incubating samples overnight at 65°C and treating them with RNase A and proteinase K for 2 h at 55°C .

Five ng of eluted DNA were used for the library preparation using the MicroPlex library preparation kit v3 (Diagenode) following the manufacturer's instructions. Sequencing was performed by the GenomEast platform (IGBMC) on an Illumina NextSeq 2000 (PE-50).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Details for individual experiments including number of biological and technical replicates and statistical tests performed can be found in the figure legends. For unique comparison ($n = 2$), non-parametric Mann & Whitney tests were performed. For multiple comparisons ($n > 2$), non-parametric Kruskal-Wallis tests were performed, followed by a Dunn post hoc test when possible. For distribution comparisons, Kolmogorov & Smirnov test were performed. Comparisons were considered statistically significant with a p -value below 0.05.

Analyses were performed using custom scripts available on request (ImageJ version 1.53q, R software version 4.0.2,⁷⁷). R analyses were achieved using ggplot2 version 3.4.0, tibble 3.1.8, tidyr 1.2.1, readr 2.1.3, purr 0.3.5, dplyr 1.1.10, stringr 1.4.1, forcats 0.5.2) and rstatix (version 4.2.2, <https://rpkgs.datanovia.com/rstatix/>) for statistical analysis.

Immunofluorescence and EdU signal quantification

Hundreds of measurements for individual nuclei were performed for the different quantifications. ImageJ was used to create a mask for the nuclei via the DAPI signal using the 'Subtract background' and 'watershed' tools. This mask was then used on the other channels to measure signal intensity. The ImageJ macro is available upon request. For the statistical analyses, non parametric Kruskal-Wallis tests were performed.

IP-MS data analysis

Proteins were identified by database searching using SequestHT (Thermo Fisher Scientific) with Proteome Discoverer 2.2 software (Thermo Fisher Scientific) on *Mus musculus* database (Swissprot, non-reviewed, release 2019_08_07, 55121 entries). Precursor and fragment mass tolerances were set at 7 ppm and 0.5 Da respectively, and up to 2 missed cleavages were allowed. Oxidation (M) was set as variable modification, and Carbamidomethylation (C) as fixed modification. Peptides were filtered with a false discovery rate (FDR) at 1%, rank 1 and proteins were identified with 1 unique peptide.

Each experiment was analyzed separately using Extracted Ion Chromatogram (XIC) values⁸³. First, only peptides whose mean XIC values from triplicate measurements of the control condition (EtOH) were greater than the mean XIC values from triplicate measurements of the mock IP were kept for further analysis. Note that TAF4 and TAF4B were analyzed together in a virtual TAF4.4B protein and TAF9 and TAF9B in a TAF9.9B protein. Second, protein XIC values (PXV) were calculated by averaging XIC values of peptides kept belonging to the same proteins (1). Third, PXV were normalized by the mean of PXV from triplicate measurements of the mock IP (ΔPXV_x) (2) and then by the normalized mean of PXV from triplicate measurements of the bait ($\Delta PXV_{bait(x)}$) (3). Last, fold change (FC) was calculated from one condition (EtOH or 4-OHT) and the average values of the control condition (EtOH) (4).

$$PXV_x = \frac{\sum_{i=1}^n XIC_{peptide(x)}}{n} \quad (\text{Equation 1})$$

$$\Delta PXV_x = PXV_{x(IP)} - \frac{\sum_{j=1}^n PXV_{x(IPmock)}}{n} \quad (\text{Equation 2})$$

$$\Delta PXV_{bait(x)} = \Delta PXV_x \left/ \frac{\sum_{j=1}^n \Delta PXV_{bait}}{n} \right. \quad (\text{Equation 3})$$

$$FC = \Delta PXV_{bait(x)} \left/ \frac{\sum_{j=1}^n \Delta PXV_{EtOH(bait(x))}}{n} \right. \quad (\text{Equation 4})$$

where x is the protein of interest, i is the number of peptides belonging to the same protein and j is the number of measurements performed on the same IP under the same conditions.

In the graph, each point corresponds to one FC value and the bar plot is the average of the FC values from different IP experiments, corresponding to the same condition, for a protein or group of proteins belonging to the same sub-complex. For the statistical analyses, non parametric Kruskal-Wallis tests were performed for multiple comparisons.

Nascent 4-sU RNA sequencing data analysis

Experiments were carried out with 3 biological replicates, 1 dataset (TAF10-depleted condition) was omitted because of technical issue. Reads were preprocessed to remove adapter, polyA, low-quality sequences (Phred quality score below 20) and reads shorter

than 40 bases. These preprocessing steps were performed using cutadapt (version 1.10,⁷⁴). Reads were mapped to rRNA sequences using bowtie (version 2.2.8,⁷³) and reads mapping to rRNA sequences were then removed for further analysis. Evaluation of the percentage of reads mapping to *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae* was carried out using Fastq-screen (version 0.11.3). Reads were mapped onto the mm10 and BDGP6 assembly of *Mus musculus* and *Drosophila melanogaster* genome using STAR (version 2.5.3a,⁸¹). Gene expression quantification was performed from uniquely aligned reads using htseq-count (version 0.6.1p1,⁷⁹), with annotations from Ensembl version 93 and “union” mode. Only non-ambiguously assigned reads to a gene have been retained for further analyses. Data were normalized using size factors computed with the median-of-ratios method, proposed in⁸⁴, on *Drosophila melanogaster* counts. Principal Component Analysis was computed on variance stabilizing transformed data calculated with the method proposed in⁷⁶, using size factors computed from *Drosophila melanogaster* counts. Comparisons of interest were performed using Wald statistic test for differential expression and implemented in the Bioconductor package DESeq2 (version 1.16.1,⁷⁶). Eulerr plots were generated using eulerr package (version 4.2.2). In genome browser view, normalized mESCs read counts were used.

CUT&RUN data analysis

Experiments were carried out with 2 biological replicates. Data were preprocessed with cutadapt v4.0⁷⁴ to trim adapter sequences (Nextera Transposase Sequence) from 3' end of reads. Cutadapt was used with the following parameters ‘-a AGATCGGAAGAG -A AGATCGGAAGAG -m 25:25’. Reads were mapped to *Mus musculus* genome (assembly mm10) using Bowtie2 v2.4.4⁷³ with default parameters except for “-end-to-end -very-sensitive -no-mixed -no-discordant -I 10 -X 700”. BigWig files were generated using deeptools bamCoverage v3.5⁷⁵ with the following parameters “-bs 10 -normalizeUsing CPM -effectiveGenomeSize 2652783500 -skipNonCoveredRegions -extendReads”. Bigwig files of mean signal per condition were generated using deeptools bamCompare v3.5⁷⁵ with the following parameters “-of bigwig -operation mean -effectiveGenomeSize 2652783500 -normalizeUsing CPM -scaleFactorsMethod None -extendReads”.

The peak calling was done with Macs2 v2.2.7.1⁸⁰ with default parameters except “-f BAMPE -q 0.1”. Peaks were annotated relative to genomic features using Homer v4.11⁷⁸ (annotations got extracted from gtf file downloaded from Ensembl 102).

Heatmap and mean profile

The tool deeptools computeMatrix v3.55⁷⁵ was used to generate a count matrix at the positions of interest (union of peaks of all datasets to compare) and finally the tool deeptools plotProfile v3.5 was used to generate mean profile plots and deeptools plotHeatmap v3.5 was used to generate heatmaps. Top 10% peaks were filtered using an in-house R script, using the fold enrichment score as input.

Differential peak analysis

Detected peaks (all peaks) were combined to get the union of all peaks (per condition RT7 or RT10) using the tool Bedtools merge v2.30.0⁸⁵. Then, the number of reads per merged peaks were computed using deeptools multiBamSummary BED-file v3.5.0⁷⁵. Data were normalized using the method proposed by Anders and Huber⁷⁹ using read counts per peaks. Comparisons of interest were performed using the method proposed by⁷⁶ implemented in the DESeq2 Bioconductor library (DESeq2 v1.42.1). Resulting *P*-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method.

Pol II Chip-seq data analysis

Experiments were conducted in biological duplicates. Reads were mapped to mouse genome (mm10) using Bowtie2 v2.5.0⁷³ with default parameters except for “-mm”. Reads which mapping quality is below 10 were removed using samtools v1.15.1⁸⁶ with the command line “samtools view -b -q 10”. Then, reads falling into Encode blacklisted regions v2⁸⁷ were removed using BEDtools intersect v2.30.0⁸⁵. BigWig files were generated using Deeptools bamCoverage⁸⁵ v3.5.4 with the following parameters “-bs 10 -p 10 -skipNonCoveredRegions -extendReads”. Deeptools bamCoverage was used with “-scaleFactor” and scale factors determined based on the background signals calculated on the 30% least enriched regions.

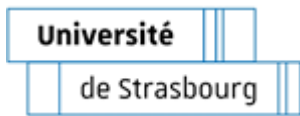
Heatmap and mean profile

The tool Deeptools computeMatrix v3.5.0 was used to generate a count matrix at the positions of interest and Deeptools plotHeatmap v3.5.0 was used to generate heatmaps and plotProfile v3.5.0 was used to create mean profiles⁷⁵. Regions of interest were either all TSS of the Mouse Genome mm10 with annotation from Ensembl v102 or TBP peaks top10 or all peaks.

Pausing index

Pausing index was described as such: Pausing index = 5' read density / gene body density. Gene positions were extracted from Ensembl v102 using R scripts and the R/Bioconductor package biomaRt v2.50.0⁸⁸. The number of reads per gene bodies and 5' regions was counted using BEDtools intersect v2.30.0⁸⁵. The 5' region of genes was defined as the regions comprised between TSS-30nt and TSS + 300nt. Gene body region was defined as the region comprised between TSS + 301nt and TTS-300nt. Gene bodies were all normalized to be 1000 nt long. Moreover, 1 was added to the gene body and 5' read counts so that illegal division does not occur. Statistical comparison of the distributions was performed using a Kolmogorov & Smirnov test.

De l'initiation de la transcription à la stabilisation de l'ARN messager. Etude du phénotype *Tbpl2*^{-/-} : de l'ovaire à l'échelle subcellulaire lors de la croissance ovocytaire chez la souris



Emmanuel GARCÍA SÁNCHEZ



Résumé en français

Dans l'ovocyte en croissance, la synthèse de l'ARNm dépend de TBPL2 et de l'ARN Pol II. La stabilité à long terme du transcriptome dépend des structures sans membrane associées au cytosquelette nommées *CytoPlasmic Lattices* (CPLs), et du raccourcissement de la queue poly(A). Les ovocytes *Tbpl2*^{-/-} cessent de croître. Est-ce que l'arrêt de croissance est lié à un défaut de régulation de la stabilité des transcrits? J'ai montré que l'expression et la localisation des sous-unités du contrôle de la stabilité du transcriptome sont impactées dans le mutant *Tbpl2*^{-/-}. Les analyses histologiques et subcellulaires révèlent des défauts cytoplasmiques, l'élargissement de foci nucléaires poly(A) et l'absence de formation de CPLs. Ensemble, mes données remettent dans le contexte l'importance fonctionnelle de la croissance ovocytaire pour la mise en place et la régulation de la stabilité du transcriptome maternel. Mots clés : TBPL2, ARN Pol II, ovocyte en croissance, transcriptome maternel, CPLs, poly(A)

Résumé en anglais

In oocytes, mRNA synthesis is regulated by the TBPL2/ RNA Pol II machinery. Transcriptome long-term stability relies on membrane-less structures associated with the cytoskeleton termed *CytoPlasmic Lattices* (CPLs) and on poly(A) shortening. *Tbpl2*^{-/-} oocytes stop growing. Could this growth arrest be linked to defects in transcript stability control? My research shows that the mRNA-associated stability proteins are indeed expressed during oocyte growth and that their expression and localization are altered in the *Tbpl2* mutant. Histological and subcellular analyses show cytoplasmic anomalies and expanded nuclear foci where poly(A) accumulates. Electron microscopy of the *Tbpl2* mutant highlights mitochondrial and golgi clustering near the nucleus and a complete absence of CPLs formation. These findings emphasize the critical role of oocyte growth in regulating maternal transcriptome stability. Keywords: TBPL2, RNA Pol II, growing oocytes, maternal transcriptome, CPLs, poly(A)