

SERGE MCGRAW

**Études de facteurs impliqués dans le remodelage de la
chromatine chez les gamètes et les embryons bovins**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en sciences animales
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES ANIMALES
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2007

© SERGE MCGRAW, 2007

RÉSUMÉ

Les histones et leurs modifications épigénétiques remodelent la chromatine et influencent la régulation génique en modifiant les interactions entre la machinerie transcriptionnelle et l'ADN. Cependant on ignore l'exacte implication de ces facteurs dans les pouvoirs de totipotence et de reprogrammation associés à l'ovocyte ou encore dans l'activation du génome embryonnaire. Malgré plusieurs études détaillées sur les modifications post-traductionnelles des histones dans l'ovocyte et dans le jeune embryon, les enzymes potentiellement aptes à les catalyser n'ont pas fait l'objet d'exploration aussi approfondie.

Dans cet ouvrage, nous avons investigué le profil d'expression de 24 régulateurs clés principalement impliqués dans l'acétylation et la méthylation des histones pendant la période comprise entre l'ovocyte immature et le blastocyste bovin. Ces analyses nous ont permis d'associer certains événements épigénétiques avec la présence de divers candidats étudiés. Une histone acétyltransférase, MYST4, a été sélectionnée pour une caractérisation plus exhaustive. Nous avons retrouvé MYST4 à l'intérieure de cellules spécialisées impliquées dans la gamétogénèse. De plus, des événements spécifiques d'acétylation peuvent être associés avec sa présence pendant cette période. L'histone H1 spécifique à l'ovocyte (H1FOO) a aussi été examinée plus en profondeur. En plus d'avoir suivi l'expression de l'ARNm et de la protéique H1FOO dans l'ovocyte et pendant le développement embryonnaire, nous avons mis en place une stratégie afin de déterminer si H1FOO a le potentiel de contrôler la transcription de certains gènes. Nos observations préliminaires suggèrent que l'histone H1FOO ne peut réguler l'expression génique par elle-même, mais qu'elle est quand même impliquée dans la modulation de la structure de la chromatine.

À un certain point, la régulation de l'expression génique de l'ovocyte et du jeune embryon doit nécessairement faire appel à un remodelage de la chromatine, cependant les acteurs impliqués dans ce processus fondamental demeurent élusifs. Nos études de MYST4 et H1FOO associent ces gènes avec divers événements spécifiques se déroulant sur la chromatine des gamètes et embryons. De plus nos analyses de profils d'expression apportent des indices sur l'implication de plusieurs autres gènes pendant cette période de développement. Les résultats présentés dans cette thèse contribuent à éclaircir la représentation globale de la modulation de la chromatine par les facteurs épigénétiques.

ABSTRACT

Histones and their post-translational modifications remodel the chromatin and influence gene regulation by altering the interactions between the transcriptional machinery and DNA. During oocyte and embryo development, important transcriptional events occur, but the exact contribution of histones and epigenetic modifications in oocyte totipotency and reprogramming capabilities or in the activation of the embryonic genome are still enigmatic. Despite numerous detailed studies on post-translational histone modifications in oocytes and early embryos, the enzymes potentially involved have been somewhat neglected.

In this work, we have investigated the expression profile of 24 key regulators primarily linked with histone acetylation and methylation in the period between immature bovine oocyte and blastocyst. The profiles obtained for the different candidates were associated with different epigenetic events occurring during this time period. One particular histone acetyltransferase, MYST4, has caught our attention and was selected for further characterization. In this study MYST4 was associated with specialized cells during gametogenesis. Furthermore, specific acetylation events are linked to the presence of MYST4 during this period. The oocyte-specific histone H1 subtype (H1FOO) was also further characterized. Although different hypotheses have been formulated about its implication in chromatin modulation and gene regulation, little information based on facts is actually available. After investigating the presence of H1FOO mRNA and protein in oocytes and early embryos, we established a strategy to discover if H1FOO had the potential to control the transcription of different genes. Our preliminary observations suggest that H1FOO, by itself, does not regulate gene expression but is involved in the modulation of the chromatin structure.

It is thought that the regulation of gene expression in the oocyte and early embryo must at some point involve chromatin remodeling. However, the genes implicated in this fundamental process during this period are still elusive. Our MYST4 and H1FOO studies associate these genes with specific events that occur on the chromatin of oocytes and embryos. Moreover, our expression profile analysis indicates that many other genes are implicated during this important developmental period. The results presented in this thesis contribute to enlighten the global representation of chromatin modulation by epigenetic factors.

AVANT-PROPOS

Il est important de signaler la contribution des co-auteurs dans les articles des chapitres IV et VI dont je suis l'auteur principal. Ces derniers ont participé à l'élaboration conceptuelle et/ou technique des expériences. Les co-auteurs de l'article du chapitre IV sont: Guillaume Morin, Christian Vigneault, Pierre Leclerc et Marc-André Sirard. Ce manuscrit est présentement sous révision dans le journal BMC Developmental Biology. Les co-auteurs de l'article du chapitre VI sont: Christian Vigneault, Karine Tremblay, Vilceu Bordignon et Marc-André Sirard. Cet ouvrage n'a pas encore été soumis pour publication.

Après tant d'années d'études supérieures, je veux profiter de cette occasion pour remercier tous ceux qui m'ont aidé et appuyé durant ce cheminement. Comme plusieurs d'entre vous le savez, mon doctorat n'a pas toujours été une partie de plaisir. Cependant, les embûches rencontrées m'ont servi de source de motivation pour redoubler d'ardeur et surpasser ces difficultés.

J'aimerais d'abord remercier Marc-André (Sirard) pour m'avoir permis de mener mon projet avec autant d'autonomie. Malgré certaines divergences d'opinions, j'ai grandement apprécié tes conseils judicieux et éclairés. Côtayer au quotidien une personne avec une attitude de gagnant qui démontre autant de passion et de dévouement pour la recherche aura été énormément formateur dans ma progression professionnelle.

Durant ces années passées au laboratoire, j'ai eu l'occasion de travailler avec des personnes extrêmement compétentes. Je tiens à remercier particulièrement : Claude (Robert) pour la confiance qu'il m'a vouée lorsque je n'étais qu'un « simple étudiant d'été »; cette période demeure pour moi le moment catalyseur de ma jeune carrière en recherche. Christian (Vigneault) pour avoir participé activement à l'ensemble de mes travaux, sans ton aide je serais sûrement encore entrain de bencher. Maud (Vallée), Guillaume (Morin), Isabelle (Gilbert) et Catherine (Gravel), merci pour votre aide et entre autre pour avoir contribué à mon équilibre mental! J'espère que les liens d'amitié que nous avons tissés ensemble ces

dernières années à travers nos nombreuses discussions au labo, en congrès, en vacances, pendant nos soupers bien arrosés, dans le spa ou bien devant une table de babyfoot, resterons solides malgré cette croisée des chemins. Vous faites maintenant partie de ma « A » liste...

Je tiens également à remercier mes autres collègues et ami(e)s pour leur aide, leurs suggestions ou encore pour m'avoir transmis une partie de votre savoir : Karine (Tremblay), Dominic (Gagné), Isabelle (Dufort), Isabelle (LaFlamme), Suzan (Novak), Karine (Coenen), Mariève (Bureau), François (Paradis), Nicolas (Lemay), Stéphanie (Desrosiers), Lyne (Massicotte), Atef (Ali), Mathieu (Boilard), Christian (Savard), ainsi que Christine (Légaré). J'aimerais aussi remercier tous les chercheurs et membres des différentes équipes du CRBR, spécialement François (Pothier), François (Richard), Robert (Sullivan) et Pierre (LeClerc), qui ont toujours répondu à l'appel lorsque j'avais besoin de conseils, de services ou références. Merci Vilceu (Bordignon) pour avoir accepté d'être mon co-directeur. J'ai beaucoup apprécié le temps que tu as pris pour effectuer les expériences de transfert nucléaire ainsi que nos discussions lors de mon passage dans ton labo.

A mes chums de pêche, Jean-François (Couture), Simon B (Bélanger), Simon C (Collin), Sonny (Bergeron) et Stéphan (Fiset). Merci de m'avoir fait décrocher du labo lors de nos voyages de pêche, même si ce n'était que pour de brèves périodes à la fois!

Aux membres de ma famille : ma mère Juliette, mon père Jean-Guy et mon frère Kevin, je ne pourrais jamais assez vous remercier. Même si vous ignorez précisément en quoi consistait cette thèse, vous m'avez toujours soutenu et encouragé tout au long de ce périple.

Finalement, Karine, j'aimerais te remercier de tout mon cœur. En fait, les mots me manquent pour t'exprimer comment tu as été importante pour moi pendant cette période. Tu m'as toujours appuyé, et ce malgré toutes ces soirées et ces fins de semaines passées sans moi pendant que j'étais au labo! Christophe, cette thèse est le résultat de passion et de persévérance, deux qualités j'espère tu maîtriseras dans le futur. Je vous aime tellement...

TABLES DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	IV
1 CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
1.1 SECTION #1: L'OVULE ET SON CHEMINEMENT VERS L'EMBRYON.....	1
1.1.1 L'ovocyte : cellule unique	1
1.1.2 Les cellules germinales primordiales et les ovogonies.....	1
1.1.3 Le follicule primordial	2
1.1.4 Le follicule primaire	3
1.1.5 Le follicule secondaire.....	5
1.1.6 Le follicule tertiaire	5
1.1.7 Le cycle œstral	6
1.1.8 Les vagues folliculaires	7
1.1.9 L'ovulation.....	7
1.1.10 La maturation nucléaire	8
1.1.11 La reprise de la méiose	9
1.1.12 La maturation cytoplasmique.....	10
1.1.13 La fécondation	10
1.1.14 Le développement embryonnaire.....	11
1.1.15 L'acquisition par l'ovocyte de la compétence au développement.....	12
1.1.16 La reprogrammation nucléaire.....	13
1.2 SECTION #2: L'EXPRESSION GÉNIQUE DANS L'OVOCYTE ET L'EMBRYON AVANT, PENDANT ET APRÈS LA TRANSITION MATERNELLE EMBRYONNAIRE	15
1.2.1 La contribution maternelle.....	15
1.2.2 La synthèse et l'accumulation des ARNm maternels dans l'ovocyte.....	15
1.2.3 La synthèse et l'accumulation des protéines.....	17
1.2.4 Le début de l'activité transcriptionnelle dans l'embryon	19
1.2.5 L'activation du génome embryonnaire	23
1.3 SECTION # 3: LE CONTRÔLE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE	25
1.3.1 La coiffe.....	25
1.3.2 L'épissage	25
1.3.3 La formation de l'extrémité 3'	26
1.3.4 La formation de l'extrémité 3' des histones	28
1.3.5 La déadénylation.....	30
1.3.6 Le masquage ou entreposage	31
1.3.7 Le démasquage des transcrits	33
1.3.8 La polyadénylation cytoplasmique	33
1.4 SECTION #4: LA CHROMATINE ET SES MODIFICATIONS	36
1.4.1 La chromatine	36
1.4.2 Le nucléosome	39
1.4.3 L'assemblage de la chromatine.....	39
1.4.4 Les histones.....	42
1.4.5 Variantes d'histones.....	43

1.4.6	La modification des histones	51
1.4.7	L'acétylation des histones.....	53
1.4.8	La déacétylation des histones	60
1.4.9	La méthylation des histones.....	63
1.4.10	La déméthylation des histones	66
1.4.11	La phosphorylation des histones.....	69
1.4.12	Ubiquitylation, sumoylation et ribosylation des histones.....	71
1.4.13	Le code histone	71
1.4.14	La modification des résidus d'histones chez l'ovule et l'embryon	72
1.4.15	La méthylation de l'ADN	75
1.5	SECTION # 5: PERSPECTIVES ET OBJECTIFS.....	80
1.6	SECTION #6: BIBLIOGRAPHIE.....	83
2	CHAPITRE # II : Quantification des transcrits d'histones acétyltransférases et d'histones déacétylases pendant le développement embryonnaire bovin.....	111
2.1	RÉSUMÉ	112
2.2	ABSTRACT.....	113
2.3	INTRODUCTION	114
2.4	MATERIALS AND METHODS.....	116
2.4.1	In Vitro Maturation	117
2.4.2	In Vitro Fertilization	117
2.4.3	In Vitro Culture.....	118
2.4.4	RNA Extraction and RT Reaction	118
2.4.5	Quantitative PCR	119
2.4.6	Statistical Analysis.....	119
2.5	RESULTS	120
2.6	DISCUSSION.....	121
2.7	ACKNOWLEDGEMENTS.....	127
2.8	REFERENCES	128
3	CHAPITRE # III : Expression temporelle de facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine et dans la régulation des gènes pendant le développement embryonnaire bovin in vitro.....	136
3.1	RÉSUMÉ	137
3.2	ABSTRACT.....	138
3.3	INTRODUCTION	139
3.4	MATERIALS AND METHODS.....	141
3.4.1	Oocyte Recovery and <i>In Vitro</i> Embryo Production.....	141
3.4.2	RNA extraction and cDNA preparation.....	142
3.4.3	Quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR)	142
3.4.4	Statistical analysis.....	143
3.5	RESULTS	143
3.6	DISCUSSION.....	146
3.6.1	mRNA Profiles Observed.....	147
3.6.2	Specific Gene Functions	148
3.6.3	Risk of ART.....	153
3.7	CONCLUDING REMARKS.....	154

3.8	ACKNOWLEDGEMENTS.....	155
3.9	REFERENCES	156
4	CHAPITRE # IV: Investigation de l'histone acétyltransférase MYST4 et son implication dans la gamétogenèse chez le mammifère.....	166
4.1	RÉSUMÉ	167
4.2	ABSTRACT.....	168
4.3	BACKGROUND	169
4.4	RESULTS	171
4.4.1	MYST4 Sequence	171
4.4.2	MYST4 mRNA in Somatic Tissues.....	171
4.4.3	MYST4 Protein in Somatic Tissues.....	172
4.4.4	MYST4 Immunohistochemistry in Ovary	172
4.4.5	MYST4 mRNA Profiles in Oocytes and Embryos.....	173
4.4.6	MYST4 Immunocytochemistry in Oocytes and Embryos.....	174
4.4.7	MYST4 Immunohistochemistry in Testis.....	174
4.5	DISCUSSION	175
4.5.1	Expression of MYST4	176
4.5.2	MYST4 in female gametogenesis.....	176
4.5.3	MYST4 in male gametogenesis	179
4.5.4	MYST4 in vivo characteristics	180
4.6	CONCLUSIONS	181
4.7	METHODS	182
4.7.1	Oocyte Recovery and <i>In Vitro</i> Embryo Production.....	182
4.7.2	RNA Extraction and cDNA Preparation.....	182
4.7.3	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	183
4.7.4	Western Blotting	184
4.7.5	Immunocytochemistry	185
4.7.6	Immunohistochemistry	185
4.7.7	Statistical Analysis.....	186
4.8	AUTHORS' CONTRIBUTIONS	187
4.9	ACKNOWLEDGEMENTS.....	187
4.10	REFERENCES	188
5	CHAPITRE # V : Caractérisation de l'histone H1FOO pendant le développement embryonnaire in vitro bovin.	200
5.1	RÉSUMÉ	201
5.2	ABSTRACT.....	202
5.3	INTRODUCTION	203
5.4	MATERIALS AND METHODS.....	205
5.4.1	Oocyte Recovery and In Vitro Embryo Production.....	205
5.4.2	RNA extraction and cDNA preparation.....	206
5.4.3	5' RACE and 3' RACE.....	206
5.4.4	Quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR)	207
5.4.5	Western blotting.....	208
5.4.6	Immunolocalization	209
5.4.7	Statistical analysis.....	210

5.5	RESULTS	210
5.5.1	Bovine H1FOO Sequence.....	210
5.5.2	H1FOO mRNA Levels	211
5.5.3	H1FOO Protein Distribution.....	211
5.5.4	H1FOO Immunolocalization	212
5.6	DISCUSSION	213
5.7	CONCLUSION.....	215
5.8	ACKNOWLEDGEMENTS.....	216
5.9	REFERENCES	217
6	CHAPITRE # VI : L'incorporation de l'histone H1FOO ovocyte spécifique dans des cellules somatiques n'altère pas l'expression génique mais affecte les modifications post-traductionnelles des histones.	224
6.1	RÉSUMÉ	225
6.2	ABSTRACT.....	226
6.3	INTRODUCTION	227
6.4	MATERIALS AND METHODS.....	229
6.4.1	H1FOO plasmid preparation.....	229
6.4.2	Expression of H1FOO in fibroblast cells.....	229
6.4.3	Western blotting.....	230
6.4.4	Immunolocalization	230
6.4.5	Reverse transcription (RT) and quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR)	231
6.4.6	Affymetrix microarray hybridization.....	231
6.4.7	Affymetrix microarray data analysis	232
6.4.8	Affymetrix microarray validation.....	232
6.4.9	Bovine developmental microarray hybridization	233
6.4.10	Statistical analysis.....	234
6.5	RESULTS	234
6.5.1	H1FOO expression in somatic cells.....	234
6.5.2	Immunocytochemistry	234
6.5.3	Expression of histone mRNA	235
6.5.4	Affymetrix microarray.....	235
6.5.5	Bovine embryo microarray	236
6.5.6	Histone modifications	236
6.6	DISCUSSION	237
6.6.1	Effects of H1FOO on somatic H1 in cell nucleus	238
6.6.2	Effects of H1FOO on gene expression	239
6.6.3	Modification of histone residues in H1FOO cells	240
6.7	CONCLUSION.....	241
6.8	ACKNOWLEDGEMENTS.....	242
6.9	REFERENCES	243
7	CHAPTITRE #VII: CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	255
7.1	BIBLIOGRAPHIE.....	268

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Schéma représentant un ovaire de mammifère avec les différents stades de croissance et de régression folliculaires.....	4
Figure 1.2. Niveaux d'ARNm maternels et embryonnaires pendant la croissance du jeune embryon bovin	20
Figure 1.3. Formation de l'extrémité 3' d'un ARNm chez les eucaryotes.....	28
Figure 1.4. Formation de l'extrémité 3' d'un ARNm d'histone réplication dépendante.....	30
Figure 1.5. Étapes dans la compaction de l'ADN.....	37
Figure 1.6. Résidus d'acides aminés des histones susceptibles à être modifiés post-traductionnellement chez les mammifères par : acétylation, méthylation, phosphorylation et ubiquitination	52
Figure 1.7. Schéma de nucléosomes avec leurs histones acétylées ou non-acétylées.	54
Figure 1.8. Reprogrammation des niveaux globaux de méthylation de l'ADN des jeunes embryons.....	77
Figure 2.1. Illustration of real-time quantitative RT-PCR amplification curves for one of the triplicates for the H2A gene.....	131
Figure 2.2. Quantification via real-time RT-PCR of histone deacetylase (HDAC1, HDAC2, HDAC3, and HDAC7) bovine embryonic mRNA expression at different preimplantation stages	132
Figure 2.3. Quantification via real-time RT-PCR of histone acetyltransferase (HAT1 and GCN5) bovine embryonic mRNA expression at different preimplantation stages	133
Figure 2.4. Quantification via real-time RT-PCR of histone H2A bovine embryonic mRNA expression at different preimplantation stages.....	134
Figure 3.1. Quantification of HELLS, JMJD1A, JMJD2A, LSD1, METTL3 and PRMT5 mRNA in bovine oocytes and early embryos using real-time RT-PCR	161
Figure 3.2. Quantification of DMAP1, EHMT1, EHMT2, PRMT2, JARID1A and RCOR2 mRNA in bovine oocytes and early embryos using real-time RT-PCR.....	162
Figure 3.3. Quantification of ATF7IP, McCP2 and JARID1B mRNA in bovine oocytes and early embryos using real-time RT-PCR.....	163
Figure 4.1. Representation of Bovine MYST4.....	192
Figure 4.2. RT-PCR analysis of MYST4 mRNA	193
Figure 4.3. Western blot analysis of MYST4 protein.....	194
Figure 4.4. Ovarian localization of MYST4 protein by immunohistochemistry.....	195
Figure 4.5. Quantification of MYST4 and all-MYST4-iso in bovine oocytes and early embryos using real-time RT-PCR.....	196
Figure 4.6. Localization of MYST4 in oocyte and early embryo development	197
Figure 4.7. Testicular localization of MYST4 protein by immunohistochemistry.....	198
Figure 5.1. Comparison of bovine, human and mouse predicted H1FOO protein sequences	219
Figure 5.2. Quantification of H1FOO mRNA in bovine oocytes and early embryos using real-time RT-PCR	220
Figure 5.3. Immunoblotting analysis of H1FOO in different bovine cell lysates.	221
Figure 5.4. Anti-H1FOO specificity	222
Figure 5.5. Localization of histone H1FOO in oocyte and early embryo development....	223
Figure 6.1. Expression of H1FOO in transfected somatic cells.....	247

Figure 6.2. Localization of linker histones in somatic cells expressing H1FOO248

Figure 6.3. Quantification of linker H1o, H1.1, H1.2, H1.4 and H1.5 mRNAs in somatic cells expressing H1FOO249

Figure 6.4. Validation of differentially expressed genes obtained on the Affymetrix microarray.....250

Figure 6.5. Analysis of the bovine embryo microarray.251

Figure 6.6. Histone H3 post-translational modifications in cells expressing H1FOO252

LISTE DES ABRÉVIATIONS

%	pourcentage
ADCL2	achaete-scute homolog 2
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	acide déoxyribonucléique complémentaire
aKG	a-kétoglutarate
ARN	acide ribonucléique
ARNhn	acide ribonucléique nucléaire hétérogène
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
CAF1	chromatin assembly factor 1
CENP-A	centromeric protein A
CFI	cleavage factor I
CFII	cleavage factor II
CGP	cellule germinale primordiale
CL	corps lutéal
COC	complexe ovocyte-cumulus
CPE	élément de polyadénylation cytoplasmique
CPEB	cytoplasmic polyadenylation binding protein
CpG	séquence dinucléotide cytosin-guanine
CPSF	facteur spécifique du clivage et de la polyadénylation
CstF	facteur de stimulation du clivage
CTD	domaine carboxy terminal
DAN	ribonucléase spécifique au poly(A)
DES	down stream element
DMAP-DNMT1-DAXX	death domain-associated protein
DNMT1	acide déoxyribonucléique 5-cytosine-méthyltransférase 1
DNMT3B	acide déoxyribonucléique 5-cytosine-méthyltransférase 3B
Dot1	disruptor of telomeric silencing-1
eCPE	élément de polyadénylation cytoplasmique embryonnaire
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
EM	lignée cellulaire embryonnaire
eRF1	polypeptide chain release factor
ES	cellules souches embryonnaires
Esal	essential Sas family acetyltransferase
EX	lignée cellulaire extra-embryonnaire
FAT	facteur d'acétyltransférase
FelI	Fer II
FIV	fécondation in vitro
FSH	hormone stimulant la folliculogénèse
GNAT	Gcn5-related N-acetyltransferase
GV	vésicule germinale
GVBD	germinal vesicle breakdown
H1FOO	histone H1 spécifique à l'ovocyte
H2A	H2A-bar-body-deficient

H2BFWT	H2B family member W testis specific
HAT	histone acétyltransférase
HDAC	histone déacétyltransférase
HDE	histone downstream element
HELLS	helicase lymphoid specific
Hif1	histone acetyltransferase-interacting factor 1
HKMT	histone lysine méthyltransférase
HMT	histon méthyltransférase
HP1	heterochromatin protein 1
HPLC	high performance liquid chromatography
hTSH2B	human testis-sperm specific H2B
ICM	masse cellulaire interne
JHDM	déméthylase contenant un domaine Jumonji C
JmjC	Jumonji C
LAP	leukemia-associated protein
LH	homome lutéinisante
LSD1	lysine spécifique histone déméthylase
MATER	maternal antigen that embryos require
MeCP2	methyl CpG-binding protein 2
MET	transition maternel embryonnaire
MGA	période mi-préimplantatoire
MI	métaphase I
miARN	micro acide ribonucléique
MII	métaphase II
mm	millimètre
MOF	male-absent on the first
MORF	monocytic leukemia zinc finger protein-related factor
MOZ	monocytic leukemia zinc finger protein
MPF	maturation-phase promoting factor
mRNP	particule ribonucléoprotéique messagère
MYST	MOZ, Yb2f/Sas3, Sas2 et Tip60
MYST4	MORF β
NAP1	nucleosome assembly protein 1
NF-AT3c	nuclear factor of activated T cells
ng	nanogramme
nm	nanomètre
NSN	nonsurrounded nucleolus
p34cdc2	protéine ayant un rôle dans la division cellulaire
PAB II	poly(A) binding protein nuclear I
PABPII	poly(A) binding protein nuclear I
PABPNI	poly(A) binding protein nuclear I
PADI4	peptidylarginine déaminase 4
PAP	poly(A) polymérase
PARN	ribonucléase spécifique au poly(A)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
pg	picogramme

PHD	plant homeodomain-linked
pol II	polymérase II
PRMT	protéine arginine méthyltransférase
RT	transcription inverse
SET	suppressor of variegation, enhancer of zeste et Trithorax
siARN	short interfering acide ribonucléique
Sir2	silent information regulator 2
Sirtuins	Silent information regulator 2-similaires aux déacétylases
SLPB	stem-loop binding protein
SN	surrounded nucleolus
spH2B	sperm specific H2B
SSH	hybridation suppressive et soustractive
TAFII	TATA-binding protein (TBP)-associated factor
µm	micromètre
UsnRNP	ribonucléoprotéine nucléaire riche en uridine
UTR	région non traduite
ZEP100	zinc finger protein 100
ZP	zone pellucide

1 CHAPITRE I : INTRODUCTION

1.1 SECTION #1: L'OVULE ET SON CHEMINEMENT VERS L'EMBRYON

1.1.1 L'ovocyte : cellule unique

Après plusieurs décennies d'étude et de recherche intensive sur la cellule reproductrice femelle, plusieurs questionnements reliés à son étonnant pouvoir de métamorphose restent encore mystérieux. La complexité des mécanismes impliqués dans la formation, la croissance et la maturation de cette cellule pourrait expliquer pourquoi seulement une infime partie des ovocytes du cortège de départ est apte à pouvoir être fécondée et transformée en embryons. Au cours de leur croissance, certains ovocytes semblent acquérir via leur environnement folliculaire la bonne combinaison de compétences, tandis que pour la majorité, ces aptitudes ne seront jamais acquises.

1.1.2 Les cellules germinales primordiales et les ovogonies

Pendant le développement foetal d'un mammifère, les cellules germinales primordiales (CGPs) sont les précurseurs des gamètes mâles et femelles. Partant du tissu extra gonadique, les CGPs migrent et s'amoncellent dans les crêtes génitales situées sur le côté ventral du mésonéphros, lieu où les gonades sont formées (revue, Van Den Hurk et al. 1997). Pendant ce périple, les CGPs prolifèrent par rondes successives de mitose pour atteindre finalement un nombre approximatif de 2.7 millions de cellules diploïdes (2N) dans les ovaires de fœtus bovins (Erickson 1966; Russe 1983). Lorsque les CGP sont englobées à l'intérieur du cortex de la gonade femelle, elles adoptent le nom d'ovogonies. À la fin de leur phase proliférative, les ovogonies poursuivent leur développement en enclenchant la première prophase du processus de méiose, s'appropriant par le fait même le

nom d'ovocyte de premier ordre (Van Den Hurk et al. 1997). Cette prophase est séparée en 5 étapes successives : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse.

Avant la naissance du fœtus, tous les ovocytes primaires sont bloqués au stade diplotène de la prophase I. On estime que des 2.7 millions de CGPs présentes au départ il ne resterait que 420 000 ovocytes dont seulement une infime proportion est destinée à être ovulée (Erickson 1966; Byskov 1986). Chez la vache, les premières ovogonies à entamer la méiose sont perçues au 82^e jour de gestation et sont localisées au centre de l'ovaire (Russe 1983; Byskov 1986). Le passage des ovogonies vers le stade diplotène est accompagné par différents changements structuraux ; on perçoit notamment une augmentation de la dimension de l'ovocyte et du nombre total d'organelles cytoplasmiques (Motta et al. 1997).

On attribue le terme ovogenèse à la conversion d'une ovogonie en ovocyte et finalement en ovule (Byskov 1986). L'ovogénèse nécessite deux phases se déroulant simultanément : la gamétogénèse et la folliculogénèse.

1.1.3 Le follicule primordial

La formation des follicules débute au 4^e mois de gestation chez la vache et coïncide avec l'interruption de la mitose (Betteridge et al. 1989; Van Den Hurk et al. 1997). Chez les ruminants, la quasi totalité des follicules primordiaux se retrouvent au niveau du cortex et sont formés au cours de la vie fœtale, tandis que pour certaines autres espèces (ex : lapin et rongeurs), ils se développent pendant la période néonatale (Marion and Gier 1971; Hirshfield 1991). Lorsque l'ensemble des follicules primordiaux est formé, leur quantité ne cessera de diminuer jusqu'à l'épuisement des réserves lors de la ménopause puisque leur approvisionnement est non-renouvelable. Chacune des vagues de recrutement folliculaire aura comme effet de réduire le nombre d'ovocytes. Cependant une équipe « challenge » cette hypothèse vieille de plus de 135 ans qui stipule que l'ovogenèse cesse peu de temps après la naissance chez le mammifère (Waldeyer 1870), doctrine étant devenue un fondement en biologie reproductive. En effet, le laboratoire du Dr. Tilly a démontré des résultats qui contestent cette idée : selon leurs études, les souris possèdent des cellules

souches germinales prolifératives qui réapprovisionneraient le bagage d'ovocytes dans l'ovaire postnatal (Johnson et al. 2004). Étonnamment cet apport en cellules germinales proviendrait de tissus extra gonadiques, plus précisément de la moelle osseuse (Johnson et al. 2005). Un scepticisme règne par contre dans la communauté scientifique et ces recherches demeurent hautement critiquées (Albertin 2004; Gosden 2004; Greenfield and Flaws 2004; Telfer 2004; Ainsworth 2005; Byskov et al. 2005; Gougeon 2005; Powell 2005; Telfer et al. 2005; Skaznik-Wikiel et al. 2007; Vogel 2005). Comme pour toute nouvelle découverte qui démantèle une idéologie classiquement acceptée, elle demeure à être confirmée par d'autres équipes.

Pour revenir au follicule primordial, l'ovocyte contenu dans celui-ci est entouré par une couche cellulaire simple constituée de 14 à 29 cellules somatiques aplaties (Figure 1). Les cellules formant cette enveloppe se nomment cellules de la granulosa et sont séparées des autres tissus somatiques par une membrane (lame) basale (Van Den Hurk et al. 1997). On attribut le terme « dormant » à un ovocyte compris à l'intérieur de cette structure, puisque ce dernier peut demeurer en latence pour une période avoisinant le demi-siècle avant d'être recruté lors de la folliculogénèse (Erickson 1966). Le nom d'ovocyte en GV (vésicule germinale) est attribué à un ovocyte primaire immobilisé au stade diplotène à l'intérieure d'un follicule (primordial, primaire, secondaire ou tertiaire). Le diamètre d'un follicule primordial varie entre 30 et 50 μm , tandis que celui de l'ovocyte compris à l'intérieur varie entre 20 et 35 μm (Figueiredo et al. 1993).

1.1.4 Le follicule primaire

Tandis que la population de follicules primordiaux demeure en formation, certains d'entre eux proprement constitués sont recrutés et abandonnent leur état latent. (Russe 1983; Fortune et al. 2000). Chez la vache cette activation folliculaire se déroule à partir du 140^e jour de gestation. En effet, quotidiennement, environ 6 follicules primordiaux sont recrutés et désertent leur état stationnaire afin de progresser au prochain stade de folliculogénèse (Scaramuzzi et al. 1980). La simple couche de cellules de granulosa aplaties visible dans le follicule primordial est graduellement substituée, dans le follicule primaire, par des cellules

de granulosa cuboïdes plus volumineuses et plus abondantes (27 à 58) (Figure 1.1) (Van Den Hurk et al. 1997; Van den Hurk et al. 2000). Suite à cette transition, le diamètre du follicule primaire (40 à 60 μm) ainsi que celui de l'ovocyte (30 à 40 μm) subissent une augmentation (Figueiredo et al. 1993). Lorsqu'amorcée, cette progression

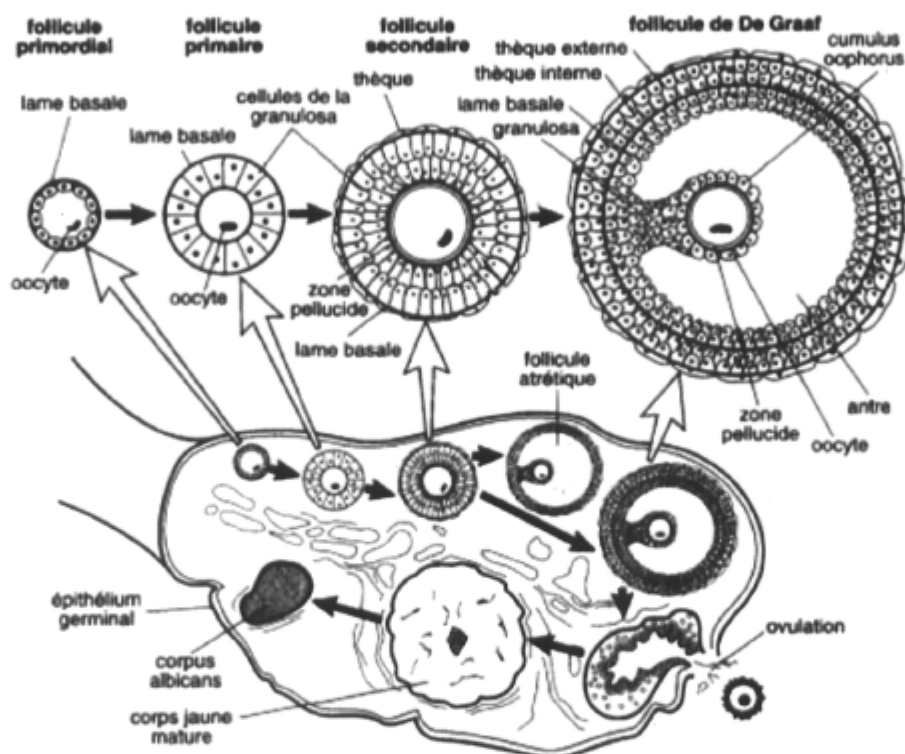


Figure 1.1. Schéma représentant un ovaire de mammifère avec les différents stades de croissance et de régression folliculaires. Les flèches pleines indiquent le cheminement qu'emprunte le follicule primaire pour se rendre au corps albicans (corps blanc). Image tirée et adaptée de Guénard et al. 1996.

folliculaire demeure active pour le reste de la vie reproductive de la vache (Gougeon 1993). On remarque à la surface des ovocytes, la présence de microvillosités qui entrent en contact avec les cellules folliculaires assises sur une mince lame basale séparant le follicule du tissu conjonctif (Sathananthan et al. 2006). Des prolongements émanent aussi des cellules folliculaires et pénètrent dans le cytoplasme de l'ovocyte (ooplasme) (Motta et al. 1994; 1995). Ces prolongements appelés jonctions communicantes ou « gap junctions »

permettent le passage de petites molécules entre l'ovocyte et les cellules de granulosa du follicule (Anderson and Albertini 1971; Gilula et al. 1978). On dénote qu'en périphérie de l'ovocyte une membrane protéique entame sa formation (Baker 1971).

1.1.5 Le follicule secondaire

Au fur et à mesure que les cellules de granulosa prolifèrent dans le follicule, elles recouvrent l'ovocyte par de multiples couches. Lorsque plusieurs couches de ces cellules sont apparentes sur l'ovocyte, le follicule secondaire succède au primaire (Figure 1.1). Chez l'espèce bovine cette enveloppe peut atteindre jusqu'à 6 couches. Le follicule secondaire se manifestant au 210^e jour chez la vache et atteint alors une dimension de 150 µm tandis que l'ovocyte, lui, fait 60 µm de diamètre (Russe 1983; Van Den Hurk et al. 1997). À cette période les cellules folliculaires sont supportées par une lame basale plus dense et se dissocient de l'ovocyte suite à l'achèvement de la couche de glycoprotéines (zone pellucide) la recouvrant. Les microvillosités de l'ovocyte s'infiltrant dans la zone pellucide alors que les jonctions communicantes provenant des cellules folliculaires la traversent (Sathananthan et al. 2006). Dans les étapes préliminaires du follicule secondaire, les cellules du tissu conjonctif présentes à l'extérieur du follicule s'organisent parallèlement à la membrane de la lame basale afin de former une strate de cellules nommée la thèque interne (Van Den Hurk et al. 1997). Les ovocytes compris dans ce stade folliculaire démontrent les premiers signes détectables de synthèse d'ARN messager (ARNm).

1.1.6 Le follicule tertiaire

Avec la croissance du follicule, les multicouches de cellules enveloppant l'ovocyte évoluent et deviennent de plus en plus complexes. Deux types distincts de cellules de thèque sont perceptibles ; l'externe, et l'interne qui devient hautement vascularisé (Figure 1.1). Parallèlement, la perméabilité de la lame basale s'accroît, occasionnant l'infiltration d'un filtrat de sang et de lymphes dans le follicule. Le liquide s'accumule dans une cavité nommée antra, et remplit progressivement l'espace intercellulaire. La formation de cet antra a comme effet de compartimenter deux populations distinctes de granulosa, le cumulus

oophorus et la granulosa pariétale. Les cellules de cumulus enveloppent l'ovocyte et leur première couche, appelée la corona radiata, entre directement en contact avec la zone pellucide. De leur côté, les granulosa pariétales tapissent le mur du follicule et rattachent le complexe ovocyte-cumulus (COC) à ce dernier (revue, Makabe et al. 2006). Chez le bovin cet ancre est décelé au 230^e jour et on le retrouve à l'intérieur de follicules variant entre 120 et 280 μm de diamètre (Russe 1983; Lussier et al. 1987; Monniaux et al. 1997). A ce stade, le follicule et son ovocyte se développent de façon parallèle. Cependant, dans le follicule tertiaire, lorsque l'ovocyte atteint une dimension de 110 μm il ralentit considérablement sa croissance comparativement au follicule qui continue à prendre de l'expansion. L'ovocyte primaire bovin peut atteindre une taille maximale de 120 à 130 μm de diamètre, tandis que le follicule avant sa rupture mesure entre 15 et 20 mm (Fair 2003). À un certain point pendant la croissance du follicule tertiaire (environ 8 à 9 mm) les cellules de la granulosa présentent des récepteurs pour la LH (Ireland and Roche 1983).

L'ovocyte enfermé dans le follicule tertiaire est transcriptionnellement actif chez le bovin, et cette activité est en directe corrélation avec sa période de croissance. La synthèse d'ARNm ayant d'abord été perçue dans l'ovocyte du follicule secondaire demeure effective jusqu'au moment où l'ovocyte atteint 110 μm de diamètre, dans un follicule tertiaire de 2 à 3 mm (Fair et al. 1995; 1996). La transcription dans l'ovocyte diminue graduellement, mais l'ARNm accumulé durant cette phase de croissance est déterminant pour le développement futur, puisque les ovocytes ne l'ayant pas complété ne peuvent atteindre le stade de blastocyste lors de protocole de fécondation in vitro (FIV) (Pavlok et al. 1992; Lonergan et al. 1994; Fair and Hyttel 1997).

1.1.7 Le cycle œstral

Chez la vache, le cycle œstral se prolonge en moyenne sur une période de 21 jours et est composé de deux phases : la phase lutéale et la phase folliculaire (revue, Thibault and Levasseur 2001). La phase lutéale débute après l'ovulation et se poursuit jusqu'au jour 16 à 18. Suite à l'expulsion de l'ovocyte, il y a formation du corps jaune ou lutéal (CL) au niveau du follicule déhiscent. Les cellules de granulosa du CL sécrètent une forte

concentration de progestérone qui varie en fonction du cycle. La progestérone agit au niveau de l'endomètre afin que ce dernier conserve et densifie la muqueuse utérine pour accueillir l'embryon. L'absence de fécondation entraîne la lutéolyse, coupant par le fait même toute production de progestérone. Cependant, la fécondation de l'ovule amène le CL à subsister et à produire la progestérone. Pendant la phase folliculaire, vers le jour 18 du cycle, le follicule en croissance sécrète l'estrogène responsable de la prolifération de l'endomètre. À la fin de cette période de prolifération, un pic d'estradiol vient simuler le relâchement de la LH (hormone lutéinisante) afin d'induire l'ovulation. (revue, Thibault and Levasseur 2001)

1.1.8 Les vagues folliculaires

À chaque cycle œstral, l'ovaire bovin produit de 2 à 3 vagues folliculaires qui durent chacune de 8 à 10 jours (Moore and Thatcher 2006). Une vague folliculaire, où une cohorte de follicules antraux sont recrutés de façon synchrone, comprend trois étapes séparées : le recrutement, la sélection et la dominance folliculaire (Ginther et al. 2001). Dans l'émergence d'une vague folliculaire composée de 5 à 10 follicules chez la vache, ce sont des follicules de plus de 4 mm qui sont recrutés suite à une réponse aux hormones gonadotrophines en circulation. L'hormone FSH (hormone stimulant la folliculogénèse) est l'hormone qui amorce cette recrudescence folliculaire (Ginther et al. 1996). Lorsque les niveaux de FSH sont inhibés par l'estradiol et l'inhibine sécrétées par le nouveau groupe de follicules, l'éventuel follicule dominant a déjà substantiellement accru sa quantité de récepteurs à la LH contrairement à ses subordonnés (Hunter et al. 2004). Ces nouveaux récepteurs lui permettent d'accroître son développement, contrairement aux autres follicules, grâce à un changement dans sa dépendance aux gonadotrophines qui passe de la FSH à la LH (Ginther et al. 1996).

1.1.9 L'ovulation

Lorsque le follicule dominant bovin est sur le point d'expulser son ovocyte, il a atteint une taille de plus de 15 mm approchant parfois même les 20 mm (Fair 2003). De son côté, la

cohorte de follicules subordonnés demeurés statiques suite à la sélection du follicule dominant sera progressivement éliminée par atresie. Cette mort cellulaire programmée (apoptose) survient suite à l'activation d'enzymes protéolytiques, qui interviennent à deux niveaux : au noyau en activant des endonucléases et dans le cytoplasme en clivant des protéines de structure ou de fonction (Quirk et al. 2004). L'ovulation du follicule dominant est déclenchée de 29 à 31 h suivant le pic de LH (Driancourt 2001). Cette augmentation soudaine de la LH signifie aussi que l'ovocyte entreprend son développement final : expansion des cellules de cumulus, dégagement de la corona radiata de la membrane de l'ovocyte et formation de l'espace périvitellin (Fair 2003). L'influx de LH ou bien l'enlèvement de l'ovocyte de son milieu folliculaire provoque une réactivation du cycle de la méiose qui a comme résultat de faire progresser l'ovocyte primaire bloqué au stade diplotène de la prophase I vers le stade de métaphase II (MII) (revue, Thibault and Levasseur 2001).

1.1.10 La maturation nucléaire

La maturation nucléaire se déroule pendant la dernière étape de la prophase, c'est-à-dire la diacinèse, et implique la reprise de la méiose. La méiose a comme but de réduire le bagage génétique (2N) de l'ovocyte afin de produire une cellule haploïde (1N). Le premier signe évident de la reprise de la méiose survient au niveau de la membrane nucléaire, lorsque celle-ci se fragmente avant de complètement disparaître. Parallèlement, les chromosomes se condensent, puis on perçoit le fuseau métaphasique (métaphase I) formé en association avec l'organisation des microtubules. Les étapes qui suivent se succèdent rapidement : les chromosomes se séparent et migrent à leur pôle respectif (anaphase I), un des 2 pôles est ensuite englobé par une partie de la membrane plasmique et forme le premier globule polaire qui est expulsé (télophase I). L'ovocyte demeure arrêté en MII de la méiose jusqu'au moment où il sera fécondé (revue, Thibault and Levasseur 2001).

1.1.11 La reprise de la méiose

La reprise de la méiose est contrôlée par un facteur qui permet la phase de maturation (MPF; maturation-phase promoting factor), un complexe protéique composé de deux sous-unités, la p34cdc2 (rôle catalytique) et la cycline B1 (rôle régulateur). Malgré la présence de deux types de cycline chez le mammifère (B1 et B2), la production de souris déficientes pour ces gènes révèle qu'uniquement la cycline B1 est essentielle au développement (Brandeis et al. 1998). Dans l'ovocyte en GV, l'ARNm des deux composantes du complexe MPF est largement accumulé (Robert et al. 2002), cependant, contrairement à p34cdc2, la forme protéique de la cycline B1 n'est pas présente (Levesque and Sirard 1996; Robert et al. 2002; Paradis et al. 2005; Tremblay et al. 2005). Par contre après seulement 3 h de maturation, on détecte la présence de la protéine cycline B1 (Levesque and Sirard 1996), indiquant ainsi que sa synthèse protéique est potentiellement contrôlée pendant la maturation. En effet, la traduction de la cycline B1 est dictée par la polyadénylation de son ARNm pendant cette période (Tremblay et al. 2005).

Pour ce qui est de l'activité kinase du MPF, elle est en relation directe avec l'augmentation des niveaux de l'histone H1 kinase (de Vanterly et al. 1997). Chez la vache cette montée des niveaux de H1 kinase se manifeste lors de la dissolution de la GV au stade GVBD (germinal vesicle breakdown) (Kalous et al. 1993). Il y a d'abord une accumulation des composantes du MPF au début de la maturation, puis l'activité H1 kinase sous l'action de p34cdc2 atteint son apogée en métaphase I (MI). Après la GVBD, on perçoit la première étape de la maturation de l'ovocyte : la condensation des chromosomes. Ce changement drastique de morphologie est essentiel pour la ségrégation adéquate de ces derniers. Certains indices suggèrent que la phosphorylation de l'histone H1 serait impliquée dans la condensation des chromosomes lors de la maturation (revue, Motlik et al. 1998). Le passage de la métaphase à la phase d'anaphase de l'ovocyte est marqué par une baisse de l'activité du MPF, par contre lorsque cette activité reprend l'ovocyte expulse son premier globule polaire et la maturation s'immobilise en MII (Wu et al. 1997).

1.1.12 La maturation cytoplasmique

L'évolution se déroulant à l'intérieur de l'ovocyte pendant les jours qui précèdent et qui suivent le pic de LH a pour but d'assembler les effectifs requis pour que l'ovocyte en GV puisse supporter la fécondation et le développement embryonnaire jusqu'à l'activation du génome embryonnaire. Contrairement à la maturation nucléaire, la maturation cytoplasmique demeure un concept encore complexe et nébuleux (revue, Sirard et al. 2006). Plusieurs organelles sont affectées lors de cette période. Les granules corticaux s'accumulent en périphérie de la membrane plasmique, tandis que les mitochondries, les gouttelettes lipidiques et les appareils de Golgi quittent les parois pour migrer vers la région périnucléaire (Assey et al. 1994; Hyttel et al. 1997).

1.1.13 La fécondation

La pénétration de la zone pellucide par le spermatozoïde est une étape critique de la fécondation. Une fois la zone traversée, le gamète mâle entre en contact avec la membrane plasmique et une réaction de fusion est déclenchée permettant au spermatozoïde d'être absorbé par l'ovule. Cette union déclenche, à l'intérieur de l'ovule, une oscillation dans la concentration du calcium intracellulaire. L'élévation du calcium libre se traduit par l'activation de l'ovule qui provoque un relâchement des granules corticaux afin de prévenir la polyspermie, la reprise et l'achèvement de la méiose ainsi que la formation des pronoyaux (Schultz and Kopf 1995).

On a longtemps pensé que le spermatozoïde n'apportait qu'une contribution génétique lors de son infiltration à l'intérieur de l'ovule. Cependant, cet apport n'est pas le seul puisque des éléments importants sont aussi véhiculés du spermatozoïde à l'ovule ; entre autre une phospholipase (PLCzeta) impliquée dans l'oscillation du calcium intracellulaire de l'ovule (Cox et al. 2002) et le centrosome spermatique jouant un rôle critique dans l'assemblage des microtubules dans le zygote (Simerly et al. 1995). La présence d'ARNm dans le spermatozoïde soulève aussi une polémique. En effet, quelles fonctions ces ARNm pourraient-ils posséder puisque la machinerie traductionnelle du spermatozoïde mature est non fonctionnelle? Certaines hypothèses stipulent que cet ARNm pourrait avoir un rôle

immédiatement après la fécondation ou plus tard dans le développement embryonnaire, mais ce rôle n'a pu être confirmé (Miller and Ostermeier 2006).

Les chromosomes à l'intérieur du spermatozoïde sont étroitement empaquetés par des protéines structurales nommées protamines. Au cours de la spermatogénèse, les histones constituant la chromatine des cellules spermatiques sont remplacées graduellement par les protamines. Les protamines sont non seulement déterminantes pour la condensation, mais aussi pour la stabilisation de l'ADN dans le noyau du spermatozoïde (Braun 2001). Lorsque le spermatozoïde entre en contact avec le cytoplasme de l'ovule arrêté en MII, le noyau paternel est décondensé par le remplacement des protamines par les histones du cytoplasme ovocytaire (Collas and Poccia 1998). Des signes de ce remplacement sont perçus 5 min après avoir injecté un spermatozoïde dans un ovule de souris mature. En effet, l'histone H1 spécifique à l'ovocyte (H1FOO) s'agglomère rapidement sur le bagage génétique paternel nouvellement arrivé dans le cytoplasme ovocytaire. Quelques minutes plus tard (30 à 60 min), la chromatine spermatique est totalement décondensée et l'histone H1FOO y est hautement concentrée (Gao et al. 2004).

1.1.14 Le développement embryonnaire

La rencontre du spermatozoïde (1N) et de l'ovule (1N) résulte en la formation d'un embryon 1-cellule nommé zygote (2N). La division cellulaire de ce zygote et des autres embryons est dictée par la mitose. Dès la fécondation, ce processus est enclenché et résulte en un clivage symétrique du zygote en un embryon 2-cellules. Une augmentation exponentielle du nombre de cellules (blastomère) découle de ces clivages, et pendant les premières étapes du développement du jeune embryon, les blastomères deviennent progressivement de plus en plus petits. Au départ, on distingue très bien les différentes unités cellulaires des embryons de stade 2-, 4-, 8- et 16-cellules, alors qu'à partir du stade morula la compaction des blastomères rendent leur différenciation plus ardue. Les divisions se poursuivent au sein de la morula, et une cavité apparaît (blastocœle). La venue de cette cavité est caractéristique du stade blastocyste. Cet embryon est constitué d'une couche externe de cellules épithélioïdes qui entoure la cavité et d'un amoncellement de

cellules non différenciées situé d'un côté de l'embryon : la masse cellulaire interne (ICM) ou bouton embryonnaire. Tout au long des différents clivages la taille globale de l'embryon ne change pas, puis avec l'arrivée du blastocyste l'embryon prend de l'expansion afin de rompre la zone pellucide et éclore.

1.1.15 L'acquisition par l'ovocyte de la compétence au développement

Ce ne sont pas tous les ovocytes présents dans l'ovaire qui pourront un jour devenir être vivant à part entière. Par contre, ceux qui réussiront auront préalablement acquis leur compétence au développement. Ce processus ovocytaire est complexe et est acquis de façon progressive pendant la croissance de l'ovocyte et du follicule. Elle se traduit par l'aptitude d'un ovocyte à accomplir adéquatement différentes étapes comprises dans la maturation, la fécondation et la croissance embryonnaire. Si l'ovocyte réussit à compléter cet itinéraire sans embuches, il pourra ensuite potentiellement en découler un individu vivant sain.

On peut se servir de la taille d'un ovocyte pour estimer sa compétence au développement. Chez le bovin, un ovocyte de moins de 100 μm de diamètre a un potentiel de développement presque nul, cependant on remarque que ce potentiel s'accroît au fur et à mesure que la taille de l'ovocyte augmente (Fair 2003). Parallèlement la proportion d'ovocytes qui franchissent certaines étapes cruciales, comme le stade MII ou le premier clivage embryonnaire, progresse également avec l'expansion de l'ovocyte (Fair 2003). Le potentiel minimal de compétence au développement in vitro est atteint lorsque le diamètre de l'ovocyte est de 120 μm (Otoi et al. 1997; Fair 2003). Par contre il semble y avoir une certaine limite, puisque les taux de blastocystes optimaux (30%) obtenus avec des ovocytes de 125 à 130 μm chutent drastiquement à 0% lorsque ceux-ci dépassent les 130 μm (Otoi et al. 1997).

Afin de faciliter et d'améliorer les protocoles de FIV bovine, la taille folliculaire peut aussi être prise en considération. En effet cette mesure s'avère un bon indice de compétence puisque les ovocytes provenant de follicules de dimensions variables ne possèdent pas la

même capacité de développement. Les ovocytes récupérés de follicules plus petits que 2 mm sont incapables d'atteindre le stade de blastocyste, tandis que ceux provenant de follicules compris entre 4 à 8 mm donnent des taux moyens de 35% (Pavlok et al. 1992; Lonergan et al. 1994). Cette compétence est d'autant plus accrue si on récupère des ovocytes découlant de follicules supérieurs à 6 mm de diamètre. Les taux d'obtention de blastocystes pour ces ovocytes est de 43%, comparativement à 23% pour ceux compris dans des follicules de 4 mm (Lequarre et al. 2005).

Certains critères morphologiques du complexe ovocyte cumulus (COC) sont aussi utilisés afin de prédéterminer la compétence d'un ovocyte. On distingue 6 classes de COC (Blondin and Sirard 1995) : 1) Les COC avec cumulus compact et un ooplasme homogène, 2) Les COC avec un cumulus compact et des zones plus foncées en périphérie de l'ooplasme, 3) Les COC avec un cumulus en début d'expansion et un ooplasme légèrement granuleux, 4) Les COC avec un cumulus en complète expansion comprenant des agrégats foncés et un ooplasme très granuleux, 5) Les COC avec très peu de cumulus et un ooplasme très variable et 6) Les COC sans cumulus et avec un ooplasme très variable. Quoique les 6 classes de COC aient la capacité de produire des embryons, on constate que certaines ont un potentiel supérieur. Étonnamment, ce ne sont pas les COC nantis d'un cumulus compact et d'un ooplasme plus homogène (classe 1 et 2) qui démontrent les meilleurs taux de développement, mais plutôt ceux avec un cumulus en légère expansion et un ooplasme granuleux (classe 3) (Blondin and Sirard 1995).

1.1.16 La reprogrammation nucléaire

La reprogrammation est le principe fondamental derrière le transfert nucléaire. On ignore pour l'instant quels facteurs présents dans l'ovocyte sont responsables d'initier la conversion de profils de modifications épigénétiques retrouvés sur le génome d'une cellule mature différenciée en un non différencié. La faculté de totipotence que possède l'ovocyte et le pouvoir de l'infliger à un génome dit somatique par reprogrammation demeure d'ailleurs un mystère. Même si certaines études démontrent que les cellules souches embryonnaires peuvent conférer un certain niveau de reprogrammation aux noyaux de

cellules différenciées (Cowan et al. 2005; Tada and Tada 2006), il en demeure que l'ovocyte est la seule cellule possédant la capacité de prendre un génome somatique et de lui conférer un état embryonnaire. Généralement on associe un faible taux de réussite aux divers protocoles de transfert nucléaire (moins que 5%) (Mann and Bartolomei 2002). Une piètre reprogrammation du noyau nouvellement introduit dans l'ovocyte serait responsable des problèmes reliés au transfert nucléaire (Review in Armstrong et al. 2006; Mann and Bartolomei 2002; Meissner and Jaenisch 2006). Des analyses conduites sur des embryons clonés démontrent que ces derniers présentent diverses anomalies épigénétiques. Par exemple, les embryons bovins clonés présentent une hyperméthylation des résidus lysines 9 (K9) des histones H3 ainsi qu'une hyperméthylation globale de l'ADN (Santos et al. 2003). On a aussi noté que certains transcrits d'ARNm (DNMT3a, DNMT3b, HAT1 et HDAC1) sont hyper exprimés dans les embryons de bison (*Bubalus bubalis*) issus de transfert nucléaire comparativement à ceux produits par fécondation in vitro (Suteevun et al. 2006). Que ce soit par la méthylation de l'ADN, le remodelage de la chromatine ou la modification des résidus d'histones, les problèmes retrouvés chez les embryons clonés sont étroitement reliés aux nombreuses altérations pouvant être apportées à la chromatine.

1.2 SECTION #2: L'EXPRESSION GÉNIQUE DANS L'OVOCYTE ET L'EMBRYON AVANT, PENDANT ET APRÈS LA TRANSITION MATERNELLE EMBRYONNAIRE

Dès la reprise de méiose, l'activité transcriptionnelle de l'ovocyte devient indétectable. Ce dernier ne produit dorénavant plus de transcrits d'ARNm et cette activité de synthèse reprendra seulement lorsque le génome embryonnaire sera activé. Les facteurs transcriptionnels requis pour compléter la méiose, la fécondation et les premiers clivages embryonnaires reposent donc sur ceux emmagasinés au cours de l'ovogenèse et la folliculogénèse. Graduellement, le génome embryonnaire est activé et le contrôle génique passe sous la dictature unique de l'embryon lorsque la transition maternelle embryonnaire (MET) est complète.

1.2.1 La contribution maternelle

Parallèlement aux stades folliculaires qui progressent (du primordial au tertiaire), l'ovocyte entreprend une phase de croissance fondamentale pour le futur développement de l'embryon. Pendant cette phase évolutive, l'ovocyte démontre un haut rythme de transcription et de traduction menant à la production d'ARN et de protéines. Les éléments produits sont non seulement indispensables pour subvenir aux besoins immédiats de l'ovocyte, mais ils sont également stockés afin d'être utilisés ultérieurement.

1.2.2 La synthèse et l'accumulation des ARNm maternels dans l'ovocyte

On sait que l'ovocyte primaire contenu dans le follicule primordial est transcriptionnellement inactif ou dormant, puisque son incubation avec de l'uridine tritiée ne permet aucune détection d'incorporation d'isotope par l'ARN (Fair et al. 1997a). Le nucléole à l'intérieur cet ovocyte, présente des structures (composantes granulaires)

impliquées dans l'assemblage des ARNr (ARN ribosomiaux), cependant les composantes (centres fibrillaires) nécessaires à l'initiation de la transcription des gènes ribosomiaux sont encore absentes. Chez la souris, ces centres fibrillaires sont déjà présents dans les follicules de stades primordiaux et primaires (Chouinard 1971). De plus, comparativement au bovin, l'ovocyte de souris démontre déjà une transcription active lors de la transition folliculaire primordiale à primaire. Au cours de cette période, la transcription initiale de plusieurs gènes murins spécifiques à l'ovocyte a été décelée. Des gènes critiques dans la folliculogénèse, comme *Gdf9*, sont transcrits et traduits (revue, Pangas and Rajkovic 2006). Comparativement, l'ovocyte bovin du follicule primaire demeure dans un état transcriptionnellement quiescent. L'observation de centres fibrillaires dans certains ovocytes indique par contre une initiation possible de synthèse d'ARN ribosomiaux (Fair et al. 1997b). Les premiers signes tangibles de synthèse d'ARNr et d'ARN nucléaire hétérogène (hnRNA, précurseur des ARNm), détectés par autoradiographies, se manifestent dans l'ovocyte primaire du follicule secondaire. Plus loin dans le développement de l'ovocyte, dans le follicule tertiaire, le marquage de l'ARN indique que la transcription s'est maintenant intensifiée. Cette synthèse persiste jusqu'au moment où le follicule atteint une taille d'environ 3 mm (Fair et al. 1997b; Fair 2003).

La dimension de l'ovocyte est aussi indicatrice de l'état de synthèse des ARN. En effet, la transcription demeure peu active dans l'ovocyte primaire, et ce aussi longtemps qu'il n'atteint pas une taille de 50 à 60 μm (Hyttel et al. 2001; Fair 2003). La synthèse d'ARN s'intensifie avec l'augmentation de la taille de l'ovocyte, et les niveaux maximums sont enregistrés lorsque l'ovocyte présente un diamètre de 80 à 100 μm (Fair et al. 1996). Dans les ovocytes de 100 à 110 μm on perçoit une réduction du niveau de transcription, tandis qu'aucune synthèse n'est détectée dans les ovocytes de 110 à 120 μm (Fair et al. 1996). Cependant, certaines études démontrent que ces ovocytes ont toujours une synthèse d'ARN clairement active (Memili et al. 1998; Tomek et al. 2002).

Tel que mentionné ci-haut, les ARN qui ne sont pas immédiatement utilisés pendant la période de transcription active de l'ovocyte sont entreposés pour un usage subséquent. Plusieurs ont tenté de mesurer quantitativement l'ARN entreposé à l'intérieur de l'ovocyte.

Toutefois, les quantités détectées sont très variables d'une étude à l'autre. Chez la souris la quantité d'ARN total est estimée à environ 0.47 à 0.6 ng (Sternlicht and Schultz 1981; Olszanska and Borgul 1993), tandis que chez la vache on retrouve des quantités supérieures variant de 0.98, 1.9 et 2.4 ng (Olszanska and Borgul 1993; Bilodeau-Goeseels and Schultz 1997; Lequarre et al. 2004). La quantité d'ARNm polyadénylés représenterait approximativement 5% de l'ARN total d'un ovocyte bovin et 8% pour celui de souris (Picton et al. 1998). La reprise de la méiose ne semble pas affecter la quantité d'ARN total de l'ovocyte, cependant il semble y avoir un processus de déadénylation puisque l'ARNm polyadénylé (poly(A)) diminue de moitié tant chez la souris que chez le bovin (53 à 25 pg) (Bachvarova and De Leon 1980; Lequarre et al. 2004). Le processus inverse se produit aussi, alors que certains transcrits sont polyadénylés durant la maturation (Brevini et al. 2002; Tremblay et al. 2005).

Suite à leur transcription par l'ARN polymérase II, les pré-ARNm doivent subir plusieurs modifications qui dicteront s'ils seront traduits ou stockés. Les différentes modifications apportées sont l'addition de la coiffe, l'épissage et la formation de l'extrémité 3' (vues en détails dans la section # 3).

1.2.3 La synthèse et l'accumulation des protéines

Quoique le contrôle de la synthèse protéique soit important au cours du développement, il est encore plus critique pendant la croissance de l'ovocyte. Pendant cette période, certaines protéines essentielles sont produites afin que l'ovocyte puisse un jour être ovulé et fécondé. Tout comme pour l'ARN, les protéines produites sont accumulées pour un usage éventuel ou utilisées sur le champ.

Comparativement à l'ARN, la détection de synthèse protéique pendant l'ovogénèse est effectuée de façon singulière. Habituellement les protéines étudiées sont mises en évidence à l'aide d'anticorps spécifiques sur des coupes de tissus (immunohistochimie). La synthèse protéique dans l'ovogénèse peut être perçue aussi tôt que dans les CGPs. Malgré une production protéique très limitée, les CGPs produisent certaines protéines qui leurs sont

propres : les DAZ. Le gène *Dazl* est impliqué dans la formation des CGPs et sa délétion chez la souris résulte en une absence d'ovocytes et de spermatozoïdes (Ruggiu et al. 1997; Houston and King 2000). En avançant temporellement dans le développement folliculaire et ovocytaire, l'ovocyte primaire traduit de plus en plus de protéines qui lui sont spécifiques. Par exemple, dans l'ovocyte du follicule primaire bovin, on détecte la présence de MATER (maternal antigen that embryos require) qui est nécessaire au développement embryonnaire (Pennetier et al. 2006). Les protéines de la zone pellucide (ZP) y sont également produites puisqu'on distingue les premières ébauches de la membrane (Baker 1971). La synthèse protéique s'intensifie dans le follicule secondaire ; les protéines de la ZP sont de plus en plus produites (Sathananthan et al. 2006) et la formation de granules corticaux, qui joueront un rôle capital afin d'empêcher la polyspermie lors de la fécondation, s'entame (Fair et al. 1997b). L'ovocyte toujours en croissance à l'intérieur du follicule tertiaire possède encore une forte production de protéines, on remarque la présence de plusieurs organites reliés à la synthèse de protéines comme les réticulum endoplasmiques rugueux et l'appareil de Golgi (Sathananthan et al. 2006). Puis avec la croissance du follicule dominant, à l'approche de sa taille maximale, plusieurs changements surviennent au niveau des organites cellulaires de l'ovocyte. Par exemple, les granules corticaux sont maintenant localisés en périphérie et les appareils de Golgi rapetissent. Les derniers moments du follicule dominant lors la période pré-ovulatoire sont marqués par une diminution plus accrue de la dimension des appareils de Golgi (Fair 2003). Puisqu'ils sont impliqués dans certaines modifications post-traductionnelles (ex : glycolysation) ainsi que dans le contrôle de la sécrétion des protéines, leur diminution coïncide avec une réduction de la synthèse protéique.

Malgré l'absence de transcription pendant la maturation, une production protéique est essentielle dans le processus de reprise de la méiose et dans la poursuite du développement de l'ovocyte bovin. Étrangement, l'ovocyte de souris n'a pas besoin de cette nouvelle mise en marche de l'appareil traductionnel (Fulka et al. 1986). Pendant la reprise de la méiose, la synthèse protéique de l'ovocyte bovin s'effectue activement à partir des ARNm stockés dans son cytoplasme. En culture in vitro, la présence d'inhibiteurs de traduction dans le milieu de maturation empêche l'ovocyte bovin de reprendre la méiose (Hunter and Moor

1987; Sirard et al. 1989). La synthèse de protéines se révèle un processus indispensable pour chacune des étapes de la méiose afin que l'ovocyte bovin complète sa maturation au stade MII (Sirard et al. 1989; Lonergan et al. 1998).

On dénote aussi que le niveau de synthèse protéique est plus élevé dans les premières heures de la maturation chez l'ovocyte bovin et ceci jusqu'à la formation de la MI (8 à 12 h). En fait, on peut diviser la synthèse protéique en trois patrons majeurs lors de la maturation d'ovocytes bovins : la période pré-GVBD (0 à 4 h), la transition GVBD et MI (4 à 16 h) et finalement la période post-MI (16 à 28 h) (Coenen et al. 2004). Le fait que certaines protéines sont produites pendant toute la maturation alors que d'autres sont seulement spécifiques à certaines étapes démontre d'autant plus que la reprise et l'achèvement de la méiose nécessite la production de nouvelles protéines. De ces protéines, la moitié ne sera plus synthétisée par le jeune embryon pré-MET (Massicotte et al. 2006).

1.2.4 Le début de l'activité transcriptionnelle dans l'embryon

Puisque l'activité transcriptionnelle est inhibée dans les ovocytes qui ont atteint leur taille maximale (Fair et al. 1996), le développement du jeune embryon dépend des transcrits maternels accumulés lors de la croissance ovocytaire (Figure 1.2). La synthèse de protéines nécessaires pour les premières étapes de clivage est régulée par cette réserve héritée du cytoplasme de l'ovocyte. Il a été démontré que les ARNm maternels stockés sont suffisants pour permettre à l'embryon de se développer jusqu'aux stades 8- à 16-cellules. En effet, l'ajout de l'inhibiteur de transcription α -amanitine à des embryons 1-, 2-, 4-, ou 8-cellules permet quand même un développement embryonnaire jusqu'au stade 8- à 16-cellules mais empêche la formation de blastocystes (Barnes and First 1991; Memili et al. 1998). La relance de la synthèse des ARNm est dite embryonnaire puisque les transcrits nouvellement produits découlent entièrement du génome de l'embryon.

Chez le bovin, la reprise de la transcription du jeune embryon a généré plusieurs débats. On retrouve dans la littérature des études contradictoires au sujet du stade embryonnaire

correspondant à cette fameuse activation du génome de l'embryon (Kopecny et al. 1989; Barnes and First 1991; Hyttel et al. 1996). Finalement le débat fut clos lorsqu'on réalisa que la mise en place de cette activation transcriptionnelle s'effectuait en deux étapes successives. Dès la fécondation de l'ovocyte, des facteurs maternels initient une série d'événements menant au réveil du programme embryonnaire (Kao et al. 2000). Il y a d'abord une production plutôt mineure de messagers, suivie par une production massive (Figure 1.2). Cette synthèse massive survient suite à l'activation transcriptionnelle majeure qui

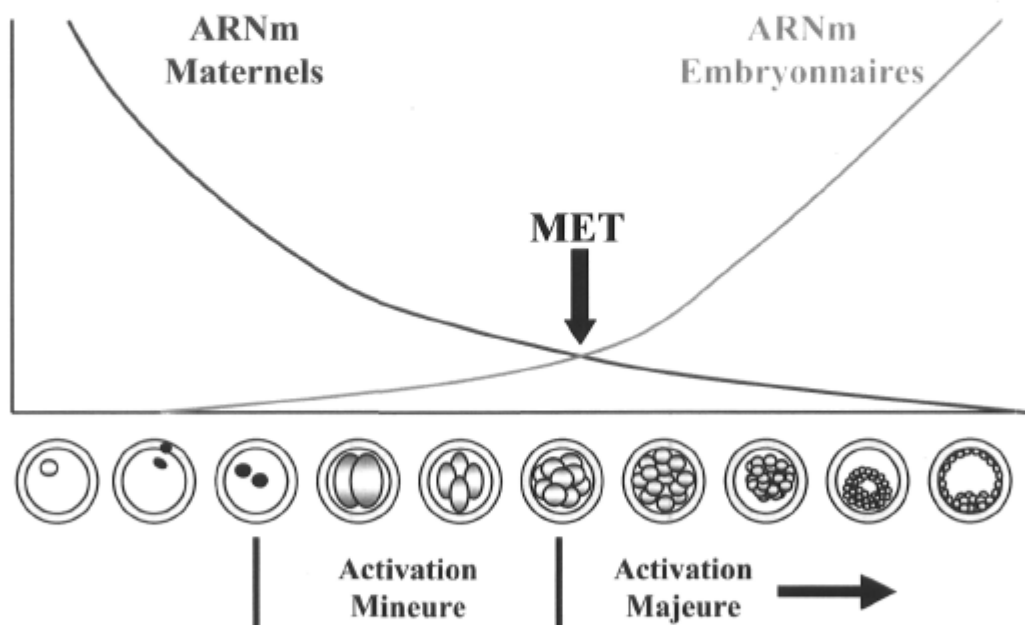


Figure 1.2. Niveaux d'ARNm maternels et embryonnaires pendant la croissance du jeune embryon bovin. L'axe des X représente la progression du développement embryonnaire : ovocyte immature (GV), ovocyte mature (MII), embryon 1-, 2-, 4- 8- 16-cellules, morula, jeune blastocyste et blastocyste. L'axe des Y désigne les niveaux d'ARNm (unité arbitraire). Les courbes désignent les niveaux d'ARNm maternels (rouge) et les niveaux d'ARNm embryonnaire (vert). La flèche noire souligne la transition maternelle embryonnaire (MET). Image tirée et adaptée de Sirard et al. 2003.

se déroule au stade 8- à 16-cellules, nommée transition maternel embryonnaire (MET) (Figure 1.2). Une production mineure de transcrits a été mesurée suite à l'incorporation d'isotopes radioactifs dans l'ARN d'embryons de stade 1- et 2-cellules (Memili and First 1999). Dans les clivages successifs qui mènent au stade 8-cellules, la synthèse d'ARNm s'intensifie significativement (Memili et al. 1998). Les embryons 1- et 2-cellules ont non seulement la compétence de fabriquer de nouveaux ARNm mais aussi de les traduire adéquatement en protéines (Barnes and First 1991; Memili and First 1999). Malgré l'initiation du programme embryonnaire, les produits maternels vont conserver un rôle essentiel dans la progression du jeune embryon, et lors des prochains clivages il y aura non seulement une coexistence mais aussi une interaction entre les deux types de produits (Telford et al. 1990). Par électrophorèse en deux dimensions notre laboratoire a démontré qu'une importante quantité de protéines, 291, 373 et 252, est toujours produite à partir des ARNm maternels dans l'embryon 2-, 4- et 8-cellules respectivement. De ces protéines, 70, 83 et 28 sont traduites exclusivement dans les stades 2-, 4- et 8-cellules respectivement (Massicotte et al. 2006).

La dégradation des transcrits maternels est aussi caractéristique des premiers stades de clivages embryonnaires. Elle débute dès que l'ovocyte reprend sa méiose pour se poursuivre suite à la fécondation. Chez la souris, plus de 90% des ARNm maternels sont déjà dégradés après le stade 2-cellules, période de la MET chez cette espèce (revue Schultz 2002). Les ARNm maternels qui sont présents dans le jeune embryon peuvent être divisés en deux sous classes selon leur synthèse suite à la MET. **La première classe d'ARNm maternels** est présente autant dans l'ovocyte que dans l'embryon pré-MET, et est transcrite par l'embryon suite à la MET. Des études de PCRs quantitatifs sur des gènes individuels ont révélé que la dégradation des ARNm maternels bovins avant la MET pouvait présenter différents profils (Tesfaye et al. 2004; Vigneault et al. 2004; Tremblay et al. 2005; Pennetier et al. 2006; Tesfaye et al. 2006; Tremblay et al. 2006). Dans une de ces études (Vigneault et al. 2004), trois patrons de dégradation pré-MET ont pu être identifiés. Le premier démontre une diminution significative des transcrits suite à la maturation de l'ovocyte, suivie par une deuxième chute lors de la MET (ex : *HMGAI*), alors que le second révèle une réduction des transcrits après le premier clivage embryonnaire et une

seconde lors de la MET (ex : *p300*). Le troisième patron expose plutôt une légère perte graduelle des transcrits avec les clivages et une baisse plus intense lors de la MET (ex : *OCT4*). Dans cette étude, la synthèse des 11 gènes regroupés dans ces 3 classes de profil d'expression a repris suite à la MET. **La seconde classe d'ARNm maternels** comprend des gènes qui sont spécifiques à l'ovocyte et ne sont pas exprimés suite à la MET. Ces ARNm sont sélectivement dégradés lors des premiers clivages et disparaissent pendant ou peu après la MET (ex : *MATERr*, *MSY2*) (Vigneault et al. 2004; Penetier et al. 2006). Même si l'ARNm de *Mater* n'est plus détecté par PCR quantitatif, la présence de la protéine perdue au-delà de la MET, et finit par être éventuellement dégradée dans les clivages subséquents. Il est important que les protéines comprises dans cette classe disparaissent dans la période post-MET puisqu'elles sont habituellement essentielles dans les processus entourant l'ovogénèse, la folliculogénèse et la maturation. Certains gènes spécifiques à l'ovocyte sont extrêmement nuisibles au développement embryonnaire et leur unique présence cause invraisemblablement la mort de l'embryon. C'est le cas pour une protéine indispensable dans la régulation de la méiose : *c-mos*. Cette dernière doit absolument être rapidement dégradée après la fécondation, puisque des études démontrent que son injection dans des embryons 2-cellules de souris cause l'inhibition du clivage (Keshet et al. 1988; Sagata et al. 1989).

Si on présume que la dégradation sélective et rapide des ARNm maternels dans le jeune embryon est nécessaire pour sa progression et pour l'établissement de la MET, ce processus précis reste encore à être déterminé chez le mammifère. Certaines pistes ont récemment été révélées suite à une hybridation suppressive et soustractive (SSH) effectuée entre des ovocytes non fécondés et des embryons 1-cellule de souris (Alizadeh et al. 2005). En effet, les auteurs stipulent que la région 3' non traduite (3'UTR; untranslated region) des gènes maternels serait impliquée dans la destruction rapide des messagers suite à la fécondation. Ils jugent que la proximité des éléments de polyadénylation cytoplasmique (CPE) et du signal poly(A) localisé dans la région 3'UTR pourrait influencer la vitesse de dégradation d'ARNm maternels suite à la fécondation. Chez la drosophile des éléments situés dans des régions distinctives du 3'UTR des ARNm maternels contrôleraient aussi leur destruction avant la transition maternel embryonnaire (revue, Bashirullah et al. 2001). Une étude

importante vient de mettre à jour l'implication de petites molécules d'ARN, les microARN (miARN), dans la destruction des ARNm maternels chez le poisson zébré (Giraldez et al. 2006). Des expériences de biopuces exposent que le micro ARN, miR-430, cible la région 3'UTR de centaines de gènes dont la plupart sont des ARNm maternels ou maternels-zygotiques. De plus, la délétion de *miR-430* occasionne l'accumulation de transcrits de gènes sensibles à ce miARN. On suppose que la liaison de miR-430 à la partie 3'UTR causerait la déadénylation des transcrits, déclenchant ainsi une dégradation massive des ARNm maternels (Giraldez et al. 2006).

1.2.5 L'activation du génome embryonnaire

Comme mentionné précédemment, l'activation majeure appelée la MET s'installe à plein régime au stade 8- à 16-cellules chez le bovin pour pallier à l'énorme diminution des réserves de transcrits maternels et à leur éventuelle disparition (Memili et al. 1998) (Figure 1.2). Pour ce qui est des autres espèces, cette reprise est également indispensable et s'installe au stade 2-cellules chez la souris, au stade 4-cellules chez l'humain, le rat et le porc (Braude et al. 1988; Jarrell et al. 1991; Schultz 1993; Zernicka-Goetz 1994) et au stade 8-cellules chez le mouton (Crosby et al. 1988). À partir de ces stades, l'embryon de chaque espèce doit pouvoir produire ses propres ARNm en quantité suffisante afin de soutenir efficacement son propre développement. Le contrôle exact de la transcription pendant la MET est essentiel pour une progression normale. Si pour une raison ou une autre, l'embryon ne peut reprendre correctement sa phase active de synthèse d'ARNm, on observe un blocage développemental. Il est possible de provoquer ce phénomène lorsque l'on met le jeune embryon en présence d' α -amanitine. Tout comme pour le bovin, si on provoque le blocage développemental avec l'inhibiteur de transcription α -amanitine, les embryons des autres espèces de mammifères suspendent leur développement dans la période entourant leur MET (Davis 1985; Kidder and McLachlin 1985; Braude et al. 1988; Telford et al. 1990; Zernicka-Goetz 1994). Le phénomène de blocage développemental est souvent observé dans la culture d'embryons in vitro.

Certains transcrits maternels qui ont été dégradés réapparaissent suite à l'activation du génome embryonnaire, mais le niveau d'expression de ces gènes suite à la MET est très variable. La mesure précise de facteurs de transcription par PCR quantitatif démontre que leurs niveaux d'ARNm retrouvés dans le blastocyste peuvent être plus faibles (ex : *HMGAI*), égaux (ex : *YAP65*) ou supérieurs (ex : *OCT4*) à ceux initialement stockés dans l'ovocyte bovin (Vigneault et al. 2004). Afin de mesurer globalement le patron d'activation de gènes embryonnaires, des analyses de biopuces d'ADN ont été effectuées sur les stades compris entre le zygote et le blastocyste murins (Hamatani et al. 2004). L'activation des gènes de l'embryon pendant cette période a pu être divisée en deux phases distinctes. La première regroupe les gènes apparaissant pendant la recrudescence des transcrits lors de la MET (2-cellules), tandis que la deuxième correspond aux gènes enrôlés lors de l'activation génique pendant la période mi-préimplantatoire (MGA) (4- et 8-cellules). Pendant la MGA, certains gènes sont activés pour soutenir les changements morphologiques et fonctionnels impliqués entre autre dans le passage du stade morula au stade blastocyste. Des gènes compris dans la MGA sont critiques pour la période préimplantatoire et sont reconnus comme étant des régulateurs dans le trophoctoderme (ex : *Gata-3*) et de la masse cellulaire interne (ICM) (ex : *Sox-2*) du blastocyste (Ma et al. 1997; Avilion et al. 2003; Hamatani et al. 2004).

1.3 SECTION # 3: LE CONTRÔLE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE

Plusieurs étapes cruciales et nécessaires doivent être accomplies de façon successive avant qu'un ARN transcrit soit traduit en protéine chez les eucaryotes. En premier lieu, les ARNm sont transcrits sous forme d'ARNm précurseurs (pré-ARNm) ou ARN nucléaires hétérogènes (ARNnh) à l'intérieur du noyau. Ensuite les pré-ARNm subissent des modifications telles que l'addition de la coiffe, l'épissage et la formation de l'extrémité 3'.

1.3.1 La coiffe

Suite à leur transcription par l'ARN polymérase II (ARN pol II), tous les messagers sont particularisés par l'ajout à leur extrémité 5' d'une structure nommée la coiffe. Cet arrangement consiste en une guanine méthylée en position 7 qui est reliée par un pont 5'-5' triphosphate au premier nucléotide du transcrit (7-methylguanidine triphosphate, 7mG5'ppp5'N) (Shuman 2002). L'assemblage de la coiffe est initialisé par la synthèse du transcrit et survient dès que les 22 à 40 premières bases émergent de l'ARN pol II (Shuman 1997; Zorio and Bentley 2004). Les trois enzymes responsables de cette organisation sont l'ARN triphosphatase, l'ARN guanylyltransférase et l'ARN guanine-7 méthyltransférase. Ces enzymes sont recrutées au moment opportun par le domaine CTD (domaine carboxy terminal) de l'ARN pol II lorsque ce dernier devient phosphorylé (Zorio and Bentley 2004). La coiffe joue un rôle fondamental au niveau de l'ARNm afin de contrôler sa stabilité, son épissage, son transport, et sa traduction (Lewis et al. 1995).

1.3.2 L'épissage

On retrouve à l'intérieur du génome eucaryote, des séquences de nucléotides codantes (les exons) ainsi que des séquences non-codantes (introns). Les gènes qui comportent des introns et des exons en alternance lors de la formation du pré-ARNm codent pour des

protéines dites morcelées ou en mosaïques. Si tel est le cas, ces ARN non-matures doivent subir une excision de leurs introns suivie par l'assemblage de leurs exons, c'est à dire exécuter de l'épissage. Ce processus se déroule à l'intérieur du noyau et permet aux régions codantes d'un pré-ARNm de venir se joindre bout à bout afin de constituer l'ARNm mature qui pourra être transporté dans le cytoplasme afin d'être traduit en protéine par la machinerie traductionnelle de la cellule. L'épissage est catalysé par un complexe nommé le spliceosome, formé de cinq petites ribonucléoprotéines nucléaires riches en uridine (UsnRNP) (U1, U2, U3, U4, U5 et U6) et plusieurs autres protéines associées (Zorio and Bentley 2004). On retrouve deux formes distinctes d'épissage : le constitutif et l'alternatif. Dans le cas de l'épissage constitutif, le spliceosome écarte tous les introns par la reconnaissance des séquences de base spécifiques bordant le début et la fin des introns (nucléotide 5'GU et 3'AG) et ne garde que les exons (Staley and Guthrie 1998). Dans l'autre cas, des balises faibles appelées signaux d'épissage alternatif vont permettre, dans certaines conditions, à la machinerie du spliceosome d'éliminer ou d'inclure des parties entières ou partielles d'intron(s) ou d'exon(s) afin d'assembler différentes combinaisons à partir du même pré-ARNm (revue, Ladd and Cooper 2002; Ast 2004). La cellule se sert de ce mécanisme afin de démultiplier les capacités codantes d'un gène et de créer une multitude de protéines différentes. On retrouve des cas extrêmes où l'épissage alternatif permet à un seul gène de coder pour des milliers de protéines. Par exemple, le gène de drosophile *Dscam* comprend 95 exons qui a un potentiel théorique d'aboutir à la création de près de 40 000 protéines différentes par épissage alternatif (Bharadwaj and Kolodkin 2006). Théoriquement, jusqu'à 65% des gènes humains peuvent subir de l'épissage alternatif, enterrant à jamais le dogme : 1 gène pour 1 protéine (Ast 2004).

1.3.3 La formation de l'extrémité 3'

Une autre modification clé apportée aux pré-ARNm avant qu'ils soient exportés du noyau est l'installation d'un segment poly(A) à leur extrémité 3' terminal (Figure 1.3). Ce mécanisme est conservé pour tous les gènes eucaryotes, sauf pour la majorité des messagers des histones qui sont régulés par un autre mécanisme (vue dans le prochain segment). L'addition de ces résidus adénine n'est pas encodée dans le gène, mais ajoutée

aux pré-ARN naissants par un processus en deux étapes qui survient rapidement avec l'arrivée du transcrit. En premier lieu, le pré-ARNm est clivé au niveau du site de polyadénylation, puis dans une étape étroitement couplée, la polyadénylation s'effectue avec l'addition de résidus adénosine (entre 200 et 250) sur le produit de clivage en amont. Le fragment en aval du site de coupure est rapidement dégradé. Ce processus débute lorsque le complexe protéique multimérique nommé facteur spécifique du clivage et de la polyadénylation (CPSF) s'ancre à une séquence consensus composée de l'hexanucléotide AAUAAA localisée 10 à 30 nucléotides en amont du site de clivage (Gilmartin 2005) (Figure 1.3). De façon synchrone, le facteur de stimulation du clivage (CstF) vient se lier à une séquence DES (Down stream element) riche en U ou en GU située à une trentaine de nucléotides en aval du site de clivage (Gilmartin 2005; Zorio and Bentley 2004). Un groupement formé de deux protéines de clivage CFI et CFII (Cleavage Factor I and II), de la poly(A) polymérase (PAP), ainsi que du CPSF, de CstF, et de l'ARN polymérase II vont interagir ensemble dans un complexe actif qui viendra sectionner le pré-ARNm au niveau du site de clivage (Brown and Gilmartin 2003; Venkataraman et al. 2005) (Figure 1.3)

Après l'étape du clivage, CPSF et PAP restent reliées avec l'ARN et débute alors un processus de polymérisation sur la partie 3' nouvellement sectionnée. L'ajout d'adénosines est très lent au départ, mais la synthèse des 10 premiers nucléotides crée un site de liaison pour la PABPN1 (poly(A) binding protein nuclear 1, alias PAB II ou PABP II) (Bienroth et al. 1993; Kuhn and Wahle 2004). Cette protéine nucléaire possède une affinité accrue pour le poly(A) et joue un rôle majeur dans la polyadénylation du pré-ARNm. Le recrutement de protéines PABPN1 sur cet oligo d'adénosines avec la coopération de CPSF et de PAP déclenche une synthèse extrêmement rapide de la queue poly(A) (Figure 1.3). Lorsque le nombre de résidus d'adénosine atteint son maximum, soit environ 250, la synthèse ralentie et s'immobilise (Zhao et al. 1999; Kuhn and Wahle 2004). Le mécanisme qui dicte la terminaison de l'allongement de la queue poly(A) n'est pas connu, mais pourrait impliquer la perturbation de deux facteurs essentiels : le CPSF ou la PAP.

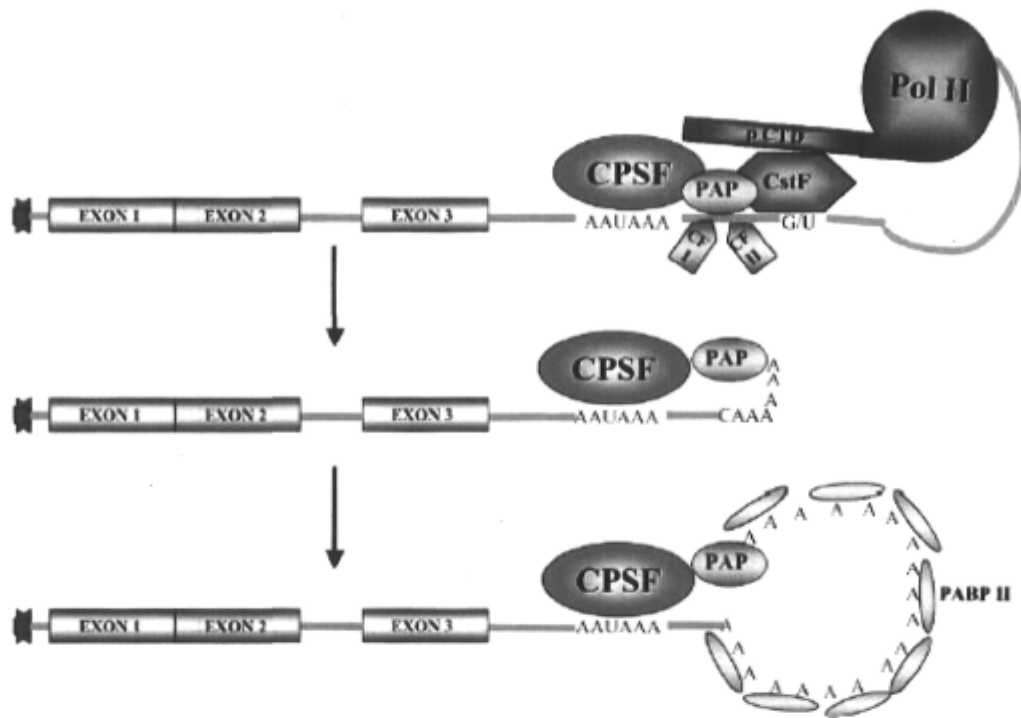


Figure 1.3. Formation de l'extrémité 3' d'un ARNm chez les eucaryotes. Avant d'être polyadénylés l'ARNm est clivé suite à l'attachement de différentes protéines : le facteur spécifique du clivage et de la polyadénylation (CPSF), le facteur de stimulation du clivage (CstF), deux protéines de clivage CFI et CFII (Cleavage Factor I and II), de la poly(A) polymérase (PAP), et l'ARN polymérase II (Pol II) (image du haut). Après le clivage (image du milieu), la polyadénylation est initiée par l'interaction entre les protéines CPSF, PAP et PABP II (PABPN1; poly(A) binding protein nuclear 1). Image tirée et adaptée de Proudfoot et al. 2002.

1.3.4 La formation de l'extrémité 3' des histones

Chez les eucaryotes multicellulaires, la maturation des pré-ARNm d'histones de type réplication dépendant est différente du processus classique que l'on vient de voir. Premièrement, aucune réaction d'épissage n'est nécessaire puisque les histones ne contiennent pas d'introns. Deuxièmement la majorité des histones dites répliquées ne contiennent pas de queue poly(A) (revue, Marzluff 2005). La production de ce type d'histone est coordonnée avec la synthèse d'ADN et la maturation de leur région 3' est contrôlée par une structure différente de la queue poly (A) (revue, Dominski and Marzluff 1999; Zhao et al. 1999; Marzluff 2005). Les histones répliquées dépendantes

sont répliquées par un mode d'expression original qui survient principalement pendant la phase-S du cycle cellulaire dans les cellules somatiques. Comme pour tous les autres messagers, la maturation des pré-ARNm d'histones implique une coupure dans son extrémité 3' non traduite. Cette région est longue chez les histones et contient des éléments qui lui sont propres, comme la tige-boucle (stem-loop) et le HDE (histone downstream element) (Figure 1.4). La tige-boucle est une structure hautement conservée de 25 à 26 nucléotides qui est située en amont du site de clivage, tandis le HDE, retrouvé plutôt en aval, est une séquence riche en purines (Marzluff 2005). Des études *in vitro* démontrent que l'unique présence de ces deux séquences est suffisante pour que la région 3' soit efficacement et correctement clivée par des extraits nucléaires de cellules de mammifère (Bond et al. 1991). Par contre une mutation dans la structure de la tige-boucle ou dans ces régions flanquantes résulte en une réduction substantielle mais non complète de l'assemblage avec sa protéine de liaison SLPB (stem-loop binding protein) (Dominski et al. 1999). Le pré-ARNm d'histone initialise sa réaction de maturation lorsque SLPB se lie de façon spécifique à la tige-boucle tandis que le complexe U7 snRNP vient s'ancrer sur le HDE (Figure 1.4). La liaison de U7 snRNP à l'ARNm non mature est stabilisée par son interaction avec SLPB et ZFP100 (Zinc Finger Protein 100). D'autres facteurs potentiellement impliqués dans le clivage, dont l'endonucléase responsable de la scission, restent à être mis à jour. Une fois le clivage du pré-ARNm effectué, la protéine SLPB reste ancrée sur la tige-boucle de l'ARNm mature, tandis que U7snRNP et les autres protéines demeurent avec la portion 3' sectionnée (revue, Marzluff and Duronio 2002). La protéine SLPB demeure fixée sur l'ARNm mature et l'accompagne dans le cytoplasme afin de participer à la stabilisation et la traduction du transcrite (Sanchez and Marzluff 2002). Chez l'ovocyte de souris, la protéine SLBP est accumulée pendant la maturation méiotique (Allard et al. 2002). L'empêchement de cette accumulation par technique d'ARN interférence (ARNi) diminue significativement la synthèse d'histones endogènes dans l'ovocyte (Allard et al. 2005). Cette carence en histones se fait ressentir suite à la fécondation, puisque les pronoyaux démontrent non seulement une dimension plus faible mais aussi des niveaux d'acétylation plus bas en H2A-K5 et H4-K12 (Allard et al. 2005).

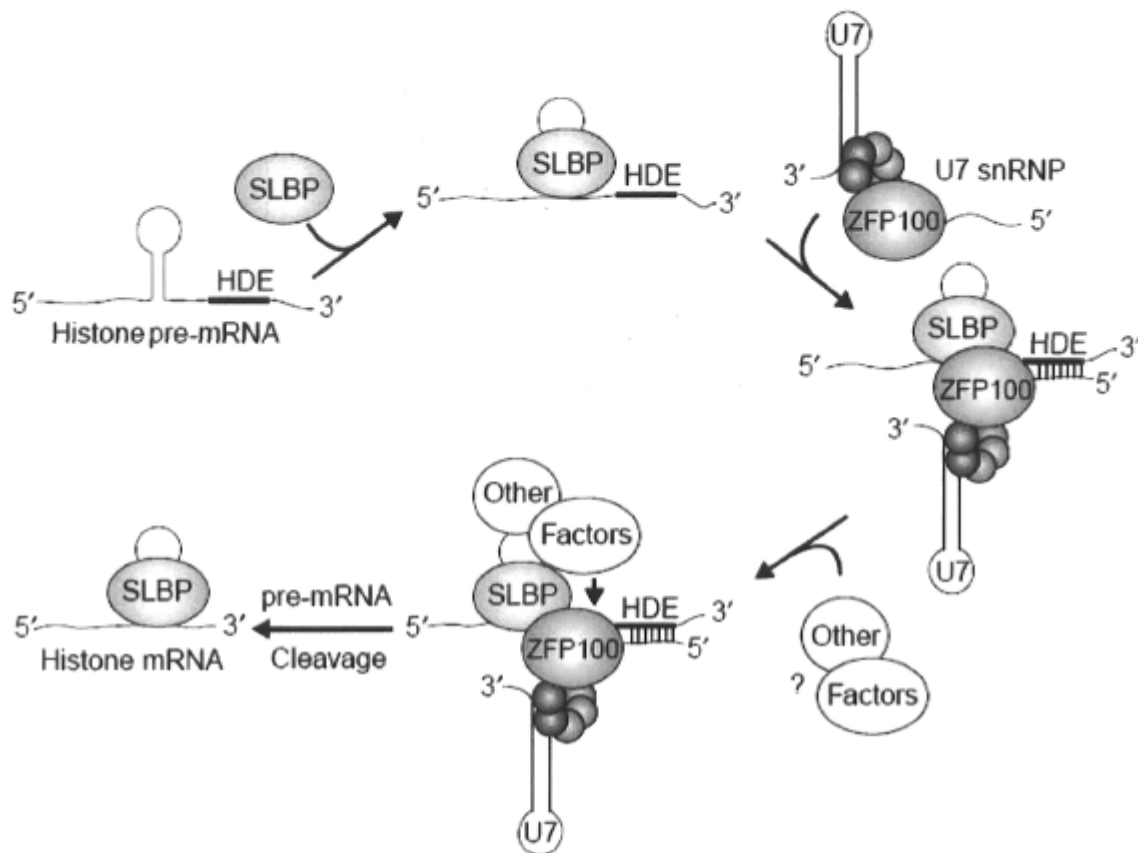


Figure 1.4. Formation de l'extrémité 3' d'un ARNm d'histone réplication dépendante. La liaison de SLBP (stem-loop binding protein) à la tige-boucle active le processus de maturation de l'extrémité 3' de l'ARNm. Ensuite, le complexe U7 snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particle) se positionne sur le HDE (histone downstream element) et est stabilisé par SLBP et par la venue de ZFP100 (Zinc Finger Protein 100). La venue potentielle de d'autres facteurs est probable pour procéder au clivage du pré-ARNm. Suite à la scission du bout 3', SLBP reste associée avec l'ARNm mature de l'histone. Image tirée et adaptée de Marzluff and Duronio 2002.

1.3.5 La déadénylation

Tel que mentionné préalablement, l'accumulation des ARN et des protéines par l'ovocyte constitue une réserve de facteurs essentiels à la compétence au développement (De Sousa et al. 1998a; 1998b). Afin d'être traduits au moment approprié, les ARNm maternels doivent subir certaines modifications. Chez de nombreuses espèces, la régulation de la queue

poly(A) est l'un des processus affectant la traduction et la dégradation des ARNm dormants pendant l'ovogénèse et le développement du jeune embryon (Paynton et al. 1988). Normalement une longue queue poly(A) (entre 80 et 500 A) est reliée à une traduction active tandis qu'une courte queue (entre 20 et 50 A) avec un état répressif (de Moor et al. 2005). Le raccourcissement de la queue poly(A) est effectué par un processus désigné comme la déadénylation cytoplasmique.

Les signaux et facteurs responsables de cette déadénylation sont très peu connus et on considère que ce processus survient par défaut dans le cytoplasme de l'ovocyte (Varnum and Wormington 1990; Huarte et al. 1992). Tout comme chez la souris et le bovin, les ARNm des ovocytes de *Xenopus* subissent une déadénylation substantielle (40%) lors de la reprise de la méiose (Sagata et al. 1980). Beaucoup de messagers subissent cette réduction, dont plusieurs gènes de la catégorie « housekeeping » (Bachvarova et al. 1985; Brevini-Gandolfi et al. 1999). Plusieurs évidences mènent à croire que la ribonucléase spécifique au poly(A) (PARN ou DAN) serait impliquée dans la déadénylation par défaut dans les ovocytes matures. En effet, l'injection d'anti-DAN dans des ovocytes mature de *Xenopus* inhibe la déadénylation de ces ARNm, alors que l'insertion d'ARNm de DAN peut restituer la déadénylation par défaut dans les ovocytes (Korner et al. 1998).

1.3.6 Le masquage ou entreposage

En plus du raccourcissement de leur queue poly(A), d'autres modifications agissent en synergie pour éviter la traduction des ARNm maternels. On se rappelle que les ARNm sont synthétisés au cours de l'ovogénèse et demeurent dormants jusqu'au moment de leur activation lors la maturation de l'ovocyte, la fécondation ou le développement embryonnaire. Mais pour réussir ce tour de force, en plus d'avoir de courtes queues poly(A), les messagers doivent être entreposés dans le cytoplasme ovocytaire par un mécanisme particulier : le masquage des transcrits. Cette dissimulation des ARNm vis-à-vis l'appareil de traduction est occasionnée par l'association de protéines spécifiques sur la région 3'UTR du transcrit (Standart et al. 1990). Ces protéines fusionnent avec l'ARNm et forment une particule ribonucléoprotéique messagère (mRNP). Cette barrière physique

emprisonne les messagers et empêche les ribosomes d'avoir accès aux différents éléments régulateurs cryptés, inhibant ainsi la synthèse protéique (Wormington 1994; Matsumoto and Wolffe 1998). L'assemblage des mRNP est dépendant de certaines classes de protéines qui s'unissent avec l'ARNm de façon non sélective : les protéines Y-box et DEAD box RNA hélicase (Evdokimova and Ovchinnikov 1999; Cole and Scarcelli 2006). Une caractéristique retrouvée dans les particules mRNP est l'abondance de protéines de type Y-box dans le cytoplasme des cellules germinales et des jeunes embryons. Les protéines Y-box ont été dépistées dans plusieurs espèces, dont *Xenopus* (ex : FRGY2) et la souris (ex : MSY2) (Bouvet and Wolffe 1994; Gu et al. 1998). En plus de FRGY2, les ARNm non traduits du cytoplasme ovocytaire de *Xenopus* contiennent aussi de grandes quantités d'hélicase DDX6 (type Xp54), de kinase CK2 α et de PABP (revue, Weston and Sommerville 2006). La stabilité de la liaison de FRGY2 sur l'ARN simple brin est soutenue grâce à sa phosphorylation ininterrompue par CK2 α à l'intérieur de la particule mRNP (Weston and Sommerville 2006). Pour ce qui est de MSY2, elle représente approximativement 2% des protéines totales de l'ovocyte, mais rapidement après la MET elle est complètement dégradée. Tout comme pour FRGY2, on rapporte qu'elle serait impliquée dans la stabilisation et/ou la régulation de la traduction des ARNm maternels (Yu et al. 2001).

Certaines protéines s'associent de façon sélective sur les transcrits afin de préserver l'état de latence. Ce modèle, qui a été mis en évidence dans les ovocytes de *Xenopus*, s'applique pour les transcrits possédant un CPE dans leur partie 3'UTR. Les messagers sont maintenus dans un état transcriptionnel répressif via la complicité d'une protéine de répression qui fait jonction entre la partie 5' et 3' du messenger. Cette protéine, la Maskin, est reconnue comme étant une inhibitrice de traduction qui est exprimée tard dans l'ovogénèse. En premier lieu elle se soude à CPEB (cytoplasmic polyadenylation binding protein) qui à son tour cible la séquence CPE située dans la région 3'UTR de l'ARNm. L'action négative de la Maskin sur la traduction se manifeste lorsqu'elle interagit avec eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) situé sur la coiffe en 5' causant une circularisation de l'ARNm. L'inhibition est causée par la compétition entre la Maskin et

eIF4G pour le même site spécifique de liaison retrouvé sur eIF4E (revue, Wilkie et al. 2003; Piccioni et al. 2005).

1.3.7 Le démasquage des transcrits

Avec l'arrivée de la maturation de l'ovocyte, certains ARNm sont démasqués afin d'être traduits en protéines. C'est la polyadénylation qui serait investigatrice de l'abandon de l'état répressif occasionné par le complexe CPEB-maskin-eIF4E. Chez *Xenopus*, la maturation peut être activée par la progestérone, qui à son tour active la protéine kinase Eg2. L'éveil de cette kinase cause la phosphorylation de CPEB qui intensifie son affinité pour le CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor). Le CPSF se lie avec la séquence hexanucléotide AAUAAA et ainsi permet à la PAP cytoplasmique de se joindre au complexe installé sur l'extrémité 3' du gène. Cette chaîne d'événements cause alors l'allongement de la queue poly (A). La taille du poly (A) est critique dans le contrôle de la répression par CPEB, et son prolongement libère l'ARNm de son état répressif. En parallèle, l'addition de ces adénines à l'extrémité 3' occasionne la dissociation entre la Maskin et eIF4E. En effet, cette rupture est causée par un nouveau complexe formé par eIF4E avec eIF4G et PABP (Cao and Richter 2002; Wilkie et al. 2003; Piccioni et al. 2005). L'arrivée de ce complexe signifie d'ailleurs l'établissement d'un état traductionnellement actif de l'ARNm.

1.3.8 La polyadénylation cytoplasmique

Les ARNm maternels dormants sont entreposés dans le cytoplasme avec une courte queue poly(A), généralement d'environ 20 à 40 résidus. Il est reconnu que la déadénylation provoque la répression de la traduction, alors que l'effet contraire, la polyadénylation cytoplasmique incite plutôt son activation. En fait ce n'est que lorsque les queues contiennent environ 150 résidus adénines que la traduction s'enclenche (Mendez and Richter 2001). Comme mentionné dans la section précédente, l'extension de la queue poly(A) corrèle aussi avec le démasquage des transcrits dans le cytoplasme. Chez de nombreuses espèces, la polyadénylation cytoplasmique est un mécanisme fondamental pour

la régulation de l'activité transcriptionnelle dans la progression méiotique de l'ovocyte (Salles et al. 1992; Sheets et al. 1995).). Lorsqu'on induit la maturation méiotique des ovocytes de *Xenopus*, on active la polyadénylation pour de nombreux gènes maternels quiescents, tels *c-mos* et les cyclines (Colegrove-Otero et al. 2005).

Afin d'augmenter leur nombre en résidus adénines, les ARNm stockés encodent dans leur région 3'UTR deux éléments essentiels à la polyadénylation cytoplasmique : la séquence hexanucléotide hautement conservée qui signale la polyadénylation (AAUAAA) ainsi que la séquence riche en U (UUUUUAU) correspondant au CPE (McGrew et al. 1989). En général, environ 20 à 30 nucléotides séparent ces deux éléments. La séquence signal AAUAAA est la même qui dicte le clivage du pré-ARNm et la polyadénylation nucléaire (Gilmartin 2005). Certaines variations sont retrouvées dans les séquences, de plus, le nombre et l'emplacement des différents CPE conservés et ces différences peuvent causer des divergences dans l'activation de la polyadénylation (Afouda et al. 1999 et revue, Stebbins-Boaz and Richter 1997; Mendez and Richter 2001). Cette asymétrie dans l'activation de la polyadénylation de certains gènes a été observée dans des ovocytes de *Xenopus* en reprise de méiose (Sheets et al. 1994; de Moor and Richter 1997). Dans ce cas, les gènes qui démontraient une période d'activation de polyadénylation différente présentaient aussi des distinctions flagrantes dans le nombre ainsi que dans la distance entre leurs CPE et le signal hexanucléotide. Le gène de la cyclin B1 est un bon exemple, puisque la séquence de cette dernière contient 4 sites CPE différents.

Cependant, la présence unique d'un CPE dans la séquence d'un transcrit ne certifie pas la polyadénylation cytoplasmique (Salles et al. 1992). D'autres facteurs externes sont nécessaires et impliqués dans l'ajout de la poly(A) comme l'enzyme PAP, le facteur CPSF et la protéine CPEB (Piccioni et al. 2005). L'établissement de la cascade d'événements impliqués dans la polyadénylation a été vu dans la Figure 1.3.

La polyadénylation cytoplasmique n'est pas réservée qu'à l'ovocyte. En effet, on en retrouve également dans les premiers stades du jeune embryon (Paris and Philippe 1990). L'ARNm des gènes *eRF1* (polypeptide chain release factor ou Cl1) et du récepteur de

l'activine sont des exemples de gènes sous son contrôle (Simon and Richter 1994; Simon et al. 1996). En plus du signal AAUAAA, les transcrits de l'embryon doivent contenir un CPE (U₁₂₋₂₇) qui est spécifique à la polyadénylation cytoplasmique embryonnaire (eCPE). Le eCPE se retrouve aussi dans la partie 3', mais contrairement aux autres CPE, il peut exécuter sa fonction même si il est très éloigné du signal hexanucléotide (environ 300 nucléotides) (Simon and Richter 1994). La maturation précoce des gènes contenant un eCPE est prohibée par un long complexe masquant la partie 3'. Ce complexe empêche les ARNm avec un eCPE (ex : C11) d'être polyadénylés pendant la maturation de l'ovocyte (Simon et al. 1992). Si le complexe masquant est retiré, l'ARNm pourra subir une modification de sa queue poly(A) tant dans l'embryon que dans l'ovocyte (Simon et al. 1992; Simon and Richter 1994). Ces CPE impliqués dans la polyadénylation des messagers lors de la maturation de l'ovocyte semblent aussi capables de promouvoir l'addition d'adénines ainsi que l'activation de la traduction chez l'embryon de *Xenopus* (Groisman et al. 2002).

1.4 SECTION #4: LA CHROMATINE ET SES MODIFICATIONS

1.4.1 La chromatine

La chromatine est la structure organisationnelle renfermant le matériel génétique chez les eucaryotes. La formation de cette armature, constituée d'un amalgame d'ADN et de protéines, est nécessaire afin de surmonter le problème d'espace restreint du noyau. En effet, l'ADN génomique d'une cellule représente une longue molécule qui mesurerait environ 1,8 mètres si elle était linéaire. Donc la cellule a dû concevoir un système afin d'entasser efficacement cette information dans un espace nucléaire de quelques μm de diamètre, soit l'équivalent d'un peu moins de 1 pico litre (Gates 2006). L'ADN ne doit pas seulement être entassé, mais la machinerie cellulaire doit pouvoir y avoir rapidement accès afin de réguler certaines fonctions de la chromatine comme la réplication, la réparation et la recombinaison.

La principale structure ou unité retrouvée dans la chromatine, le nucléosome (octamère d'histones), a été démontré à l'aide de digestions aux nucléases ainsi que par associations par agents pontants (cross-linking) (Kornberg and Thomas 1974). La présence de cette structure instaure un premier degré de compaction à l'ADN nucléaire. La double hélice de 2 nm de diamètre est ainsi diminuée d'environ 7 fois en longueur pour devenir une fibre un peu plus compacte de 10 nm de diamètre (Figure 1.5) (Richmond and Davey 2003). Les nucléosomes sont fondamentaux pour l'enroulement de l'ADN et on en retrouve à des intervalles réguliers d'environ 220 pb sur la totalité de la chromatine (Nemeth and Langst 2004). Cette disposition sur l'ADN des nucléosomes forme une configuration dite en collier de perles. Cette fibre nucléosomale (ADN + nucléosomes) est encore plus resserrée pour former une hélice solénoïde de 30 nm de diamètre suite à l'association des histones H1 avec les nucléosomes, en synergie avec de nouvelles interactions inter-nucléosomes. Cet enroulement supplémentaire génère un repliement 50 fois supérieur à l'ADN natif (Finch and Klug 1976; Losa et al. 1984; Woodcock et al. 1991). Enfin, d'autres phases de

compaction auront lieu et diverses composantes viendront se joindre afin que la chromatine atteigne finalement son niveau supérieur de condensation au stade du chromosome métaphasique. L'ADN rectiligne qui était de 2 nm d'épaisseur, se retrouve maintenant dans une structure extrêmement compacte de 1400 nm. Des analyses biochimiques sur des chromosomes isolés à partir de cellules en culture ont permis de démontrer que le chromosome était composé d'approximativement 1/3 d'ADN, 1/3 d'histones et 1/3 de protéines non-histones (Blumenthal et al. 1979; Lewis and Laemmli 1982).

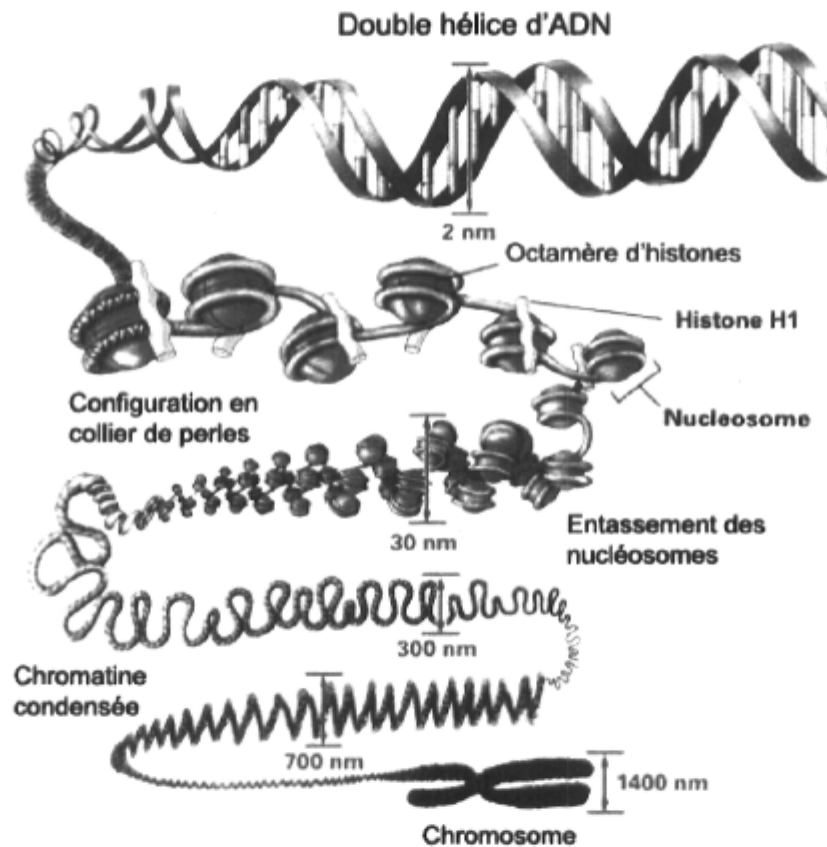


Figure 1.5. Étapes dans la compaction de l'ADN. La fibre de 2 nm contenant le code génétique est repliée par une série d'événements, impliquant entre autre la formation de nucléosomes dont les unités fondamentales sont les histones. La répétition de ces nucléosomes forme une configuration dite en collier de perles. L'ADN passe d'un diamètre de 2 nm à une structure de 1400 nm de diamètre : le chromosome. Image tirée et adaptée de www.epitron.eu.

Le chromosome correspond à l'enroulement ultime de l'ADN. Par contre, on note que la chromatine peut être à différents degrés de condensation dans le noyau ; la condensation et la décondensation de la chromatine étant régulées pendant le cycle cellulaire. Pendant la mitose, la chromatine est fortement compactée afin de permettre la ségrégation adéquate des chromosomes, tandis que pendant les autres phases cellulaires elle est plutôt diffuse et partiellement décondensée (revue, Cook 1995). À l'intérieur du noyau des cellules en interphase on distingue deux dispositions de chromatine : l'organisation non-compacte de l'ADN (euchromatine) caractérise l'activité transcriptionnelle de l'ADN tandis que la chromatine compacte (hétérochromatine) est associée à la non-transcription de l'ADN. En fait l'euchromatine est une chromatine dans un état décondensée que l'on retrouve répartie à l'intérieur du nucléoplasme. Puisque cette structure est plus relâchée, la machinerie transcriptionnelle a facilement accès à l'ADN qui la compose. Les portions d'ADN nucléaire constituées d'euchromatine contiennent des histones hyperacétylées et hypométhylées comparativement à l'hétérochromatine (Sarg et al. 2004). Pour ce qui est de l'hétérochromatine, elle correspond à une chromatine condensée qui ne change pas de degré de compaction au cours du cycle cellulaire. Elle se situe principalement en périphérie du noyau et ses histones, comparativement à l'euchromatine sont hypoacétylées et hyperméthylées (Sarg et al. 2004). On décèle deux types d'hétérochromatine : la constitutive et la facultative (revue, Dimitri et al. 2005). Globalement, les portions de chromosomes comprises dans l'hétérochromatine constitutive sont inactivées. Elle est composée principalement de séquences répétées dont la majeure partie est retrouvée en proximité des centromères et des télomères. Certaines portions du chromosome Y contiennent cette catégorie de chromatine. Pour ce qui est de l'hétérochromatine facultative, on la perçoit dans des régions où la chromatine peut revenir dans un état d'euchromatine. Le transcriptome dans ces locus est régulé par cette structure en réponse à un signal cellulaire ou bien à l'activité génique. Dans une cellule par exemple, les mêmes régions d'hétérochromatine facultative vont adopter une conformation encombrée ou non, dépendamment de l'état de différenciation de la cellule. Chez la femelle le chromosome X inactivé est composé de ce type de chromatine.

1.4.2 Le nucléosome

La découverte du nucléosome fut une révolution dans le monde de la chromatine. L'ADN ne serait plus jamais perçu comme une molécule recouverte d'histones, mais plutôt comme un long fragment embobiné sur l'extérieur d'un globule d'histones (Figure 1.5), permettant ainsi l'accès et la liaison de d'autres protéines nucléaires (Oudet et al. 1975). À partir de ce point, le nucléosome devint l'unité fondamentale dans la régulation des fonctions de la chromatine.

Le nucléosome est composé d'environ 146 paires de bases d'ADN enroulées 1.65 fois (hélice gauche) autour d'un octamère d'histones. La structure du nucléosome a été cristallisée en incorporant des histones de *Xenopus* synthétisées dans des bactéries avec de l'ADN nu (Luger et al. 1997). Les composantes de cet octamère comprennent deux exemplaires des histones H2A, H2B, H3 et H4. Ces histones possèdent toutes dans leur région globulaire un domaine conservé, nommé le histone « fold ». En plus d'être impliqué dans la liaison des histones avec l'ADN, ce motif est aussi crucial dans l'interaction histone-histone (Arents and Moudrianakis 1995). Ce domaine est aussi directement responsable de la configuration menant à la formation du dimère H2A/H2B et du tétramère (H3/H4)₂ impliqués dans la formation du nucléosome (Arents et al. 1991). L'initiation de l'assemblage du nucléosome survient lorsque le tétramère (H3/H4)₂ se lie à l'ADN et est entouré par 121 pb, ce qui est suivi de l'attachement des deux dimères H2A/H2B de chaque côté du tétramère, forçant maintenant 147 pb à entourer le nouveau complexe (Hayes et al. 1991). Une autre caractéristique typique des histones formant le nucléosome est la présence d'extensions correspondant à leurs régions N- et C- terminales. Désignés queues d'histones, ces segments terminaux sont dépourvus de structures secondaires mais sont la cible de différentes modifications post-traductionnelles catalysées par des enzymes spécifiques (détaillé plus loin).

1.4.3 L'assemblage de la chromatine

La synthèse des histones majeures (H2A, H2B, H3 et H4) qui forment le nucléosome est dite réplication dépendante et se manifeste essentiellement au cours de la phase S du cycle

cellulaire. Pendant la réplication, l'ADN est dans une conformation plus relaxe et c'est pendant cette période que les histones sont incorporées au sein de l'ADN. Certaines variantes de ces histones sont formées pendant d'autres phases du cycle cellulaire et par le fait même pourraient être incorporées de manière indépendante à la réplication du matériel génétique (Ahmad and Henikoff 2002; Ray-Gallet et al. 2002).

La déposition des histones survient dans la région immédiatement adjacente à la fourche de réplication et découle de deux processus (revue, Annunziato 2005). Les histones dites parentales sont transloquées et dispersées sur chacun des brins de la fourche. On suppose que ce transfert permettrait de léguer certains signaux de régulation du génome instaurés sur ces histones aux deux brins filles. En parallèle, les histones qui viennent d'être synthétisées sont aussi incorporées pour former *de novo* des nucléosomes. Avant leur importation sur l'ADN, les portions terminales de ces nouvelles histones peuvent aussi porter certains profils de modifications post-traductionnelles.

Il y a un consensus sur le procédé ainsi que sur les composantes de bases impliquées dans l'assemblage de la chromatine. Néanmoins, la variation possible de certains éléments pendant ces étapes peut mener à une structure chromatiniennne distincte (Ridgway and Almouzni 2000). L'assemblage initial de la chromatine débute avant la déposition des histones sur l'ADN. Peu de temps après leur synthèse, les histones H3/H4 s'associent ensemble via leur domaine histone fold pour former un tétramère. Il y a ensuite acétylation de certains résidus situés dans les portions terminales de ce complexe (Jackson et al. 1976). Les queues de ces protéines seraient altérées par au moins deux HATs de type B capables d'interagir avec des histones libres (non liées à l'ADN). Les enzymes impliquées demeurent hypothétiques, mais certaines évidences indiquent que les acétylases Hat1 et Hat2 pourraient être impliquées (Ai and Parthun 2004). Le complexe Hat1-Hat2 a été copurifié avec une chaperonne, Hif1 (Hat1-interacting factor 1), impliquée dans l'assemblage de la chromatine chez la levure. De plus la liaison du complexe H3/H4 acétylé à Hif1 dépend de Hat1-Hat2. Le dépôt du tétramère H3/H4 sur les brins d'ADN filles nouvellement synthétisés est stimulé par le facteur d'assemblage CAF1 (chromatin assembly factor 1) en collaboration avec la protéine chaperonne ASF1 (Annunziato 2005).

CAF1 et ses composantes sont recrutées au niveau de la fourche de réplication grâce à leur affinité pour PCNA (proliferating cell nuclear antigen) qui se cramponne au site de réplication (Shibahara and Stillman 1999; Moggs et al. 2000). Entre temps les dimères d'histones H2A/H2B qui se sont eux aussi liés ensemble via leur domaine histone fold, vont venir rapidement se joindre au tétramère H3/H4 situé sur l'ADN (Worcel et al. 1978; Smith and Stillman 1991). Les processus de positionnement des dimères H2A/H2B sont beaucoup moins connus mais certaines évidences portent à croire que la protéine NAP1 (nucleosome assembly protein 1) serait le chef d'orchestre de cette mission. Dans des extraits de cellules humaines, NAP1 est associée avec les histones H2A nouvellement synthétisées, tandis qu'on retrouve NAP1 complexée au dimère H2A/H2B dans les embryons de drosophile (Chang et al. 1997; Ito et al. 1996).

Rapidement après la formation du nucléosome, les histones H1, surnommées les histones de liaison, rejoignent la fibre nucléosomale et s'ancrent sur les nucléosomes. Les mécanismes exacts d'implantation pour H1 sont ambigus, mais il semble que plusieurs étapes seraient nécessaires pour l'attachement de cette histone avec le nucléosome (Brown et al. 2006). Premièrement, à travers des interactions non spécifiques, la portion C-terminale de H1 s'attache faiblement à la portion d'ADN retrouvée entre deux nucléosomes. Cette liaison initiale permet ensuite à la région globulaire de H1 de sonder le noyau du nucléosome afin de déceler la région optimale de sa fixation. Cette union stabilise le nucléosome et entraîne des modifications dans la conformation des queues N- et C-terminales de H1. Ces modifications causent un repositionnement des queues de H1, occasionnant par le fait même des changements structuraux stabilisant la chromatine. D'autres facteurs déterminant pourraient inciter la liaison de H1 avec le nucléosome, mais ils restent à être déterminés (Catez et al. 2006).

C'est durant la mitose que la chromatine est compactée et repliée en sa configuration de chromosome. Si on compare la longueur d'un chromosome versus celui de l'ADN, la compaction générée par les repliements est d'environ 10 000 à 20 000 fois (Li et al. 1998). Par contre les processus de compaction finale suite aux liaisons des histones demeurent controversés. D'après le modèle « radial loop », les fibres de 30 nm (ADN + nucléosomes

+ H1) forment des boucles d'environ 50 à 100 kilo bases en longueur qui seraient rattachées à des protéines d'échafaudage centrales (scaffold) (Marsden and Laemmli 1979; Rattner and Lin 1985; Boy de la Tour and Laemmli 1988). Selon le modèle chromonema, la structure finale du chromosome découle de trois repliements hélicaux successifs (revue, Belmont 2002) ; des fibres de 60 à 80 nm de diamètre sont d'abord enroulées en des fibres de 100 à 130 nm, qui sont par la suite elles même enroulées en des structures de 200 à 300 nm. La structure précise du niveau d'enroulement supérieur de la chromatine reste à être découverte, mais il est certain que la complexité des repliements engendrés requiert des changements structuraux organisés afin que les processus ADN-dépendants soient exécutés.

1.4.4 Les histones

Comme nous venons de le constater, les histones s'avèrent des composantes indispensables dans la formation de la chromatine. Ce sont de petites protéines basiques chargées positivement avec de faibles poids moléculaires. Leur charge positive vient du fait que les nombreux résidus arginines et lysines à l'intérieur de leur séquence attirent des protons (H⁺) (Klevan et al. 1979). Puisqu'on retrouve des groupements phosphates chargés négativement à la surface de l'ADN, l'affinité entre la fibre génétique et les histones s'en retrouve donc accrue.

On a vu que le domaine globulaire des histones est important dans la formation des complexes H3/H4 et H2A/H2B, mais quelles fonctions ont les parties N- et C-terminales? Afin de déterminer le rôle des queues des histones dans la compaction de la chromatine, des histones sans portions terminales ont été conçues (Dorigo et al. 2003). Cette équipe a démontré que même sans leurs queues, sauf une exception, les histones étaient capables de reconstituer des nucléosomes et de former des structures compactes. La seule défaillance a été constatée avec l'élimination de résidus spécifiques en N-terminal de l'histone H4. En effet, sans cette portion la formation adéquate du nucléosome et d'une fibre de chromatine a été empêchée, montrant qu'au moins une des queues de ces 4 histones est nécessaire dans la formation d'une structure hautement compacte. Un point intéressant vient du fait que

cette portion particulière de H4 fait partie de la région N-terminale hautement basique qui semble faire un contact spécifique avec une zone acidifiée en surface du dimère H2A/H2B sur un nucléosome adjacent (Luger et al. 1997). De plus, la modification par une acétylase de la lysine 16 (K16) à l'intérieur de cette région semble être suffisante pour causer un déséquilibre dans l'interaction nucléosome-nucléosome, causant ainsi un relâchement de la fibre chromatinienne (Shogren-Knaak et al. 2006).

Quoique les histones aient été découvertes en 1884, ce n'est que plus d'un siècle plus tard que la doctrine, stipulant que les histones occupaient un rôle exclusif à l'empaquetage de l'ADN nucléaire, a été démentie (revue, Brownell and Allis 1996). La fonction régulatrice attribuée aux histones est gouvernée par l'entremise du nucléosome qui module entre autre l'accessibilité des séquences d'ADN aux facteurs de transcription ainsi que la transmission des modifications post-traductionnelles de génération en génération (Wolffe 1998). Avec la découverte de ce rôle fonctionnel, les histones n'ont plus jamais été vues comme de simples protéines structurales, mais plutôt comme des protéines pouvant contrôler l'expression génique de la cellule.

1.4.5 Variantes d'histones

En plus de la complexité des mécanismes impliqués dans l'enroulement de l'ADN, plusieurs variantes d'histones ont été découvertes chez les eucaryotes. Le remplacement d'une histone classique ou constitutionnelle par une variante entraîne des changements probants dans la structure, la stabilité et les interactions reliées au nucléosome (Sarma and Reinberg 2005). Ce n'est que depuis peu de temps qu'on s'attarde à l'importance des ces substitutions au sein du nucléosome. De plus, les modifications apportées par ces protéines diversifiantes semblent jouer un rôle spécifique dans la fonction de la chromatine dans certaines régions du génome (Kamakaka and Biggins 2005). Comparativement aux histones constitutionnelles, la majorité des variantes sont synthétisées et assemblées à l'intérieur de la chromatine, indépendamment de la phase de réplication de l'ADN (Sarma and Reinberg 2005). Aussi, les gènes d'histones variantes ne se retrouvent pas regroupés dans les mêmes régions chromosomiques (clusters) que les histones classiques (Ausio et al.

2001; Jin et al. 2005). Ces éléments suggèrent que l'impact de leur incorporation pourrait avoir un effet considérable sur l'élaboration et la maintenance d'empreintes épigénétiques dans des régions spécifiques de la chromatine.

On distingue deux types de variantes d'histones : les homéomorphes et les hétéromorphes (Perche et al. 2003). Les variantes homéomorphes divergent des histones classiques que par la substitution de quelques acides aminés. Ces dernières sont retrouvées dans toutes les classes d'histones. À l'opposé, les variantes hétéromorphes démontrent des changements majeurs dans leur portion terminale. Puisqu'ils ont évolué de façon plus divergente, les gènes composants cette classe pourraient avoir des rôles structuraux et fonctionnels plus spécifiques.

1.4.5.1 *Histone H2A*

Chez les eucaryotes, l'histone H2A est la protéine du nucléosome qui possède le plus grand nombre de variantes. On retrouve deux variantes homéomorphes : H2A.1 et H2A.2 (Perche et al. 2003). L'ARNm des ces deux histones a été évalué dans des ovocytes et des embryons bovins produits in vitro (Vigneault et al. 2006). Même si les niveaux d'ARNm poly(A) pour ces deux gènes semblent plutôt stables pendant le développement embryonnaire, le nombre de messagers retrouvés dans l'ovocyte en GV semble plus élevé. Pour l'instant aucune fonction spécifique n'est associée avec ces deux variantes. On retrouve plusieurs types de variantes hétéromorphes pour H2A : H2A.Z, MacroH2A, H2A-Bbd (H2A-bar-body-deficient) et H2A.X (Kamakaka and Biggins 2005). Certaines de ces formes comme H2A.Z sont conservées à travers l'évolution tandis que d'autres comme MacroH2A et H2A-Bbd ne sont présentes que chez les vertébrés (Jackson et al. 1996; Pehrson and Fuji 1998; Chadwick and Willard 2001). La distinction majeure entre les différents types de H2A réside dans leur queue C-terminale, qui se distingue en séquence et en longueur, et dans leur distribution à travers le génome (Kamakaka and Biggins 2005). La localisation de MacroH2A est essentiellement au niveau du chromosome X inactivé, tandis qu'à l'opposé, H2A-Bbd se retrouve particulièrement sur le chromosome X activé (Costanzi and Pehrson 1998; Chadwick and Willard 2001). Pour ce qui est de la forme

H2A.Z et H2A.X, toutes deux seraient exprimées et localisées à travers le génome. Dans les lignées cellulaires de mammifères H2A.Z se retrouve sur des locus riches en hétérochromatine et son inhibition partielle par ARN interférence occasionne une instabilité génomique (Rangasamy et al. 2004). Des résidus spécifiques de cette variante causeraient la déstabilisation de la liaison entre les dimères H2A.Z/H2B et H3/H4 du nucléosome afin de faciliter le passage de facteurs de transcription sur la chromatine (Perche et al. 2003). Une délétion complète de cette variante empêche l'embryon de souris de se développer au-delà de la période de gastrulation (jour 6,5) (Faast et al. 2001). Chez le bovin, l'ARNm de H2A.Z n'est pas détecté dans les ovocytes, cependant la synthèse des transcrits apparaît suite à l'activation du génome embryonnaire (Vigneault et al. 2006). Pour ce qui est de H2A.X, on la retrouve aléatoirement incorporée dans la chromatine, mais sa forme phosphorylée est un marqueur d'ADN endommagé. H2A.X possède une sérine en position 139 dans sa queue C-terminale qui se retrouve phosphorylée en réponse à une lésion dans l'ADN double brin (Rogakou et al. 1998). Elle paraît être impliquée dans un processus qui maintiendrait l'intégrité du génome suite à une cassure de l'ADN (Perche et al. 2003). Lors de protocoles de transfert nucléaire, la forme phosphorylée d'H2A.X semble varier selon la technique utilisée (Che et al. 2005). Les blastocystes issus de ces transferts nucléaires démontrent des signes symptomatiques, puisque leur nombre de cellules est inversement proportionnel à la phosphorylation de H2A.X. Comme le clonage par transfert nucléaire semble causer une accumulation de bris dans l'ADN, cette perturbation pourrait mettre en péril le développement du jeune embryon.

1.4.5.2 *Histone H2B*

On ne connaît que trois autres variantes pour cette histone : spH2B (sperm specific H2B), hTSH2B (human testis/sperm specific H2B) et H2BFWT (H2B family member W testis specific). Pour l'instant, l'expression des trois semble localisée au niveau du testicule et leurs fonctions demeurent encore méconnues (Bernstein and Hake 2006). La séquence de spH2B n'a pas encore été déterminée mais cette protéine est comprise dans un complexe liant la région télomérique (Gineitis et al. 2000). La deuxième variante à être identifiée, hTSH2B, démontre non seulement une localisation mais aussi un patron d'expression

temporel différent de spH2B (Zalensky et al. 2002). La queue N-terminale de hTSH2B est très différente de celle de H2B classique (Kimmins and Sassone-Corsi 2005). Dans l'histone H2B somatique, cette séquence est importante pour l'interaction avec l'ADN, ainsi que pour la condensation mitotique et apoptotique des chromosomes (de la Barre et al. 2001; Cheung et al. 2003; Kimmins and Sassone-Corsi 2005). Il a aussi été démontré que les nucléosomes qui sont constitués de la variante hTSH2B sont beaucoup moins stables que ceux constitués de H2B (Li et al. 2005). Pour ce qui est de la troisième variante, H2BFWT, elle est exprimée exclusivement dans le testicule et démontre une très faible homologie avec la région N-terminale de H2B (Churikov et al. 2004). Même si cette différence ne semble pas infliger de changement dans la structure globale du nucléosome, sa présence se fait ressentir au niveau de la chromatine puisqu'elle empêche le recrutement de facteurs impliqués dans la condensation du chromosome (Boulard et al. 2006).

1.4.5.3 *Histone H3*

Jusqu'à présent, cinq différentes histones H3 ont été décrites chez le mammifère : H3.1, H3.2, H3.3, H3.1t et CENP-A (Bernstein and Hake 2006). Comme pour les autres types de variantes, les principales distinctions des H3 se retrouvent au niveau de la séquence, l'expression et la fonction. Quoique seulement quelques acides aminés soient différents dans les séquences des H3.1, H3.2, H3.3 et H3.1t, ces changements subtils semblent affecter leurs rôles. En effet, même si H3.1 et H3.2 ne diffèrent que de 1 acide aminé à la position 96 (cystéine vs sérine), ces protéines démontrent un profil d'expression qui leur est spécifique dans les cellules de mammifère ainsi qu'un patron de modifications post-traductionnelles très disparate (Hake and Allis 2006). La variante H3.2 est enrichie en di- et tri-méthylation de la K27, tandis que H3.1 est plutôt enrichie en diméthylation de la K9 et en acétylation de la K14 (Hake and Allis 2006). Ces divergences au niveau des modifications post-traductionnelles pourraient avoir un effet sur leur fonction biologique puisque la di- et tri-méthylation de K27 sont associées au silence transcriptionnel et sont reliées à l'hétérochromatine facultative, tandis que la méthylation de K9 est associée à l'hétérochromatine constitutive. Pour ce qui est de la modification au niveau du résidu en position 96, une théorie expliquant cette évolution a été formulée : l'hypothèse code barre

de l'histone H3 (Hake and Allis 2006). Cette hypothèse mentionne que les variantes de H3 seraient englobées dans un mécanisme jouant un rôle dans l'héritage épigénétique et la restriction du destin cellulaire (cell fate restriction). En gros, des régions spécifiques du génome incorporeraient différentes variantes de H3 dans la chromatine : H3.1 serait annexée à l'hétérochromatine constitutive, H3.2 à l'hétérochromatine facultative et H3.3 à l'euchromatine. Pour ce qui est de l'histone H3.3, seulement 5 et 4 acides aminés divergent de H3.1 et H3.2 respectivement. Ces légères variations affectent quand même l'association de ces histones avec certaines chaperonnes, puisque le complexe CAF-1 et HIRA reconnaissent spécifiquement H3.1 et H3.3 respectivement (Tagami et al. 2004). L'histone H3.3 est la variante du type H3 la plus étudiée puisqu'elle est enrichie en modifications associées à l'activation transcriptionnelle (Hake and Allis 2006). Lorsqu'on immunoprécipite H3.3, on découvre qu'elle est déposée dans la chromatine de gènes avec une transcription active (Wirbelauer et al. 2005; Dauray et al. 2006). H3.3 possède un résidu sérine (S31) qui est phosphorylé chez une sous-population durant la métaphase (Hake et al. 2005). Puisque cette sérine n'est pas retrouvée chez H3.1 et H3.2, on pense que cette modification pourrait affecter la structure du nucléosome. Comparativement aux autres, l'expression d'H3.1 est presque exclusive au testicule, mais aucune fonction, localisation et chaperonne ne lui sont associées (Bernstein and Hake 2006). La présence d'une cystéine additionnelle (présente également chez H3.1) pourrait lui conférer des responsabilités qui restent à être déterminées. Une des variantes de H3 qui est hautement spécialisée et conservée est la protéine CENP-A (centromeric protein A). Malgré certaines similitudes dans le domaine histone fold, elle diverge beaucoup des autres H3 par sa portion N-terminale unique (Kamakaka and Biggins 2005; Bernstein and Hake 2006). Les différences retrouvées dans sa séquence permettent à CENP-A de déplacer les autres variantes H3 de la chromatine dans la région du centromère du chromosome (Shelby et al. 1997). L'incorporation de CENP-A dans les nucléosomes centromériques est nécessaire pour une ségrégation précise des chromosomes, ainsi sa délétion cause un arrêt dans le développement embryonnaire chez la souris (Howman et al. 2000). Ces embryons ne peuvent se développer plus loin que le jour 6,5 et leur chromatine démontre des problèmes de fragmentation et d'hyper-condensation.

1.4.5.4 *Histone H4*

Jusqu'à maintenant aucune variante pour cette histone n'a été décelée (Bernstein and Hake 2006; Hake and Allis 2006).

1.4.5.5 *Histone H1*

Quoique les histones soient des protéines hautement conservées, la classe des histones H1 est la plus divergente. Il y a au moins huit sous-types d'histones H1 chez les mammifères : H1s somatique (H1a à H1e), H1t et H1oo qui sont spécifiques aux cellules germinales, et l'histone de remplacement H1^o (Lennox and Cohen 1983; Tanaka et al. 2001). On s'accorde pour dire que, généralement, les eucaryotes supérieurs possèdent approximativement une histone H1 par nucléosome (Bates and Thomas 1981; Van Holde 1988). Des études quantitatives effectuées par HPLC démontrent que le niveau d'histone H1 par nucléosome est en réalité inférieur à 1 dans des tissus normaux. Les niveaux présents dans le thymus et dans le foie sont respectivement de 0,83 et 0,79 H1 par nucléosome (Fan et al. 2003). La proportion de chaque sous-types de H1 dans ces deux tissus est très variable (Tableau 1).

Tableau 1. Composition et stoechiométrie par nucléosome des sous-types d'histones H1 provenant de cellules de thymus et de foie. Tiré et modifié de Fan et al. 2003.

Tissue and genotype	% of total H1						Total H1/nucleosome (no. of determinations)
	H1 ^o	H1a	H1b	H1c	H1d	H1e	
Thymus							
Wild type (+/+)	1.9 ± 1.6	10.7 ± 1.3	16.5 ± 0.9	26.7 ± 3.5	35.4 ± 2.7	9.6 ± 1.5	0.83 ± 0.10
Liver							
Wild type (+/+)	29.0 ± 0.8	1.4 ± 0.6	15.8 ± 3.5	12.5 ± 1.0	14.3 ± 0.6	39.9 ± 2.5	0.79 ± 0.07

La grande diversité retrouvée à l'intérieur de la famille des H1 demeure toujours énigmatique. L'un des plus petits, et très divergent membre de la famille des H1 est la H1^o (Zlatanova and Doenecke 1994). L'histone de remplacement H1^o est accumulée dans les cellules au repos (quiescentes), pendant les dernières étapes de la division cellulaire et lors

de la différenciation terminale des cellules. Dans certains tissus, comme le foie, elle peut atteindre un taux aussi élevé que 29% alors que dans le thymus elle ne constitue que 2% des H1 totales (Tableau 1). Cependant, elle ne semble pas être indispensable à la croissance et à la survie chez le mammifère, puisque des souris H1^o-nuelles se développent normalement même en son absence (Zlatanova and Doenecke 1994). Des analyses de quantification du niveau d'histones H1 présentes sur la chromatine de ces souris révèlent que le ratio de H1 par nucléosome est demeuré similaire dans la chromatine déficiente en H1^o. Cette conservation du ratio H1:nucléosome est due à l'augmentation des autres H1 somatiques, spécialement H1c, H1d, et H1e. Pour examiner l'importance individuelle des H1s, des souris déficientes pour ces trois histones ont été générées par recombinaison homologe (Fan et al. 2001). Aucun phénotype ou altération au niveau du développement n'a été observé chez ces souris. On a ensuite voulu identifier si l'une de ces trois H1s était spécifiquement responsable pour la compensation retrouvée dans les souris H1^o-nuelles. La génération de souris déficientes pour H1c/H1^o, H1d/H1^o ou H1e/H1^o n'apporta pas plus de réponses, puisqu'elles ne démontrent aucun signe anormal non plus. Puisque la chromatine n'est pas altérée, on suppose que les sous-types d'histones individuelles ne sont pas essentiels. Cependant, la préservation d'une stœchiométrie fidèle en nucléosomes et H1 serait fondamentale. Chez la levure, une délétion du gène H1 ne semble pas plus affecter le phénotype, mais des examens par biopuces du génome confirment une diminution modeste dans l'expression de 27 gènes (Hellauer et al. 2001). La combinaison de ces résultats porte donc à croire que toutes les H1 ne sont pas essentielles mais qu'elles sont quand même responsables de l'activation de certains gènes. Non convaincu que les H1s soient redondantes chez le mammifère et pour établir comment H1 affecte la structure de la chromatine ainsi que la transcription *in vivo*, le laboratoire du Dr. Skoultchi a effectué une triple délétion pour les histones H1c, H1d et H1e (Fan et al. 2003). Cette combinaison s'est avérée fatale chez le mammifère, puisqu'aucun souriceau portant cette mutation n'a vu le jour. Malgré la létalité de cette triple délétion, des cellules souches embryonnaires (ES) ont quand même été isolées à partir des mutants. En comparant le ratio de H1 par nucléosome des cellules ES triple nulles et sauvages, il a été établi que les cellules triple nulles ne contiennent que la moitié (0.25) de H1 normalement retrouvé par nucléosome dans les ES sauvages (0.5) (Tableau 2) (Fan et al. 2005). Malgré cette importante

réduction, aucun changement de morphologie ou de vitesse de croissance n'a pu être observé chez les cellules ES mutantes. Par contre des études de biopuces ont décelé que l'expression de 29 gènes démontre une augmentation ou diminution de plus de 2 fois. De plus, une diminution de la présence de H4-K12 acétylée et de H3-K9 di-méthylée a été notée, tandis que d'autres modifications comme H3-K27 méthylée et H3-K14 phosphorylée sont demeurées inchangées.

Tableau 2. Composition et stoechiométrie par nucléosome des sous-types d'histones H1 provenant de cellules souches embryonnaires sauvages et mutantes. Tiré et modifié de Fan et al. 2005.

Genotype	% of Total H1*						Total H1 per Nucleosome [#]
	H1 ^o	H1a	H1b	H1c	H1d	H1e	
wild-type(+/+) (F4)	2.1± 1.4	13.5± 0.4	21.0± 2.4	16.4± 2.7	32.6± 0.4	12.4 ± 0.5	0.46±0.05
H1cH1dH1e (c-c-c-c-c)(F1)	8.6± 3.9	34.3± 3.4	57.1± 1.6	0	0	0	0.26±0.03
H1cH1dH1e (c-c-c-c-c)(F6)	6.2± 2.1	34.6± 1.3	60.1± 0.9	0	0	0	0.25±0.05

Chez plusieurs espèces, certaines formes somatiques de l'histone H1 sont absentes des ovocytes et embryons. Cependant, leur détection devient perceptible sur la chromatine au moment où le génome de l'embryon s'active transcriptionnellement (Ohsumi and Katagiri 1991; Dworkin-Rastl et al. 1994; Clarke et al. 1992; Smith et al. 1995). La perte et la réapparition d'histones H1 somatiques peuvent aussi être observées dans les protocoles de transfert nucléaire. Lorsque le noyau d'un blastomère de morula est transplanté dans un ooplasme, il est possible d'utiliser un anticorps reconnaissant certaines H1 somatiques afin de démontrer l'absence de ces derniers sur la chromatine. Lorsque l'on laisse ces mêmes embryons reconstruits en culture, l'immunoréactivité de ces histones H1s réapparaît au stade 8- à 16-cellules, similairement aux embryons bovins non-manipulés (Bordignon et al. 1999).

La substitution des sous-types d'H1 ainsi que le changement dans leurs niveaux d'expression pendant l'ovogénèse et l'embryogénèse sont bien connus chez plusieurs organismes. Ces événements ont été largement étudiés chez l'oursin de mer, où des

groupes variés de gènes d'histones sont exprimés successivement pendant les premiers stades du développement. Avant d'être fécondé, et pour une brève période après la fécondation, l'ovocyte de l'oursin de mer produit un grand nombre de l'histone de liaison maternelle connue sous le nom de « cleavage-stage linker H1 » (Childs et al. 1982; Herlands et al. 1982). Une transition similaire survient pendant le développement de la grenouille. Chez *Xenopus laevis*, les ovocytes possèdent une variante de l'histone H1 nommée B4 ou HIM. L'histone B4 est la principale histone de liaison pendant l'embryogénèse jusqu'à la transition mi-blastula. Par la suite, ce sont les sous-types somatiques qui la remplacent pour devenir prédominants vers la fin de la gastrulation (Dimitrov et al. 1993). Ces transitions dans la composition de la chromatine corrént avec des changements majeurs dans l'activité de réplication ou de transcription dans le noyau embryonnaire.

Une histone H1 spécifique à l'ovocyte (H1foo) de mammifère a été découverte en scrutant une librairie sélective d'ADNc d'ovaire de souris (Tanaka et al. 2001). Cette protéine s'est révélée homologue à la B4 de la grenouille et à la csH1 de l'oursin. L'hybridation *in situ* nous dévoile que l'ARNm de l'H1foo est localisé exclusivement dans les ovocytes, et ce pendant tous les stades de développement à partir du follicule primaire. Par RT-PCR, la présence du transcrit de ce gène a été détectée jusqu'au stade embryonnaire 8-cellules. Cependant, la présence du transcrit H1foo diminue subitement après la fécondation. Pour ce qui est de la protéine H1foo, elle décroît et disparaît entièrement au stade 2-cellules chez la souris. (Tanaka et al. 2001)

1.4.6 La modification des histones

Malgré une conformation d'aspect rigide, la chromatine présente une structure très dynamique efficacement exploitée par les différents acteurs impliqués dans le processus transcriptionnel. Les modifications enzymatiques pouvant être apportées aux histones (Figure 1.6), à leurs variantes et aux nucléosomes sont directement responsables de la structure permissive conférée à la chromatine.

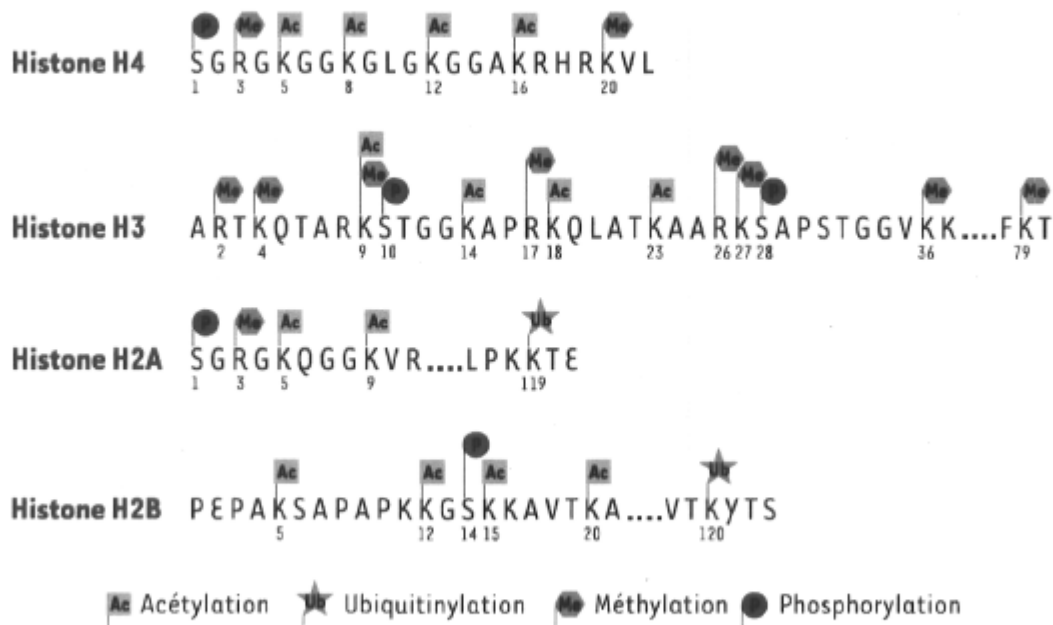


Figure 1.6. Résidus d'acides aminés des histones susceptibles à être modifiés post-traductionnellement chez les mammifères par : acétylation, méthylation, phosphorylation et ubiquitination. Image tirée et adaptée de Lacoste and Cote 2003.

La découverte de modifications post-traductionnelles pouvant altérer la structure et l'affinité des histones pour l'ADN a entièrement révolutionné le domaine. Ces modifications sont essentiellement apportées aux portions N-terminales des histones et agissent selon deux mécanismes. Premièrement presque toutes les modifications altèrent les charges électrostatiques des histones, changeant par le fait même les propriétés structurales des histones et leur affinité pour l'ADN. En deuxième lieu, ces modifications pourraient former des surfaces de reconnaissance pour le recrutement et l'attachement spécifique de complexes protéiques (Strahl and Allis 2000). Ces modifications dites épigénétiques sont des marques laissées sur des régions génomiques, agissant comme des instructions pour l'organisation spécifique de la structure de la chromatine afin de dicter son état transcriptionnel. En effet, sans remanier le code génétique sous-jacent, les modifications épigénétiques contrôlent le décodage et l'interprétation de l'information compris dans un segment de chromatine. Ce remodelage repose sur l'intervention

d'enzymes spécialisées capables de modifier covalamment les histones par acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation et ribosilation (Biel et al. 2005). Les modifications post-traductionnelles des histones par acétylation, méthylation et phosphorylation seront vues en détails dans les pages suivantes.

1.4.7 L'acétylation des histones

Les modifications conférées par les histones acétyltransférases (HAT) sont parmi les transformations les mieux étudiées et décrites. Il est maintenant bien reconnu qu'elles sont très étroitement jumelées avec l'activité transcriptionnelle (Brownell and Allis 1996; Wolffe and Pruss 1996). D'ailleurs ce lien a été établi avec la découverte des complexes de co-activation qui nécessitent une fonction d'acétylation afin d'activer la transcription, et des complexes de co-repression qui doivent posséder une activité de déacétylation pour conférer la répression de la transcription (Brownell et al. 1996; Wong et al. 1998). La pensée générale est que l'ajout d'un groupement acétyl, sur certains résidus spécifiques sur le groupe amine en epsilon des lysines, neutralise la charge positive des histones (Figure 1.7). Ceci aurait comme effets de réduire l'affinité des parties N-terminales des histones pour l'ADN et d'affaiblir les liens nucléosomes-nucléosomes, causant ainsi des changements conformationnels dans la structure nucléosomale. Ces changements augmenteraient ainsi l'accessibilité des facteurs de transcription et de protéines nucléaires sur l'ADN double brin dans la région affectée. L'effet opposé est causé par la déacétylation des résidus lysines. Les histones sont acétylées de façon réversible et chacune des histones H2B, H3 et H4 ont quatre lysines susceptibles d'être acétylées alors que H2A en possède deux (Figure 1.6).

Il existe deux classes de HATs : le type-A et le type-B, dépendant de leur localisation cellulaire, leur fonction et leur origine. Les HATs de type-A sont retrouvées dans le noyau où elles acétylent les histones nucléosomales, d'où leur rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. Elles agissent comme co-activateurs transcriptionnels. Pour ce qui est des HATs de type-B, elles joueraient plutôt un rôle de « housekeeping » dans la cellule. Elles acétylent les histones libres à l'intérieur du cytoplasme et pourraient intervenir dans

l'assemblage de la chromatine (Roth and Allis 1996; Brownell and Allis 1996; Benson et al. 2007).

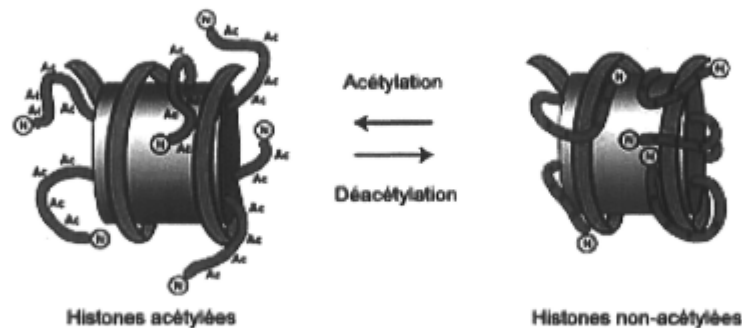


Figure 1.7. Schéma de nucléosomes avec leurs histones acétylées ou non-acétylées. Tiré et adapté de Hassig and Schreiber 1997.

Pour l'instant, un peu plus d'une trentaine de HATs sont identifiées dans diverses espèces allant de la levure à l'humain (revue, Sterner and Berger 2000; Yang 2004). Avant d'être définies comme des enzymes pouvant modifier les histones, la plupart de ces protéines étaient reconnues comme des régulateurs de la transcription. L'ensemble de ces enzymes peut être subdivisé en familles dont voici les principales (Tableau 3) : **1)** la superfamille des GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase) rassemble des protéines avec diverses séquences et motifs conservés entre elles (Neuwald and Landsman 1997). **2)** La famille des MYST (MOZ, Yb2f/Sas3, Sas2 et Tip60) compte plusieurs membres qui demeurent peu caractérisés. Même si ils possèdent tous une région HAT similaire, ils démontrent plusieurs différences dans leur domaine, dans la formation de complexes multiprotéiques et dans leurs fonctions biologiques (Carrozza et al. 2003; Yang 2004). **3)** La famille des protéines p300 et CBP, qui sont reconnues comme des co-activateurs de transcription. Ces deux protéines jouent un rôle crucial dans la coordination et l'intégration de facteurs de transcription dans la machinerie transcriptionnelle (Chan and La Thangue 2001). **4)** La famille des co-activateurs des récepteurs hormonaux nucléaires, qui déclenchent l'activation transcriptionnelle via des signaux hormonaux. Cette famille est unique puisque l'activité HAT interagit directement avec les récepteurs hormonaux. Leur activité est

régulée par l'acétylation de leur domaine de liaison aux récepteurs par p300/CBP (Chen et al. 1999b). 5) La famille du facteur TAF_{II}250. Cette protéine est une des sous-unités de TAF_{II}

Tableau 3. Classification des histones acétylases connues. Tiré et adapté de Yang 2004.

Family	LAT	Organism	Substrate	Stoichiometric complex	Established roles/function
Hat1	Hat1	<i>S.cerevisiae</i> to mammals	H4	Hat B	Histone deposition, chromatin assembly and gene silencing
Gcn5/PCAF	Gcn5	<i>S.cerevisiae</i>	H4/H2B	SAGA, ADA, HAT A2, SLIK/SALSA	Transcriptional co-activator
p300/CBP	PCAF	Mammals	H3/H4, TFs, E1A, TAT	PCAF	Transcriptional co-activator
	GCNSL	Worms to mammals	H3/H4, TFs ^a	STAGA, TPTC	Transcriptional co-activator
	CBP	<i>C.elegans</i> to mammals	Histones, TFs, E1A		Transcriptional co-activator
	p300	Mammals	Histones, TFs, E1A, TAT		Transcriptional co-activator and E4 ubiquitin ligase for p53
MYST	Sas2	<i>S.cerevisiae</i>	H4 K16 ^b	SAS	Gene silencing
	Sas3	<i>S.cerevisiae</i>	H3	NuA3	Transcriptional elongation
	Esa1	<i>S.cerevisiae</i>	H4/H2A	NuA4, piccolo NuA4	Transcriptional coactivator and cell cycle control
p160	Mof	<i>Drosophila</i>	H4 K16	MSL	Gene dosage compensation
	Chameau	<i>Drosophila</i>			PcG-dependent gene silencing
	Enok	<i>Drosophila</i>			Neuroblast proliferation
	TIP60	Mammals	H3/H4, androgen receptor	TIP60	Transcriptional co-activator, DNA repair and apoptosis
	MOF	Mammals	H4	MAF2	Transcriptional co-activator
CHTA	HBO1	Mammals	H3/H4 ^b		DNA replication, transcriptional co-repressor
	MOZ	Mammals	H3/H4		Transcriptional co-activator
	MORF	Mammals	H3/H4		Transcriptional co-activator
	SRC 1	Mammals	H3/H4		Transcriptional co-activator
ATF2	ACTR	Mammals	H3/H4		Transcriptional co-activator
	CHTA	Mammals	H4		Transcriptional co-activator
TAF _{II} 250	ATF2	Mammals	H4/H2B		Transcriptional activator
	TAF _{II} 230	<i>Drosophila</i>	H3/H4	TFIID	Transcription initiation
TFIIIC	TAF _{II} 250	Mammals	H3/H4	TFIID	Transcription initiation, kinase and ubiquitin ligase
	TFIIIC subunits	<i>S.cerevisiae</i> to mammals	H3/H4		Transcription initiation
	Nut1	<i>S.cerevisiae</i>	H3/H4	Mediator	Transcription initiation
CDY	Elp3	<i>S.cerevisiae</i> to mammals	Histones	Elongator	Transcription elongation, lysine demethylase?
	CDY	Humans	H4		
Hpa2	CDYL	Mammals	H4		Histone to protamine transition during spermatogenesis
	Hpa2	<i>S.cerevisiae</i>	H3/H4		Unknown
	Hpa3	<i>S.cerevisiae</i>			Unknown

^aTF, transcription factor.

^bRecombinant enzymes have weak activity, but their respective complexes are much more active.

(TATA-binding protein [TBP]-associated factor) et fait partie du facteur de transcription TFIID. On suggère que son activité HAT pourrait être utilisée lors de l'initiation de la formation du complexe transcriptionnel dans la région promotrice de la chromatine (Stern and Berger 2000). 6) La dernière famille représente trois composantes du complexe TFIIIC. Ce complexe est un facteur général de transcription de l'ARN Pol III. Leur rôle demeure éluif, mais on pense qu'elles pourraient jouer une fonction similaire à TAF_{II}250 (Stern and Berger 2000).

Certaines des HATs de ces familles ont aussi la capacité d'acétyler d'autres substrats que les histones, on les nomme FATs (facteur d'acétyltransférase). On retrouve entre autre cette activité chez PCAF, p300/CBP et TAF_{II}250 (Sterner and Berger 2000; Yang 2004). Les substrats impliqués peuvent être des activateurs ou co-activateurs de transcription, des facteurs basaux ainsi que des protéines chromosomales non-histones.

Les HATs agissent sur une diversité remarquable de substrats et démontrent un haut degré de spécificité pour les résidus sur lesquels elles agissent, confirmant ainsi leur potentiel de mécanisme régulateur. Les familles des GNAT et MYST seront vues plus en détails dans les prochains paragraphes.

1.4.7.1 *Les HATs de la famille des GNAT*

Les gènes composant la famille des GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase) sont très bien caractérisés. En plus de contenir un domaine catalytique particulier aux HATs dans leur région C-terminale, chacun des membres de cette famille contient un bromo-domaine qui interagit spécifiquement avec des groupements lysines acétylés (Biel et al. 2005). Cette famille présente également quatre séquences ou motifs conservés dont leurs fonctions demeurent vaguement comprises. Finalement, les membres de cette famille possèdent également la séquence Arg/Gln-X-X-Gly-X-Gly/Ala, une suite nécessaire à la reconnaissance et la liaison du substrat acétyl-CoA (Wolf et al. 1998). Les GNATs sont retrouvées dans une variété de complexes HAT (revue, Carrozza et al. 2003).

Gcn5 a été la première protéine à être identifiée comme une HAT de type-A (Brownell et al. 1996). Cependant, des extraits nucléaires fractionnés par chromatographie avaient préalablement révélé qu'un peptide exposant une activité acétylase sur des histones libres était présent chez *Tetrahymena thermophila* (Brownell and Allis 1996). Ce peptide correspondait à une protéine, Gcn5, qui avait été préalablement reconnue chez la levure comme étant un co-activateur impliqué dans l'interaction entre certains activateurs et complexes de transcription (Marcus et al. 1994; Silverman et al. 1994). Des mutations introduites dans le domaine HAT de Gcn5 ont permis d'identifier les résidus critiques pour

son activité et ont aussi permis de démontrer que l'activité HAT de Gcn5 est impliquée dans la croissance cellulaire, dans la transcription *in vivo* et dans l'acétylation d'histones de certaines régions promotrices (Kuo et al. 1998; Wang et al. 1998). En analysant un peu plus ces mutants, il a aussi été déterminé que l'activité HAT de Gcn5 peut avoir un effet sur le remodelage *in vivo* de la chromatine dans des régions promotrices spécifiques (Gregory et al. 1998). *In vitro*, la protéine recombinante peut acétyler les H3 et H4 libres, mais seulement dans un contexte de complexe comprenant de multiples sous-unités natives (ex : SAGA et ADA), par contre Gcn5 peut acétyler efficacement des histones comprises dans le nucléosome (Kuo et al. 1996; Ruiz-Garcia et al. 1997). Elle est essentielle chez plusieurs organismes puisque sa délétion chez la souris occasionne un arrêt du développement embryonnaire (Xu et al. 2000), tandis que chez la levure son absence engendre une accumulation de cellules en G2/M (Zhang et al. 1998). Cette HAT demeure la plus caractérisée et les membres de la famille des GNAT ont été classés dans ce sous-groupe selon leur homologie avec Gcn5.

Hat1 est la première et la seule acétylase identifiée et décrite comme une HAT de type-B, impliquée dans la modification des histones cytoplasmiques destinées à l'ADN nucléaire (Kleff et al. 1995; Parthun et al. 1996). Sa mutation chez la levure ne cause aucun effet phénotypique, laissant sous entendre que ses fonctions sont partagées par une ou d'autres HATs. Sa purification met en évidence une autre protéine, Hat2, qui est nécessaire pour son ancrage à l'histone H4 et pour la spécificité du substrat (Parthun et al. 1996). Hat2 fait partie d'une famille dont certains membres sont impliqués dans l'assemblage de la chromatine via CAF-1 (Verreault et al. 1996). Certaines évidences laissent croire que l'activité d'Hat1 n'est pas exclusivement conférée au cytoplasme, puisque Hat1 et Hat2 sont retrouvées dans un complexe HAT nucléaire acétylant efficacement les histones libres (Ruiz-Garcia et al. 1998). Leur rôle nucléaire reste à être déterminé, mais il a été suggéré qu'elles pourraient être incluses dans un complexe retrouvé à la fourche de réplication afin d'assembler la chromatine.

1.4.7.2 Les HATs de la famille des MYST

Les HATs de cette famille renferment plusieurs domaines, dont certains sont très conservés tandis que d'autres sont seulement analogues entre quelques membres. Celui qui contrôle l'acétylation des histones, le domaine MYST, est présent chez tous les membres de ce groupe d'enzymes (Yang 2004). Une portion de ce domaine est aussi conservée chez les membres de la famille des GNAT. Ces enzymes, sauf Eas1, possèdent également toutes un motif de liaison à doigt de zinc C2HC près de leur domaine MYST. Des mutations spécifiques dans cette région du gène *MOF* a permis de constater qu'il était essentiel pour l'activité HAT du domaine catalytique MYST (Akhtar and Becker 2001). Ce motif à doigt de zinc fait contact avec la chromatine à travers le domaine globulaire du nucléosome ainsi qu'avec la région N-terminale de l'histone H4. On retrouve aussi deux domaines PHD (plant homeodomain-linked) à doigt de zinc dans la région N-terminale de Enok, MOZ et MYST4 (MORF β) (Aasland et al. 1995; Borrow et al. 1996; Champagne et al. 1999; Scott et al. 2001). Ce domaine PHD est aussi connu sous le nom de domaine LAP (leukemia-associated protein) et est présent dans plusieurs régulateurs de chromatine (Saha et al. 1995; Ito et al. 1999). Des mutations dans ce domaine contribuent à une panoplie de maladies chez l'homme (Capili et al. 2001; Gibbons et al. 2003). Une séquence dans MOZ et MYST4 démontre aussi beaucoup de similarité avec le domaine globulaire des histones H1 et H5 (domaine H15) (Yang 2004). Même si la fonction de ce motif n'est pas déterminée pour ces deux gènes, ces régions sont normalement reconnues pour susciter l'association d'une protéine avec une semblable, avec le nucléosome ou bien avec une des histones formant cette structure (Ramakrishnan et al. 1993; Carter and van Holde 1998). Finalement, la région C-terminale de MOZ et de MYST4 est riche en sérines et méthionines (domaine SM) et possède un potentiel d'activation de transcription (Champagne et al. 1999; 2001).

Les membres de la famille MYST ont des fonctions très diversifiées : le contrôle épigénétique, la régulation de la transcription, la réplication de l'ADN, l'assemblage de la chromatine, la progression du cycle cellulaire ainsi que la signalisation cellulaire (révisé dans Sterner and Berger 2000; Carrozza et al. 2003). Quelques unes des composantes de

cette famille ont été associées à différents complexes impliqués dans certaines des fonctions mentionnées (Carrozza et al. 2003; Yang 2004; Doyon et al. 2006).

Esa1 (essential Sas family acetyltransferase 1) a été identifiée comme étant essentielle pour la progression du cycle cellulaire et pour la viabilité de la levure. (Clarke et al. 1999). Ses fonctions ont été établies par la création de lignées contenant des mutations sensibles à la température. La croissance de ces lignées dans un environnement restrictif cause l'arrêt du cycle cellulaire juste avant la mitose, et la division cellulaire, au stade transitoire G2-M. Cette enzyme a une forte affinité pour la lysine 5 de l'histone H4, et sa délétion cause une diminution flagrante de cette modification covalente.

Chez la Drosophile, MOF (male-absent on the first), s'avère indispensable dans la survie des mâles. Les mâles de cette espèce doivent exprimer deux fois plus les gènes présents sur leur unique chromosome X afin que leur expression soit au même niveau que ceux de la femelle qui possède deux chromosomes X. Cette régulation implique entre autre que H4-K16 soit acétylée par MOF via un complexe (Hilfiker et al. 1997; Gu et al. 2000). L'acétylation de cette lysine particulière confère un état plus accessible à la chromatine afin que le complexe impliqué dans cette compensation d'expression vienne s'installer sur un endroit précis situé sur le chromosome X.

Une HAT de ce groupe qui nous intéresse particulièrement se nomme MYST4 (alias MORF : monocytic leukemia zinc finger protein-related factor). Elle a été identifiée grâce à sa similarité avec MOZ (monocytic leukemia zinc finger protein) (Champagne et al. 1999). Trois formes alternatives de MYST4 sont connues (MORF, MORF α , MORF β) et des études *in vitro* démontrent que MYST4 est capable d'acétyler des histones, ayant une préférence pour les histones H2A, H3 et H4 libres ainsi que pour H3 et H4 nucléosomales. On ignore son implication spécifique dans les processus transcriptionnels, mais on sait que des anomalies chromosomiques retrouvées chez des patients souffrant de leucémie démontrent que le gène MYST4 est réarrangé et fusionné avec le gène CBP (Panagopoulos et al. 2001; Murati et al. 2004). Cette translocation a aussi été associée avec MOZ (Borrow et al. 1996). La mutation de MYST4 (Querkopf) chez des souris homozygotes cause la

perte de 90% des transcrits normaux comparativement aux souris sauvages (Thomas et al. 2000). Ces énormes diminutions causent des anomalies crânio-faciales, des retards dans le développement post-natal, des défauts du système nerveux et des problèmes neurogéniques chez l'adulte (Thomas et al. 2000; Merson et al. 2006). Ces problèmes sont essentiellement entraînés par la perte de fonction de MYST4 dans les cellules neurales ainsi que dans la formation des os (via son interaction avec RUNX1; runt-related transcription factor 1) (Thomas et al. 2000; Rietze et al. 2001; Pelletier et al. 2002; Lian et al. 2003). Puisqu'il y a encore une expression partielle de MYST4, ces souris réussissent néanmoins à se développer. La présence de domaines répresseurs et activateurs dans les régions terminales de MYST4, ainsi que la présence des domaines H15 et C2H2, permettent de présumer qu'elle pourrait posséder certaines fonctions partagées par les autres membres de sa famille mais aussi d'autres qui lui seraient propres (Pelletier et al. 2002; Yang 2004).

1.4.8 La déacétylation des histones

Pour ce qui est des enzymes provoquant la réaction inverse de l'acétylation, elles sont appelées histones déacétyltransférases (HDAC) (revue, Grozinger and Schreiber 2002; Biel et al. 2005). Comme leur nom l'indique, elles déacétylent les groupements acétylés retrouvés sur les histones. Même avant l'isolation et la caractérisation de la première HDAC, on était capable d'inhiber l'action de ces enzymes et de mesurer l'accumulation de formes hyperacétylées de H3 et H4 (Boffa et al. 1978). Tout comme pour les HATs, ces enzymes sont très importantes dans la modification de la structure de la chromatine et dans la régulation de l'expression génique. Elles sont non seulement impliquées dans la régulation de la transcription mais aussi dans la progression du cycle cellulaire, le silence génique, la différenciation, la réplication de l'ADN et dans la réponse aux dommages à l'ADN (revue, Thiagalingam et al. 2003). Présentement il y a 18 HDACs connues chez l'humain. Malgré la connaissance des fonctions globales des HDACs on ignore la responsabilité de la majorité de ces individus. Les HDACs ne peuvent pas interagir directement avec l'ADN ou les histones, elles ciblent leur site d'action avec l'aide de protéines se liant à l'ADN, ou bien à travers différents facteurs de transcription et complexes multiprotéiques (Grozinger and Schreiber 2002). Il y a deux familles de

déacétylases identifiées chez les eucaryotes : les HDACs et les Sir2-similaires aux déacétylases (Sirtuins) (Grozinger and Schreiber 2002; Biel et al. 2005). Les HDACs possèdent un domaine catalytique hautement conservé et sont toutes sensibles à l'inhibiteur de déacétylase TSA (Tricostatin A) tandis que les Sirtuins se partagent une région active distincte et ne sont pas affectées par le TSA (Thiagalingam et al. 2003). Les HDACs se divisent en deux sous-groupes selon leur ressemblance à des HDACs retrouvées chez la levure ; les HDACs de classe I ressemblent à Rpd3 tandis que celles de la classe II sont similaires à Hda1.

La première classe de HDACs chez l'humain regroupe les HDACs qui ont une petite taille, généralement entre 40 et 55 kDa (HDAC1, -2, -3, -8 et -11). Ces dernières partagent entre elles une séquence hautement homologue à Rpd3, la même structure compacte ainsi qu'une localisation nucléaire exclusive dans la plupart des tissus et lignées cellulaires (Fischle et al. 2001). C'est grâce à la puissante affinité de HDAC1 pour le Trapoxin, un inhibiteur de HDAC, qu'on a finalement réussi à isoler la première déacétylase (Taunton et al. 1996). Dans cette classe, ce sont HDAC1 et HDAC2 qui sont les mieux caractérisées. Entre autre, ces deux enzymes régulent la fonction d'un facteur de transcription, YY1, qui active ou réprime plusieurs gènes durant la croissance et la différenciation cellulaire et qui est nécessaire pour le développement normal de l'embryon de mammifère (Yao et al. 2001). Les groupements acétyles déposés sur YY1 par p300 et PCAF sont efficacement enlevés par HDAC1 et HDAC2. Ces déacétylases sont également retrouvées dans de gros complexes protéiques qui sont associés au silence transcriptionnel tel que Sin3, NuRD et CoREST (Grozinger and Schreiber 2002; Thiagalingam et al. 2003). Dans le complexe Sin3, HDAC1/HDAC2 s'assemble avec mSin3A, RpAp46/48 et SAP18/30, un complexe qui peut être recruté par différents facteurs tel que MeCP2 (Methyl CpG-Binding Protein 2). MeCP2 se lie aux îlots CpG méthylés, et sous l'effet du complexe Sin3, remodèle la chromatine afin d'éteindre spécifiquement l'expression génique (Jones et al. 1998). HDAC1 et HDAC2 sont aussi mobilisées par certaines enzymes reliées à la méthylation de l'ADN, comme DNMT1 et DNMT3B (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1 et 3B), afin de contrôler l'expression génique (Robertson et al. 2000; Rountree et al. 2000).

La deuxième classe de HDACs humaines rassemble des enzymes possédant une dimension beaucoup plus volumineuse, variant entre 100 et 139 kDa (HDAC4, -5, -6, -7, -9 et -10). La principale caractéristique de ces enzymes est leur ressemblance pour la déacétylase Hfa1 de levure. Contrairement à la première classe, les HDAC de classe II ne sont présentes que dans un nombre limité de lignées cellulaires et leur localisation ne se limite pas uniquement au noyau puisqu'on les retrouve également dans le cytoplasme (Biel et al. 2005). Le patron d'expression restrictif de ces enzymes suggère qu'elles pourraient bien être impliquées dans la différenciation cellulaire et le développement (Fischle et al. 1999; Grozinger et al. 1999). Une autre chose qui les différencie des HDAC de classe I est qu'elles possèdent des domaines de répression (Sparrow et al. 1999; Kao et al. 2000; Lemerrier et al. 2000). Elles interagissent avec d'autres co-répresseurs ou se lient directement avec des facteurs de transcription comme MEF2 (myocyte enhancer factor 2), Runx3, NF-AT3c (nuclear factor of activated T cells) (Yang and Gregoire 2005). La liaison aux membres de la famille des MEF se fait via une région comprise dans la partie N-terminale des enzymes HDAC4, -5, -7 et -9. Les MEF2 interagissent avec des régions promotrices spécifiques de la chromatine et sont identifiées comme des activateurs de transcription majeurs dans l'expression de gènes spécifiques aux muscles (Black and Olson 1998). Le site de liaison pour les HDACs sur MEF2 est aussi convoité par les HATs (ex : p300), démontrant ainsi que certaines HATs et HDACs interagissent avec les mêmes facteurs de transcription afin de réguler l'activité transcriptionnelle (Biel et al. 2005). La liaison d'un facteur de transcription avec une HAT signifie une transcription active des gènes qu'il contrôle, tandis que son union avec une HDAC les inactive.

Pour ce qui est des enzymes Sirtuins, elles forment la troisième classe de HDAC (SIRT1 à SIRT7). Elles ont gardé plusieurs similitudes avec leur protéine ancestrale, Sir2 (silent information regulator 2). Contrairement aux HDACs de classe I et II, celles-ci nécessitent le NAD⁺ (nicotine adénine dinucléotide) comme cofacteur dans leur réaction catalytique (Imai et al. 2000). De plus, les Sirtuins contiennent deux domaines à doigt de zinc (motif CXXC) et au moins une région hydrophobique (leucine zipper) qui facilite les interactions protéine-protéine et protéine-ADN (Brachmann et al. 1995; Frye 2000). Pour l'instant

l'activité déacétylase des SIRT est très peu documentée, seule SIRT1, -2 et -3 sont bien caractérisées, alors que peu de choses sont connues pour SIRT4, -5, -6, et -7.

1.4.9 La méthylation des histones

La première étude à signaler que les histones pouvaient être méthylées a été effectuée dans le milieu des années soixante (Murray 1964). Mais l'effervescence de cette découverte a pris tout son ampleur vers la fin des années 90 après qu'un lien direct fut établi entre cette modification des histones et la régulation de la transcription (Chen et al. 1999a). La méthylation peut avoir plusieurs impacts sur les fonctions de la chromatine, dépendamment du résidu spécifique ciblé et du niveau de la modification (mono-, di- ou tri-méthylé). Tout comme pour l'acétylation, différents résidus situés majoritairement à l'intérieur des portions terminales d'histones sont convoités afin d'être modifiés par l'ajout de groupements méthyls. Même si certains mentionnent que la méthylation des histones H1, H2A ou H2B est observée (Van Holde 1988; Spencer and Davie 1999), cette modification marque plutôt les histones H4 et H3 (Figure 1.6) (Biel et al. 2005). Contrairement à l'acétylation, la méthylation n'affecte pas la charge totale des queues d'histones (Biel et al. 2005). Par contre l'augmentation du niveau de méthylation cause une élévation de la basicité, de l'hydrophobicité et influence l'affinité des histones envers les molécules anioniques (Byvoet et al. 1972; Baxter and Byvoet 1975). Ces changements affectent l'interaction des histones avec l'ADN ainsi qu'avec les protéines associées à la chromatine, modifiant par le fait même la structure du nucléosome et ses fonctions (Rice and Allis 2001).

Depuis la découverte de la première histone méthyltransférase (HMT), plusieurs autres HMTs ont été identifiées et caractérisées. Les histones peuvent être méthylées sur leurs résidus lysines et arginines, et dans les deux cas, les modifications sont effectuées par des enzymes HMTs spécifiques sur des résidus qui doivent être exempts de groupement acétyl. Afin d'ajouter encore plus de variabilité et de complexité au phénomène de méthylation, on dénote que les lysines des histones peuvent subir une mono-, di- ou tri-méthylation tandis que les arginines, elles, ne sont que mono- ou di-méthylées (Biel et al. 2005). Avec les

précisions apportées aux différentes HMTs, on sait maintenant que la méthylation des histones ne résulte pas en une activation ou répression transcriptionnelle automatique, car la localisation du résidu méthylé et le nombre de groupements méthyls insérés à l'intérieur d'une histone spécifique affectera différemment la régulation génique (Iizuka and Smith 2003). Prenons par exemple le résidu K4 de l'histone H3; sa di-méthylation est associée avec l'activation et la répression de certains gènes, tandis que sa tri-méthylation est reliée uniquement avec la régulation de gènes actifs (Fischle et al. 2003)

1.4.9.1 *La méthylation des résidus lysines des histones*

Malgré plusieurs similitudes existant dans le processus d'acétylation des lysines, il reste que la méthylation de ces résidus comporte plusieurs particularités. Bien que moins dynamique que l'acétylation, la méthylation semble beaucoup plus stable à long terme (Sims et al. 2003). En plus d'être fondamentale dans l'établissement et la maintenance de l'activité transcriptionnelle, la méthylation des lysines de H3 et H4 (Figure 1.6) joue également un rôle dans la génération d'empreintes génétiques ainsi que dans l'inactivation du chromosome X (mammifères femelles) (Sims et al. 2003). Comme préalablement mentionné, les lysines peuvent subir une triple méthylation par les HKMTs (histones lysines méthyltransférases). En plus de changer la structure et la fonction de la chromatine, on suppose que la tri-méthylation des résidus lysines augmenterait la stabilité de cette modification et pourrait générer une empreinte génétique à long terme (ex : l'inactivation du chromosome X chez le mammifère femelle) (Lachner et al. 2003).

Des HKMTs ont été caractérisées chez plusieurs espèces dont la levure, la drosophile et certains mammifères. Une propriété commune retrouvée chez ces enzymes est qu'elles possèdent toutes un domaine catalytique du type SET (Suppressor of Variegation, Enhancer of Zeste et TriThorax : 3 premiers membres retrouvés chez la drosophile). Ce motif catalytique se retrouve dans la partie globulaire des HKMTs et est constitué d'environ 130 acides aminés (Biel et al. 2005). Depuis quelques années, des variations structurales du domaine SET ont été décelées (revue, Couture et al. 2006). Ces différences de domaines SET pourraient permettre aux HKMTs de reconnaître une multitude de substrats, mettant

même en doute leur spécificité envers les lysines des histones. Afin d'avoir une activité enzymatique fonctionnelle, le domaine SET doit être nécessairement bordé par des régions riches en cystéines (domaine pré-SET ou post-SET) (Kouzarides 2002; Schneider et al. 2002; Marmorstein 2003). Puisque la grande majorité des protéines contenant un domaine SET sont des HMTs, on a pu identifier plusieurs de ces enzymes par homologie de ce domaine.

La méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 est une modification très bien caractérisée. Tout comme pour la méthylation des autres résidus histones, on la retrouve sur certains sites définis dans l'hétérochromatine ou bien l'euchromatine. Chez la souris la délétion de protéines HKMTs reconnues (Suv39h1 et Suv39h2) affecte la méthylation normale de H3-K9 présente dans l'hétérochromatine (Aagaard et al. 1999; Peters et al. 2001). En plus de démontrer une méthylation réduite d'environ 50% sur H3-K9, ces souris manifestent un retard de croissance et des défauts dans la ségrégation de leurs chromosomes. La délétion d'une autre HKMT qui agit sur les H3-K9 de la souris a aussi pour effet de réduire globalement la méthylation de ces résidus (Tachibana et al. 2002). En effet, la perte de l'enzyme G9a chez la souris résulte en des niveaux équivalents à moins de 20% des proportions mesurées chez des souris sauvages. Des défauts majeurs de méthylation des H3-K9 sont retrouvés au niveau de sites hétérochromatiques et euchromatiques. Cette délétion est non seulement néfaste au niveau moléculaire, mais également du point de vue phénotypique puisqu'elle cause un arrêt complet du développement et la mort embryonnaire.

La méthylation de H3-K9 est ciblée spécifiquement par un chromodomaine contenu à l'intérieur de la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1). Cette protéine est impliquée dans la répression transcriptionnelle puisqu'elle cause la condensation de la chromatine et la formation d'hétérochromatine (Bannister et al. 2001; Lachner et al. 2001). Un dérèglement dans la méthylation des groupements H3-K9 dans une région empêche la fixation de protéines HP1 et le niveau de transcription est maintenu puisque la condensation de la chromatine et la formation d'hétérochromatine sont enrayées.

Les HKMTs possèdent toutes un domaine SET, sauf pour une exception. La protéine Dot1 (Disruptor of telomeric silencing-1) fait partie d'une autre classe de HKMTs puisqu'elle ne contient pas le motif distinct aux autres HKMTs (Khan and Hampsey 2002; Lacoste et al. 2002). Contrairement à la majorité des autres HKMTs qui cible des résidus présents dans la portion terminale des histones, Dot1 vise une lysine (K79) qui est contenue à l'intérieur du domaine globulaire de H3. Le méthylation de H3-K79 est associée avec la répression du locus télomérique. Cette méthylation apporte aussi un changement structural de la chromatine qui semble favoriser la fixation de protéines Sir (Sir2 et Sir3) dans l'hétérochromatine (Ng et al. 2002).

1.4.9.2 *La méthylation des résidus arginines des histones*

Jusqu'à présent 7 PRMTs (protéines arginines méthyltransférases) ont été identifiées chez le mammifère, cependant seulement trois d'entre elles sont définies comme d'authentiques HMTs (PRMT1, PRMT4 et PRMT5) (Biel et al. 2005). L'activité des autres est plutôt orientée vers des résidus arginines de protéines non-histones qui sont impliquées dans la transduction du signal, l'épissage de l'ARN, le transport de l'ARN et l'interaction protéine-protéine (Biel et al. 2005). Contrairement aux HKMTs, les PRMTs renferment peu de domaines conservés entre elles en dehors de leur domaine catalytique. On constate aussi que dans certains cas, la méthylation des résidus arginine est directement rattachée à l'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes. Cette relation vient du fait qu'il y a une synergie entre la méthylation des arginines et l'acétylation des histones. Lorsque H4-R3 est méthylée par PRMT1, l'acétylation de H4-K8 par p300/CBP est favorisée et intensifie l'activation de la transcription induite par les récepteurs hormonaux du noyau (Wang et al. 2001). Certaines enzymes de ce groupe, comme PRMT5, seraient aussi capables d'induire la répression suite à la méthylation d'histones lorsqu'elles sont incluses dans des complexes visant la région promotrice des gènes (Fabrizio et al. 2002; Pal et al. 2003).

1.4.10 La déméthylation des histones

Tout récemment, la doctrine qui stipulait que la méthylation était un processus irrévocable fut chambardée. Cette théorie venait du fait que le temps de demi-vie de la méthylation

d'une lysine est similaire à celui d'une histone (revue, Bannister et al. 2002). En plus, le fait qu'aucune enzyme possédant un pouvoir déméthylant n'avait été trouvée malgré les efforts de plusieurs renforçait cette pensée. On connaît maintenant quelques enzymes provoquant la déméthylation des histones et elles peuvent être divisées en 3 catégories (PADI4, LSD et protéines à domaine Jmjc).

1.4.10.1 *PADI4*

En 2002, deux équipes ont démontré indépendamment que la méthylation n'est pas un processus statique mais bien réversible (Cuthbert et al. 2004; Wang et al. 2004). Il a été révélé que l'enzyme PADI4 (peptidylarginine déminase 4) est capable de catalyser la conversion des groupements arginines mono-méthylés en citruline (acide aminé non standard normalement absent des protéines). Cette enzyme n'utilise pas les arginines diméthylées comme substrat, donc on peut émettre l'hypothèse que la cellule possède d'autres enzymes capables de déméthyliser les résidus arginines des histones. L'effet sur la structure de la chromatine suite au remplacement d'une arginine par une citruline demeure indéterminé pour l'instant, mais on peut imaginer que ce changement pourrait affecter la reconnaissance et la liaison de d'autres protéines sur ce site. On sait cependant que la déposition des citrulines semble seulement provisoire, mais on ignore toujours comment ces résidus sont remplacés ou reconvertis en arginine ou en méthyl-arginine. Même si PADI4 enlève distinctement la mono-méthylation des arginines elle ne peut être considérée comme une déméthylase pure et dure car elle entraîne aussi le remplacement de l'arginine méthylée par une citruline au lieu d'une arginine non-modifiée. Nous possédons peu d'indices sur l'activité de PADI4 mais on sait qu'elle est rattachée à l'expression de pS2, un gène contrôlé par les œstrogènes (Crosby et al. 1988).

1.4.10.2 *LSD1*

La première réelle enzyme pouvant renverser la réaction de méthylation sur une lysine afin que cette dernière retrouve son aspect non-modifié se nomme LSD1 (lysine specific histone demethylase 1) (Shi et al. 2004). Cette protéine déméthyle spécifiquement la lysine 4 des histones H3 avec l'aide d'une réaction amine oxydase. Cette réaction a notamment été

identifiée sur les H3-K4 des régions promotrices de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et neuronal, mais elle ne semble pas impliquée dans le contrôle de la déméthylation globale ou totale des H3-K4 du génome (Shi et al. 2004). De plus, son action est restreinte sur les H3-K4 qui sont mono- et di-méthylées puisqu'elle est incapable de convertir les résidus tri-méthylés. D'après le mécanisme d'action de la réaction amine oxydase, il est impossible pour ce type d'enzyme d'enlever l'état de méthylation d'une lysine tri-méthylée, donc une autre catégorie d'enzymes est nécessaire pour effectuer cette tâche (revue, Bannister and Kouzarides 2005). De plus, LSD1 fait partie d'une petite famille de gènes qui comprend environ une dizaine de membres dont très peu démontrent un potentiel d'histone déméthylase (Kubicek and Jenuwein 2004; Wysocka et al. 2005). Afin d'avoir sa pleine activité enzymatique, LSD1 doit être associée avec d'autres protéines (ex : CoREST; restin corepressor) qui agissent comme des sous-unités régulatrices et qui modulent l'activité déméthylase de LSD1 (Lee et al. 2005; Shi et al. 2005). La diminution de fonction de LSD1 est directement corrélée avec une augmentation de méthylation de H3-K4 et l'augmentation de la régulation des gènes qu'elle cible (Shi et al. 2004). Si les premières études associaient des fonctions de répresseur de transcription à LSD1, une plus récente indique aussi que LSD1 peut activer certains gènes dont l'expression est hormono-dépendante (Metzger et al. 2005). Les différentes activités de LSD1 sont potentiellement régulées par les protéines qui interagissent avec elle, modifiant ainsi la spécificité du substrat. Son association par exemple avec le récepteur aux androgènes semble lui conférer la capacité de déméthyliser les H3-K9 (Metzger et al. 2005).

1.4.10.3 *Les protéines à domaine JmjC*

Les dernières enzymes à être qualifiées comme des déméthylases de lysines d'histones sont des protéines qui contiennent toutes un domaine JmjC (Jumonji C) (revue, Klose et al. 2006). Leur processus de déméthylation se fait à travers une réaction oxydative qui nécessite du fer (FeII) et du α -ketoglutarate (α KG) comme cofacteurs (Tsukada et al. 2006). Comparativement à LSD1, certaines des déméthylases contenant un domaine JmjC (JHDMs) peuvent enlever la triple méthylation sur les lysines des histones. De plus, les protéines à domaine JmjC forment une vaste famille dont le nombre de membres serait

suffisant pour combler les besoins enzymatiques nécessaires à la régulation et pour contrecarrer la méthylation des histones (Klose et al. 2006). Présentement, on a démontré que les groupements mono- et di-méthylés de H3-K36 sont sollicités par JHDM1A et JHDM1B (Tsukada et al. 2006), les mono- et di-méthylés de H3-K9 sont retirés par JHDM2A (JMJD1) (Yamane et al. 2006) tandis que les sites tri-méthylés de H3-K9 et de H3-K36 sont efficacement délogés par JHDM3A (JMJD2a) (Zhang et al. 2005; Klose et al. 2006). Une caractérisation plus robuste de JHDM3A a permis de découvrir que sa surexpression neutralise le recrutement de HP1 vers la chromatine ce qui pourrait ainsi affecter la structure de l'hétérochromatine (Klose et al. 2006). De plus, la diminution significative des niveaux de l'enzyme JHDM3A par siARN (Short interfering RNA) mène à une augmentation des niveaux de méthylation de H3-K9, ce qui cause une recrudescence entre autre du gène *ASCL2* (Achaete-scute homolog 2) (Klose et al. 2006). JHDM3A pourrait aussi être impliquée avec l'euchromatine afin d'enlever des marques de méthylation restrictive pour activer la transcription de certains gènes. Puisque la découverte des fonctions déméthylases des membres de cette famille vient tout juste d'émerger, nous devrions en apprendre plus dans un avenir rapproché sur leurs responsabilités dans les différents processus de régulation de la chromatine.

1.4.11 La phosphorylation des histones

Les premières indications de la phosphorylation des histones datent aussi des années soixante (Gutierrez and Hnilica 1967). Depuis cette découverte, il a été établi que toutes les histones pouvaient subir cette modification sur certains de leurs résidus sérines, thréonines ou tyrosines (Figure 1.6). La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3-S10) a été excessivement étudiée et on a déterminé quelle était impliquée dans un grand nombre de mécanismes et fonctions qui sont parfois divergents. En effet, l'ajout d'un groupement PO_3^{2-} sur H3-S10 est essentiel pour la condensation des chromosomes puisqu'elle incite la mobilisation de la condensine (Nowak and Corces 2004). Par contre cette phosphorylation spécifique joue aussi un rôle primordial dans l'activation transcriptionnelle puisqu'elle est étroitement liée avec l'acétylation de résidus lysines adjacents. Lorsque H3-S10 est phosphorylée par la kinase Snf1, on remarque que le résidu

lysine (K14) adjacent est activement acétylé par GCN5 (Cheung et al. 2000; Lo et al. 2001). Il a aussi été déterminé que la stimulation de cellules quiescentes par certains facteurs de croissance nécessite l'action de kinases dont l'activité stimule la transcription de c-jun, c-fos et c-myc suite à la phosphorylation de H3-S10 (Mahadevan et al. 1991; Chadee et al. 1999; Zhong et al. 2000; Strelkov and Davie 2002).

Des études sur une chromatine native et reconstruite ont permis de démontrer que la phosphorylation des histones H1 déstabilise la structure de la chromatine (Kaplan et al. 1984; Hill et al. 1991). Cette modification augmente la mobilité des H1 dans le noyau, affaiblit leur interaction avec la chromatine (Lever et al. 2000) et imiterait l'effet d'un enlèvement partiel de H1 (Dou et al. 1999). La phosphorylation de l'histone H1 régule également l'expression de gènes spécifiques, mais comparativement à certaines autres modifications qui n'altèrent qu'un résidu ou la charge d'un résidu spécifique, la phosphorylation des H1 change complètement la charge globale d'un domaine (nommé la « charge-patch ») (Downs et al. 2000). L'augmentation de phosphorylation des H1 pourrait conférer un état de décondensation dans la chromatine, permettant ainsi à certains acteurs impliqués dans la transcription de venir s'installer sur cette dernière (Roth and Allis 1992). Par contre la phosphorylation de H1 pendant la reprise de la méiose ovocytaire est aussi associée à la condensation des chromosomes (Nurse 1990). Chez le mammifère, l'ovocyte en GV démontre une faible activité kinase envers H1, cependant après la GVBD, l'amplification brusque et substantielle de cette activité coïncide avec la condensation des chromosomes en MI ainsi qu'en MII (Hashimoto and Kishimoto 1988; Choi et al. 1991; Jelinkova et al. 1994; Naito and Toyoda 1991; Dedieu et al. 1996; Wu et al. 1997). La double fonctionnalité de la phosphorylation de H1 dans la condensation et la décondensation des chromosomes pourrait être expliquée par le degré de phosphorylation apporté sur les différentes variantes de H1 présentes pendant le cycle cellulaire (Talaszy et al. 1996).

La phosphorylation des histones est aussi fondamentale dans la réparation post-répllicative de l'ADN double brin. Cette modification survient sur la sérine 139 dans la variante H2AX (γ H2AX) seulement quelques minutes après l'apparition d'une brisure de l'ADN (Rogakou

et al. 1998; Downs et al. 2000). La présence de γ H2AX dans la région de l'ADN brisée mène au recrutement de nombreux facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN, ainsi que de la cohésine, un complexe servant à maintenir groupées les chromatides sœurs durant la réplication (revue, Fillingham et al. 2006).

1.4.12 Ubiquitylation, sumoylation et ribosylation des histones

Ces modifications peuvent aussi survenir sur les résidus des histones, mais leur influence sur l'organisation de la chromatine et du nucléosome est beaucoup moins connue que les autres modifications que nous venons de voir. Il est toutefois établi que l'ubiquitylation des histones peut avoir une dualité de rôle, puisqu'elle peut être impliquée dans l'activation et la répression transcriptionnelle (Davie et al. 1991; Shilatifard 2006). L'ubiquitylation de H2A ou de H2B (Figure 1.6) aurait comme effet de fragiliser l'association du dimère H2A-H2B avec le tétramère formé des histones H3 et H4 (Li et al. 1993). Pour ce qui est de la sumoylation, toutes les histones du nucléosome peuvent subir cette modification, mais l'histone H4 est la seule à en démontrer des niveaux élevés (Shiio and Eisenman 2003). Cette H4 sumoylée serait impliquée dans la répression transcriptionnelle à travers le recrutement d'HDACs et de la protéine HP1. Pour ce qui est de la ribosylation des histones, elle semble impliquée dans la relaxation de la chromatine et dans le recrutement de certains facteurs auprès de l'ADN (revue Biel et al. 2005; Hassa et al. 2006).

1.4.13 Le code histone

Ce code est plutôt une hypothèse qui stipule que les diverses modifications post-traductionnelles des histones agissent de façons synergiques ou séquentielles sur une ou plusieurs queues d'histones afin de contrôler divers processus biologiques spécifiques (Strahl and Allis 2000). Ce code déposé sur les histones serait reconnu et interprété par d'autres protéines ou complexes protéiques pour contrôler les diverses fonctions associées à la chromatine. Il y a de plus en plus d'évidences qui suggèrent que la modification des histones sert comme une plateforme hautement sélective pour l'attachement de différentes protéines régulatrices. La liaison hautement spécifique de ces protéines sur certaines

modifications s'effectueraient à travers des domaines conservés avec l'évolution. Parmi ces domaines on distingue a) les bromodomains, que l'on retrouve dans certaines protéines associées à la chromatine ainsi que dans la plupart des HATs, et b) les chromodomains, décelés dans les régulateurs de structure chromatinienne et dans les HATs et HMTs (revue, de la Cruz et al. 2005).

On retrouve des protéines contenant ces domaines autant dans la chromatine active que non-active. Par exemple, plusieurs facteurs de transcription qui contiennent un bromodomaine ont une affinité élevée pour les résidus acétylés de H3 et/ou de H4. Il est spéculé que la liaison spécifique de ces facteurs sur ces résidus acétylés stabiliserait la machinerie transcriptionnelle dans cette région afin d'activer la transcription. Puisque ces protéines se lient spécifiquement à des résidus acétylés, les régions dépourvues de cette modification ne seraient pas capables d'activer la transcription à partir de ces facteurs. Dans le cas contraire, si une région de la chromatine qui est transcriptionnellement active devait être inactivée (hétérochromatine), certains groupements acétyls présents sur les H3-K9 par exemple devaient être enlevés par des HDACs. Ensuite ces mêmes résidus H3-K9 seraient méthylés par des HKMTs afin que les protéines à chromodomaine HP1 soient recrutées par cette modification spécifique, ce qui causera une condensation et une répression locale de la chromatine (de la Cruz et al. 2005).

1.4.14 La modification des résidus d'histones chez l'ovule et l'embryon

Le noyau de l'ovocyte, communément appelé la GV, démontre une conformation unique de la chromatine qui est propice à diverses modifications durant l'ovogénèse (De La Fuente 2006). Quoique plusieurs modifications épigénétiques ont lieu durant cette période de développement ainsi que pendant l'évolution du jeune embryon, très peu d'indices disponibles nous permettent de déchiffrer les mécanismes impliqués dans la restructuration de la chromatine pendant cette période. Il est connu que de nombreuses modifications post-traductionnelles ciblent les résidus d'histones des ovules et embryons afin de réguler l'activité de la chromatine. Parmi elles, l'acétylation et la méthylation des histones sont particulièrement fondamentales dans le contrôle de l'euchromatine et l'hétérochromatine.

La régulation propice de l'activité de la chromatine permet le remodelage approprié du génome de l'ovocyte et un développement normal de l'embryon.

La configuration de la chromatine à l'intérieur de l'ovocyte GV du stade diplotène est diffuse et décondensée autour du noyau (NSN; nonsurrounded nucleolus), alors qu'une fois la croissance de l'ovocyte terminée on observe que cette même chromatine est plutôt condensée (SN; surrounded nucleolus) autour du noyau (revue, De La Fuente 2006). L'arrangement de la chromatine NSN des ovocytes démontre des niveaux de transcription plus élevés que la chromatine SN, qui elle, est associée avec la répression globale de l'activité transcriptionnelle (Parfenov et al. 1989; Bouniol-Baly et al. 1999; Miyara et al. 2003). Les HDACS semblent impliquées dans le maintien de la configuration condensée puisque la paralysie de leur activité par des inhibiteurs spécifiques cause une décondensation de la chromatine de l'ovocyte pré-ovulatoire (De La Fuente et al. 2004a). Les HDACs jouent aussi un rôle décisif dans le remodelage de la chromatine lors de la méiose puisqu'une vague de déacétylation se produit sur le génome de l'ovocyte avec la reprise de la méiose (Kim et al. 2003; De La Fuente et al. 2004b; Sarmiento et al. 2004; Wang et al. 2006). Les ovocytes GV de souris immobilisés à la phase G2 du premier cycle cellulaire de la méiose démontrent tous un marquage d'acétylation intense pour différents résidus d'histones (H3-K9, H3-K14, H4-K5, H4-K12 et H4-K16) (Kim et al. 2003). Cependant, les signaux perçus disparaissent rapidement des chromosomes condensés suite à l'enlèvement du milieu inhibiteur. Le marquage des résidus continu d'être absent dans la phase GVBD, MI et MII de l'ovocyte. Avec la fécondation, le marquage en acétylation des différents résidus, sauf H4-K5, réapparaît sur la chromatine des embryons à partir du stade 1- et 2-cellules. Ce ne sont pas toutes les lysines qui perdent leur acétylation pendant la GVBD, MI et MII de l'ovocyte puisque H4-K8 demeure faiblement acétylée pendant cette période (Kim et al. 2003). Les HDACS impliquées demeurent inconnues, mais certaines sont présentes durant cette période. Entre autres HDAC1 est localisée sur les chromosomes de l'ovocyte en GVBD, tandis que HDAC4 n'est localisée qu'au niveau du noyau de l'ovocyte en fin de croissance (Kim et al. 2003; Kageyama et al. 2006). Tout comme pour d'autres gènes reliés à la régulation transcriptionnelle, les HDACs semblent aussi affectées par le transfert nucléaire. C'est le cas pour les HDAC1, 2 et 3 qui lorsque comparées avec

des embryons bovins produits *in vitro* démontrent des variations de profils d'ARNm pour les stades morula et blastocyste (Beyhan et al. 2007). Ces variations corrént avec une hyperacétylation de H3-K9 sur la totalité de la chromatine des embryons (2-cellules à blastocyste) clonés par transfert nucléaire chez le bovin (Santos et al. 2003). Chez le singe, on constate aussi que l'acétylation de H3-K9 est altérée dans certains embryons 8-cellules et blastocystes produits par transfert nucléaire (Yang et al. 2007). L'hyperacétylation de H3-K9 est associée avec une structure de chromatine active et une dérégulation de son marquage suggère un état transcriptionnel erroné.

La méthylation des histones est aussi abondamment présente dans l'ovocyte et dans le jeune embryon. Dans le cas de la mono- et tri-méthylation de H3-K4, on en décèle dans le génome de tous les stades d'ovocytes incluant l'ovocyte mature (Lepikhov and Walter 2004). Cette modification indique que l'histone méthyltransférase Set9 qui est spécifique à la méthylation de H3-K4 pourrait être active dans l'ovocyte de mammifère (Nishioka et al. 2002). Rapidement après la fécondation (environ 5 h), on perçoit la mono-méthylation de H3-K4 sur le pronoyau mâle du zygote, tandis que sa tri-méthylation prend environ le double du temps à être détectée. Ces résultats, joints avec le fait que les histones H3 sont incorporées préalablement à la présence des H3-K4 méthylées, portent à croire que ces histones sont intercalées dans la chromatine puis ensuite méthylées progressivement (Lepikhov and Walter 2004). Contrairement à H3-K4 mono et tri-méthylées, la forme di-méthylée de H3-K9 n'est pas présente sur le génome paternel suivant la fécondation (Lepikhov and Walter 2004). Cette asymétrie épigénétique au niveau du génome maternel et paternel peut être observée pour H3-K9 jusqu'au stade 2-cellules, puisque par la suite le niveau augmente et les noyaux des embryons démontrent une méthylation comparable pour H3-K9 (Liu et al. 2004; Yeo et al. 2005). La méthylation de H4-R3 manifeste aussi un patron distinctif durant le développement (Sarmiento et al. 2004). Dans l'ovocyte immature, cette modification est faible et diffuse à l'intérieur du noyau puis disparaît pendant la fécondation. Dans les embryons pré-blastocystes, cette modification spécifique est liée avec le cycle cellulaire des blastomères puisque les H4-R3 sont méthylées intensément pendant l'interphase et faiblement lors de la métaphase. Très peu d'enzymes liées à la méthylation des résidus arginines d'histones sont identifiées dans l'ovocyte ou le

jeune embryon. Ces dernières semblent par contre importantes pendant le développement puisque la délétion de l'une d'entre elles, *Ezh2* (Enhancer of zeste 2), cause la mort embryonnaire (O'Carroll et al. 2001). *Ezh2* serait impliquée entre autre dans la régulation de patrons de méthylation causant la différenciation des premières cellules embryonnaires en trophoctoderme et en épiblaste (Erhardt et al. 2003).

1.4.15 La méthylation de l'ADN

Les marques épigénétiques occasionnées par les modifications post-traductionnelles des histones ne sont pas les seules à influencer l'état transcriptionnel de la chromatine ; on décèle également une autre modification très importante : la méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN est une autre marque épigénétique héritable et réversible qui conditionne l'expression génique sans remanier la nature même de la séquence de l'ADN. Cette altération majeure se retrouve sur le génome des vertébrés, de certaines fleurs ainsi que dans plusieurs autres organismes (Goll and Bestor 2005).

Chez les mammifères il ne se produit qu'un seul type de méthylation de l'ADN et celle-ci se produit en position 5 sur les résidus cytosines (C) à l'intérieur des séquences dinucléotides cytosine-guanine (CpG). Le génome du mammifère contient approximativement 30 millions de ces sites CpG, dont 60 à 80% sont méthylés (revue, Trasler 2006). Les groupements de dinucléotides CpG sont principalement retrouvés à l'intérieur de fragments d'ADN (0.5-5 kb) dans des régions riches en GC (60 à 70%) et sont désignés comme des îlots CpG. Ces îlots sont particulièrement intercalés dans la région promotrice ainsi que dans le premier exon de nombreux gènes (Takai and Jones 2003). C'est principalement la méthylation de ces îlots dans la région promotrice qui est associée avec la répression de la transcription et qui procure un autre moyen de contrôle de l'expression génique (Kelly and Trasler 2004). Les différents états de méthylation des îlots CpG dans distinctes régions du génome peuvent résulter en des conséquences très divergentes et sont impliqués dans un grand nombre de fonctions spécialisées. Ces fonctions sont essentielles pour le fonctionnement normale de l'organisme et comprennent entre autre l'implication de la méthylation de l'ADN dans la stabilité de la structure de la

chromatine, l'intégrité du génome, la modulation de l'expression génique de gènes tissus spécifiques, le contrôle des gènes constitutifs, l'inactivation du chromosome X chez la femelle, ainsi que la reprogrammation des patrons de méthylation génomique dans l'embryon (Figure 1.8) (revue, Li 2002; Goll and Bestor 2005). On sait maintenant aussi que l'hyperméthylation et l'hypométhylation de nombreuses régions du génome contribuent aussi à des maladies malignes (ex : cancers) ou auto-immunes (Das and Singal 2004; Jones and Laird 1999).

La méthylation de l'ADN est causée par une famille d'enzymes, les DNA 5-cytosine-méthyltransférases (DNMT). Ces enzymes peuvent être divisées en 3 groupes : DNMT1, 2 et 3 (Kelly and Trasler 2004; Goll and Bestor 2005). Ces trois familles sont apparentées et on pense qu'elles ont toutes évolué à partir d'un ancêtre commun (Howell et al. 2001). Pour l'instant, seuls les membres affiliés aux DNMT1 et DNMT3 possèdent une activité transméthylase active par l'entremise d'un motif cytosine-méthyltransférase à l'intérieur de leur domaine catalytique. Les membres de la famille DNMT1 sont des méthyltransférases de maintien qui restituent le patron de méthylation d'ADN en méthylant les sites CpG hémi-méthylés suite à la réplication d'ADN, tandis que les DNMT3 sont importantes pendant le développement afin d'initier la méthylation *de novo* pour établir de nouveaux patrons de méthylation d'ADN (Figure 1.8) (Li 2002). Pour ce qui est de DNMT2, elle démontre une faible activité ADN méthyltransférase *in vitro* (Hermann et al. 2003; Goll and Bestor 2005) mais de récentes études démontrent qu'elle est plutôt cytoplasmique (Goll et al. 2006) et potentiellement nécessaire pour la méthylation cytoplasmique de l'ARN (Rai et al. 2007).

Certains membres des DNMTs ont été associés à différentes protéines ou complexes protéiques dans la régulation de différents processus cellulaires. Dans le cas de DNMT1 elle interagit entre autre avec DMAP1, MeCP2 et HDAC2, des protéines qui sont respectivement associées avec la réplication, la répression de la transcription et la déacétylation d'histones (Nan et al. 1998; Rountree et al. 2000; Kimura et al. 2003). Le recrutement de DNMT1 sur l'ADN méthylé se fait via son interaction avec MeCP2, une

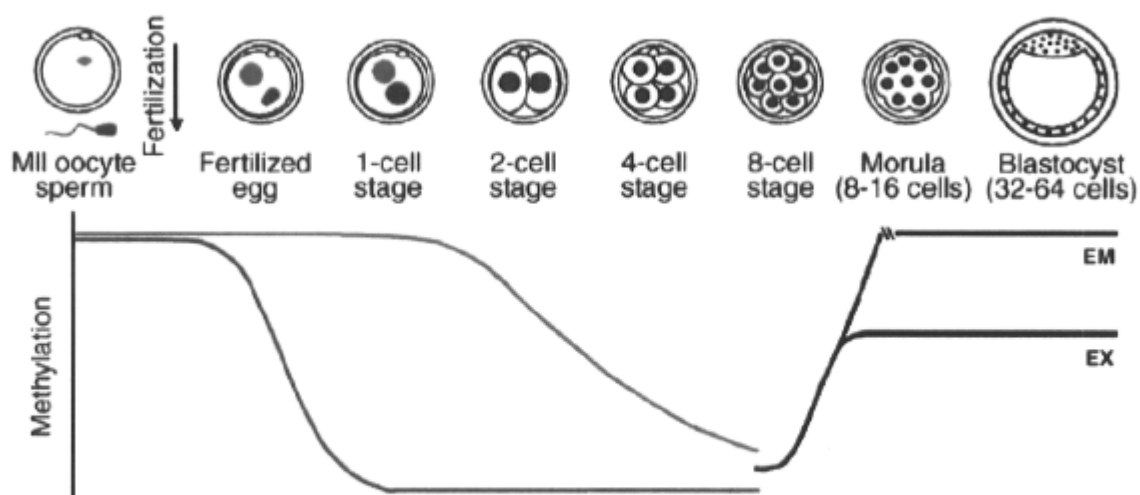


Figure 1.8. Reprogrammation des niveaux globaux de méthylation de l'ADN des jeunes embryons. Le génome paternel (bleu) subit une déméthylation active tandis que le génome maternel (rouge), lui, est passivement déméthylé. Les premiers indices de méthylation *de novo* (ligne noire) indiquent que ce processus débiterait à partir de l'embryon 8-cellules. EM (lignées cellulaires embryonnaires) et EX (lignées cellulaires extra-embryonnaires). Images tirée et adaptée de Dean et al. 2003.

protéine qui a une affinité pour les CpG méthylés (Meehan et al. 1992; Fraga et al. 2003). Ce complexe serait impliqué dans la méthylation de l'ADN hémi-méthylé à travers le génome (Kimura et al. 2003). Durant la phase de réplication de l'ADN (phase S), DNMT1 s'associe plutôt avec DMAP1 qui elle cible la fourche de réplication, puis vers la fin de la phase S, HDAC2 vient se joindre au complexe (Rountree et al. 2000). La présence de HDAC2 pourrait expliquer la déacétylation des histones, afin que ces dernières retrouvent leur patron original de modification hétérochromatique suite à la réplication de l'ADN (Rountree et al. 2000; Ehrenhofer-Murray 2004). Dans le noyau DMAP1 peut aussi former un autre complexe avec DNMT1, qui favorise cette fois la répression de l'activité transcriptionnelle suite la formation du complexe DMAP1-DNMT1-DAXX (death domain-associated protein) (Muromoto et al. 2004). Les enzymes responsables pour la méthylation *de novo*, DNMT3a et 3b, s'associent aussi à certaines protéines afin d'exécuter leur fonction. Une de ces protéines, HELLS (helicase, lymphoid specific), est fondamentale dans le développement embryonnaire (Zhu et al. 2006). HELLS est aussi cruciale dans la formation d'une hétérochromatine normale.

1.4.15.1 LES DNMTs dans le développement embryonnaire

La famille DNMT1 peut être décomposée en trois isoformes qui ne diffèrent de séquence que dans leur premier exon : DNMT1s (somatique), DNMT1o (ovocyte spécifique) et DNMT1p (spermatocyte pachytène) (revue Kelly and Trasler 2004; Swales and Spears 2005). L'expression de ces gènes est contrôlée par des promoteurs dits sexe-spécifique. Quoique les niveaux de DNMT1s chez la souris soient très élevés dans le testicule, l'ovaire ainsi que dans plusieurs autres tissus, l'ovocyte et le jeune embryon en sont déficients (Howell et al. 2001; Ratnam et al. 2002). Pendant cette période, l'action des DNMT1 est assurée par DNMT1o. Dans l'ovule en croissance DNMT1o est principalement nucléaire, mais elle devient cytoplasmique dans l'ovule en GV et ce jusqu'au stade blastocyste sauf au stade 8-cellules où elle est transloquée au noyau (Mertineit et al. 1998; Ratnam et al. 2002). Les embryons possédant la délétion de DNMT1o se développent normalement pendant la période préimplantatoire jusqu'à la mi-gestation. Ces embryons meurent tous avant la naissance et démontrent environ 50% de la méthylation normale dans leurs gènes empreints ainsi que des anomalies dans l'expression de ces derniers (Howell et al. 2001). DNMT1o ne semble donc pas requise pour l'acquisition maternelle de cet empreinte génétique mais serait plutôt essentielle pour le maintien de ces marques au niveau du stade 8-cellules suite à sa translocation au noyau (Lucifero et al. 2002).

La famille DNMT2, dont DNMT2 est le seul membre. L'expression du message de DNMT2 dans l'ovaire bovin surpasse tous les autres DNMTs, quoique son rôle demeure élitif dans ce tissu ainsi que dans l'ovocyte et le développement embryonnaire (Golding and Westhusin 2003).

Trois composantes forment **la famille DNMT3** : DNMT3a, DNMT3b et DNMT3l. Dans les cellules germinales, DNMT3a et 3b jouent toutes deux un rôle dans l'acquisition des patrons de méthylation *de novo* (Kelly and Trasler 2004). Dans l'embryon préimplantatoire DNMT3a est exprimée et est circonscrite au noyau, tandis que DNMT3b est détectée principalement dans le cytoplasme et faiblement dans le noyau (Ko et al. 2005). Même si ces deux enzymes ont des fonctions qui se chevauchent, elles sont si essentielles que la perte de l'une ne peut être compensée par l'autre (Okano et al. 1999). Les souris

déficientes pour DNMT3a sont sous-développées et meurent quelques semaines suivant leur naissance, tandis que la délétion de DNMT3b est beaucoup plus sévère puisque les embryons meurent à mi-gestation. La perte simultanée de ces deux DNMTs a un effet additif et les embryons meurent aux environs de leur gastrulation. Les doubles mutants démontrent aussi une absence de méthylation de novo qui a normalement lieu après l'implantation (Okano et al. 1999). Pour ce qui est du troisième membre de cette famille, DNMT3l, il démontre une accumulation d'ARNm plus élevée que DNMT3a et 3b pendant la croissance de l'ovocyte post-natal (Lucifero et al. 2004), cependant aucune activité transméthylase fonctionnelle n'a pu lui être rattachée (Li 2002). DNMT3l demeure indispensable puisque l'absence du gène maternel est létal chez les embryons hétérozygotes (Bourc'his et al. 2001). L'analyse des profils de méthylation d'ADN provenant d'ovules de souris déficientes en DNMT3l indique que plusieurs gènes maternels méthylés (ex : Ifig2r, Peg1 et Peg3) n'ont pu établir d'empreinte spécifique de méthylation maternelle (Li 2002). Même si elle n'a aucune activité de méthylase, DNMT3l influence ce type de gènes par une interaction probable avec les autres enzymes de sa famille, puisqu'on la retrouve liée et co-localisée avec DNMT3a et 3b.

1.5 SECTION # 5: PERSPECTIVES ET OBJECTIFS

L'investigation des activités entourant la régulation génique a été complètement bouleversée il y a un peu plus d'une décennie, suite au lien établi entre les modifications post-traductionnelles des histones et la structure de la chromatine. Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, les différentes modifications apportées aux histones perturbent la conformation de la chromatine, influençant par le fait même les interactions entre la machinerie transcriptionnelle et l'ADN (Strahl and Allis 2000). Ces altérations dites épigénétiques n'affectent aucunement le code génétique sous-jacent, ce sont plutôt des empreintes qui contrôlent le décodage et l'interprétation de l'information compris dans un segment de chromatine. Ce remodelage est engendré par l'action d'enzymes spécialisées capables de modifier covalamment les histones entre autre par acétylation et méthylation (Biel et al. 2005). Par surcroît, les histones affligées par ces enzymes sont présentes sous différentes variables, ce qui confère un échelon additionnel de complexité.

En plus d'assurer une activation génique appropriée pendant le développement du jeune embryon, ces différentes histones et modifications épigénétiques apportées au génome pourraient jouer un rôle majeur dans le pouvoir de totipotence de l'ovocyte. Que ce soit lors de sa rencontre avec le spermatozoïde ou lors de protocole de transfert nucléaire, l'ovocyte est capable de remodeler la chromatine étrangère afin de se développer et de former un embryon viable. Pour ce faire, elle doit pouvoir instaurer et réguler le patron épigénétique de chacune des modifications jusqu'au moment où l'embryon contrôle lui-même sa propre destinée, c'est-à-dire jusqu'à la transition maternelle-embryonnaire. Quoiqu'une panoplie de ces modifications ait été étudiée dans l'ovocyte et l'embryon précoce, peu d'enzymes spécifiquement responsables ont été mises à jour pendant cette période de développement cruciale.

L'objectif général de cette thèse était d'étudier des facteurs potentiellement impliqués dans le remodelage de la chromatine de l'ovocyte et du jeune embryon, afin d'identifier des

gènes jouant un rôle important durant cette période cruciale du développement. Pour la totalité de nos expériences, le modèle animal bovin a été utilisé.

Dans un premier lieu nous avons quantifié les transcrits, dans l'ovocyte et à travers le développement embryonnaire *in vitro*, de facteurs pouvant moduler certaines modifications épigénétiques (chapitre II et III). L'objectif de l'étude du chapitre II était de déterminer les profils d'ARNm pour des enzymes impliquées dans l'acétylation et la déacétylation des histones afin d'évaluer leur possible responsabilité dans la régulation génique pendant le développement embryonnaire. Pour ce qui est de l'étude présentée dans le chapitre III, nous avons plutôt établi les patrons d'expression d'enzymes impliquées dans la méthylation et la déméthylation des histones. L'objectif était d'associer à ces patrons, des mécanismes ou événements spécifiques reliés au remodelage de la chromatine dans l'ovocyte et l'embryon en développement.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué une caractérisation plus approfondie de deux gènes possiblement liés au remodelage de la chromatine chez l'ovocyte et l'embryon: une histone acétyltransférase (MYST4) (chapitre IV) et une histone H1 spécifique à l'ovocyte (H1F00) (chapitre V). Des observations préliminaires effectuées en parallèle à l'étude du chapitre II nous ont permis d'établir que l'ARNm de *MYST4* est hautement présente dans l'ovocyte. En plus d'être retrouvé dans différentes anomalies chromosomiques (Murati et al. 2004), *MYST4* jouerait un rôle dans la différenciation cellulaire (Thomas et al. 2000). Son implication en reproduction n'a par contre jamais été investiguée. L'objectif du chapitre IV était d'analyser l'ARNm et la protéine *MYST4* dans les tissus somatiques, reproductifs ainsi que dans les gamètes. Afin de pallier avec l'absence d'un anticorps fonctionnel, nous avons dû produire un anti-*MYST4*. Pour ce qui est de *H1f00*, elle fait partie des trois variantes d'histone H1 présentes sur la chromatine de l'ovocyte (Avilion et al. 2003) et pourrait bien être la plus abondante (Tanaka et al. 2001). La disparition de *H1f00* chez la souris est coordonnée avec l'apparition des histones H1 somatiques (Clarke et al. 1992; Tanaka et al. 2001). Notre premier objectif était de valider la présence de *H1F00* sur la chromatine de l'ovocyte bovin. En deuxième lieu, déterminer les profils d'expression d'ARNm et protéique de *H1F00* pendant le développement embryonnaire *in*

vitro afin de déterminer si sa disparition est associée avec l'incorporation des histones somatiques au stade 8- à 16-cellules, lors de la MET (Smith et al. 1995)

Finalement, afin d'approfondir le rôle de H1FOO dans la régulation génique, nous avons introduit ce gène par transfection transitoire dans des fibroblastes fœtaux bovins. H1FOO pourrait être impliquée dans la modulation de la structure de la chromatine chez l'ovocyte, et tout comme pour les histones H1 somatiques, être impliquée dans la régulation des transcrits de certains gènes (Fan et al. 2005). L'objectif de cette 5^e étude (chapitre VI) était de déterminer si cette insertion unique aurait un effet sur la transcription d'une sous population de gènes ainsi que sur la modification de certains résidus d'histones.

1.6 SECTION #6: BIBLIOGRAPHIE

- Aagaard L, Laible G, Selenko P, Schmid M, Dorn R, Schotta G, Kuhfittig S, Wolf A, Lebersorger A, Singh PB, Reuter G, Jenuwein T. 1999. Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *The EMBO journal* 18(7):1923-1938.
- Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF. 1995. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends in biochemical sciences* 20(2):56-59.
- Afouda AB, Reynaud-Deonauth S, Mohun T, Spohr G. 1999. Localized Xid3 mRNA activation in *Xenopus* embryos by cytoplasmic polyadenylation. *Mechanisms of development* 88(1):15-31.
- Ahmad K, Henikoff S. 2002. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Molecular cell* 9(6):1191-1200.
- Ai X, Parthun MR. 2004. The nuclear Hat1p/Hat2p complex: a molecular link between type B histone acetyltransferases and chromatin assembly. *Molecular cell* 14(2):195-205.
- Ainsworth C. 2005. Bone cells linked to creation of fresh eggs in mammals. *Nature* 436(7051):609.
- Akhtar A, Becker PB. 2001. The histone H4 acetyltransferase MOF uses a C2HC zinc finger for substrate recognition. *EMBO reports* 2(2):113-118.
- Albertin DF. 2004. Micromanagement of the ovarian follicle reserve--do stem cells play into the ledger? *Reproduction (Cambridge, England)* 127(5):513-514.
- Alizadeh Z, Kageyama S, Aoki F. 2005. Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Molecular reproduction and development* 72(3):281-290.
- Allard P, Champigny MJ, Skoggard S, Erkmann JA, Whitfield ML, Marzluff WF, Clarke HJ. 2002. Stem-loop binding protein accumulates during oocyte maturation and is not cell-cycle-regulated in the early mouse embryo. *Journal of cell science* 115(Pt 23):4577-4586.
- Allard P, Yang Q, Marzluff WF, Clarke HJ. 2005. The stem-loop binding protein regulates translation of histone mRNA during mammalian oogenesis. *Developmental biology* 286(1):195-206.
- Anderson E, Albertini DF. 1976. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *The Journal of cell biology* 71(2):680-686.
- Annunziato AT. 2005. Split decision: what happens to nucleosomes during DNA replication? *The Journal of biological chemistry* 280(13):12065-12068.
- Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN. 1991. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(22):10148-10152.
- Arents G, Moudrianakis EN. 1995. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(24):11170-11174.

- Armstrong L, Lako M, Dean W, Stojkovic M. 2006. Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24(4):805-814.
- Assey RJ, Hyttel P, Greve T, Purwantara B. 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Molecular reproduction and development* 37(3):335-344.
- Ast G. 2004. How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet* 5(10):773-782.
- Ausio J, Abbott DW, Wang X, Moore SC. 2001. Histone variants and histone modifications: a structural perspective. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 79(6):693-708.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development* 17(1):126-140.
- Bachvarova R, De Leon V. 1980. Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. *Developmental biology* 74(1):1-8.
- Bachvarova R, De Leon V, Johnson A, Kaplan G, Paynton BV. 1985. Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental biology* 108(2):325-331.
- Baker TG. 1971. Electron microscopy of the primary and secondary oocyte. *Advances Biosciences* 6:7-23.
- Bannister AJ, Kouzarides T. 2005. Reversing histone methylation. *Nature* 436(7054):1103-1106.
- Bannister AJ, Schneider R, Kouzarides T. 2002. Histone methylation: dynamic or static? *Cell* 109(7):801-806.
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410(6824):120-124.
- Barnes FL, First NL. 1991. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Molecular reproduction and development* 29(2):117-123.
- Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD. 2001. Spatial and temporal control of RNA stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(13):7025-7028.
- Bates DL, Thomas JO. 1981. Histones H1 and H5: one or two molecules per nucleosome? *Nucleic acids research* 9(22):5883-5894.
- Baxter CS, Byvoet P. 1975. Intercalating agents as probes of the spatial relationship between chromatin components. *Biochemical and biophysical research communications* 63(1):286-291.
- Belmont AS. 2002. Mitotic chromosome scaffold structure: new approaches to an old controversy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(25):15855-15857.
- Benson LJ, Phillips JA, Gu Y, Parthun MR, Hoffman CS, Annunziato AT. 2007. Properties of the type B histone acetyltransferase Hat1: H4 tail interaction, site preference, and involvement in DNA repair. *The Journal of biological chemistry* 282(2):836-842.
- Bernstein E, Hake SB. 2006. The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 84(4):505-517.

- Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP, King WA. 1989. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. *Journal of reproduction and fertility* 38:87-98.
- Beyhan Z, Forsberg EJ, Eilertsen KJ, Kent-First M, First NL. 2007. Gene expression in bovine nuclear transfer embryos in relation to donor cell efficiency in producing live offspring. *Molecular reproduction and development* 74(1):18-27.
- Bharadwaj R, Kolodkin AL. 2006. Descrambling Dscam diversity. *Cell* 125(3):421-424.
- Biel M, Wascholowski V, Giannis A. 2005. Epigenetics—an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. *Angewandte Chemie (International ed)* 44(21):3186-3216.
- Bienroth S, Keller W, Wahle E. 1993. Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *The EMBO journal* 12(2):585-594.
- Bilodeau-Goeseels S, Schultz GA. 1997. Changes in ribosomal ribonucleic acid content within in vitro-produced bovine embryos. *Biology of reproduction* 56(5):1323-1329.
- Black BL, Olson EN. 1998. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annual review of cell and developmental biology* 14:167-196.
- Blondin P, Sirard MA. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular reproduction and development* 41(1):54-62.
- Blumenthal AB, Dieden JD, Kapp LN, Sedat JW. 1979. Rapid isolation of metaphase chromosomes containing high molecular weight DNA. *The Journal of cell biology* 81(1):255-259.
- Boffa LC, Vidali G, Mann RS, Allfrey VG. 1978. Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *The Journal of biological chemistry* 253(10):3364-3366.
- Bond UM, Yario TA, Steitz JA. 1991. Multiple processing-defective mutations in a mammalian histone pre-mRNA are suppressed by compensatory changes in U7 RNA both in vivo and in vitro. *Genes & development* 5(9):1709-1722.
- Bordignon V, Clarke HJ, Smith LC. 1999. Developmentally regulated loss and reappearance of immunoreactive somatic histone H1 on chromatin of bovine morula-stage nuclei following transplantation into oocytes. *Biology of reproduction* 61(1):22-30.
- Borrow J, Stanton VP, Jr., Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RS, Civin CI, Distèche C, Dube I, Frischauf AM, Horsman D, Mitelman F, Volinia S, Watmore AE, Housman DE. 1996. The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nature genetics* 14(1):33-41.
- Boulard M, Gautier T, Mbele GO, Gerson V, Hamiche A, Angelov D, Bouvet P, Dimitrov S. 2006. The NH2 tail of the novel histone variant H2BFWT exhibits properties distinct from conventional H2B with respect to the assembly of mitotic chromosomes. *Molecular and cellular biology* 26(4):1518-1526.
- Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Guibert J, Beaujean N, Szollosi MS, Debey P. 1999. Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biology of reproduction* 60(3):580-587.
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294(5551):2536-2539.
- Bouvet P, Wolffe AP. 1994. A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus* oocytes. *Cell* 77(6):931-941.

- Boy de la Tour E, Laemmli UK. 1988. The metaphase scaffold is helically folded: sister chromatids have predominantly opposite helical handedness. *Cell* 55(6):937-944.
- Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, Boeke JD. 1995. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes & development* 9(23):2888-2902.
- Brandeis M, Rosewell I, Carrington M, Crompton T, Jacobs MA, Kirk J, Gannon J, Hunt T. 1998. Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(8):4344-4349.
- Braude P, Bolton V, Moore S. 1988. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332(6163):459-461.
- Braun RE. 2001. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature genetics* 28(1):10-12.
- Brevini TA, Lonergan P, Cillo F, Francisci C, Favetta LA, Fair T, Gandolfi F. 2002. Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. *Molecular reproduction and development* 63(4):510-517.
- Brevini-Gandolfi TA, Favetta LA, Mauri L, Luciano AM, Cillo F, Gandolfi F. 1999. Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. *Molecular reproduction and development* 52(4):427-433.
- Brown DT, Izard T, Misteli T. 2006. Mapping the interaction surface of linker histone H1(0) with the nucleosome of native chromatin in vivo. *Nature structural & molecular biology* 13(3):250-255.
- Brown KM, Gilmartin GM. 2003. A mechanism for the regulation of pre-mRNA 3' processing by human cleavage factor Im. *Molecular cell* 12(6):1467-1476.
- Brownell JE, Allis CD. 1996. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Current opinion in genetics & development* 6(2):176-184.
- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD. 1996. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84(6):843-851.
- Byskov AG. 1986. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological reviews* 66(1):71-117.
- Byskov AG, Faddy MJ, Lemmen JG, Andersen CY. 2005. Eggs forever? Differentiation; research in biological diversity 73(9-10):438-446.
- Byvoet P, Shepherd GR, Hardin JM, Noland BJ. 1972. The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 148(2):558-567.
- Cao Q, Richter JD. 2002. Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *The EMBO journal* 21(14):3852-3862.
- Capili AD, Schultz DC, Rauscher IF, Borden KL. 2001. Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. *The EMBO journal* 20(1-2):165-177.
- Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Cote J. 2003. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* 19(6):321-329.

- Carter GJ, van Holde K. 1998. Self-association of linker histone H5 and of its globular domain: evidence for specific self-contacts. *Biochemistry* 37(36):12477-12488.
- Catez F, Ueda T, Bustin M. 2006. Determinants of histone H1 mobility and chromatin binding in living cells. *Nature structural & molecular biology* 13(4):305-310.
- Chadee DN, Hendzel MJ, Tylicski CP, Allis CD, Bazett-Jones DP, Wright JA, Davie JR. 1999. Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 274(35):24914-24920.
- Chadwick BP, Willard HF. 2001. Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant. *Human molecular genetics* 10(10):1101-1113.
- Champagne N, Bertos NR, Pelletier N, Wang AH, Vezmar M, Yang Y, Heng HH, Yang XJ. 1999. Identification of a human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein. *The Journal of biological chemistry* 274(40):28528-28536.
- Champagne N, Pelletier N, Yang XJ. 2001. The monocytic leukemia zinc finger protein MOZ is a histone acetyltransferase. *Oncogene* 20(3):404-409.
- Chan HM, La Thangue NB. 2001. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *Journal of cell science* 114(Pt 13):2363-2373.
- Chang L, Loranger SS, Mizzen C, Ernst SG, Allis CD, Annunziato AT. 1997. Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry* 36(3):469-480.
- Che L, Lalonde A, Bordignon V. 2005. The occurrence of phosphorylated histone H2A.X in porcine embryos produced by somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. *Biology of Reproduction (special issue)* 671.
- Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR. 1999a. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284(5423):2174-2177.
- Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM. 1999b. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 98(5):675-686.
- Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD. 2000. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Molecular cell* 5(6):905-915.
- Cheung WL, Ajiro K, Samejima K, Kloc M, Cheung P, Mizzen CA, Beeser A, Etkin LD, Chernoff J, Earnshaw WC, Allis CD. 2003. Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell* 113(4):507-517.
- Childs G, Nocente-McGrath C, Lieber T, Holt C, Knowles JA. 1982. Sea urchin (*Lytechinus pictus*) late-stage histone H3 and H4 genes: characterization and mapping of a clustered but nontandemly linked multigene family. *Cell* 31(2 Pt 1):383-393.
- Choi T, Aoki F, Mori M, Yamashita M, Nagahama Y, Kohmoto K. 1991. Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development (Cambridge, England)* 113(3):789-795.
- Chouinard LA. 1971. A light- and electron-microscope study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. *Journal of cell science* 9(3):637-663.

- Churikov D, Siino J, Svetlova M, Zhang K, Gineitis A, Morton Bradbury E, Zalensky A. 2004. Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics* 84(4):745-756.
- Clarke AS, Lowell JE, Jacobson SJ, Pillus L. 1999. Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Molecular and cellular biology* 19(4):2515-2526.
- Clarke HJ, Oblin C, Bustin M. 1992. Developmental regulation of chromatin composition during mouse embryogenesis: somatic histone H1 is first detectable at the 4-cell stage. *Development (Cambridge, England)* 115(3):791-799.
- Coenen K, Massicotte L, Sirard MA. 2004. Study of newly synthesized proteins during bovine oocyte maturation in vitro using image analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Molecular reproduction and development* 67(3):313-322.
- Cole CN, Scarcelli JJ. 2006. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Current opinion in cell biology* 18(3):299-306.
- Colegrove-Otero LJ, Minshall N, Standart N. 2005. RNA-binding proteins in early development. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 40(1):21-73.
- Collas P, Poccia D. 1998. Remodeling the sperm nucleus into a male pronucleus at fertilization. *Theriogenology* 49(1):67-81.
- Cook PR. 1995. A chromomeric model for nuclear and chromosome structure. *Journal of cell science* 108 (Pt 9):2927-2935.
- Costanzi C, Pehrson JR. 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 393(6685):599-601.
- Couture JF, Collazo E, Hauk G, Trievel RC. 2006. Structural basis for the methylation site specificity of SET7/9. *Nature structural & molecular biology* 13(2):140-146.
- Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science (New York, NY)* 309(5739):1369-1373.
- Cox LJ, Larman MG, Saunders CM, Hashimoto K, Swann K, Lai FA. 2002. Sperm phospholipase Czeta from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction (Cambridge, England)* 124(5):611-623.
- Crosby IM, Gandolfi F, Moor RM. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fertil* 82(2):769-775.
- Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T. 2004. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118(5):545-553.
- Das PM, Singal R. 2004. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 22(22):4632-4642.
- Daury L, Chailleux C, Bonvallet J, Trouche D. 2006. Histone H3.3 deposition at E2F-regulated genes is linked to transcription. *EMBO reports* 7(1):66-71.
- Davie JR, Lin R, Allis CD. 1991. Timing of the appearance of ubiquitinated histones in developing new macronuclei of *Tetrahymena thermophila*. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 69(1):66-71.

- Davis DL. 1985. Culture and storage of pig embryos. *Journal of reproduction and fertility* 33:115-124.
- de la Barre AE, Angelov D, Molla A, Dimitrov S. 2001. The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *The EMBO journal* 20(22):6383-6393.
- de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas MA. 2005. Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* 27(2):164-175.
- De La Fuente R. 2006. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Developmental biology* 292(1):1-12.
- De La Fuente R, Viveiros MM, Burns KH, Adashi EY, Matzuk MM, Eppig JJ. 2004a. 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):447-458.
- De La Fuente R, Viveiros MM, Wigglesworth K, Eppig JJ. 2004b. ATRX, a member of the SNF2 family of helicase/ATPases, is required for chromosome alignment and meiotic spindle organization in metaphase II stage mouse oocytes. *Developmental biology* 272(1):1-14.
- de Moor CH, Meijer H, Lissenden S. 2005. Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Seminars in cell & developmental biology* 16(1):49-58.
- de Moor CH, Richter JD. 1997. The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Molecular and cellular biology* 17(11):6419-6426.
- De Sousa PA, Caveney A, Westhusin ME, Watson AJ. 1998a. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. *Theriogenology* 49(1):115-128.
- De Sousa PA, Watson AJ, Schultz GA, Bilodeau-Goeseels S. 1998b. Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. *Molecular reproduction and development* 51(1):112-121.
- de Vantery C, Stutz A, Vassalli JD, Schorderet-Slatkine S. 1997. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes is controlled at both translational and posttranslational levels. *Developmental biology* 187(1):43-54.
- Dean W, Santos F, Reik W. 2003. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Seminars in cell & developmental biology* 14(1):93-100.
- Dedieu T, Gall L, Crozet N, Sevellec C, Ruffini S. 1996. Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Molecular reproduction and development* 45(3):351-358.
- Dimitri P, Corradini N, Rossi F, Verni F. 2005. The paradox of functional heterochromatin. *Bioessays* 27(1):29-41.
- Dimitrov S, Almouzni G, Dasso M, Wolffe AP. 1993. Chromatin transitions during early *Xenopus* embryogenesis: changes in histone H4 acetylation and in linker histone type. *Developmental biology* 160(1):214-227.
- Dominski Z, Marzluff WF. 1999. Formation of the 3' end of histone mRNA. *Gene* 239(1):1-14.

- Dominski Z, Zheng LX, Sanchez R, Marzluff WF. 1999. Stem-loop binding protein facilitates 3'-end formation by stabilizing U7 snRNP binding to histone pre-mRNA. *Molecular and cellular biology* 19(5):3561-3570.
- Dorigo B, Schalch T, Bystricky K, Richmond TJ. 2003. Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *Journal of molecular biology* 327(1):85-96.
- Dou Y, Mizzen CA, Abrams M, Allis CD, Gorovsky MA. 1999. Phosphorylation of linker histone H1 regulates gene expression in vivo by mimicking H1 removal. *Molecular cell* 4(4):641-647.
- Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP. 2000. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408(6815):1001-1004.
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ, Cote J. 2006. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Molecular cell* 21(1):51-64.
- Driancourt MA. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55(6):1211-1239.
- Dworkin-Rastl E, Kandolf H, Smith RC. 1994. The maternal histone H1 variant, H1M (B4 protein), is the predominant H1 histone in *Xenopus pregastrula* embryos. *Developmental biology* 161(2):425-439.
- Ehrenhofer-Murray AE. 2004. Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *European journal of biochemistry / FEBS* 271(12):2335-2349.
- Erhardt S, Su IH, Schneider R, Barton S, Bannister AJ, Perez-Burgos L, Jenuwein T, Kouzarides T, Tarakhovskiy A, Surani MA. 2003. Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. *Development (Cambridge, England)* 130(18):4235-4248.
- Erickson BH. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of animal science* 25(3):800-805.
- Evdokimova VM, Ovchinnikov LP. 1999. Translational regulation by Y-box transcription factor: involvement of the major mRNA-associated protein, p50. *The international journal of biochemistry & cell biology* 31(1):139-149.
- Faast R, Thonglairoam V, Schulz TC, Beall J, Wells JR, Taylor H, Matthaei K, Rathjen PD, Tremethick DJ, Lyons I. 2001. Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol* 11(15):1183-1187.
- Fabrizio E, El Messaoudi S, Polanowska J, Paul C, Cook JR, Lee JH, Negre V, Rousset M, Pestka S, Le Cam A, Sardet C. 2002. Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO reports* 3(7):641-645.
- Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal reproduction science* 78(3-4):203-216.
- Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1997a. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. *Molecular reproduction and development* 46(2):208-215.
- Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1997b. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and embryology* 195(4):327-336.

- Fair T, Hyttel P. 1997. Oocyte growth in cattle—ultrastructure, transcription and developmental competence. *Microscopy of Reproduction and Development: A Dynamic Approach*. Motta P.M. ed. Rome. pp 109-118.
- Fair T, Hyttel P, Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular reproduction and development* 42(4):437-442.
- Fair T, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1996. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. *Molecular reproduction and development* 43(4):503-512.
- Fan Y, Nikitina T, Morin-Kensicki EM, Zhao J, Magnuson TR, Woodcock CL, Skoultschi AI. 2003. H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Molecular and cellular biology* 23(13):4559-4572.
- Fan Y, Nikitina T, Zhao J, Fleury TJ, Bhattacharyya R, Bouhassira EE, Stein A, Woodcock CL, Skoultschi AI. 2005. Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* 123(7):1199-1212.
- Fan Y, Sirotkin A, Russell RG, Ayala J, Skoultschi AI. 2001. Individual somatic H1 subtypes are dispensable for mouse development even in mice lacking the H1(0) replacement subtype. *Molecular and cellular biology* 21(23):7933-7943.
- Figueiredo JR, Hulshof SC, Van den Hurk R, Ectors FJ, Fontes RS, Nussgens B, Bevers MM, Beckers JF. 1993. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology* 40(4):789-799.
- Fillingham J, Keogh MC, Krogan NJ. 2006. GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 84(4):568-577.
- Finch JT, Klug A. 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(6):1897-1901.
- Fischle W, Emiliani S, Hendzel MJ, Nagase T, Nomura N, Voelter W, Verdin E. 1999. A new family of human histone deacetylases related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p. *The Journal of biological chemistry* 274(17):11713-11720.
- Fischle W, Kiermer V, Dequiedt F, Verdin E. 2001. The emerging role of class II histone deacetylases. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 79(3):337-348.
- Fischle W, Wang Y, Allis CD. 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Current opinion in cell biology* 15(2):172-183.
- Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. 2000. The primordial to primary follicle transition. *Molecular and cellular endocrinology* 163(1-2):53-60.
- Fraga MF, Ballestar E, Montoya G, Taysavang P, Wade PA, Esteller M. 2003. The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic acids research* 31(6):1765-1774.
- Frye RA. 2000. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 273(2):793-798.
- Fulka J, Jr., Motlik J, Fulka J, Jilek F. 1986. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 77(1):281-285.

- Gao S, Chung YG, Parseghian MH, King GJ, Adashi EY, Latham KE. 2004. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Developmental biology* 266(1):62-75.
- Gates KS. 2006. Getting under wraps: alkylating DNA in the nucleosome. *Nature chemical biology* 2(2):64-66.
- Gibbons RJ, Pellagatti A, Garrick D, Wood WG, Malik N, Ayyub H, Langford C, Boulwood J, Wainscoat JS, Higgs DR. 2003. Identification of acquired somatic mutations in the gene encoding chromatin-remodeling factor ATRX in the alpha-thalassemia myelodysplasia syndrome (ATMDS). *Nature genetics* 34(4):446-449.
- Gilmartin GM. 2005. Eukaryotic mRNA 3' processing: a common means to different ends. *Genes & development* 19(21):2517-2521.
- Gilula NB, Epstein ML, Beers WH. 1978. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *The Journal of cell biology* 78(1):58-75.
- Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM, Zalensky AO. 2000. Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *The Journal of cell biology* 151(7):1591-1598.
- Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. 2001. Follicle selection in monovular species. *Biology of reproduction* 65(3):638-647.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of reproduction* 55(6):1187-1194.
- Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF. 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312(5770):75-79.
- Golding MC, Westhusin ME. 2003. Analysis of DNA (cytosine 5) methyltransferase mRNA sequence and expression in bovine preimplantation embryos, fetal and adult tissues. *Gene Expr Patterns* 3(5):551-558.
- Goll MG, Bestor TH. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual review of biochemistry* 74:481-514.
- Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH. 2006. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311(5759):395-398.
- Gosden RG. 2004. Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a testis? *Human reproduction update* 10(3):193-195.
- Gougeon A. 1993. Dynamics of human follicular growth. In: Adashi EY, Leung PCK (eds), *The Ovary* Raven Press ed. New York.
- Gougeon A. 2005. [Neo-oogenesis in the postnatal ovary: fantasy or reality?]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité* 33(10):819-823.
- Greenfield C, Flaws JA. 2004. Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary. *Bioessays* 26(8):829-832.

- Gregory PD, Schmid A, Zavari M, Lui L, Berger SL, Horz W. 1998. Absence of Gen5 HAT activity defines a novel state in the opening of chromatin at the PHO5 promoter in yeast. *Molecular cell* 1(4):495-505.
- Groisman I, Jung MY, Sarkissian M, Cao Q, Richter JD. 2002. Translational control of the embryonic cell cycle. *Cell* 109(4):473-483.
- Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL. 1999. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(9):4868-4873.
- Grozinger CM, Schreiber SL. 2002. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chemistry & biology* 9(1):3-16.
- Gu W, Tekur S, Reinbold R, Eppig JJ, Choi YC, Zheng JZ, Murray MT, Hecht NB. 1998. Mammalian male and female germ cells express a germ cell-specific Y-Box protein, MSY2. *Biology of reproduction* 59(5):1266-1274.
- Gu W, Wei X, Pannuti A, Lucchesi JC. 2000. Targeting the chromatin-remodeling MSL complex of *Drosophila* to its sites of action on the X chromosome requires both acetyl transferase and ATPase activities. *The EMBO journal* 19(19):5202-5211.
- Guénard H, Boisseau MR, Carré F, Deviller P, Hanoune J, Harf A, Lacour J-R, Lamour Y, Lévy B, Marthan R, Martineaud JP, Minaire Y, Mion F, Paillard M, Swynghedauw B, Varène P, Vincent J. 1996. *Physiologie Humaine*. Éditions Pradel, 4, passage de la Main d'Or, Paris.
- Gutierrez RM, Hnilica LS. 1967. Tissue specificity of histone phosphorylation. *Science* 157(794):1324-1325.
- Hake SB, Allis CD. 2006. Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(17):6428-6435.
- Hake SB, Garcia BA, Kauer M, Baker SP, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD. 2005. Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(18):6344-6349.
- Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. 2004. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Developmental cell* 6(1):117-131.
- Hashimoto N, Kishimoto T. 1988. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Developmental biology* 126(2):242-252.
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. 2006. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* 70(3):789-829.
- Hassig CA, Schreiber SL. 1997. Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. *Current opinion in chemical biology* 1(3):300-308.
- Hayes JJ, Clark DJ, Wolffe AP. 1991. Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(15):6829-6833.
- Hellauer K, Sirard E, Turcotte B. 2001. Decreased expression of specific genes in yeast cells lacking histone H1. *The Journal of biological chemistry* 276(17):13587-13592.

- Herlands L, Allfrey VG, Poccia D. 1982. Translational regulation of histone synthesis in the sea urchin *strongylocentrotus purpuratus*. *The Journal of cell biology* 94(1):219-223.
- Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A. 2003. The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *The Journal of biological chemistry* 278(34):31717-31721.
- Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Pannuti A, Lucchesi JC. 1997. *mof*, a putative acetyl transferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in *Drosophila*. *The EMBO journal* 16(8):2054-2060.
- Hill CS, Rimmer JM, Green BN, Finch JT, Thomas JO. 1991. Histone-DNA interactions and their modulation by phosphorylation of -Ser-Pro-X-Lys/Arg- motifs. *The EMBO journal* 10(7):1939-1948.
- Hirshfield AN. 1991. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biology of reproduction* 44(6):1157-1162.
- Houston DW, King ML. 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):447-456.
- Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR. 2001. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene. *Cell* 104(6):829-838.
- Howman EV, Fowler KJ, Newson AJ, Redward S, MacDonald AC, Kalitsis P, Choo KH. 2000. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (*Cenpa*) null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(3):1148-1153.
- Huarte J, Stutz A, O'Connell ML, Gubler P, Belin D, Darrow AL, Strickland S, Vassalli JD. 1992. Transient translational silencing by reversible mRNA deadenylation. *Cell* 69(6):1021-1030.
- Hunter AG, Moor RM. 1987. Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *Journal of dairy science* 70(8):1646-1651.
- Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal reproduction science* 82-83:461-477.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47:33-42.
- Hyttel P, Viuff D, Avery B, Laurincik J, Greve T. 1996. Transcription and cell cycle-dependent development of intranuclear bodies and granules in two-cell bovine embryos. *J Reprod Fertil* 108(2):263-270.
- Hyttel P, Viuff D, Fair T, Laurincik J, Thomsen PD, Callesen H, Vos PL, Hendriksen PJ, Dieleman SJ, Schellander K, Besenfelder U, Greve T. 2001. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction (Cambridge, England)* 122(1):21-30.
- Iizuka M, Smith MM. 2003. Functional consequences of histone modifications. *Current opinion in genetics & development* 13(2):154-160.
- Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403(6771):795-800.
- Ireland JJ, Roche JF. 1983. Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *Journal of animal science* 57(1):157-167.

- Ito T, Bulger M, Kobayashi R, Kadonaga JT. 1996. *Drosophila* NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Molecular and cellular biology* 16(6):3112-3124.
- Ito T, Levenstein ME, Fyodorov DV, Kutach AK, Kobayashi R, Kadonaga JT. 1999. ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly. *Genes & development* 13(12):1529-1539.
- Jackson JD, Falciano VT, Gorovsky MA. 1996. A likely histone H2A.F/Z variant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in biochemical sciences* 21(12):466-467.
- Jackson V, Shires A, Tanphaichitr N, Chalkley R. 1976. Modifications to histones immediately after synthesis. *Journal of molecular biology* 104(2):471-483.
- Jarrell VL, Day BN, Prather RS. 1991. The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *Sus scrofa*: quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Biology of reproduction* 44(1):62-68.
- Jelinkova L, Kubelka M, Motlik J, Guerrier P. 1994. Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbit oocytes. *Molecular reproduction and development* 37(2):210-215.
- Jin J, Cai Y, Li B, Conaway RC, Workman JL, Conaway JW, Kusch T. 2005. In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends in biochemical sciences* 30(12):680-687.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428(6979):145-150.
- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 122(2):303-315.
- Jones PA, Laird PW. 1999. Cancer epigenetics comes of age. *Nature genetics* 21(2):163-167.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature genetics* 19(2):187-191.
- Kageyama S, Liu H, Nagata M, Aoki F. 2006. Stage specific expression of histone deacetylase 4 (HDAC4) during oogenesis and early preimplantation development in mice. *The Journal of reproduction and development* 52(1):99-106.
- Kalous J, Sutovsky P, Rimkevics Z, Shioya Y, Lie BL, Motlik J. 1993. Pig membrana granulosa cells prevent resumption of meiosis in cattle oocytes. *Molecular reproduction and development* 34(1):58-64.
- Kamakaka RT, Biggins S. 2005. Histone variants: deviants? *Genes & development* 19(3):295-310.
- Kao HY, Downes M, Ordentlich P, Evans RM. 2000. Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes & development* 14(1):55-66.
- Kaplan LJ, Bauer R, Morrison E, Langan TA, Fasman GD. 1984. The structure of chromatin reconstituted with phosphorylated H1. Circular dichroism and thermal denaturation studies. *The Journal of biological chemistry* 259(14):8777-8785.

- Kelly TL, Trasler JM. 2004. Reproductive epigenetics. *Clinical genetics* 65(4):247-260.
- Keshet E, Rosenberg MP, Mercer JA, Propst F, Vande Woude GF, Jenkins NA, Copeland NG. 1988. Developmental regulation of ovarian-specific *Mos* expression. *Oncogene* 2(3):235-240.
- Khan AU, Hampsey M. 2002. Connecting the DOTs: covalent histone modifications and the formation of silent chromatin. *Trends Genet* 18(8):387-389.
- Kidder GM, McLachlin JR. 1985. Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenesis in preimplantation mouse embryos. *Developmental biology* 112(2):265-275.
- Kim JM, Liu H, Tazaki M, Nagata M, Aoki F. 2003. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *The Journal of cell biology* 162(1):37-46.
- Kimmins S, Sassone-Corsi P. 2005. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 434(7033):583-589.
- Kimura H, Nakamura T, Ogawa T, Tanaka S, Shiota K. 2003. Transcription of mouse DNA methyltransferase 1 (*Dnmt1*) is regulated by both E2F-Rb-HDAC-dependent and -independent pathways. *Nucleic acids research* 31(12):3101-3113.
- Kleff S, Andrulis ED, Anderson CW, Sternglanz R. 1995. Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 270(42):24674-24677.
- Klevan L, Armitage IM, Crothers DM. 1979. ³¹P NMR studies of the solution structure and dynamics of nucleosomes and DNA. *Nucleic acids research* 6(4):1607-1616.
- Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. 2006. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* 7(9):715-727.
- Ko YG, Nishino K, Hattori N, Arai Y, Tanaka S, Shiota K. 2005. Stage-by-stage change in DNA methylation status of *Dnmt1* locus during mouse early development. *The Journal of biological chemistry* 280(10):9627-9634.
- Kopečný V, Flechon JE, Camous S, Fulka J, Jr. 1989. Nucleologenesis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. *Molecular reproduction and development* 1(2):79-90.
- Kornberg RD, Thomas JO. 1974. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184(139):865-868.
- Korner CG, Wormington M, Muckenthaler M, Schneider S, Dehlin E, Wahle E. 1998. The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *The EMBO journal* 17(18):5427-5437.
- Kouzarides T. 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Current opinion in genetics & development* 12(2):198-209.
- Kubicek S, Jenuwein T. 2004. A crack in histone lysine methylation. *Cell* 119(7):903-906.
- Kuhn U, Wahle E. 2004. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1678(2-3):67-84.
- Kuo MH, Brownell JE, Sobel RE, Ranalli TA, Cook RG, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD. 1996. Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383(6597):269-272.

- Kuo MH, Zhou J, Jambeck P, Churchill ME, Allis CD. 1998. Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes & development* 12(5):627-639.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410(6824):116-120.
- Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T. 2003. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *Journal of cell science* 116(Pt 11):2117-2124.
- Lacoste N, Cote J. 2003. [The epigenetic code of histones]. *Med Sci (Paris)* 19(10):955-959.
- Lacoste N, Utley RT, Hunter JM, Poirier GG, Cote J. 2002. Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone H3 methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 277(34):30421-30424.
- Ladd AN, Cooper TA. 2002. Finding signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era. *Genome biology* 3(11):reviews0008.
- Lee MG, Wynder C, Cooch N, Shiekhatar R. 2005. An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* 437(7057):432-435.
- Lemercier C, Verdel A, Galloo B, Curtet S, Brocard MP, Khochbin S. 2000. mHDA1/HDAC5 histone deacetylase interacts with and represses MEF2A transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry* 275(20):15594-15599.
- Lennox RW, Cohen LH. 1983. The histone H1 complements of dividing and nondividing cells of the mouse. *The Journal of biological chemistry* 258(1):262-268.
- Lepikhov K, Walter J. 2004. Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote. *BMC developmental biology* 4:12.
- Lequarre AS, Traverso JM, Marchandise J, Donnay I. 2004. Poly(A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. *Biology of reproduction* 71(2):425-431.
- Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbies-Tran R, Callesen H, Mermillod P. 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63(3):841-859.
- Lever MA, Th'ng JP, Sun X, Hendzel MJ. 2000. Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells. *Nature* 408(6814):873-876.
- Levesque JT, Sirard MA. 1996. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biology of reproduction* 55(6):1427-1436.
- Lewis CD, Laemmli UK. 1982. Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. *Cell* 29(1):171-181.
- Lewis JD, Gunderson SI, Mattaj IW. 1995. The influence of 5' and 3' end structures on pre-mRNA metabolism. *J Cell Sci Suppl* 19:13-19.
- Li A, Maffey AH, Abbott WD, Conde e Silva N, Prunell A, Siino J, Churikov D, Zalensky AO, Ausio J. 2005. Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry* 44(7):2529-2535.
- Li E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3(9):662-673.

- Li G, Sudlow G, Belmont AS. 1998. Interphase cell cycle dynamics of a late-replicating, heterochromatic homogeneously staining region: precise choreography of condensation/decondensation and nuclear positioning. *The Journal of cell biology* 140(5):975-989.
- Li W, Nagaraja S, Delcuve GP, Hendzel MJ, Davie JR. 1993. Effects of histone acetylation, ubiquitination and variants on nucleosome stability. *The Biochemical journal* 296 (Pt 3):737-744.
- Lian JB, Balint E, Javed A, Drissi H, Vitti R, Quinlan EJ, Zhang L, Van Wijnen AJ, Stein JL, Speck N, Stein GS. 2003. Runx1/AML1 hematopoietic transcription factor contributes to skeletal development in vivo. *Journal of cellular physiology* 196(2):301-311.
- Liu H, Kim JM, Aoki F. 2004. Regulation of histone H3 lysine 9 methylation in oocytes and early pre-implantation embryos. *Development (Cambridge, England)* 131(10):2269-2280.
- Lo WS, Duggan L, Emre NC, Belotserkovskya R, Lane WS, Shiekhattar R, Berger SL. 2001. Snf1—a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* 293(5532):1142-1146.
- Loneragan P, Fair T, Khatir H, Cesaroni G, Mermillod P. 1998. Effect of protein synthesis inhibition before or during in vitro maturation on subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology* 50(3):417-431.
- Loneragan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular reproduction and development* 37(1):48-53.
- Losa R, Thoma F, Koller T. 1984. Involvement of the globular domain of histone H1 in the higher order structures of chromatin. *Journal of molecular biology* 175(4):529-551.
- Lucifero D, Mann MR, Bartolomei MS, Trasler JM. 2004. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Human molecular genetics* 13(8):839-849.
- Lucifero D, Mertineit C, Clarke HJ, Bestor TH, Trasler JM. 2002. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics* 79(4):530-538.
- Luger K, Rechsteiner TJ, Flaus AJ, Waye MM, Richmond TJ. 1997. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *Journal of molecular biology* 272(3):301-311.
- Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 81(2):301-307.
- Ma GT, Roth ME, Groskopf JC, Tsai FY, Orkin SH, Grosveld F, Engel JD, Linzer DI. 1997. GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo. *Development (Cambridge, England)* 124(4):907-914.
- Mahadevan LC, Willis AC, Barratt MJ. 1991. Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* 65(5):775-783.
- Makabe S, Naguro T, Stallone T. 2006. Oocyte-follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. *Microscopy research and technique* 69(6):436-449.
- Mann MR, Bartolomei MS. 2002. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome biology* 3(2):REVIEWS1003.

- Marcus GA, Silverman N, Berger SL, Horiuchi J, Guarente L. 1994. Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *The EMBO journal* 13(20):4807-4815.
- Marion GB, Gier HT. 1971. Ovarian and uterine embryogenesis and morphology of the non-pregnant female mammal. *Journal of animal science* 32 Suppl 1:24-47.
- Marmorstein R. 2003. Structure of SET domain proteins: a new twist on histone methylation. *Trends in biochemical sciences* 28(2):59-62.
- Marsden MP, Laemmli UK. 1979. Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* 17(4):849-858.
- Marzluff WF. 2005. Metazoan replication-dependent histone mRNAs: a distinct set of RNA polymerase II transcripts. *Current opinion in cell biology* 17(3):274-280.
- Marzluff WF, Duronio RJ. 2002. Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. *Current opinion in cell biology* 14(6):692-699.
- Massicotte L, Coenen K, Mourot M, Sirard MA. 2006. Maternal housekeeping proteins translated during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Proteomics* 6(13):3811-3820.
- Matsumoto K, Wolffe AP. 1998. Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends in cell biology* 8(8):318-323.
- McGrew LL, Dworkin-Rastl E, Dworkin MB, Richter JD. 1989. Poly(A) elongation during *Xenopus* oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by a short sequence element. *Genes & development* 3(6):803-815.
- Meehan RR, Lewis JD, Bird AP. 1992. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic acids research* 20(19):5085-5092.
- Meissner A, Jaenisch R. 2006. Mammalian nuclear transfer. *Dev Dyn* 235(9):2460-2469.
- Memili E, Dominko T, First NL. 1998. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Molecular reproduction and development* 51(1):36-41.
- Memili E, First NL. 1999. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biology of reproduction* 61(5):1198-1207.
- Mendez R, Richter JD. 2001. Translational control by CPEB: a means to the end. *Nature reviews* 2(7):521-529.
- Merson TD, Dixon MP, Collin C, Rietze RL, Bartlett PF, Thomas T, Voss AK. 2006. The transcriptional coactivator Querkopf controls adult neurogenesis. *J Neurosci* 26(44):11359-11370.
- Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM, Bestor TH. 1998. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development (Cambridge, England)* 125(5):889-897.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R, Schule R. 2005. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437(7057):436-439.
- Miller D, Ostermeier GC. 2006. Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? *Gynecologie, obstetrique & fertilité* 34(9):840-846.

- Miyara F, Migne C, Dumont-Hassan M, Le Meur A, Cohen-Bacrie P, Aubriot FX, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A, Debey P. 2003. Chromatin configuration and transcriptional control in human and mouse oocytes. *Molecular reproduction and development* 64(4):458-470.
- Moggs JG, Grandi P, Quivy JP, Jonsson ZO, Hubscher U, Becker PB, Almouzni G. 2000. A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Molecular and cellular biology* 20(4):1206-1218.
- Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clement F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana JC. 1997. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *Journal of reproduction and fertility* 51:3-23.
- Moore K, Thatcher WW. 2006. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *Journal of dairy science* 89(4):1254-1266.
- Motlik J, Pavlok A, Kubelka M, Kalous J, Kalab P. 1998. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* 49(2):461-469.
- Motta PM, Makabe S, Naguro T, Correr S. 1994. Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. *Archives of histology and cytology* 57(4):369-394.
- Motta PM, Nottola SA, Familiari G, Macchiarelli G, Vizza E, Correr S. 1995. Ultrastructure of human reproduction from folliculogenesis to early embryo development. A review. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia* 100(4):9-72.
- Motta PM, Nottola SA, Makabe S. 1997. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 75(1):5-10.
- Murati A, Adelaide J, Mozziconacci MJ, Popovici C, Carbuccia N, Letessier A, Birg F, Birnbaum D, Chaffanet M. 2004. Variant MYST4-CBP gene fusion in a t(10;16) acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 125(5):601-604.
- Muromoto R, Sugiyama K, Takachi A, Imoto S, Sato N, Yamamoto T, Oritani K, Shimoda K, Matsuda T. 2004. Physical and functional interactions between Daxx and DNA methyltransferase 1-associated protein, DMAP1. *J Immunol* 172(5):2985-2993.
- Murray K. 1964. The Occurrence of Epsilon-N-Methyl Lysine in Histones. *Biochemistry* 3:10-15.
- Naito K, Toyoda Y. 1991. Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. *J Reprod Fertil* 93(2):467-473.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393(6683):386-389.
- Nemeth A, Langst G. 2004. Chromatin higher order structure: opening up chromatin for transcription. *Briefings in functional genomics & proteomics* 2(4):334-343.
- Neuwald AF, Landsman D. 1997. GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends in biochemical sciences* 22(5):154-155.
- Ng HH, Feng Q, Wang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Zhang Y, Struhl K. 2002. Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes & development* 16(12):1518-1527.

- Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D. 2002. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes & development* 16(4):479-489.
- Nowak SJ, Corces VG. 2004. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 20(4):214-220.
- Nurse P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344(6266):503-508.
- O'Carroll D, Erhardt S, Pagani M, Barton SC, Surani MA, Jenuwein T. 2001. The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Molecular and cellular biology* 21(13):4330-4336.
- Ohsumi K, Katagiri C. 1991. Occurrence of H1 subtypes specific to pronuclei and cleavage-stage cell nuclei of anuran amphibians. *Developmental biology* 147(1):110-120.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. 1999. DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99(3):247-257.
- Olszanska B, Borgul A. 1993. Maternal RNA content in oocytes of several mammalian and avian species. *The Journal of experimental zoology* 265(3):317-320.
- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. 1997. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 48(5):769-774.
- Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P. 1975. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4(4):281-300.
- Pal S, Yun R, Datta A, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Kumar J, Tempst P, Sif S. 2003. mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the *Myc* target gene *cad*. *Molecular and cellular biology* 23(21):7475-7487.
- Panagopoulos I, Fioretos T, Isaksson M, Samuelsson U, Billstrom R, Strombeck B, Mitelman F, Johansson B. 2001. Fusion of the MORF and CBP genes in acute myeloid leukemia with the t(10;16)(q22;p13). *Human molecular genetics* 10(4):395-404.
- Pangas SA, Rajkovic A. 2006. Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Human reproduction update* 12(1):65-76.
- Paradis F, Vigneault C, Robert C, Sirard MA. 2005. RNA interference as a tool to study gene function in bovine oocytes. *Molecular reproduction and development* 70(2):111-121.
- Parfenov V, Potchukalina G, Dudina L, Kostyuchek D, Gruzova M. 1989. Human antral follicles: oocyte nucleus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data). *Gamete research* 22(2):219-231.
- Paris J, Philippe M. 1990. Poly(A) metabolism and polysomal recruitment of maternal mRNAs during early *Xenopus* development. *Developmental biology* 140(1):221-224.
- Parthun MR, Widom J, Gottschling DE. 1996. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* 87(1):85-94.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular reproduction and development* 31(1):63-67.

- Paynton BV, Rempel R, Bachvarova R. 1988. Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Developmental biology* 129(2):304-314.
- Pehrson JR, Fuji RN. 1998. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic acids research* 26(12):2837-2842.
- Pelletier N, Champagne N, Stifani S, Yang XJ. 2002. MOZ and MORF histone acetyltransferases interact with the Runt-domain transcription factor Runx2. *Oncogene* 21(17):2729-2740.
- Pennetier S, Perreau C, Uzbekova S, Thelie A, Delaleu B, Mermillod P, Dalbies-Tran R. 2006. MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. *BMC developmental biology* 6:26.
- Perche PY, Robert-Nicoud M, Khochbin S, Voure'h C. 2003. [Nucleosome differentiation: role of histone H2A variants]. *Med Sci (Paris)* 19(11):1137-1145.
- Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schofer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T. 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107(3):323-337.
- Piccioni F, Zappavigna V, Verrotti AC. 2005. Translational regulation during oogenesis and early development: the cap-poly(A) tail relationship. *Comptes rendus biologies* 328(10-11):863-881.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and cellular endocrinology* 145(1-2):27-37.
- Powell K. 2005. Skeptics demand duplication of controversial fertility claim. *Nature medicine* 11(9):911.
- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108(4):501-512.
- Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. 2004. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *Journal of animal science* 82 E-Suppl:E40-52.
- Rai K, Chidester S, Zavala CV, Manos EJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR. 2007. Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish. *Genes & development* 21(3):261-266.
- Ramakrishnan V, Finch JT, Graziano V, Lee PL, Sweet RM. 1993. Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature* 362(6417):219-223.
- Rangasamy D, Greaves I, Tremethick DJ. 2004. RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nature structural & molecular biology* 11(7):650-655.
- Ratnam S, Mertineit C, Ding F, Howell CY, Clarke HJ, Bestor TH, Chaillet JR, Trasler JM. 2002. Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Developmental biology* 245(2):304-314.
- Rattner JB, Lin CC. 1985. Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes. *Cell* 42(1):291-296.
- Ray-Gallet D, Quivy JP, Scamps C, Martini EM, Lipinski M, Almouzni G. 2002. HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Molecular cell* 9(5):1091-1100.

- Rice JC, Allis CD. 2001. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Current opinion in cell biology* 13(3):263-273.
- Richmond TJ, Davey CA. 2003. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423(6936):145-150.
- Ridgway P, Almouzni G. 2000. CAF-1 and the inheritance of chromatin states: at the crossroads of DNA replication and repair. *Journal of cell science* 113 (Pt 15):2647-2658.
- Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF. 2001. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 412(6848):736-739.
- Robert C, Hue I, McGraw S, Gagne D, Sirard MA. 2002. Quantification of cyclin B1 and p34(cdc2) in bovine cumulus-oocyte complexes and expression mapping of genes involved in the cell cycle by complementary DNA macroarrays. *Biology of reproduction* 67(5):1456-1464.
- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. 2000. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nature genetics* 25(3):338-342.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* 273(10):5858-5868.
- Roth SY, Allis CD. 1992. Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *Trends in biochemical sciences* 17(3):93-98.
- Roth SY, Allis CD. 1996. Histone acetylation and chromatin assembly: a single escort, multiple dances? *Cell* 87(1):5-8.
- Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. 2000. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nature genetics* 25(3):269-277.
- Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, Dorin J, Cooke HJ. 1997. The mouse *Dazl* gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389(6646):73-77.
- Ruiz-Garcia AB, Sendra R, Galiana M, Pamblanco M, Perez-Ortin JE, Tordera V. 1998. HAT1 and HAT2 proteins are components of a yeast nuclear histone acetyltransferase enzyme specific for free histone H4. *The Journal of biological chemistry* 273(20):12599-12605.
- Ruiz-Garcia AB, Sendra R, Pamblanco M, Tordera V. 1997. Gcn5p is involved in the acetylation of histone H3 in nucleosomes. *FEBS letters* 403(2):186-190.
- Russe I. 1983. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca anatomica* 24:77-92.
- Sagata N, Shiokawa K, Yamana K. 1980. A study on the steady-state population of poly(A)+RNA during early development of *Xenopus laevis*. *Developmental biology* 77(2):431-448.
- Sagata N, Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y. 1989. The *c-mos* proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342(6249):512-518.
- Saha V, Chaplin T, Gregorini A, Ayton P, Young BD. 1995. The leukemia-associated-protein (LAP) domain, a cysteine-rich motif, is present in a wide range of proteins, including MLL, AF10, and MLLT6 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(21):9737-9741.

- Salles FJ, Darrow AL, O'Connell ML, Strickland S. 1992. Isolation of novel murine maternal mRNAs regulated by cytoplasmic polyadenylation. *Genes & development* 6(7):1202-1212.
- Sanchez R, Marzluff WF. 2002. The stem-loop binding protein is required for efficient translation of histone mRNA in vivo and in vitro. *Molecular and cellular biology* 22(20):7093-7104.
- Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W, Dean W. 2003. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol* 13(13):1116-1121.
- Sarg B, Helliger W, Talasz H, Koutzamani E, Lindner HH. 2004. Histone H4 hyperacetylation precludes histone H4 lysine 20 trimethylation. *The Journal of biological chemistry* 279(51):53458-53464.
- Sarma K, Reinberg D. 2005. Histone variants meet their match. *Nature reviews* 6(2):139-149.
- Sarmiento OF, Digilio LC, Wang Y, Perlin J, Herr JC, Allis CD, Coonrod SA. 2004. Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development. *Journal of cell science* 117(Pt 19):4449-4459.
- Sathananthan AH, Selvaraj K, Girijashankar ML, Ganesh V, Selvaraj P, Trounson AO. 2006. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy research and technique* 69(6):396-407.
- Scaramuzzi RJ, Turnbull KE, Nancarrow CD. 1980. Growth of Graafian follicles in cows following luteolysis induced by the prostaglandin F2 alpha analogue, cloprostenol. *Australian journal of biological sciences* 33(1):63-69.
- Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T. 2002. Unsafe SETs: histone lysine methyltransferases and cancer. *Trends in biochemical sciences* 27(8):396-402.
- Schultz RM. 1993. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays* 15(8):531-538.
- Schultz RM. 2002. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Human reproduction update* 8(4):323-331.
- Schultz RM, Kopf GS. 1995. Molecular basis of mammalian egg activation. *Current topics in developmental biology* 30:21-62.
- Scott EK, Lee T, Luo L. 2001. enok encodes a Drosophila putative histone acetyltransferase required for mushroom body neuroblast proliferation. *Curr Biol* 11(2):99-104.
- Sheets MD, Fox CA, Hunt T, Vande Woude G, Wickens M. 1994. The 3'-untranslated regions of c-mos and cyclin mRNAs stimulate translation by regulating cytoplasmic polyadenylation. *Genes & development* 8(8):926-938.
- Sheets MD, Wu M, Wickens M. 1995. Polyadenylation of c-mos mRNA as a control point in Xenopus meiotic maturation. *Nature* 374(6522):511-516.
- Shelby RD, Vafa O, Sullivan KF. 1997. Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *The Journal of cell biology* 136(3):501-513.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119(7):941-953.
- Shi YJ, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T, Shi Y. 2005. Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Molecular cell* 19(6):857-864.

- Shibahara K, Stillman B. 1999. Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* 96(4):575-585.
- Shiio Y, Eisenman RN. 2003. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(23):13225-13230.
- Shilatifard A. 2006. Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression. *Annual review of biochemistry*.
- Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL. 2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311(5762):844-847.
- Shuman S. 1997. Origins of mRNA identity: capping enzymes bind to the phosphorylated C-terminal domain of RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(24):12758-12760.
- Shuman S. 2002. What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. *Nature reviews* 3(8):619-625.
- Silverman N, Agapite J, Guarente L. 1994. Yeast ADA2 protein binds to the VP16 protein activation domain and activates transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(24):11665-11668.
- Simerly C, Wu GJ, Zoran S, Ord T, Rawlins R, Jones J, Navara C, Gerrity M, Rinehart J, Binor Z. 1995. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. *Nature medicine* 1(1):47-52.
- Simon R, Richter JD. 1994. Further analysis of cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* embryos and identification of embryonic cytoplasmic polyadenylation element-binding proteins. *Molecular and cellular biology* 14(12):7867-7875.
- Simon R, Tassan JP, Richter JD. 1992. Translational control by poly(A) elongation during *Xenopus* development: differential repression and enhancement by a novel cytoplasmic polyadenylation element. *Genes & development* 6(12B):2580-2591.
- Simon R, Wu L, Richter JD. 1996. Cytoplasmic polyadenylation of activin receptor mRNA and the control of pattern formation in *Xenopus* development. *Developmental biology* 179(1):239-250.
- Sims RJ, 3rd, Nishioka K, Reinberg D. 2003. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* 19(11):629-639.
- Sirard MA, Dufort I, Coenen K, Tremblay K, Massicotte L, Robert C. 2003. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement* 61:117-129.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of reproduction* 40(6):1257-1263.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65(1):126-136.
- Skaznik-Wikiel M, Tilly JC, Lee HJ, Niikura Y, Kaneko-Tarui T, Johnson J, Tilly JL. 2007. Serious doubts over "Eggs forever?" *Differentiation; research in biological diversity* 75(2):93-99.

- Smith LC, Meirelles FV, Bustin M, Clarke HJ. 1995. Assembly of somatic histone H1 onto chromatin during bovine early embryogenesis. *The Journal of experimental zoology* 273(4):317-326.
- Smith S, Stillman B. 1991. Stepwise assembly of chromatin during DNA replication in vitro. *The EMBO journal* 10(4):971-980.
- Sparrow DB, Miska EA, Langley E, Reynaud-Deonauth S, Kotecha S, Towers N, Spohr G, Kouzarides T, Mohun TJ. 1999. MEF-2 function is modified by a novel co-repressor, MITR. *The EMBO journal* 18(18):5085-5098.
- Spencer VA, Davie JR. 1999. Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* 240(1):1-12.
- Staley JP, Guthrie C. 1998. Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92(3):315-326.
- Standart N, Dale M, Stewart E, Hunt T. 1990. Maternal mRNA from clam oocytes can be specifically unmasked in vitro by antisense RNA complementary to the 3'-untranslated region. *Genes & development* 4(12A):2157-2168.
- Stebbins-Boaz B, Richter JD. 1997. Translational control during early development. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 7(1-2):73-94.
- Stern DE, Berger SL. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(2):435-459.
- Sternlicht AL, Schultz RM. 1981. Biochemical studies of mammalian oogenesis: kinetics of accumulation of total and poly(A)-containing RNA during growth of the mouse oocyte. *The Journal of experimental zoology* 215(2):191-200.
- Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765):41-45.
- Strelkov IS, Davie JR. 2002. Ser-10 phosphorylation of histone H3 and immediate early gene expression in oncogene-transformed mouse fibroblasts. *Cancer research* 62(1):75-78.
- Suteevun T, Smith SL, Muenthaisong S, Yang X, Parnpai R, Tian XC. 2006. Anomalous mRNA levels of chromatin remodeling genes in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. *Theriogenology* 65(9):1704-1715.
- Swales AK, Spears N. 2005. Genomic imprinting and reproduction. *Reproduction (Cambridge, England)* 130(4):389-399.
- Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y. 2002. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & development* 16(14):1779-1791.
- Tada M, Tada T. 2006. Epigenetic reprogramming of somatic genomes by electrofusion with embryonic stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 325:67-79.
- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. 2004. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116(1):51-61.
- Takai D, Jones PA. 2003. The CpG island searcher: a new WWW resource. *In silico biology* 3(3):235-240.

- Talasz H, Helliger W, Puschendorf B, Lindner H. 1996. In vivo phosphorylation of histone H1 variants during the cell cycle. *Biochemistry* 35(6):1761-1767.
- Tanaka M, Hennebold JD, Macfarlane J, Adashi EY. 2001. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development (Cambridge, England)* 128(5):655-664.
- Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272(5260):408-411.
- Telfer EE. 2004. Germline stem cells in the postnatal mammalian ovary: a phenomenon of prosimian primates and mice? *Reprod Biol Endocrinol* 2:24.
- Telfer EE, Gosden RG, Byskov AG, Spears N, Albertini D, Andersen CY, Anderson R, Braw-Tal R, Clarke H, Gougeon A, McLaughlin E, McLaren A, McNatty K, Schatten G, Silber S, Tsafiri A. 2005. On regenerating the ovary and generating controversy. *Cell* 122(6):821-822.
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Molecular reproduction and development* 26(1):90-100.
- Tesfaye D, Kadanga A, Rings F, Bauch K, Jennen D, Nganvongpanit K, Holker M, Tholen E, Ponsuksili S, Wimmers K, Montag M, Gilles M, Kirfel G, Herzog V, Schellander K. 2006. The effect of nitric oxide inhibition and temporal expression patterns of the mRNA and protein products of nitric oxide synthase genes during in vitro development of bovine pre-implantation embryos. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 41(6):501-509.
- Tesfaye D, Ponsuksili S, Wimmers K, Gilles M, Schellander K. 2004. A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced in vitro or in vivo. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 39(6):396-404.
- Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. 2003. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Annals of the New York Academy of Sciences* 983:84-100.
- Thibault C, Levasseur M. 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA, Paris.
- Thomas T, Voss AK, Chowdhury K, Gruss P. 2000. Querkopf, a MYST family histone acetyltransferase, is required for normal cerebral cortex development. *Development (Cambridge, England)* 127(12):2537-2548.
- Tomek W, Torner H, Kanitz W. 2002. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 37(2):86-91.
- Trasler JM. 2006. Gamete imprinting: setting epigenetic patterns for the next generation. *Reproduction, fertility, and development* 18(1-2):63-69.
- Tremblay K, Vigneault C, McGraw S, Morin G, Sirard MA. 2006. Identification and characterization of a novel bovine oocyte-specific secreted protein gene. *Gene* 375:44-53.
- Tremblay K, Vigneault C, McGraw S, Sirard MA. 2005. Expression of cyclin B1 messenger RNA isoforms and initiation of cytoplasmic polyadenylation in the bovine oocyte. *Biology of reproduction* 72(4):1037-1044.

- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. 2006. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439(7078):811-816.
- Van den Hurk R, Abir R, Telfer EE, Bevers MM. 2000. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Human reproduction update* 6(5):457-474.
- Van Den Hurk R, Bevers MM, Beckers JF. 1997. In vivo and in vitro development of preantral follicles. *Theriogenology* 47:73-82.
- Van Holde KE. 1988. *Chromatin*. New York: Springer-Verlag. p 530
- Varnum SM, Wormington WM. 1990. Deadenylation of maternal mRNAs during *Xenopus* oocyte maturation does not require specific cis-sequences: a default mechanism for translational control. *Genes & development* 4(12B):2278-2286.
- Venkataraman K, Brown KM, Gilmartin GM. 2005. Analysis of a noncanonical poly(A) site reveals a tripartite mechanism for vertebrate poly(A) site recognition. *Genes & development* 19(11):1315-1327.
- Verreault A, Kaufman PD, Kobayashi R, Stillman B. 1996. Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* 87(1):95-104.
- Vigneault C, Gilbert I, Sirard MA, Robert C. 2006. Using the histone H2a transcript as an endogenous standard to study relative transcript abundance during bovine early development. *Molecular reproduction and development*.
- Vigneault C, McGraw S, Massicotte L, Sirard MA. 2004. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biology of reproduction* 70(6):1701-1709.
- Vogel G. 2005. Reproductive biology. Controversial study finds an unexpected source of oocytes. *Science* (New York, NY 309(5735):678-679.
- Waldeyer W. 1870. *Eierstock und Ei*. Engelmann, Leipzig.
- Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P, Zhang Y. 2001. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 293(5531):853-857.
- Wang L, Liu L, Berger SL. 1998. Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo. *Genes & development* 12(5):640-653.
- Wang Q, Yin S, Ai JS, Liang CG, Hou Y, Chen DY, Schatten H, Sun QY. 2006. Histone deacetylation is required for orderly meiosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 5(7):766-774.
- Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA. 2004. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science* 306(5694):279-283.
- Weston A, Sommerville J. 2006. Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation. *Nucleic acids research* 34(10):3082-3094.
- Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK. 2003. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends in biochemical sciences* 28(4):182-188.

- Wirbelauer C, Bell O, Schubeler D. 2005. Variant histone H3.3 is deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes while active histone modifications show a promoter-proximal bias. *Genes & development* 19(15):1761-1766.
- Wolf E, Vassilev A, Makino Y, Sali A, Nakatani Y, Burley SK. 1998. Crystal structure of a GCN5-related N-acetyltransferase: *Serratia marcescens* aminoglycoside 3-N-acetyltransferase. *Cell* 94(4):439-449.
- Wolffe A. 1998. *Chromatin, structure and function : overview*. London: Academic Press.
- Wolffe AP, Pruss D. 1996. Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84(6):817-819.
- Wong J, Patterton D, Imhof A, Guschin D, Shi YB, Wolffe AP. 1998. Distinct requirements for chromatin assembly in transcriptional repression by thyroid hormone receptor and histone deacetylase. *The EMBO journal* 17(2):520-534.
- Woodcock CL, Woodcock H, Horowitz RA. 1991. Ultrastructure of chromatin. I. Negative staining of isolated fibers. *Journal of cell science* 99 (Pt 1):99-106.
- Worcel A, Han S, Wong ML. 1978. Assembly of newly replicated chromatin. *Cell* 15(3):969-977.
- Wormington M. 1994. Unmasking the role of the 3' UTR in the cytoplasmic polyadenylation and translational regulation of maternal mRNAs. *Bioessays* 16(8):533-535.
- Wu B, Ignatz G, Currie WB, Yang X. 1997. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Biology of reproduction* 56(1):253-259.
- Wysocka J, Milne TA, Allis CD. 2005. Taking LSD 1 to a new high. *Cell* 122(5):654-658.
- Xu W, Edmondson DG, Evrard YA, Wakamiya M, Behringer RR, Roth SY. 2000. Loss of *Gen512* leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. *Nature genetics* 26(2):229-232.
- Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y. 2006. JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* 125(3):483-495.
- Yang J, Yang S, Beaujean N, Niu Y, He X, Xie Y, Tang X, Wang L, Zhou Q, Ji W. 2007. Epigenetic marks in cloned rhesus monkey embryos: comparison with counterparts produced in vitro. *Biology of reproduction* 76(1):36-42.
- Yang XJ. 2004. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic acids research* 32(3):959-976.
- Yang XJ, Gregoire S. 2005. Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Molecular and cellular biology* 25(8):2873-2884.
- Yao YL, Yang WM, Seto E. 2001. Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Molecular and cellular biology* 21(17):5979-5991.
- Yeo S, Lee KK, Han YM, Kang YK. 2005. Methylation changes of lysine 9 of histone H3 during preimplantation mouse development. *Molecules and cells* 20(3):423-428.
- Yu J, Hecht NB, Schultz RM. 2001. Expression of *MSY2* in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biology of reproduction* 65(4):1260-1270.

- Zalensky AO, Siino JS, Gincitis AA, Zalenskaya IA, Tomilin NV, Yau P, Bradbury EM. 2002. Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *The Journal of biological chemistry* 277(45):43474-43480.
- Zernicka-Goetz M. 1994. Activation of embryonic genes during preimplantation rat development. *Molecular reproduction and development* 38(1):30-35.
- Zhang D, Yoon HG, Wong J. 2005. JMJD2A is a novel N-CoR-interacting protein and is involved in repression of the human transcription factor achaete scute-like homologue 2 (ASCL2/Hash2). *Molecular and cellular biology* 25(15):6404-6414.
- Zhang W, Bone JR, Edmondson DG, Turner BM, Roth SY. 1998. Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *The EMBO journal* 17(11):3155-3167.
- Zhao J, Kessler M, Helmling S, O'Connor JP, Moore C. 1999. Pta1, a component of yeast CF II, is required for both cleavage and poly(A) addition of mRNA precursor. *Molecular and cellular biology* 19(11):7733-7740.
- Zhong SP, Ma WY, Dong Z. 2000. ERKs and p38 kinases mediate ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10. *The Journal of biological chemistry* 275(28):20980-20984.
- Zhu H, Geiman TM, Xi S, Jiang Q, Schmidtman A, Chen T, Li E, Muegge K. 2006. Lsh is involved in de novo methylation of DNA. *The EMBO journal* 25(2):335-345.
- Zlatanova J, Doenecke D. 1994. Histone H1 zero: a major player in cell differentiation? *Faseb J* 8(15):1260-1268.
- Zorio DA, Bentley DL. 2004. The link between mRNA processing and transcription: communication works both ways. *Experimental cell research* 296(1):91-97.

2 CHAPITRE # II : Quantification des transcrits d'histones acétyltransférases et d'histones déacétylases pendant le développement embryonnaire bovin.

Serge McGraw, Claude Robert, Lyne Massicotte et Marc-André Sirard

Cet article a été publié dans la revue "**Biology of Reproduction**" sous la référence suivante: McGraw S, Robert C, Massicotte L, Sirard MA. Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. Biol Reprod. 2003 Feb;68(2):383-9.

2.1 RÉSUMÉ

L'acétylation est une des modifications portées aux histones, qui altèrent la structure hautement ordonnée de la chromatine afin de rendre l'ADN plus accessible à la machinerie transcriptionnelle. L'objectif de cette étude était d'établir précisément les profils d'expression de sept gènes agissant sur la structure de la chromatine, dans l'ovocyte et durant le développement embryonnaire *in vitro*. Les profils d'expression d'ARNm des histones déacétylases (HDAC1, HDAC2, HDAC3, et HDAC7), des histones acétyltransférases (GCN5 et HAT1), ainsi que de l'histone H2A ont été établis par RT-PCR quantitatif. Des profils d'expression similaires ont été dévoilés pour HDAC1, HDAC2 (HDAC de classe I), et HAT1 (HAT de type B). Pour ce qui est de HDAC3 (HDAC de classe I), son profil s'apparente à ceux de HDAC1, HDAC2, et HAT1, alors que les profils de HDAC7 (HDAC de classe II) et GCN5 (HAT de type A) sont différents. Ces résultats indiquent que les histones déacétylases et acétyltransférases ont des niveaux d'ARNm variables tout au long du développement embryonnaire, et pourraient indiquer que leur implication dans le remodelage de la chromatine est tout aussi variable pendant cette période.

2.2 ABSTRACT

Mammalian oocytes are very unique cells with an unlimited developmental potential. These totipotent cells are able to remove existing gene-expression patterns and to impose new ones. However, genome reprogramming is still a mystery. Posttranslational modifications by acetylation of the N-termini portion of histones composing the nucleosome are involved in genome reprogramming. These modifications alter the higher-order chromatin structure to render the DNA accessible to the regulatory and transcriptional machinery. In the present study, we have investigated, to our knowledge for the first time, precise expression patterns of seven genes involved in chromatin structure throughout bovine embryo development. Oocytes harvested from bovine ovaries were used for *in vitro* production of germinal vesicle oocytes, metaphase II oocytes, 2- and 8-cell embryos, and blastocysts. Total RNA was extracted from pools (triplicates) of 20 oocytes or from embryos of each developmental stage. By means of quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction using SYBR Green to detect double-stranded DNA, mRNA expression profiles for histone deacetylases (HDAC1, HDAC2, HDAC3, and HDAC7), histone acetyltransferases (GCN5 and HAT1), and histone H2A were established. Transcripts for all genes were detected at all stages from the oocyte to the blastocyst. The HDAC1, HDAC2 (class I HDAC), and HAT1 (type B HAT) revealed similar expression profiles. The HDAC3 (class I HDAC) tends to have an expression profile similar to those of HDAC1, HDAC2, and HAT1, whereas the HDAC7 (class II HDAC) and GCN5 (type A HAT) profiles were different from those three. These results indicate variable levels of histone deacetylases and histone acetyltransferases throughout embryonic development and may indicate that their implication in chromatin remodelling is as variable during this time period.

2.3 INTRODUCTION

During the last few years, research toward understanding nuclear reprogramming has uncovered an impressive arsenal of complex mechanisms elucidating parts of that process. However, the exact mechanisms of how the totipotent oocyte is able to erase the patterns of gene expression are still unknown. Understanding this process would help to resolve developmental problems occurring in the production of embryos by cloning, nuclear transfer, and in vitro fertilization (IVF). In the early bovine embryo, transcription is inactive, and the accumulated maternal mRNA is essential for protein synthesis until the activation of zygotic transcription (8-cell stage). When matured, fertilized, and cultured in vitro, only 35% of bovine oocytes reach the blastocyst stage, although 95% of these oocytes are capable of accomplishing the first cleavage [1]. The majority of embryos not reaching the blastocyst stage do not develop past the 4- to 8-cell stage, just before the maternal zygotic transition (MZT). This suggests that for a large number of oocytes, the stored maternal mRNA is not sufficient to activate the zygotic genome.

In all eukaryotic cells, the genetic information is partially compacted into the nucleus through nucleosomes. The nucleosome consists of 145 base pairs of DNA wrapped around an octamer of H2A, H2B, H3, and H4 histone proteins (two of each). Histone H1 attaches itself to the exterior of the octamer to stabilize the DNA strands, and it contributes to the formation of higher-order structure (i.e., heterochromatin) [2]. Repeating units of nucleosome with the addition of histone H1 and linker DNA form the dense, compact fiber called chromatin [3]. The histone-DNA interactions within the nucleosome core particle and the histone tail interactions in the chromatin fiber are thought to influence the expression or repression of transcription [4]. The amino-terminal tails protruding from the core are subject to enzyme-catalyzed and posttranslational modification, such as acetylation, methylation, phosphorylation, and ubiquitination [5–7], which can affect their charge and function [3]. Therefore, the histones play structural and regulatory roles that are still not fully understood.

The modifications mediated by the histone acetyltransferases (HATs) have been associated with transcriptional activity [8, 9]. The general thought is that acetylation of specific lysine residues on the epsilon-amino groups, in the amino-terminal tails of histones, neutralizes the positive charges of the histone N-termini, causing a reduction in their affinity for DNA and, thereby, increasing the accessibility of transcription factors to the DNA template. Histone acetyltransferases can be separated in two types, type A and type B, depending on their subcellular localization, origin, and function. Type A HATs are found in the nucleus, where they play important roles in the regulation of gene expression by functioning as transcriptional coactivators. Type B HATs primarily acetylate nascent histones in the cytoplasm and may function in chromatin assembly [10, 11]. However, HAT1, a type B HAT, has been localized in the nucleus [12, 13]. Many HATs have a coactivating role for different transcriptional factors, and some HATs can also acetylate transcription factors [14].

Acetylation is a reversible process, and the histone deacetylase (HDAC) is responsible for the opposite reaction, which often results in transcriptional repression [8, 9]. To date, 10 mammalian HDACs have been cloned, and these can be divided into two classes according to their size, their sequence homology, and their protein-protein interactions. Class I is composed of enzymes significantly homologous to the yeast protein RPD3 and includes HDAC1, HDAC2, HDAC3, and HDAC8. The HDACs composing class II are HDA1-like enzymes and include HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, and HDAC10. The third group, class III enzymes, are human homologues to yeast Sir2 protein, which contains seven members (SIRT1 to SIRT7). However, class III homologues have yet to be proven as being functional HDACs [15]. Both acetylases and deacetylases can be parts of large, multisubunit complexes, and most of them were first identified as proteins involved in transcriptional regulation.

In the present study, we investigated the expression profile of seven genes involved in chromatin formation or modification in the bovine oocyte and across development of the preimplantation embryo with quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Two of those genes are HATs: GCN5, a type A enzyme, and HAT1, a type B

enzyme. Four are HDACs: HDAC1, HDAC2, and HDAC3, class I enzymes; and HDAC7, a class II deacetylase. We also verified histone H2A levels, because previous studies from our lab indicated that this mRNA is a stable quantitative marker [16].

Our objective was to measure mRNA levels of these genes as an indication of their possible role in the ability of the oocyte to reprogram the chromatin. Knowing the mRNA profiles of these genes would provide greater knowledge regarding chromatin silencing and activation, thus helping us to understand the MZT.

2.4 MATERIALS AND METHODS

All materials were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) unless otherwise stated.

Oocyte Recovery and Selection

Bovine ovaries were collected at a commercial slaughterhouse and transported to the laboratory in a thermoflask with a standard saline solution supplemented with an antimycotic agent. Cumulus-oocyte complexes (COCs) from follicles (3- to 5-mm diameter) were collected by aspiration using an 18-gauge needle attached to a 10-ml syringe. The COCs were selected according to their morphological characteristics [17], and classes 1, 2, and 3 were put through in vitro-production procedures after being washed three times in HEPES-buffered Tyrode medium (TLH) supplemented with 0.3% (w/v) BSA (fraction V), 0.2 mM pyruvic acid, and 50 μ g/ml of gentamicin. Some of the COCs from classes 1, 2, and 3 were mechanically treated to separate the cumulus cells from the oocyte. The denuded oocytes were transferred and washed three times with PBS buffer to prevent cumulus cell contamination. Groups of 20 oocytes were then briefly centrifuged, the supernatant discarded, and the oocytes immediately frozen and stored at -80°C until RNA extraction.

2.4.1 In Vitro Maturation

Groups of 10 COCs were incubated in medium droplets under mineral oil. Each droplet had 50 μ l of maturation medium composed of modified synthetic oviduct fluid (SOF) supplemented with 0.8% BSA, MEM nonessential amino acids (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada), MEM essential amino acids (Gibco BRL), and 1 mM glutamine supplemented with 1 μ g/ml of 17 β -estradiol [18]. After the addition of the oocytes, the droplets were incubated in a humidified atmosphere for 23–24 h at 38.5°C with 5% CO₂ in air. After 24 h of in vitro maturation, oocytes in metaphase II (MII) were collected, and groups of 20 were mechanically denuded, washed three times in PBS buffer, and centrifuged. The supernatant was then discarded, and the oocytes were immediately frozen at -80°C until RNA extraction.

2.4.2 In Vitro Fertilization

For IVF, five oocytes were added to 52- μ l droplets. The droplets were composed of modified Tyrode lactate medium supplemented with 0.6% BSA (fatty-acid free), 0.2 mM pyruvic acid, 2 μ g/ml of heparin, and 50 μ g/ml of gentamicin. Before the transfer, the COCs were washed twice in TLH. Following the transfer, 2 μ l of PHE (1 mM hypotaurine, 2 mM penicillamine, and 250 mM epinephrine) were added to each droplet. The semen came from a single bull (Centre d'Insémination Artificielle du Québec; CIAQ, St. Hyacinthe, QC, Canada). The spermatozoa were thawed in 35°C water for 1 min, added to a discontinuous Percoll gradient (45% over a 90% Percoll), and centrifuged at 700 x g for 30 min at 26°C. The pellet was resuspended in 1 ml of modified Tyrode medium and centrifuged at 250 x g for 5 min at 26°C. The supernatant was discarded, and the spermatozoa were resuspended in IVF medium to obtain a final concentration of 1 x 10⁶ cells/ml. Two microliters of the sperm suspension were added to the droplets, and the incubation took place in a humidified atmosphere at 38.5°C in 5% CO₂ in air for 15–18 h.

2.4.3 In Vitro Culture

Following insemination, presumably fertilized oocytes were mechanically denuded by repeated pipetting, washed three times in PBS buffer, and transferred to culture droplets (50 μ l) in groups of 20–30 embryos. The embryo culture was held in modified SOF under mineral oil at 38.5°C in 5% CO₂ in a reduced oxygen atmosphere (7%) with saturated humidity. The SOF was replaced every 72 h to prevent ammonium accumulation resulting from amino acid degradation, which can be toxic. A dual-culture system was used. The SOFC1 medium used for the first 72 h contained 0.8% BSA, MEM nonessential amino acids, 1 mM glutamine, and 10 μ M EDTA. That medium was then replaced by the SOFC2 medium containing 0.8% BSA, MEM nonessential amino acids, MEM essential amino acids, and 1 mM glutamine for the remaining culture. Two-cell embryos were collected 36 h postfertilization, 8-cell embryos after 72 h, and blastocysts after Day 8. These were all washed three times in PBS buffer and centrifuged. The supernatant was then discarded, and the embryos and blastocysts were frozen at -80°C until RNA extraction.

2.4.4 RNA Extraction and RT Reaction

All the pools were done in triplicate and contained 20 oocytes or embryos from these different developmental stages: germinal vesicle (GV) oocytes, MII oocytes, 2-cell embryos, 8-cells embryos, and blastocysts. The total RNA was extracted from those pools using the Strataprep Total RNA Microprep kit (Stratagene, La Jolla, CA), and a DNase I treatment was performed directly in the column as described by the manufacturer. Before precipitation, 30 μ g of glycogen (Gibco BRL) were added as a carrier. The RNA precipitation was carried out using a one-fifth volume of sodium acetate (1.4 M, pH 4.0) and one volume of isopropanol. The mixture was incubated at -80°C for 10 min before centrifugation at 13 000 rpm for 15 min. The pellets were washed with 70% ethanol, centrifuged for 5 min at 8000 rpm, and air-dried. The entire RNA pellet was used for the RT. The RNA pellet was dissolved in 3.4 μ l of sterile water and primed using 100 ng of oligodt-18. Secondary structures were removed and the oligodt-18 annealed to the mRNA by heating the sample at 72°C for 2 min, then the reaction was quenched rapidly on ice. Next, 5x RT buffer, 4 mM dNTPs, 10 mM dithiothreitol, and 200 U of Superscript II RT

(Gibco BRL) were added to obtain a total reaction mix volume of 10 μ l. This mix was first heated at 42°C for 1 h and then at 70°C for 10 min to terminate the reaction. When the reaction was completed, 10 μ l of water were added to the RT to get a final volume of 20 μ l (the equivalent of 1 oocyte or embryo/ μ l). The RTs were carried out in a PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., Watertown, MA).

2.4.5 Quantitative PCR

The quantification of all gene transcripts was done by real-time quantitative RT-PCR [19]. The primers for each gene were designed from conserved sequences of human and mouse found in GenBank (Table 1). The reaction mixture consisted of 2 μ l cDNA (1 oocyte or embryo/ μ l), except for H2A (for which only 1 μ l of cDNA was used), 50 ng of each primer, 14.4 μ l of water, 3 mM MgCl₂, and 2 μ l of Master SYBR Green mix (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) for a total of 20 μ l. A Light Cycler apparatus (Roche Diagnostics) was used for quantification using SYBR Green to detect the double-stranded DNA produced during the amplification. For each gene studied, a specific standard curve was made using a series of dilutions from the corresponding PCR product. These PCR products were previously cleaned on Qiaquick columns (Qiagen, Inc., Mississauga, ON, Canada), and the concentration was evaluated by visual comparative analysis using a standardized mass ladder (Gibco BRL). The program used for all genes consisted of a denaturing cycle of 10 min at 95°C; 45–50 cycles of PCR (95°C for 0 sec, 57°C for 5 sec, and 72°C for 16 sec); a melting cycle consisting of 95°C for 0 sec, 70°C for 30 sec, and a step cycle starting at 70°C until 95°C with a 0.2°C/sec transition rate; and finally, a cooling cycle of 40°C for 30 sec.

2.4.6 Statistical Analysis

Results obtained for each gene in each pool of cDNA were normalized with a ratio of H2A. Data are presented as the mean \pm SEM. Statistically significant differences in means between each developmental stage in terms of mRNA expression were calculated by the

Tukey Studentized Range (honestly significant difference) test. Differences were considered to be statistically significant at the 95% confidence level ($P < 0.05$).

2.5 RESULTS

To study the gene expression of H2A, HAT1, GCN5, HDAC1, HDAC2, HDAC3, and HDAC7 during the bovine preimplantation period, GV oocytes, MII oocytes, 2- and 8-cell embryos, and blastocysts were used for preparation of cDNA. Each gene was tested in every single RT, composed of 20 oocytes or embryos at different stages and performed in triplicate. After the RT, amplification by quantitative PCR was carried out using an equivalent of two oocytes or cleavage-stage embryos (1 for H2A) per reaction as described in Materials and Methods. The values obtained were normalized with the values of H2A [16].

The bovine cDNA of all genes (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC7, HAT1, GCN5, and H2A) was detected in all unfertilized oocytes and embryo stages tested, from immature oocytes to blastocysts, except for one RT from a 2-cell stage triplicate that did not show a signal for HDAC1, HDAC3, and HAT1 and another from an 8-cell stage triplicate that did not show a signal for HDAC1 and HDAC3.

Figure 2.1 shows results obtained from the Light Cycler apparatus for one of the triplicates for the H2A gene (used to normalize). We observe in **Figure 2.1A** that the sample amplification curves start rising between the 27th and 29th cycles of PCR, showing that the mRNA levels in all developmental stages are close to the same (confirmed in **Fig. 2.4**), whereas the negative control stayed flat, meaning that no product was detected. The exponential phase of the amplification curves is used by the Light Cycler software to calculate the concentration of the accumulating PCR products in the samples. The negative derivative of fluorescence (with respect to temperature) is plotted to generate a melting peak (**Fig. 2.1B**). The melting peak can be used to evaluate the specificity of the amplification. In this example, the melting peak observed around 79.5°C for the negative

control represents primer dimer formation, and the melting peak observed around 90°C is specific for the H2A PCR product.

Results from the quantitative analysis of the four HDAC genes studied are presented in **Figure 2.2**. The HDAC1 gene (**Fig. 2.2A**) is strongly expressed in the blastocyst stage compared to the other developmental stages, which remained constant ($P < 0.05$). As for the HDAC2 gene (**Fig. 2.2B**), it is also highly expressed in the blastocyst stage compared to all other stages, except for the MII stage, which has an intermediate expression level ($P < 0.05$). The lowest level of mRNA of HDAC2 is at the 8-cell stage ($P < 0.05$). No significant differences ($P > 0.05$) were observed between the expression levels of HDAC3 (**Fig. 2.2C**) and HDAC7 (**Fig. 2.2D**) throughout the developmental stages. Although high variance in blastocyst embryos for the HDAC3 gene precluded a statistical difference from being observed, its expression pattern strongly resembles those of HDAC1 and HDAC2.

The expression profiles of the two HATs studied are presented in **Figure 2.3**. The level of expression of HAT1 (**Fig. 2.3A**) in the blastocysts is significantly higher than in the GV oocytes and the 8-cell embryos ($P < 0.05$). The expression levels of HAT1 are the same from the oocyte up to the 8-cell stage. The expression pattern of GCN5 (**Fig. 2.3B**) showed no significant difference ($P > 0.05$) in levels throughout embryonic development. Similar levels of the H2A genes (**Fig. 2.4**) were also found in all oocytes and embryo stages.

2.6 DISCUSSION

Through real-time quantitative PCR, we established mRNA profiles of four HDACs and two HATs that could be involved in the reprogramming of nuclei and in the activation/silencing of chromatin. The mRNA of H2A, a constituent of the nucleosome, was also verified and employed to standardize the results.

The mRNA of HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC7, HAT1, and GCN5 are expressed throughout development of the preimplantation embryo, from the immature oocyte to the

blastocyst stage (**Figs. 2.2–4**). An earlier study by RT-PCR showed that mouse HDAC1, HDAC2, and HDAC3 are expressed from the oocyte through the blastocyst stage at varying levels [20]. Those authors found that the patterns for HDAC2 and HDAC3 demonstrate high levels of mRNA in the oocyte, followed by degradation until the 4-cell stage and then a major increase in the blastocyst. They also observed that very low levels of transcripts are found in immature oocytes, MII oocytes, and 1-cell embryos for HDAC1 compared to HDAC2 and HDAC3; however, extremely high levels of HDAC1 are found in 4-cell embryos [20]. Segev et al. [21] looked at the expression patterns for bovine HDAC1, HDAC2, and HDAC3 from immature oocytes to 8-cell embryos. Those authors did not detect any mRNA encoding for HDAC1 and HDAC2 in the immature oocytes with normal RT-PCR using an equivalent of four oocytes or embryos from each stage per PCR reaction. Here, we demonstrated that using two oocytes or embryos per reaction on a quantitative PCR with SYBR Green was sufficient to detect HDAC1 and HDAC2 mRNA in the immature oocytes. Steuerwald et al. [22] compared the sensitivity of fluorescent-monitored product accumulation versus conventional product identification by gel electrophoresis. With the SYBR Green 1, they detected β -actin cDNA formation at the 12th cycle, and when using ethidium bromide-stained gel electrophoresis, a minimum of 20 cycles were required to detect a faded band corresponding to the PCR product generated from the same cDNA template. Without a doubt, real-time PCR with detection by means of fluorescence provides an enhanced way to verify the presence of genes when working with modest quantities of cDNA template.

We observed two different expression patterns for the HDACs (**Fig. 2.2**), one for HDAC1 and HDAC2 (class I HDACs) and the other for HDAC7 (class II HDAC). Although no significant difference could be found between the different developmental stages for the HDAC3 (class I HDAC) gene, its profile clearly tended to resemble those of the other class I HDACs. However, even if the patterns for the class I HDACs tend to be similar, their expression levels differ. In **Figure 2.2**, the levels of HDAC1 expression appear higher than those of the other HDACs at every developmental stage, and HDAC2 expression levels seem higher than those of HDAC3 and HDAC7. The mRNA levels for the HDAC1 transcripts are present in greater numbers than are those of HDAC2, HDAC3, and HDAC7

at all developmental stages. These differences are more noticeable in the blastocyst stage, when its level of expression is approximately 42-, 322-, and 1420-fold higher than that of HDAC2, HDAC3, and HDAC7, respectively. In all three class I HDACs, we have the impression that the lowest mRNA levels are found at the 8-cell stage, suggesting that the mRNA is, perhaps, more translated either at or just before this developmental stage.

Our study confirms the work of Segev et al. [21], who demonstrated that HDAC1, HDAC2, and HDAC3 proteins are expressed during oocyte maturation and embryogenesis. That work also highlighted that HDAC1 and HDAC2 protein expression is increased at the 8-cell stage. Here, we found that the increase in mRNA expression from the 8-cell stage to the blastocyst is quite important for HDAC1 and HDAC2. A possible explanation for the similar expression patterns observed for HDAC1, HDAC2, and HDAC3 is that in mammals, these three genes are isoforms, orthologues to the yeast RPD3 gene. Those genes are highly similar in the human: HDAC1 (482 residues) and HDAC2 (488 residues) share 84% identity, whereas HDAC3 (428 residues) shares less identity to HDAC1 and HDAC2 (51%). However, even if they are isoforms, they do not act the same way. They may differ in substrate specificity, intracellular localization, and posttranslational modification. Hassig et al. [23] determined by immunoprecipitation in HeLa cells that HDAC1 and HDAC2 are coimmunoprecipitated, whereas Grozinger et al. [24] found that HDAC3 preferentially associates with HDAC4 and HDAC5. However, in some cell lines, HDAC3 has been described to associate with HDAC1 and HDAC2 (discussed in [24]), and recently, HDAC1 was proven to form hetero-oligomers (in vitro) with HDAC2 and HDAC3 [25]. Combining this information with the data that we obtained, we can state that HDAC1, HDAC2, and HDAC3 proteins not only interact together but exhibit the equivalent mRNA profile in the early embryo development. However, despite these homologies, HDAC1, HDAC2, and HDAC3 are definitely deviant in their functions. In chicken DT40 cells, HDAC1 and HDAC2 are preferentially localized in the nuclei [26]. However, HDAC3, a class I HDAC, is the only enzyme known to shuttle between the nucleus and cytoplasm, and this property appears to be fundamental for its function [27]. Moreover, by generating HDAC1, HDAC2, or HDAC3 knock-out DT40 cells, HDAC1 and HDAC2 were shown to be nonessential [26], whereas HDAC3 was shown to be essential for the viability of the cells [27].

Observations from the literature indicate that HDAC7 could also shuttle in and out of the cell nucleus [28] analogous to HDAC4 and HDAC5, which are other class II HDACs [29]. The HDAC7 interacts with HDAC3 in the nucleus and correlates with enzymatic activity, whereas in the cytoplasm, HDAC7 does not associate with HDAC3 and is enzymatically inactive [28]. Consequently, this strengthens the fact that HDAC3 must be necessary for the viability of the cells. Treatment of 2-cell mouse embryos with butyrate increases the nuclear concentration of acetylated histone H4 [30]. This increase in the amount of acetylated histone H4 with an HDAC inhibitor means that early embryos have functional HDACs [30, 31]. Furthermore, in mouse oocytes and in 2-cell embryos, HDAC inhibitors increase the number of nuclear-acetylated histone H4 by approximately 2.5-fold more than in 1-cell embryos [30]. Is this increase of acetylated histone H4 in the treated 2-cell embryos caused by a required limitation of the increase in acetylation before MZT? If so, would we observe a similar expression before the bovine MZT at the 8-cell stage. Histone deacetylase inhibitors increase synthesis of TRC, a zygotic gene activation (ZGA) marker protein [32], and prevent development of the transcriptionally repressive status for overall gene expression. Repression could be associated with structural changes in the chromatin, and the discovery that histone deacetylation can be associated with chromatin offers enlightenment regarding how histone deacetylation relates to repression of gene expression [20].

The mRNA expression profile for HAT1 (**Fig. 2.3A**) evokes the idea that HAT1, HDAC1, HDAC2, and HDAC3 proteins could have a similar protein expression pattern. Unlike other type B HATs, the HAT1 enzyme seems to be found in the nucleus and/or in the cytoplasm with different ratios, depending on the organism and the cell type considered. Human Hat1 enzyme is extensively found in the nucleus [33], which is in distinction to the yeast homologue, which is located in both the cytoplasm and the nucleus [12]. In *Xenopus* oocyte, the Hat1 enzyme is largely nuclear; following maturation, the Hat1 enzyme leaves the nucleus to become primarily located in the cytoplasm throughout early embryogenesis [13]. We found that mRNA levels of HAT1 are relatively constant during early bovine development until the blastocyst stage (**Fig. 2.4**), and similarly, total Hat1 activity was found to be constant through early *Xenopus* development [13]. In yeast, HAT1 mutants

show no obvious growth defects or phenotypes other than the enzyme defect itself [34]. Although no significant difference was found in the pattern for GCN5 (**Fig. 2.3B**), a type A HAT, it remains especially interesting, because the expression appears to be at its maximum during the MII stage. For the preblastocyst period, levels of mRNA for GCN5 are approximately 7.5-fold higher than those of HAT1 for the same period. On the other hand, levels of HAT1 in the blastocyst stage are approximately 1.4-fold higher than those of GCN5. This may indicate that GCN5 protein is perhaps more active than HAT1 for disabling the transcriptionally repressive environment during the preblastocyst stage. This may suggest that GCN5 maternal mRNA is more important during the early stages of development to produce the nuclear GCN5 protein, which will be necessary for the decondensation of chromatin and required further in development after the MZT. The GCN5 protein HAT activity is possibly shared by another nuclear HAT, because the yeast GCN5 knock-out results in slight phenotypic effects, such as slow growth on minimal medium [35]. The double mutant (HAT1 and GCN5) produces a phenotype similar to the GCN5 single mutant [12].

The mRNA expression of histone H2A remained constant during all of the stages tested (**Fig. 2.4**). This is surprising, because the number of cells from the oocyte to the blastocyst stage increase by 100-fold in the blastocyst and because the mRNA levels of histone H2A should also increase in a proportional way. This is especially true after the MZT, which occurs at the 8- to 16-cell stage in the bovine. Once the embryonic genome is activated, the transcript level should mirror the number of cells, whereas before the MZT, the maternal RNA pools are the only source of transcript. Thus, the housekeeping mRNA levels should be high in the oocyte and gradually degraded as the embryonic development progresses to the MZT. In a previous report [16], in which we measured the RNA levels of eight housekeeping genes during preimplantation development, nearly all of them followed the normal degradation pattern up to the MZT, followed by a dramatic increase at the blastocyst stage. However, H2A escaped that degradation pattern and was found to be constant across preimplantation. We currently do not have an explanation for why H2A is stable across the preimplantation period, but it is possibly being transcribed constantly throughout this period.

Research using HDAC inhibitors revealed that the relative time of replication of two late-replicating, imprinted genes is advanced [36], and in the mouse 1-cell embryo, the rate of DNA synthesis is increased in the peripheral regions compared to the intranuclear region [37], thus implying that histone acetylation is involved in the regulation of DNA replication. The action of both histone deacetylation and DNA methylation may control the expression of some imprinted genes; however, the modification in DNA methylation, in contrast to histone acetylation, generates a heritable epigenetic status at some specific loci in somatic cells [38].

During the oocyte growth period, RNA particles accumulate in the oocyte cytoplasm to assure the initial stages of embryonic development until the transcription of embryonic DNA (i.e., the MZT). This time period varies across species; the mouse MZT takes place in the late 2-cell stage, compared to the 8- to 16-cell stage for bovine embryos [39]. None of the genes studied here showed a significant decrease in mRNA level at the 8-cell stage, which is consistent with the MZT of bovine embryos. Accordingly, maternal mRNA expression levels should be at their maximum intensity at the oocyte stage and decrease throughout embryonic development. However, our results indicate no significant increase or decrease in mRNA levels from the GV oocyte to the MII stage for any of the genes studied. The most likely explanation is the length of mRNA poly(A) tails, which can be altered by polyadenylation or deadenylation. During oocyte maturation, genes can have a very short tail or a default deadenylation pattern, or they can lengthen their poly(A) tail [40, 41]. As previously mentioned, we used oligodt-18 for primers, which anneals with the poly(A) tail, in the RT reaction to obtain our cDNA. The mRNAs of all the genes tested were found in the oocyte, meaning that some mRNA transcripts had elongated poly(A) tails to get reverse transcribed. So, if none of the genes displayed a significant increase or decrease of mRNA expression levels from the GV oocyte to the MII stage, the plausible explanation is that they maintained their poly(A) tail length by acquiring poly(A) during maturation.

The diversity of HDACs and HATs in their ability to form complexes and in their mRNA patterns strongly indicates that each may be involved in distinct and possibly overlapping

functions. A few HATs or HDACs specific to the oocyte may be waiting to be discovered. Given that RT-PCR is not an evaluation of the protein content, it will be important to measure the levels of HAT or HDAC proteins in the oocytes or embryos to correlate with mRNA levels. The protein analysis should allow us to further define the possible roles of HDACs and HATs by measuring quantitative variations in relation to mRNA levels and qualitative variations in terms of cellular localization. By illustrating which mRNA is present at different stages and their specific expression patterns, this study is opening the path for protein analysis.

2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dominic Gagné and Atef Ali for their assistance and Dr. Susan Novak for manuscript correction and statistical advice. Supported by the Canadian National Sciences and Engineering Research Council.

2.8 REFERENCES

1. Sirard MA, Blondin P. Oocyte quality and embryo production in cattle. *Can J Anim Sci* 1998 78:513-517
2. Edmondson DG, Roth SY. Chromatin and transcription. *FASEB J* 1996 10:1173-1182
3. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997 389:251-260
4. Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 1999 98:285-294
5. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997 389:349-352
6. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000 403:41-45
7. Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 2000 103:263-271
8. Pazin MJ, Kadonaga JT. What's up and down with histone deacetylation and transcription?. *Cell* 1997 89:325-328
9. Wolffe AP. Transcriptional control. Sinful repression. *Nature* 1997 387:16-17
10. Roth SY, Allis CD. Histone acetylation and chromatin assembly: a single escort, multiple dances?. *Cell* 1996 87:5-8
11. Brownell JE, Allis CD. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 1996 6:176-184
12. Ruiz-Garcia AB, Sendra R, Galiana M, Pamblanco M, Perez-Ortin JE, Tordera V. HAT1 and HAT2 proteins are components of a yeast nuclear histone acetyltransferase enzyme specific for free histone H4. *J Biol Chem* 1998 273:12599-12605
13. Imhof A, Wolffe AP. Purification and properties of the *Xenopus* Hat1 acetyltransferase: association with the 14-3-3 proteins in the oocyte nucleus. *Biochemistry* 1999 38:13085-13093
14. Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 1999 9:40-48
15. Gray SG, Ekstrom TJ. The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* 2001 262:75-83
16. Robert C, McGraw S, Massicotte L, Pravetoni M, Sirard MA. Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryo. *Biol Reprod* 2002 67:1465-1472
17. Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995 41:54-62

18. Ali A, Sirard MA. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Biol Reprod* 2002 66:901-905
19. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001 25:386-401
20. Schultz RM, Davis W Jr, Stein P, Svoboda P. Reprogramming of gene expression during preimplantation development. *J Exp Zool* 1999 285:276-282
21. Segev H, Memili E, First NL. Expression patterns of histone deacetylases in bovine oocytes and early embryos, and the effect of their inhibition on embryo development. *Zygote* 2001 9:123-133
22. Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, Brenner CA. Analysis of gene expression in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Mol Hum Reprod* 1999 5:1034-1039
23. Hassig CA, Tong JK, Fleischer TC, Owa T, Grable PG, Ayer DE, Schreiber SL. A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 95:3519-3524
24. Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 96:4868-4873
25. Taplick J, Kurtev V, Kroboth K, Posch M, Lechner T, Seiser C. Homo-oligomerisation and nuclear localisation of mouse histone deacetylase 1. *J Mol Biol* 2001 308:27-38
26. Takami Y, Kikuchi H, Nakayama T. Chicken histone deacetylase-2 controls the amount of the IgM H-chain at the steps of both transcription of its gene and alternative processing of its pre-mRNA in the DT40 cell line. *J Biol Chem* 1999 274:23977-23990
27. Takami Y, Nakayama T. N-terminal region, C-terminal region, nuclear export signal, and deacetylation activity of histone deacetylase-3 are essential for the viability of the DT40 chicken B cell line. *J Biol Chem* 2000 275:16191-16201
28. Fischle W, Dequiedt F, Fillion M, Hendzel MJ, Voelter W, Verdin E. Human HDAC7 histone deacetylase activity is associated with HDAC3 *in vivo*. *J Biol Chem* 2001 276:35826-35835
29. Grozinger CM, Schreiber SL. Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 97:7835-7840
30. Wiekowski M, Miranda M, Nothias JY, DePamphilis ML. Changes in histone synthesis and modification at the beginning of mouse development correlate with the establishment of chromatin mediated repression of transcription. *J Cell Sci* 1997 110:1147-1158
31. Worrad DM, Turner BM, Schultz RM. Temporally restricted spatial localization of acetylated isoforms of histone H4 and RNA polymerase II in the 2-cell mouse embryo. *Development* 1995 121:2949-2959
32. Davis W Jr, De Sousa PA, Schultz RM. Transient expression of translation initiation factor eIF-4C during the 2-cell stage of the preimplantation mouse embryo: identification by mRNA differential display and the role of DNA replication in zygotic gene activation. *Dev Biol* 1996 174:190-201
33. Verreault A, Kaufman PD, Kobayashi R, Stillman B. Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr Biol* 1998 8:96-108

34. Kleff S, Andrulis ED, Anderson CW, Sternglanz R. Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J Biol Chem* 1995 270:24674-24677
35. Georgakopoulos T, Thireos G. Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J* 1992 11:4145-4152
36. Bickmore WA, Carothers AD. Factors affecting the timing and imprinting of replication on a mammalian chromosome. *J Cell Sci* 1995 108:2801-2809
37. Aoki E, Schultz RM. DNA replication in the 1-cell mouse embryo: stimulatory effect of histone acetylation. *Zygote* 1999 7:165-172
38. El Kharroubi A, Piras G, Stewart CL. DNA demethylation reactivates a subset of imprinted genes in uniparental mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 2001 276:8674-8680
39. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990 26:90-100
40. Brevini-Gandolfi TA, Favetta LA, Mauri L, Luciano AM, Cillo F, Gandolfi F. Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev* 1999 52:427-433
41. Gandolfi TA, Gandolfi F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 2001 55:1255-1276

FIGURES

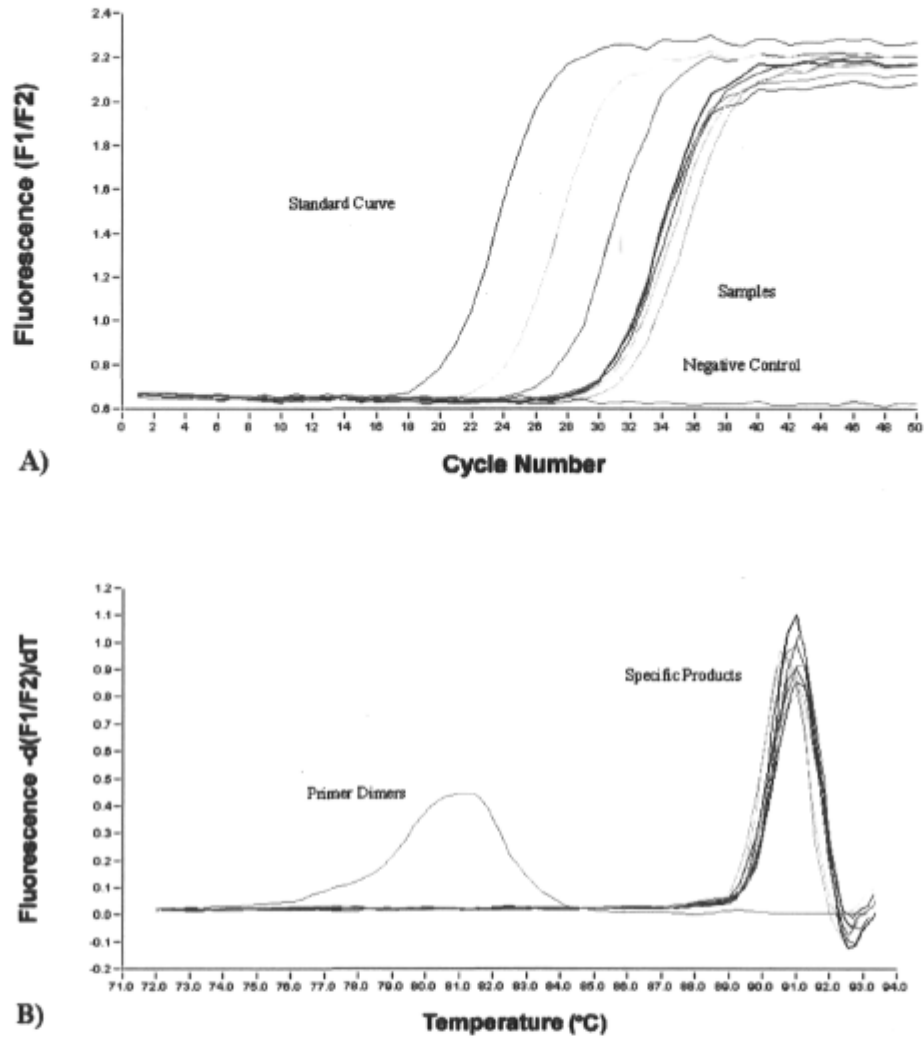


Figure 2.1. A) Illustration of real-time quantitative RT-PCR amplification curves for one of the triplicates for the H2A gene. SYBR Green I was used to monitor product accumulation. The standard curve was made from dilution series of the H2A PCR product. The equivalent of one oocyte or embryo was used to establish if H2A mRNA was present. B) The derivative melting curve shows that only one specific product was amplified, with the other peak representing primer dimers in the negative control.

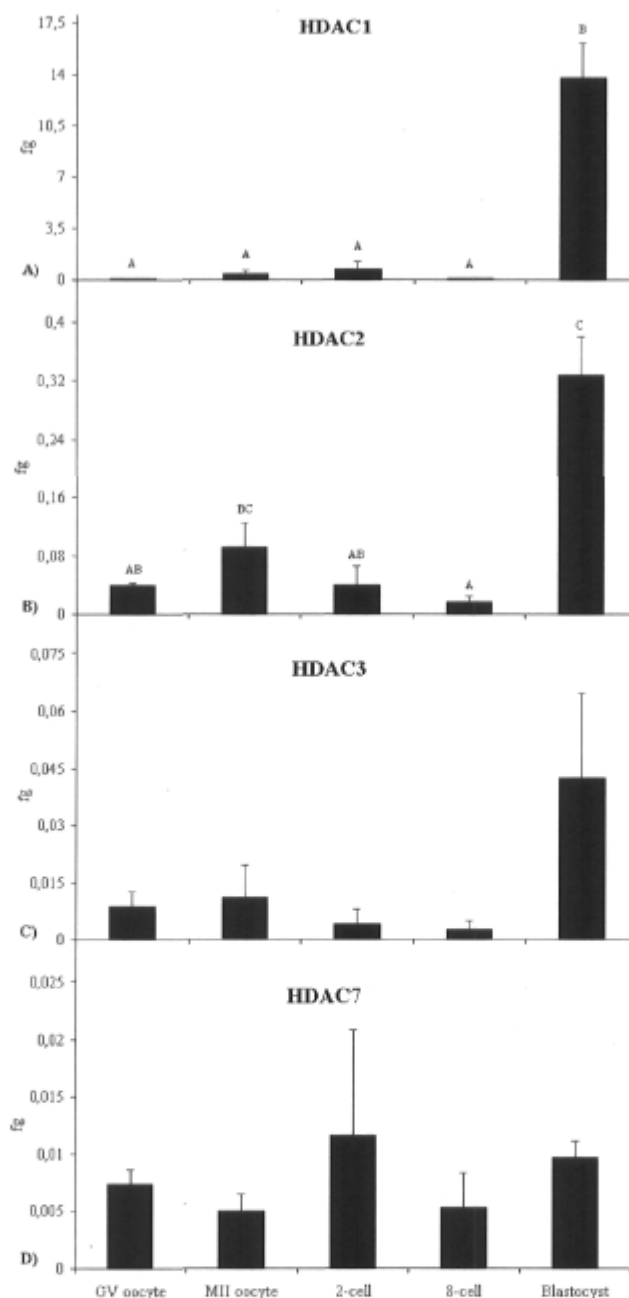


Figure 2.2. Quantification via real-time RT-PCR of histone deacetylase (HDAC1, HDAC2, HDAC3, and HDAC7) bovine embryonic mRNA expression at different preimplantation stages. A) HDAC1. B) HDAC2. C) HDAC3. D) HDAC7. Each developmental stage was done in triplicate, and two oocytes or embryos were used for each PCR run. The expression level of mRNA for each gene was tested in the same cDNA pool at every developmental stage. The relative mRNA levels represent the amount in femtograms of mRNA expression corrected to the ratio of H2A gene mRNA.

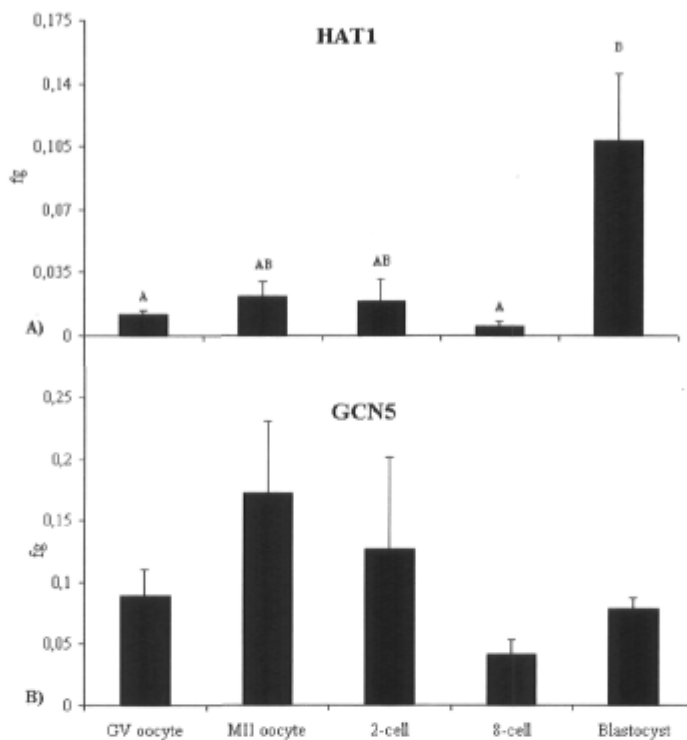


Figure 2.3. Quantification via real-time RT-PCR of histone acetyltransferase (HAT1 and GCN5) bovine embryonic mRNA expression at different preimplantation stages. A) HAT1. B) GCN5. Each developmental stage was done in triplicate, and two oocytes or embryos were used for each PCR run. The expression level of mRNA for each gene was tested in the same cDNA pool at every developmental stage. The relative mRNA levels represent the amount in femtograms of mRNA expression corrected to the ratio of H2A gene mRNA.

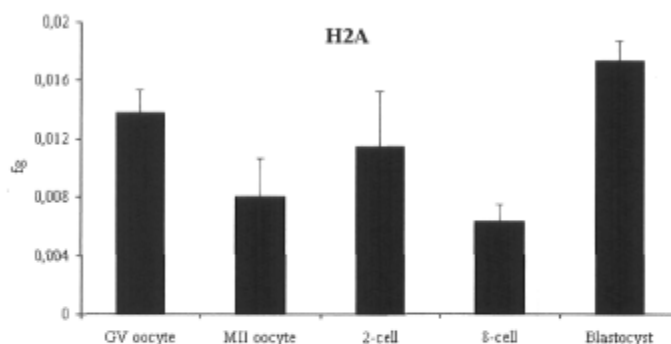


Figure 2.4. Quantification via real-time RT-PCR of histone H2A bovine embryonic mRNA expression at different preimplantation stages. Each developmental stage was done in triplicate, and one oocyte or embryo was used for each PCR run. The expression level of mRNA for each gene was tested in the same cDNA pool at every developmental stage. These values were used to normalize the values presented in **Figures 2.2** and **2.3**.

TABLE**Table 1. Details of primers used for RT-PCR**

Genes	Gene Bank accession #	Primers	Product size (bp)
HDAC1	XM_001767	Up 5'-actactacgacgggatgtg-3' Low 5'-gccaaagacgatattgacg-3'	441
HDAC2	XM_004370	Up 5'-gacatatgagactgcagttgc-3' Low 5'-acctcttctccttcatecte-3'	355
HDAC3	U66914	Up 5'-tatgcaaggcttcaccaagag-3' Low 5'-tccgtattgtggaaggacac-3'	358
HDAC7	AF239243	Up 5'-aggacaccatgcagatcattc-3' Low 5'-atcaaatccagcagacaccag-3'	412
HAT1	NM_003642	Up 5'-cagatatataaggctgacatgac-3' Low 5'-gctgtaatatcaagaactgtagg-3'	347
GCN5	U57316	Up 5'-cagaatgttttcccaccag-3' Low 5'-ggattcagctcacactccate-3'	401
H2A	U62674	Up 5'-gtcgtggcaagcaaggag-3' Low 5'-gatctggccgtaggtactc-3'	182

3 CHAPITRE # III : Expression temporelle de facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine et dans la régulation des gènes pendant le développement embryonnaire bovin in vitro.

Serge McGraw, Christian Vigneault et Marc-André Sirard

Cet article a été publié dans la revue "**Reproduction**" sous la référence suivante: McGraw S, Vigneault C, Sirard MA. Temporal expression of factors involved in chromatin remodeling and in gene regulation during early bovine in vitro embryo development. *Reproduction*. 2007 Mar;133(3):597-608.

3.1 RÉSUMÉ

Des événements de modification épigénétique distincts régulent l'expression génique et la structure de la chromatine pendant la période qui sépare l'ovocyte immature et le blastocyste. Durant ce développement, des fluctuations de méthylation importantes se produisent sur l'ADN génomique et les histones. Afin de comprendre le processus épigénétique en entier, il est essentiel de découvrir les facteurs impliqués pendant cette période, qu'ils agissent seuls, ou en combinaison. C'est pourquoi nous avons étudié le profil d'expression temporel de 15 régulateurs clés reliés entre autre à la méthylation, à la modification de la chromatine et à la transcription pendant la période comprise entre l'ovocyte immature et le blastocyste. Pour ce faire, le RT-PCR en temps réel a été utilisé pour quantifier les niveaux d'ARNm de *ATF7IP*, *DMAPI*, *EHMT1*, *EHMT2*, *HELLS*, *JARID1A*, *JARID1B*, *JMJD1A*, *JMJD2A*, *LSD1*, *MeCP2*, *METTL3*, *PRMT2*, *PRMT5* et *RCOR2*, dans l'ovocyte et tout le long du développement embryonnaire bovin *in vitro*. Nos résultats démontrent que les 15 régulateurs sont présents à différents degrés dans les stades de développement testés, et qu'ils peuvent être divisés en trois groupes dépendant de leur profil d'ARNm respectif.

3.2 ABSTRACT

Distinct epigenetic modifications events regulate gene expression and chromatin structure during the period between the immature oocyte and the blastocyst. Throughout this developmental period, important methylation fluctuations occur on genomic DNA and histones. Finding single or combinations of factors which are at work during this period is essential to understand the entire epigenetic process. With this in mind, we assessed the precise temporal expression profile, during preimplantation embryo development, of 15 key regulators involved in RNA, DNA or histone methylation, chromatin modification or silencing and transcription regulation. To achieve this, real-time reverse transcription-polymerase chain reaction was used to quantify the mRNA levels of *ATF7IP*, *DMAPI*, *EHMT1*, *EHMT2*, *HELLS*, *JARID1A*, *JARID1B*, *JMJD1A*, *JMJD2A*, *LSD1*, *MeCP2*, *METTL3*, *PRMT2*, *PRMT5* and *RCOR2*, in the oocyte and throughout *in vitro* bovine embryo development. Our results demonstrate that all 15 key regulators were present to different degrees in the developmental stages tested, and they can be divided into three different groups depending on their respective mRNA profile.

3.3 INTRODUCTION

The regulation of gene expression is a cellular process that controls the level and the interval of time in which genes are in a state of transcription or translation. This regulation also dictates the structure and function of the cell, and is fundamental to control differentiation, morphogenesis and growth.

Different mechanisms are involved in the control of gene expression. By their diverse actions in eukaryotic cells, they can have a transcriptional, post-transcriptional, translational, or post-translational effect on gene activity. Epigenetics are involved in some of these processes and can be defined as the reversible heritable changes in gene function that occur during cell division without changes in nuclear DNA sequence. They include modifications that take place on genomic DNA such as methylation of cytosine residues, and post-transcriptional modifications on the tail domains of histones by methylation, acetylation, phosphorylation, ubiquitination or sumoylation (reviewed in (Jenuwein & Allis 2001, Gill 2004, Peterson & Laniel 2004, Morgan *et al.* 2005))

DNA methylation is generally associated with transcriptional repression and is involved in genomic imprinting. This modification is active during the entire life of a cell, and it is essential for modeling and modulating the genome during gametogenesis and in the early stages of mammalian embryo development where epigenetic events are crucial (reviewed in Reik *et al.* 2001). Before oocyte growth, the methylation status of the primordial germ cell genome is completely blank, and as the oocyte grows methylation in the female germ line is reinstated. Upon fertilization, the highly methylated state found in the matured oocyte will undergo a demethylation phase on most of its genome by a passive mechanism which depends on DNA replication (reviewed in Reik *et al.* 2001). By the time of implantation in the mouse, *de novo* methylation is initiated in the cell lineage that will form the inner cell mass and trophoctoderm of the blastocyst, whereas in the bovine this begins at the 8- to 16-cell stage (reviewed in Dean *et al.* 2003). Genes from the DNA methyltransferase family (DNMT) have been linked to some of the methylation states found in the primordial germ cell and throughout embryo development until implantation (Maatouk *et al.* 2006,

reviewed in Trasler 2006). In recent years, the discovery of histone demethylases has shattered the long-held dogma that histone methylation was stable and irreversible. Even if LSD1, JHDM1, JMJD1A, JMJD2A and JMJD2C have all been classified as *bona fide* histone demethylases, thus far their presence and action in mammalian oocytes and early embryos have not been documented (Shi *et al.* 2004, Cloos *et al.* 2006, Klose *et al.* 2006, Yamane *et al.* 2006 and reviewed in Tsukada *et al.* 2006).

Abnormal epigenetic modifications, especially defects in methylation or demethylation, are associated with several syndromes and diseases (reviewed in Rodenhiser & Mann 2006). The probability of suffering from an alteration in imprinting patterns, such as in Beckwith–Wiedemann syndrome, and other related epigenetic abnormalities is accentuated in embryos arising from assisted reproduction techniques (ART), or with manipulated gametes and embryos (reviewed in Gicquel *et al.* 2003, Rodenhiser & Mann 2006). In animals, the use of *in vitro* embryo culture is responsible for methylation status alteration of imprinted genes, resulting in a condition named the large offspring syndrome (Young *et al.* 2001). Even though the risk of complications for the incoming newborns is enhanced, these protocols are still being used in both animal and human ART.

To successfully develop into a healthy offspring, the growing and maturing mammalian oocytes must not only contain the appropriate epigenetic factors but also need to accumulate mRNAs and proteins to allow the zygote to perform its first divisions until the embryonic genome is activated. After this maternal embryonic transition (MET), the embryo will become fully self-reliant by producing its own mRNAs and proteins. MET may occur at different times in different species: 1- to 2-cell stage in mouse (reviewed in Schultz 1993), 4- to 8-cell stage in human (reviewed in Telford *et al.* 1990) and 8- to 16-cell stage in bovine (Kopecny *et al.* 1989). This major checkpoint is a crucial and necessary step during embryo ontogeny since it coincides with a developmental block observed within mammalian embryos cultured *in vitro* (reviewed in Memili & First 2000). Still, the individual genes or mechanisms responsible for such a transition are still unknown.

Since unique and important epigenetic events occur during the period between the immature oocyte and the blastocyst, finding single or combinations of factors which are at work during this period is essential to understand the entire epigenetic process.

This is the first study that seeks to assess the precise temporal expression profile of 15 key regulators (Table 1) in oocytes and throughout early embryo development. The mRNA profiles were divided into three different groups depending on their respective appearance. To investigate the potential meaning of each gene profile, we have attempted to associate specific mechanisms or chromatin remodeling events that occur in somatic cells, oocytes and developing embryos. Because few studies have examined the role of regulatory genes in oocyte and preimplantation embryonic development, our results will expand the knowledge in this enigmatic field.

3.4 MATERIALS AND METHODS

Unless otherwise stated, all materials were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.4.1 Oocyte Recovery and *In Vitro* Embryo Production

The procedures for oocyte recovery and *in vitro* embryo production have been described previously (Vigneault *et al.* 2004). Using this culture system, over 30% of oocytes usually developed into blastocysts. Briefly, cumulus-oocyte complexes (COCs) were harvested from bovine ovaries collected in a slaughterhouse. Throughout *in vitro* culture, oocytes or embryos were added to 50- μ l droplets of media under mineral oil. COCs were matured in modified synthetic oviduct fluid (SOF) for 24 h. For *in vitro* fertilization, matured COCs were transferred and cultured in modified Tyrode lactate for 15-18 h. Following fertilization, putative zygotes were mechanically denuded by repeated pipetting, washed in PBS and transferred in groups of 25-30 to modified SOF medium for embryo development.

The 2-, 4-, 8-, and 16-cell embryos were collected at 36, 48, 72, and 108 h post-fertilization, respectively, and morulae and blastocysts were collected after 6 and 8 d of development. All were washed 3 times in PBS, collected in pools of 20, frozen and stored at -80°C until RNA extraction. All oocyte and embryo pools used for RNA extractions were collected and analyzed in triplicates.

3.4.2 RNA extraction and cDNA preparation

As an external control, 10 pg of exogenous *GFP* RNA containing a poly-A tail (Vigneault *et al.* 2004) was added to each pool of oocytes and embryos prior to RNA extraction. RNA extractions of the oocyte or embryo pools containing *GFP* RNA were then performed using the PicoPure RNA isolation kit (Arcturus, Molecular Devices Corporation, CA, USA) and directly used for cDNA preparation as previously described (Vigneault *et al.* 2004).

3.4.3 Quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR)

Primers for all of the genes studied are listed in Table 2 and were designed using bovine sequences when possible, or from a consensus derived from human and mouse sequences. Real-time PCR was performed on a Lightcycler apparatus (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) using SYBR green incorporation as previously described (McGraw *et al.* 2003, McGraw *et al.* 2006). Briefly, for each gene, a standard curve consisting of purified PCR product was included in the run. Each of the PCR reactions was performed using the equivalent of 0.5 oocyte/embryo, $0.25\ \mu\text{M}$ of each primer, $3\ \text{mM}\ \text{MgCl}_2$ and $2\ \mu\text{l}$ of Master SYBR Green mix (Roche). The annealing temperatures for each gene are listed in Table 2. The real-time PCR product specificity was confirmed by analysis of the melting curve given by the Lightcycler software (Roche). The PCR products were migrated on agarose gel electrophoresis and sequenced. *GFP* mRNA was used as an external control to account for experimental errors due to techniques involved or materials used for RNA extraction and reverse transcription. (McGraw *et al.* 2006, Vigneault *et al.* 2004)

3.4.4 Statistical analysis

The level of mRNA for each gene subjected to statistical analysis was normalized using the *GFP* external control (Vigneault *et al.* 2004, McGraw *et al.* 2006). The value obtained for each gene, within each pool of cDNA, was divided by the value obtained for *GFP* in the same cDNA pool. Data are presented as mean \pm SEM. Statistically significant differences in mRNA levels between each developmental stage were calculated by protected ANOVA (SAS Institute, Cary, NC, USA), and treatment and replicate were included in the model. Differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ($P < 0.05$).

3.5 RESULTS

Using an RNA expression database that profiles gene expression by microarray in an extensive range of mouse and human tissues (Su *et al.* 2002), in parallel with Gene Ontology (GO) terms association, we have selected genes that could potentially be involved in epigenetic transformations. To be selected, potential genes had to be present in the oocyte or blastocyst and record one GO designation related with RNA, DNA or histone methylation, chromatin modification or silencing and transcription regulation. Fifteen genes that met these criteria were selected and their mRNA transcripts were studied and profiled in bovine oocytes and preimplantation embryos. Genes with these GO appellations could play crucial roles during oocyte and embryo development.

Our results demonstrate that all 15 regulation factors examined were present to different extents in each of the developmental stages observed (from the immature GV oocyte to the blastocyst stage). To our knowledge, this is the first study to precisely profile these mRNA transcripts in the oocyte and early mammalian embryo development (except for *MeCP2*; Kantor *et al.* 2003, Huntriss *et al.* 2004). Based on the mRNA expression patterns obtained for each gene throughout embryo development, profiles were classified in three different groups (Figs. 3.1, 3.2, and 3.3). The first group (Fig. 3.1) represents genes that are maternally stored in abundance, showed low levels around the MET stage and regained in

the blastocyst at least 50% of the relative mRNA levels initially found in GV or MII oocytes. The second group (Fig. 3.2) consists of genes with elevated maternal transcripts in the oocyte stages, decreased intensity during the subsequent cleavage and lower relative mRNA levels in the blastocyst compared to values obtained in GV or MII oocytes. As for the final set of genes (Fig. 3.3), they did not reach their highest relative mRNA levels in the oocyte stages like the two previous groups, but rather during or after MET.

In the first group (Fig. 3.1), every gene (*HELLS*, *JMJD1A*, *JMJD2A*, *LSD1*, *METTL3* and *PRMT5*) exhibited a similar expression pattern. Their levels were highest in the oocyte and tended to decrease during the first few cell divisions until the 8-cell stage, where they reached significantly lower amounts. In the subsequent cell divisions, the levels remained stable until the blastocyst stage, where levels were significantly higher than at the 8-cell stage. The mRNA encoding *HELLS*, *LSD1* and *JMJD1A* not only showed a similar pattern but also similar significant changes during embryo development. These 3 transcripts were abundant in the oocyte and showed their first significant reduction in the 4-cell embryo. From the 4-cell to the morula stage, no significant changes in mRNA transcripts were noted, but a significant increase was detected in the blastocyst compared to the previous embryo stage suggesting a more active transcription state. The *METTL3* and *JMJD2A* transcripts were comparable in the developing embryo. The first significant loss of maternal transcripts was observed in the 2-cell embryo, and then a significant decrease was also seen during the following cell division at the 4-cell stage. No significant changes were observed from the 4-cell to the morula stages, but blastocyst levels were different from the morula for *METTL3* and from the 16-cell embryo for *JMJD2A*. Of all the genes in the first group, only *PRMT5* displayed a significant reduction of transcripts between the GV and MII oocytes. Even if the *PRMT5* mRNA tended to increase in the 16-cell and blastocyst stages, it was the only member of the first group that did not show any significant differences in the period between the MII oocyte stage and the blastocyst. With the exception of *JMJD2A* and *METTL3*, no significant differences were found between transcripts in the GV oocyte and blastocyst. These genes showed accumulated mRNA in the GV oocyte, and then lost most of the transcripts during subsequent cleavage stages. However the embryo reinitiated

transcription in or around the blastocyst stage to reach levels comparable to those observed in the oocyte.

In the second group (Fig. 3.2), the expression patterns of *DMAPI*, *EHMT1*, *EHMT2*, *JARID1A*, *PRMT2* and *RCOR2* were relatively comparable to the genes found in group 1. They also had their highest relative levels peaking in GV or MII oocytes and their lowest levels around the MET embryo stages. However relative transcript levels observed at the blastocyst stage did not reach at least 50% of the original levels measured in the GV oocyte (*DMAPI*, *EHMT2*, *PRMT2*, *RCOR2*) or MII oocyte (*EHMT1*, *JARID1A*). In addition, some genes showed a similar pattern and comparable significant changes during embryo development. The transcript levels for *EHMT1* and *RCOR2* remained stable and elevated during the stages comprised between the oocyte and 4-cell embryo, then a major decrease in levels was measured during the MET period. Despite the fact that a significant upregulation was observed between the 8-cell embryo and the blastocyst, levels remained relatively low. The accumulated maternal levels observed for *DMAPI* (in GV oocytes) and *EHMT2* (in GV and MII oocytes) were not reached in any other development stage. During oocyte maturation, *DMAPI* mRNA decreased markedly to remain stable during the entire development, even if reductions were also assessed from the 2-cell to the 8-cell stage and morula embryo. As for *EHMT2*, significant decreases were measured after maturation, in the 2-cell and 4-cell embryo. The *EHMT2* mRNA transcripts were nearly eliminated in the 8-cell embryo and a significant increase was measured between the 8-cell and blastocyst stages. During the first three stages examined, the mRNA transcripts for *JARID1A* remained constant except for a relative increase during the maturation period. A significant decrease was observed between the MII oocyte and the 4- and 8-cell embryos, although no significant distinction could be established between the 4-cell and blastocyst embryos. The stored maternal transcript of *PRMT2* diminished significantly during maturation, and remained stable until MET where they declined again to remain steady until a significant upregulation was observed in the blastocyst. These genes are probably needed during the very first cleavage of embryo development, even if their mRNA is still present at different degrees in the later stages of preimplantation.

The three members (*ATF7IP*, *MeCP2* and *JARID1B*) composing the third group displayed various mRNA patterns not seen in the two other groups. For *ATF7IP*, levels in the oocyte through the 4-cell stage were low and very similar, then levels were significantly upregulated during MET and reached their highest relative level. In the case of *MeCP2*, levels tended to be stable during all development stages, but the lowest relative level was found in the 8-cell embryo, which was significantly lower than in the blastocyst. In human tissues, *MeCP2* was also detected in the GV oocyte, but was sporadically present in the cDNA prepared from single MII oocyte, 4-cell embryo and blastocyst (Huntriss *et al.* 2004). In the mouse oocyte, 8- and 16-cell embryos and blastocyst, no *MeCP2* mRNA was detected (Kantor *et al.* 2003). The mRNA levels for *JARID1B* were significantly lower in the oocyte and in the first cleavage stages compared to the 8-cell embryo. Later in development, relative levels increased and were higher than levels observed in the 8-cell embryo. The profiles for the third group, especially for *ATF7IP* and *JARID1B*, indicate that these genes could be more important in the embryo during or after MET.

3.6 DISCUSSION

The data presented here provide novel information in the early embryo development about 15 key regulators known or thought to be involved in the control of gene regulation. If we exclude *MeCP2* which had already been studied in human and mouse oocytes and embryos (Kantor *et al.* 2003, Huntriss *et al.* 2004), our study is the first to explore and precisely report these mRNA transcripts in oocytes and throughout preimplantation embryos. The profile obtained for each gene will help to trace a parallel between their presence in specific stages and different gene regulation processes such as RNA, DNA or histone methylation, chromatin modification or silencing and transcription regulation. These key processes which are active at different stages during embryo development are still enigmatic. Our work will provide new information on whether these 15 genes are potentially involved in important mechanisms occurring during oocyte and embryo development.

3.6.1 mRNA Profiles Observed

One of the first noticeable characteristics common to all 15 transcripts analyzed is that none of the genes retained significantly stable and ubiquitous mRNA expression during the eight oocyte and embryo stages examined. In fact three different profiles can be extrapolated from the quantitative results. The first collection of profiles included genes with higher expression in oocytes and blastocysts, with generally a minor presence at or around MET. This category of transcripts suggests three possible explanations for the high accumulation originating from the oocyte. The first is that mRNAs accumulated during oocyte growth to be transcribed into proteins during that period and levels detected could just be leftover mRNA. The second option is that they accumulated during oocyte growth to be transcribed during maturation or early cleavage stages to support the maternal zygotic transition until the embryo is competent to produce its own mRNA and be self-reliant. The third alternative could involve a combination of the two previous options. Then, after reaching reduced levels around MET, the elevated intensities that were reestablished in the blastocyst are presumably required to support the embryonic pattern of epigenetic modifications needed for further development. The declines in maternal mRNA observed could imply deadenylation, degradation, protein translation or synthesis. These distinctive processes have all been linked with mRNA decay in eukaryotes (reviewed in Paillard & Osborne 2003, de Moor *et al.* 2005, Sachs 1993, Ross 1995). However it is unlikely that the oocyte would store useless products, so it is likely that this decrease is related to protein production, although this remains to be demonstrated for each gene.

The second group also exhibited elevated maternal transcripts, with decreased intensity in the subsequent embryo stages. However, the relative mRNA levels in the blastocyst remained lower than those observed in oocytes. The potential significance of elevated maternal levels can be similar to that of the first group, but the lower mRNA levels measured in the post-MET period could indicate that for the most part, these genes are not as critical for epigenetic events leading to gene regulation in the blastocyst or that their impact is limited to modification events occurring right after fertilization. The third and final set of genes revealed the opposite, with transcripts reaching their peak during or after

MET, suggesting that they either play a critical function in the embryonic pattern of expression or are only needed in the embryo.

To further explore the significance of these profiles, each gene was correlated to its involvement in specific mechanisms or chromatin remodeling events established in somatic cells, oocytes and embryos.

3.6.2 Specific Gene Functions

3.6.2.1 RNA Methylation

In eukaryotic cells, pre-mRNAs have to undergo several modifications to excise the introns present prior to translation of the matured mRNA. Interestingly, this splicing process can be affected by the methylation of internal adenosine residues located within the 5' cap and 3' poly (A) tail (reviewed in Rottman *et al.* 1994). The mRNA N6-adenosine methyltransferase activity is generated by a large, mostly uncharacterized complex. METTL3 is one of the components found in this large enzymatic organization and is similar to other genes involved in methyltransferase activity (Bujnicki *et al.* 2002). The high levels of *METTL3* present in the oocyte that decreased until the 4-cell stage suggest possible mRNA degradation or protein synthesis. METTL3 may in fact be necessary between these stages for pre-mRNA processing, because of the minor gene activation occurring at the 1- through 4-cell stages in bovine embryos (Memili & First 2000).

3.6.2.2 Histone H3-K9 Methylation

The mRNA expression levels for *EHMT1* and *EHMT2* are similar in their general patterns, although levels of *EHMT1* tended to remain constant during the oocyte to the 4-cell stage before diminishing significantly at the 8-cell stage, whereas *EHMT2* had significant drops after the MII and the 2-cell stages. In fact these similar patterns are not surprising because *EHMT1* and *EHMT2* are involved in a heteromeric complex critical for the mono- and dimethylation of H3-K9 in euchromatin (Tachibana *et al.* 2005). The di-methylation state of

H3-K9 in mouse oocyte and zygote revealed that only the maternal histone H3 showed clear staining, whereas the male pronucleus remained unstained. This asymmetrical methylation is maintained even in the 2-cell embryo and only becomes symmetrical in the 4-cell embryo (Lepikhov & Walter 2004, Liu *et al.* 2004). Methylation of H3-K9 is usually linked to transcriptional repression of developmental genes and, in *EHMT2*-deficient mice, lack of euchromatic H3-K9 methylation leads to early embryo mortality (Tachibana *et al.* 2002). Shi *et al.* (2003) also propose that a complex that includes HDAC1/2 would remove the acetyl group from the histone tails of active chromatin, allowing EHMT1 and EHMT2 to methylate H3-K9. *HDAC1* and *HDAC2* transcripts were also detected in these stages in bovine oocytes and embryos (McGraw *et al.* 2003). The hypothesis of Shi *et al.* (2003) could also apply to the oocyte, where HDAC1/2 could deacetylate the transcriptionally active chromatin of the GV oocyte during maturation, allowing EHMT1 and EHMT2 to methylate H3-K9 which would result in a repressive chromatin state.

Relative levels of the *ATF7IP* transcript were low during the oocyte to 4-cell period and reached their peak during the 8-cell stage. Results from a suppression subtractive hybridization (SSH) revealed that *ATF7IP* was highly transcribed in 8-cell embryos (C.V., unpublished observations). *ATF7IP* forms a tight complex with SETDB1 that increases the methylase activity of SETDB1 and allows the conversion of di-methylated H3-K9 to the tri-methylated form, which hinders transcription from chromatin (Wang *et al.* 2003). The intensity of H3-K9 methylation in 16-cell bovine embryos increases compared to the 4-cell stage suggesting a repressive state (Santos *et al.* 2003). However, in 8-cell bovine embryos, the general transcriptional state is permissive, although the presence of *ATF7IP* at that time suggests that with SETDB1, they could be involved in the repression of oocyte-specific genes when the embryonic pattern of gene expression is starting to take place.

Although the presence of *MeCP2* mRNA in oocytes and embryos is only sporadic in human while it is not even detected in the mouse (Huntriss *et al.* 2004), we clearly demonstrated that *MeCP2* was present in all developmental stages tested. In our study, *MeCP2* showed a relatively constant expression profile, except for the slight decrease at the

8-cell stage and the higher levels found in the blastocyst. MeCP2 can bind to DNMT1 (Kimura & Shiota 2003), which is absent in mouse oocyte and early embryo, however they express an oocyte-specific form DNMT1 α (Howell *et al.* 2001, Ratnam *et al.* 2002).

Given that DNMT1 α and DNMT1 are almost identical, could MeCP2 bind to DNMT1 α ? Although this possibility has not been documented, a stretch of 11 consecutive residues within the 64-amino acid region needed for MeCP2/DNMT1 association are different in DNMT1 α (S McGraw, unpublished observations), suggesting that their interaction might be compromised. MeCP2 is also associated with an unknown histone methyltransferase which targets histone H3-K9 (Fuks *et al.* 2003). A recent study suggests that MeCP2 is probably involved in the stabilization of transcriptional silencing patterns rather than regulating gene expression during cell differentiation (reviewed in Brero *et al.* 2006). MeCP2 could be involved in many different mechanisms during embryo development, but high levels re-established after the 8-cell stage indicate that it is needed for post-blastocyst events.

3.6.2.3 Histone H3-K4 Methylation

HELLS, which is crucial for normal embryogenesis, belongs to the SNF2 family which is at the core of the SWI/SNF chromatin remodeling complex (reviewed in Muegge 2005). It controls hyper-methylation of H3-K4 in the tightly packed heterochromatin which is fundamental for the normal control of gene transcription (Yan *et al.* 2003). These specific histone H3 modifications are present within the maternal genome throughout all zygotic stages including the mature oocyte (Lepikhov & Walter 2004). Recently, *HELLS* has also been associated with DNMT3A and DNMT3B suggesting a possible implication in the control of *de novo* methylation of DNA during embryogenesis (Zhu *et al.* 2006). The elevated *HELLS* mRNA levels that we have found in the oocyte and its decrease right before MET could indicate translation of this transcript in response to H3-K4 methylation and *de novo* methylation found in the 8- to 16-cell bovine embryo (reviewed in Dean *et al.* 2001).

3.6.2.4 Histone H4-R3 Methylation

PRMT5 is associated with many different proteins implicated in germ cell formation in *Drosophila* (Anne & Mechler 2005, Gonsalvez *et al.* 2006) and in mouse (Ancelin *et al.* 2006). Its deletion in *Drosophila* causes male infertility with defects in spermatogenesis. In mutant females, the first generation is fertile, but their descendants are sterile and agametic (Gonsalvez *et al.* 2006). Methylation of H4-R3 (Me(Arg3)H4) is one of the modifications triggered by *PRMT5*. This specific modification is present within the germinal vesicle of immature mouse oocytes and decreases dramatically in ovulated oocytes to become undetectable in fertilized oocytes (Sarmiento *et al.* 2004). It is also present in interphase blastomeres of the following stage embryos and in the blastocyst. The mRNA profile that we established for *PRMT5* in bovine is relatively consistent with Me(Arg3)H4 modification found in the mouse oocyte and embryos, where higher levels seem to be found in GV oocyte. This modification mark is associated with gene expression (reviewed in Davie & Dent 2002) and its actual removal from the transcriptionally inactive mouse MII oocyte and fertilized egg suggests that *PRMT5* may be important in germ cell formation but also in gene expression in the oocyte and embryo.

Unlike *PRMT5*, *PRMT2* substrate and effect are not fully known. However it regulates factors that influence cell activation and programmed cell death (Ganesh *et al.* 2006) and it is also believed to be a coactivator of estrogen receptor alpha (ER α) (Qi *et al.* 2002). The mRNA profile for *PRMT2* is quite similar to the pig ER α expression, indicating that perhaps *PRMT2* in the oocyte and embryo could affect ER α function (Ying *et al.* 2000).

3.6.2.5 DNA Methylation

DMAP1 was the only transcript that was high in the GV oocyte and remained particularly low during all developmental stages. This protein binds to DNMT1 and HDAC2 to mediate transcriptional repression (Rountree *et al.* 2000). Mouse oocyte and early embryo are deficient in DNMT1, and the oocyte-specific form DNMT1o lacks nearly all of the N-terminal 120-amino acid region needed to bind with *DMAP1* (Howell *et al.* 2001, Ratnam

et al. 2002, Yoder *et al.* 1997, Mertineit *et al.* 1998). *DMAP1* involvement and association in oocytes remain to be discovered.

3.6.2.6 Histone Demethylation

JMJD1A exclusively targets mono- and di-methyl H3-K9 (Yamane *et al.* 2006) whereas JMJD2A efficiently targets both tri-methyl H3-K9 and H3-K36 for demethylation (Klose *et al.* 2006). Strong evidence supports the notion that JMJD2A could also be involved in mono- and di-methylation of H3-K9 (Klose *et al.* 2006). Similar general patterns of expression were revealed for both genes during development, except that *JMJD1A* decreased more rapidly after the first stages and increased in the blastocyst, whereas *JMJD2A* decreased constantly until the 8-cell stage to then steadily increase until the blastocyst stage. In bovine embryos, immunolocalization staining revealed that the H3-K9 di-methylation pattern is closely related to the DNA methylation pattern, with low H3-K9 di-methylation in the 2-, 4- and 8-cell embryo and higher levels in the morula and blastocyst stages (Santos *et al.* 2003). JMJD1A and possibly JMJD2a might be implicated in the reduction of H3-K9 methylation in pre-MET embryos.

Two other members of the jumonji family that also contain the *jmjC* domain found in demethylase genes (reviewed in Takeuchi *et al.* 2006) were assessed. Despite that no demethylation activity has yet been discovered for *JARID1A* and *JARID1B*, both have been implicated in transcription repression (Chan & Hong 2001, Lu *et al.* 1999). They displayed two different patterns of expression throughout preimplantation development. *JARID1A* had generally higher expression levels during the pre-MET period. Free JARID1A protein is considered to act as an inhibitor of differentiation, through the repression of transcription and its implication in a differentiation checkpoint (Benevolenskaya *et al.* 2005). In the same model, when forming a complex with RB1 in response to differentiation signals, JARID1A is converted to a stimulator of differentiation. The presence of the RB1/JARID1A complex is still unknown in the oocyte or embryo, although RB1 is present in mouse oocyte (Moore *et al.* 1996). In oocytes, *JARID1A* could possibly be involved in this inhibitor/activator complex to regulate differentiation. The

profile of *JARID1B* was very intriguing; faint traces of *JARID1B* mRNA were detected until MET, when transcripts were upregulated. In later mouse embryo stages, transcripts for *JARID1B* are present in developing organs, whisker follicles, teeth and limbs (Madsen *et al.* 2002). In the adult mouse *JARID1B* is only detected in two tissues: it is highly present in the testis and barely in the ovary. It is also highly expressed in breast cancer cells (Barrett *et al.* 2002). These results showing high expression in post-MET embryo suggest that *JARID1B* is important for embryo differentiation and progression, and that its localization and expression are stage specific.

RCOR2 belongs to the *CoREST* family, members of which interact with *REST*, a key regulator of neuronal gene expression (reviewed in Ballas & Mandel 2005). CoREST members are also known to form immuno-complexes with histone modifying enzymes such as EHMT2 (Shi *et al.* 2003), LSD1 (Shi *et al.* 2004), HDAC1 and HDAC2 (Humphrey *et al.* 2001, You *et al.* 2001). Moreover, CoREST not only interacts with LSD1, but enhances its association with nucleosomes resulting in demethylation of H3-K4 (Lee *et al.* 2005). The mRNA profiles established for *EHMT2* and *LSD1* are very similar during the oocyte to 8-cell period and suggest a possible interaction between RCOR2-EHMT2 and/or RCOR2-LSD1. Because the low nucleosomal demethylation of H3-K4 is related to a repressive state of gene expression, the intensifying action of RCOR2 towards LSD1 demethylation activity could implicate this complex in the repression of specific genes during early embryo development.

3.6.3 Risk of ART

Transcriptional patterns from individual genes are altered during prolonged *in vitro* culture when compared to *in vivo* embryo development (reviewed in Lonergan *et al.* 2003). Other studies also noticed that the expression profiles of some genes, including DNA methylation transcripts, were aberrant in *in vitro* and nuclear transfer derived embryos when compared with their *in vivo* counterparts (reviewed in Wrenzycki & Niemann 2003). In *in vitro* derived embryos, if the expression variations take place within genes that are somehow involved in the regulation of transcription during embryo development, the incoming

offspring could suffer from a variety of malformations or diseases (Young *et al.* 2001, reviewed in Gicquel *et al.* 2003, Rodenhiser & Mann 2006). Genes implicated in transcription regulation, especially methylation-related genes, are frequently associated to various disorders (reviewed in Arnaud & Feil 2005). All 15 genes that we studied are implicated or are thought to be associated with methylation or demethylation complexes, thus their improper regulation during ART procedures could increase the risk of complications in the developing embryo. For instance, dysregulation of genes like *HELLS* during embryonic development could have severe impact on the *de novo* methylation of the genome which is reinstated during that period. Consequently, cross examination of these and other chromatin remodeling genes with *in vivo* derived embryos, would provide important information regarding epigenetic modifications implicated in the abnormal development frequently seen during ART.

3.7 CONCLUDING REMARKS

The information obtained through this work highlight the fact that factors involved in chromatin remodeling and gene regulation are present to different degrees in the oocyte and early embryo development. For many of the genes studied, important maternal accumulation was observed in the oocyte and many are probably translated during the MET period. For some, expression was upregulated in the blastocyst period, around the time that the embryonic pattern of epigenetics modification is implanted. We have also confirmed that genes responsible for methylation of certain recognized histone modifications are present during the preimplantation period. These modifications are often problematic in clones, thus the presence of the genes responsible for their maintenance gives possible clues for nuclear reprogramming abnormalities. Importantly, three novel histone demethylases have been linked with the oocyte and early embryos, a developmental period known for its important methylation fluctuations. The use of GO terms in database screening has revealed to be very useful when searching for related mechanisms of action in specific tissues. Although further characterization is required, this study has set firm

foundations for the involvement and comprehension of specific chromatin remodeling and regulation genes in oocyte and embryo development.

3.8 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Isabelle Laflamme for technical assistance. S McGraw is supported by an NSERC fellowship. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work. Supported by a Canada Research Chair and the Natural Science and Engineering

3.9 REFERENCES

- Ancelin K, Lange UC, Hajkova P, Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T & Surani MA 2006 Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nat Cell Biol* 8 623-630.
- Anne J & Mechler BM 2005 Valois, a component of the nuage and pole plasm, is involved in assembly of these structures, and binds to Tudor and the methyltransferase Capsuleen. *Development* 132 2167-2177.
- Arnaud P & Feil R 2005 Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75 81-97.
- Ballas N & Mandel G 2005 The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Curr Opin Neurobiol* 15 500-506.
- Barrett A, Madsen B, Copier J, Lu PJ, Cooper L, Scibetta AG, Burchell J & Taylor-Papadimitriou J 2002 PLU-1 nuclear protein, which is upregulated in breast cancer, shows restricted expression in normal human adult tissues: a new cancer/testis antigen? *Int J Cancer* 101 581-588.
- Benevolenskaya EV, Murray HL, Branton P, Young RA & Kaelin WG, Jr. 2005 Binding of pRB to the PHD protein RBP2 promotes cellular differentiation. *Mol Cell* 18 623-635.
- Bokar JA, Shambaugh ME, Polayes D, Matera AG & Rottman FM 1997 Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *Rna* 3 1233-1247.
- Brero A, Leonhardt H & Cardoso MC 2006 Replication and translation of epigenetic information. *Curr Top Microbiol Immunol* 301 21-44.
- Bujnicki JM, Feder M, Radlinska M & Blumenthal RM 2002 Structure prediction and phylogenetic analysis of a functionally diverse family of proteins homologous to the MT-A70 subunit of the human mRNA:m(6)A methyltransferase. *J Mol Evol* 55 431-444.
- Chan SW & Hong W 2001 Retinoblastoma-binding protein 2 (Rbp2) potentiates nuclear hormone receptor-mediated transcription. *J Biol Chem* 276 28402-28412.
- Cloos PA, Christensen J, Agger K, Maiolica A, Rappsilber J, Antal T, Hansen KH & Helin K 2006 The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature* 442 307-311.
- Davie JK & Dent SY 2002 Transcriptional control: an activating role for arginine methylation. *Curr Biol* 12 R59-61.
- De Graeve F, Bahr A, Chatton B & Kedinger C 2000 A murine ATF α -associated factor with transcriptional repressing activity. *Oncogene* 19 1807-1819.
- de Moor CH, Meijer H & Lissenden S 2005 Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 16 49-58.
- Dean W, Santos F & Reik W 2003 Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol* 14 93-100.
- Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E & Reik W 2001 Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 13734-13738.

- Fraga MF, Ballestar E, Montoya G, Taysavang P, Wade PA & Esteller M 2003 The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Res* 31 1765-1774.
- Friesen WJ, Wyce A, Paushkin S, Abel L, Rappsilber J, Mann M & Dreyfuss G 2002 A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *J Biol Chem* 277 8243-8247.
- Fuks F, Hurd PJ, Deplus R & Kouzarides T 2003 The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 31 2305-2312.
- Ganesh L, Yoshimoto T, Moorthy NC, Akahata W, Boehm M, Nabel EG & Nabel GJ 2006 Protein methyltransferase 2 inhibits NF-kappaB function and promotes apoptosis. *Mol Cell Biol* 26 3864-3874.
- Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A & Le Bouc Y 2003 In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN10T gene. *Am J Hum Genet* 72 1338-1341.
- Gill G 2004 SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 18 2046-2059.
- Gonsalvez GB, Rajendra TK, Tian L & Matera AG 2006 The Sm-protein methyltransferase, *dart5*, is essential for germ-cell specification and maintenance. *Curr Biol* 16 1077-1089.
- Harikrishnan K, Pal S, Yarski M, Baker EK, Chow MZ, de Silva MG, Okabe J, Wang L, Jones PL, Sif S *et al.* 2006 Reply to "Testing for association between MeCP2 and the brahma-associated SWI/SNF chromatin-remodeling complex". *Nat Genet* 38 964-967.
- Harikrishnan KN, Chow MZ, Baker EK, Pal S, Bassal S, Brasacchio D, Wang L, Craig JM, Jones PL, Sif S *et al.* 2005 Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet* 37 254-264.
- Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM & Chaillet JR 2001 Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene. *Cell* 104 829-838.
- Humphrey GW, Wang Y, Russanova VR, Hirai T, Qin J, Nakatani Y & Howard BH 2001 Stable histone deacetylase complexes distinguished by the presence of SANT domain proteins CoREST/kiaa0071 and Mta-L1. *J Biol Chem* 276 6817-6824.
- Huntriss J, Hinkins M, Oliver B, Harris SE, Beazley JC, Rutherford AJ, Gosden RG, Lanzendorf SE & Picton HM 2004 Expression of mRNAs for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins in the human female germ line, preimplantation embryos, and embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev* 67 323-336.
- Ichimura T, Watanabe S, Sakamoto Y, Aoto T, Fujita N & Nakao M 2005 Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins. *J Biol Chem* 280 13928-13935.
- Jenuwein T & Allis CD 2001 Translating the histone code. *Science* 293 1074-1080.
- Kantor B, Makedonski K, Shemer R & Razin A 2003 Expression and localization of components of the histone deacetylases multiprotein repressory complexes in the mouse preimplantation embryo. *Gene Expr Patterns* 3 697-702.
- Kimura H & Shiota K 2003 Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, *Dnmt1*. *J Biol Chem* 278 4806-4812.

- Klose RJ, Yamane K, Bae Y, Zhang D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J & Zhang Y 2006 The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature* 442 312-316.
- Kopecny V, Flechon JE, Camous S & Fulka J, Jr. 1989 Nucleologenesis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. *Mol Reprod Dev* 1 79-90.
- Lee MG, Wynder C, Cooch N & Shiekhatter R 2005 An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* 437 432-435.
- Lepikhov K & Walter J 2004 Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote. *BMC Dev Biol* 4 12.
- Liu H, Kim JM & Aoki F 2004 Regulation of histone H3 lysine 9 methylation in oocytes and early pre-implantation embryos. *Development* 131 2269-2280.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T & Boland MP 2003 Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies. *Reprod Biomed Online* 7 657-663.
- Lu PJ, Sundquist K, Baeckstrom D, Poulosom R, Hanby A, Meier-Ewert S, Jones T, Mitchell M, Pitha-Rowe P, Freemont P *et al.* 1999 A novel gene (PLU-1) containing highly conserved putative DNA/chromatin binding motifs is specifically up-regulated in breast cancer. *J Biol Chem* 274 15633-15645.
- Maatouk DM, Kellam LD, Mann MR, Lei H, Li E, Bartolomei MS & Resnick JL 2006 DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages. *Development* 133 3411-3418.
- Madsen B, Spencer-Dene B, Poulosom R, Hall D, Lu PJ, Scott K, Shaw AT, Burchell JM, Freemont P & Taylor-Papadimitriou J 2002 Characterisation and developmental expression of mouse Plu-1, a homologue of a human nuclear protein (PLU-1) which is specifically up-regulated in breast cancer. *Gene Expr Patterns* 2 275-282.
- McBride AE & Silver PA 2001 State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 106 5-8.
- McGraw S, Robert C, Massicotte L & Sirard MA 2003 Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol Reprod* 68 383-389.
- McGraw S, Vigneault C, Tremblay K & Sirard MA 2006 Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. *Mol Reprod Dev* 73 692-699.
- Memili E & First NL 2000 Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8 87-96.
- Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM & Bestor TH 1998 Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* 125 889-897.
- Moore GD, Ayabe T, Kopf GS & Schultz RM 1996 Temporal patterns of gene expression of G1-S cyclins and cdk's during the first and second mitotic cell cycles in mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 45 264-275.
- Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W & Reik W 2005 Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1 R47-58.
- Muegge K 2005 Lsh, a guardian of heterochromatin at repeat elements. *Biochem Cell Biol* 83 548-554.

- Muromoto R, Sugiyama K, Takachi A, Imoto S, Sato N, Yamamoto T, Oritani K, Shimoda K & Matsuda T 2004 Physical and functional interactions between Daxx and DNA methyltransferase 1-associated protein, DMAP1. *J Immunol* 172 2985-2993.
- Paillard L & Osborne HB 2003 East of EDEN was a poly(A) tail. *Biol Cell* 95 211-219.
- Peterson CL & Laniel MA 2004 Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14 R546-551.
- Qi C, Chang J, Zhu Y, Yeldandi AV, Rao SM & Zhu YJ 2002 Identification of protein arginine methyltransferase 2 as a coactivator for estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 277 28624-28630.
- Ratnam S, Mertineit C, Ding F, Howell CY, Clarke HJ, Bestor TH, Chaillet JR & Trasler JM 2002 Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Dev Biol* 245 304-314.
- Reik W, Dean W & Walter J 2001 Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293 1089-1093.
- Rho J, Choi S, Seong YR, Cho WK, Kim SH & Im DS 2001 Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family. *J Biol Chem* 276 11393-11401.
- Rodenhiser D & Mann M 2006 Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Cmaj* 174 341-348.
- Ross J 1995 mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 59 423-450.
- Rottman FM, Bokar JA, Narayan P, Shambaugh ME & Ludwiczak R 1994 N6-adenosine methylation in mRNA: substrate specificity and enzyme complexity. *Biochimie* 76 1109-1114.
- Rountree MR, Bachman KE & Baylin SB 2000 DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 25 269-277.
- Sachs AB 1993 Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* 74 413-421.
- Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W & Dean W 2003 Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol* 13 1116-1121.
- Sarmiento OF, Digilio LC, Wang Y, Perlin J, Herr JC, Allis CD & Coonrod SA 2004 Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development. *J Cell Sci* 117 4449-4459.
- Schultz RM 1993 Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays* 15 531-538.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA & Casero RA 2004 Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119 941-953.
- Shi Y, Sawada J, Sui G, Affar el B, Whetstine JR, Lan F, Ogawa H, Luke MP & Nakatani Y 2003 Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature* 422 735-738.
- Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Walker JR, Wiltshire T, Orth AP, Vega RG, Sapinoso LM, Moqrich A *et al.* 2002 Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 4465-4470.
- Tachibana M, Ueda J, Fukuda M, Takeda N, Ohta T, Iwanari H, Sakihama T, Kodama T, Hamakubo T & Shinkai Y 2005 Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev* 19 815-826.

- Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H *et al.* 2002 G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev* 16 1779-1791.
- Takeuchi T, Watanabe Y, Takano-Shimizu T & Kondo S 2006 Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development. *Dev Dyn* 235 2449-2459.
- Telford NA, Watson AJ & Schultz GA 1990 Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26 90-100.
- Trasler JM 2006 Gamete imprinting: setting epigenetic patterns for the next generation. *Reprod Fertil Dev* 18 63-69.
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P & Zhang Y 2006 Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439 811-816.
- Vigneault C, McGraw S, Massicotte L & Sirard MA 2004 Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biol Reprod* 70 1701-1709.
- Wang H, An W, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Chatton B, Tempst P, Roeder RG & Zhang Y 2003 mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Mol Cell* 12 475-487.
- Wilsker D, Probst L, Wain HM, Maltais L, Tucker PW & Moran E 2005 Nomenclature of the ARID family of DNA-binding proteins. *Genomics* 86 242-251.
- Wrenzycki C & Niemann H 2003 Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer. *Reprod Biomed Online* 7 649-656.
- Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J & Zhang Y 2006 JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* 125 483-495.
- Yan Q, Huang J, Fan T, Zhu H & Muegge K 2003 Lsh, a modulator of CpG methylation, is crucial for normal histone methylation. *Embo J* 22 5154-5162.
- Ying C, Hsu WL, Hong WF, Cheng WT & Yang Y 2000 Estrogen receptor is expressed in pig embryos during preimplantation development. *Mol Reprod Dev* 55 83-88.
- Yoder JA, Soman NS, Verdine GL & Bestor TH 1997 DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol* 270 385-395.
- You A, Tong JK, Grozinger CM & Schreiber SL 2001 CoREST is an integral component of the CoREST-human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 1454-1458.
- Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I & Sinclair KD 2001 Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 27 153-154.
- Zhu H, Geiman TM, Xi S, Jiang Q, Schmidtman A, Chen T, Li E & Muegge K 2006 Lsh is involved in de novo methylation of DNA. *Embo J* 25 335-345.

FIGURES

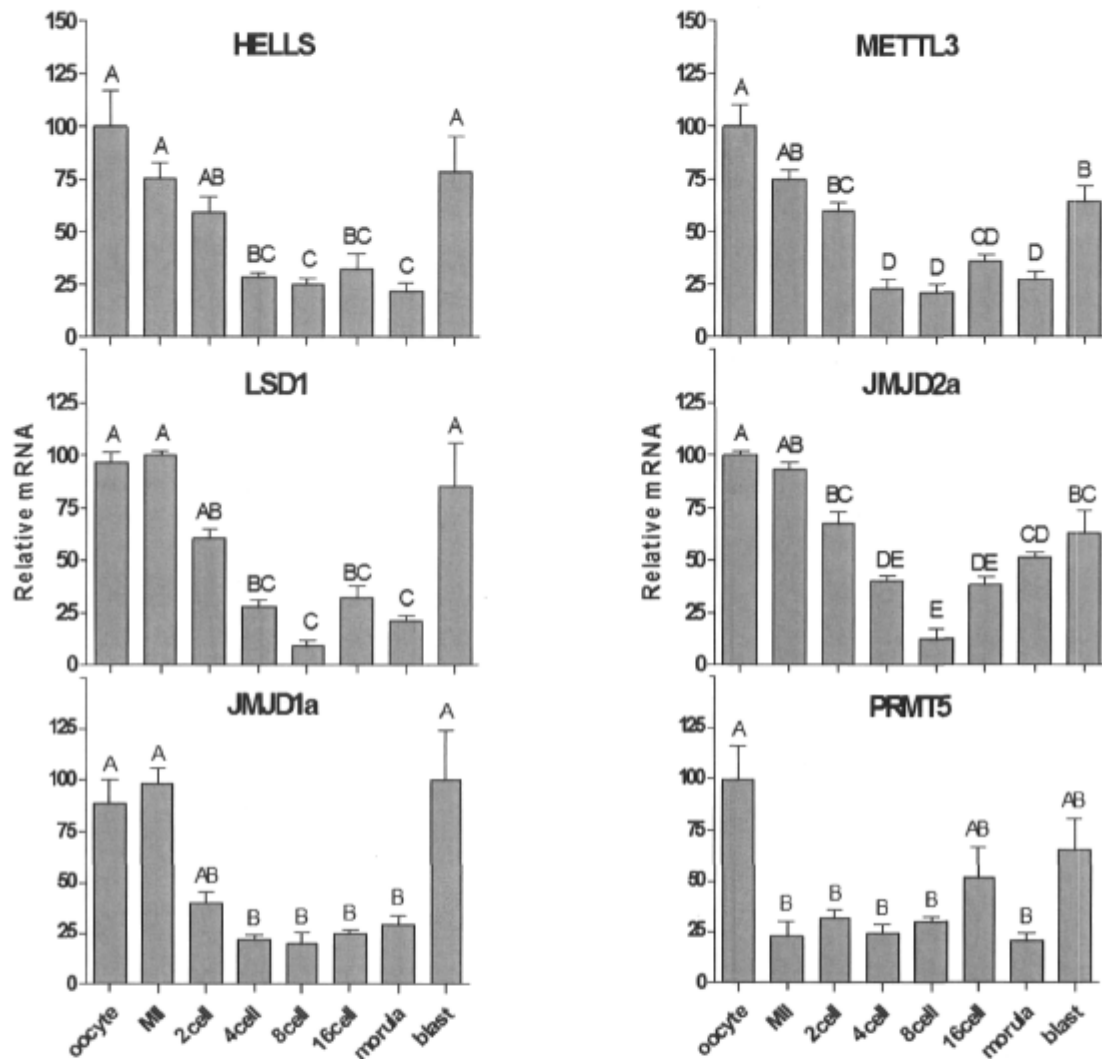


Figure 3.1. Quantification of HELLS, JMJD1A, JMJD2A, LSD1, METTL3 and PRMT5 mRNA in bovine oocytes and early embryos using real-time RT-PCR. Each developmental stage was analyzed in triplicate using 0.5 oocyte or embryo per reaction. The relative mRNA levels shown represent the quantity of transcript corrected with the GFP value obtained for each pool. The highest level was attributed the relative value of 100. Shown is the relative mRNA abundance (mean \pm SEM). Different letters indicate a significant difference of relative mRNA abundance ($P < 0.05$).

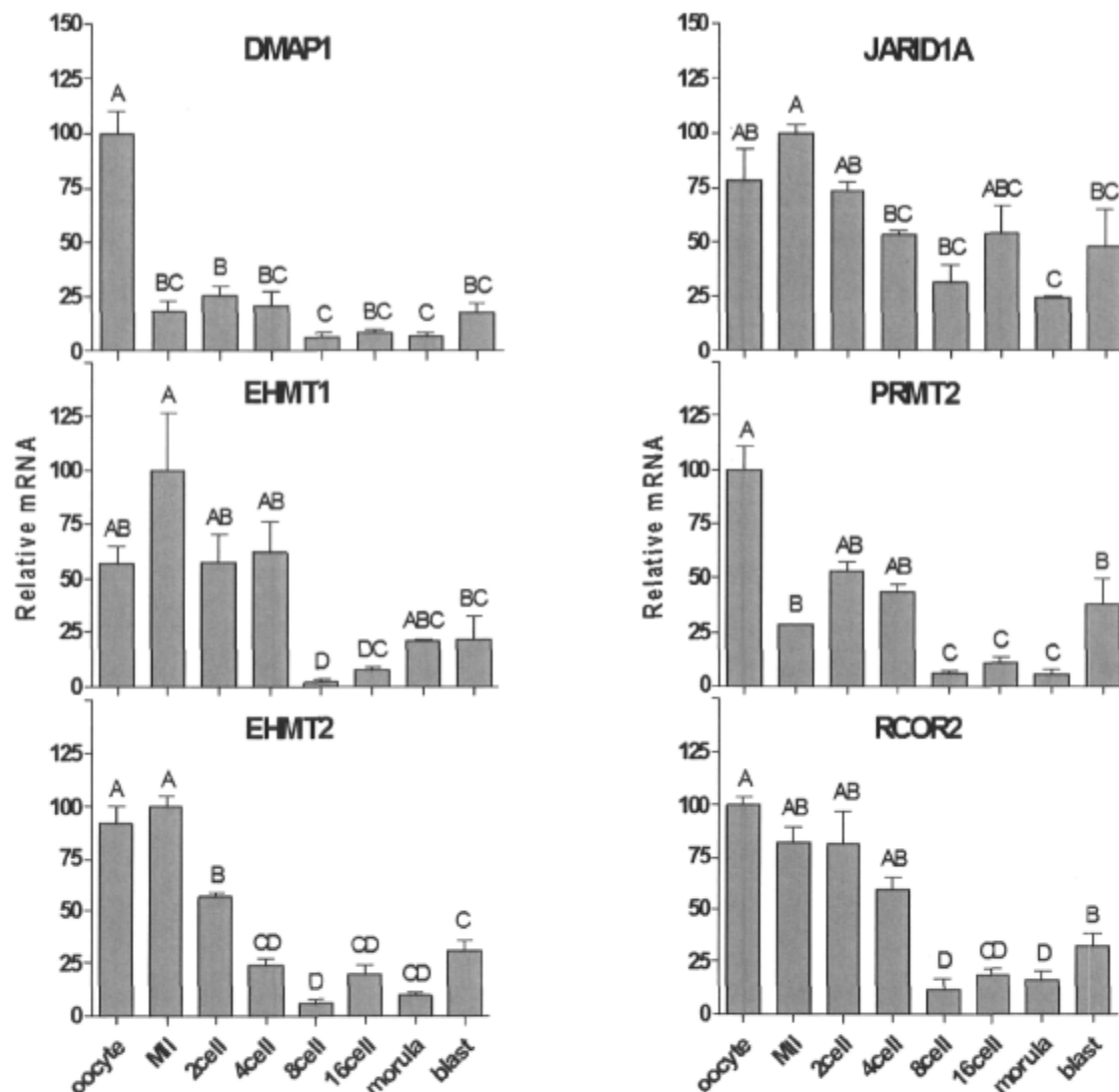


Figure 3.2. Quantification of DMAP1, EHMT1, EHMT2, PRMT2, JARID1A and RCOR2 mRNA in bovine oocytes and early embryos using real-time RT-PCR. Each developmental stage was analyzed in triplicate using 0.5 oocyte or embryo per reaction. The relative mRNA levels shown represent the quantity of transcript corrected with the GFP value obtained for each pool. The highest level was attributed the relative value of 100. Shown is the relative mRNA abundance (mean \pm SEM). Different letters indicate a significant difference of relative mRNA abundance ($P < 0.05$).

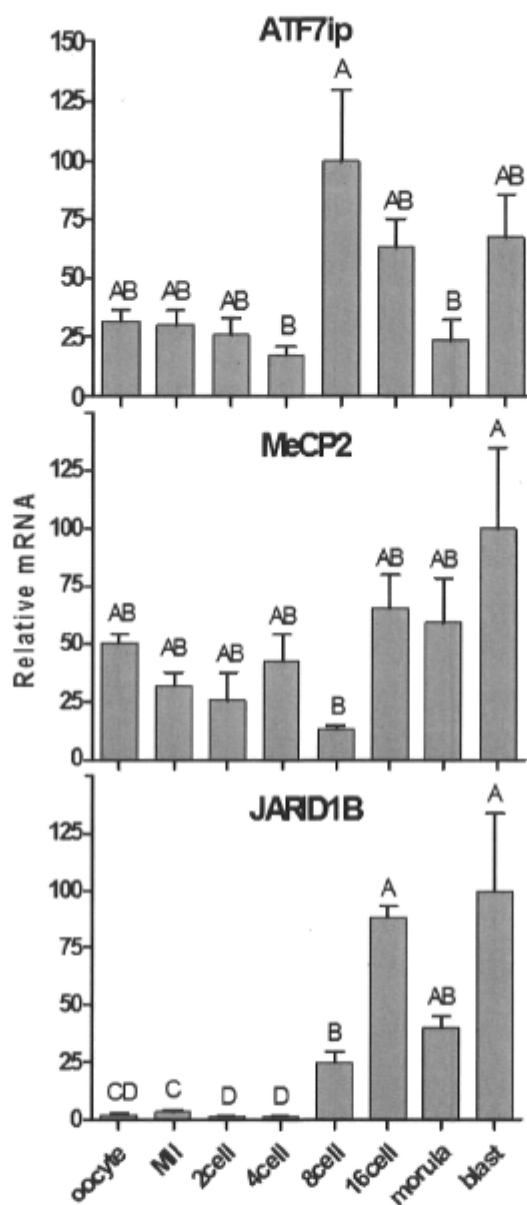


Figure 3.3. Quantification of ATF7IP, MeCP2 and JARID1B mRNA in bovine oocytes and early embryos using real-time RT-PCR. Each developmental stage was analyzed in triplicate using 0.5 oocyte or embryo per reaction. The relative mRNA levels shown represent the quantity of transcript corrected with the GFP value obtained for each pool. The highest level was attributed the relative value of 100. Shown is the relative mRNA abundance (mean \pm SEM). Different letters indicate a significant difference of relative mRNA abundance ($P < 0.05$).

Table 1. Information on genes studied.

Gene	Relevant information	Gene Ontology (GO)*
ATF7IP	Activating transcription factor 7 interacting protein. Interacts with several transcriptional factors to regulate gene transcription (De Graeve <i>et al.</i> 2000, Ichimura <i>et al.</i> 2005). It also forms a tight complex with SETBD1, a histone H3-K9 methyltransferase (Wang <i>et al.</i> 2003).	Methyltransferase activity Regulation of transcription Transcription activity
DMAP1	DNA methyltransferase 1 associated protein 1. Has an intrinsic transcriptionally repressive activity and forms a complex that includes DNA methyltransferase 1 (DNMT1) (Rountree <i>et al.</i> 2000), as well with other different associates to mediate transcriptional repression (Muromoto <i>et al.</i> 2004).	Chromatin modification Regulation of transcription Transcription activity
EHMT1 and EHMT2	Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1 and 2. EHMT1 and EHMT2 are highly similar. They form a complex and both are essential for H3-K9 dimethylation (Tachibana <i>et al.</i> 2005). More over, EHMT2 is crucial for early embryonic development (Tachibana <i>et al.</i> 2002).	Chromatin modification Methyltransferase activity Regulation of transcription Transcription activity
HELLS	Helicase, lymphoid specific. Fundamental for normal embryonic development and for maintaining a normal H3-K4me pattern in mammalian cells (Yan <i>et al.</i> 2003). A major epigenetic regulator involved in de novo methylation of DNA (Zhu <i>et al.</i> 2006).	Chromatin silencing Methyltransferase activity
JARID1A and JARID1B	Jumonji, AT rich interactive domain 1A et 1B. JARID1A enhances nuclear hormone receptor-mediated transcription (Chan & Hong 2001) whereas JARID1B has transcriptional repression activity (Lu <i>et al.</i> 1999). Both also contain a JmjC domain which is known for histone demethylation (Wilsker <i>et al.</i> 2005).	Chromatin modification Regulation of transcription Transcription activity
JMJD1A and JMJD2B	Jumonji domain containing 1A et 1B. Both contain JmjC domains which catalyze histone demethylation (Tsukada <i>et al.</i> 2006), (Yamane <i>et al.</i> 2006). JMJD1a targets specifically mono- and di-methyl H3-K9 (Yamane <i>et al.</i> 2006) whereas JMJD2a efficiently demethylates both tri-methyl H3-K9 and H3-K36 (Klose <i>et al.</i> 2006).	Chromatin modification Regulation of transcription Demethylation
LSD1	Lysine-specific histone demethylase 1. Demethylates mono- and di-methyl histone H3 lysine 4 (H3-K4) via FAD-dependent oxidative reaction (Shi <i>et al.</i> 2004), and has been linked in a number of corepressor complexes.	Chromatin modification Regulation of transcription
MeCP2	Methyl CpG binding protein 2. Composed of a methyl-CpG binding domain (MBD), it binds with a strong preference to methylated CpG dinucleotides (Fraga <i>et al.</i> 2003). It associates with the chromatin-modifying enzymes SWI/SNF (Harikrishnan K. N. <i>et al.</i> 2005, Harikrishnan K. <i>et al.</i> 2006) and DNMT1 (Kimura & Shiota 2003), also linked with the methylation of histone H3-K9 (Fuks <i>et al.</i> 2003).	Regulation of transcription Transcription activity
METTL3	Methyltransferase like 3. Encodes for the 70 kDa subunit of MT-A which is a component of the N6-adenosine-methyltransferase. This enzyme posttranscriptionally methylates internal adenosine residues in some mRNAs. (Bokar <i>et al.</i> 1997)	Methyltransferase activity
PRMT2 and PRMT5	Protein arginine methyltransferase 2 and 5. PRMTs are the only group of enzymes known to methylate arginine residues in select target proteins (Lee <i>et al.</i> 2005, McBride & Silver 2001). PRMT2 function as a co-activator for the estrogen receptor (Qi <i>et al.</i> 2002). PRMT5 mono- or di-methylate arginine residues from histone and non-histone substrates (Rho <i>et al.</i> 2001, Friesen <i>et al.</i> 2002).	Methyltransferase activity
RCOR2	RE1-silencing transcription factor corepressor. Encodes a functional corepressor for REST, which regulates gene expression by orchestrating a set of epigenetic modifications (Ballas & Mandel 2005).	Regulation of transcription Transcription activity

* Some GO categories were summarized and merged to fit properly in this table

Table 2. Primers used for RT-PCR experiments.

Gene	Primer sequences	Accession number	Length of PCR product (bp)	T _M (°C)
ATF7IP	Up 5'-acagtgagacagatgctggag-3' Low 5'-gcaacaggtacatgcaaaac-3'	BC053625	290	60
DMAP1	Up 5'-tgccttgetctactctgacaa-3' Low 5'-cttctgaactgctggtggtc-3'	XM_584860	382	60
EHMT1	Up 5'-gcttcaaatggacagatgga-3' Low 5'-gacacagtcgtagcgggtctc-3'	NM_024757	350	60
EHMT2	Up 5'-cgattgctccaggaatttaac-3' Low 5'-atgcagtacacctctccatcc-3'	NM_025256	296	53
HELLS	Up 5'-agcatgttgacatttgatg-3' Low 5'-gactgaccaccttgaaatga-3'	BC030963	395	53
JARD1A	Up 5'-atgtcggaggaagaggtgtt-3' Low 5'-gtgattgaagttggcggataa-3'	XM_584665	291	60
JARID1B	Up 5'-tagaggtgctgtgctcctgat-3' Low 5'-tgacacacgcagactctcatc-3'	XM_612405.	286	60
JMJD1A	Up 5'-gtgggttgagtggtgtg-3' Low 5'-tgtcttcttggaggctgtg-3'	XM_616193.	273	60
JMJD2A	Up 5'-ctcctgctgaaggggaagtag-3' Low 5'-tgcaggctcgatgtaatctc-3'	XM_590169.	305	60
LSD1	Up 5'-acgggtcctctgtacccttcctt-3' Low 5'-ttctcccgcacagtgccaaca-3'	XM_612243	275	60
MeCP2	Up 5'-acagactcaccagttcctgctt-3' Low 5'-gctcatgcttgccctcttctt-3'	XM_588477	218	57
METTL3	Up 5'-acctatgctgaccattccaag-3' Low 5'-ctgttggttcagaaggtctc-3'	BC001650.	261	60
PRMT2	Up 5'-aactcacttgagatgttg-3' Low 5'-gatggactcgatcatgaactc-3'	BC104629.	350	55
PRMT5	Up 5'-taccttcagccatcctaacag-3' Low 5'-gttgtaatagcagagcagac-3'	XM_879124.	325	53
RCOR2	Up 5'-acagtagaggacaaggtgctg-3' Low 5'-ggagatgagctgagagtcaag-3'	BC023587	474	60

4 CHAPITRE # IV: Investigation de l'histone acétyltransférase MYST4 et son implication dans la gamétogenèse chez le mammifère.

**Serge McGraw, Guillaume Morin, Christian Vigneault,
Pierre Leclerc et Marc-André Sirard.**

Cet article a été publié dans la revue "**BMC Developmental Biology**" sous la référence suivante: McGraw S, Morin G, Vigneault C, Leclerc P, Sirard MA. Investigation of MYST4 histone acetyltransferase and its involvement in mammalian gametogenesis. BMC Dev Biol. 2007 Nov 2;7(1):123

4.1 RÉSUMÉ

Différentes histones acétylases (HATs) jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression génique, mais les fonctions précises de plusieurs de ces enzymes demeurent inconnues. Dans cette étude nous mettons en évidence que l'HAT MYST4 pourrait être impliquée dans la gamétogénèse. Quoique les transcrits d'ARNm de MYST4 soient ubiquitaires, l'expression de la protéine a été observée dans certains extraits seulement, incluant l'ovaire et le testicule. Des expériences d'immunohistochimie effectuées sur des sections d'ovaires ont révélé que la protéine MYST4 est cependant spécifique à l'ovocyte, aux cellules de granulosa et de thèque. Les transcrits pour MYST4 ainsi que pour ses isoformes ont été retrouvés dans les ovocytes et embryons produits *in vitro*. Dans les ovocytes et embryons, la protéine MYST4 est localisée dans le cytoplasme et dans le noyau. Dans le testicule MYST4 est circonscrite à un type cellulaire : les spermatides en élongation, où elle est exclusivement nucléaire. Nous avons établi que MYST4 est spécifique à certaines cellules impliquées dans la gamétogénèse. De plus des événements d'acétylation spécifiques peuvent être associés avec la présence de MYST4 dans l'ovaire et le testicule.

4.2 ABSTRACT

Background

Various histone acetylases (HATs) play a critical role in the regulation of gene expression, but the precise functions of many of those HATs are still unknown. Here we provide evidence that MYST4, a known HAT, may be involved in early mammalian gametogenesis.

Results

Although *MYST4* mRNA transcripts are ubiquitous, protein expression was restricted to select extracts (including ovary and testis). Immunohistochemistry experiments performed on ovary sections revealed that the MYST4 protein is confined to oocytes, granulosa and theca cells, as well as to cells composing the blood vessels. The transcripts for *MYST4* and all-*MYST4*-isoforms were present in oocytes and in *in vitro* produced embryos. In oocytes and embryos the MYST4 protein was localized in both the cytoplasm and nucleus. Within testis sections, the MYST4 protein was specific to only one cell type, the elongating spermatids, where it was exclusively nuclear.

Conclusions

We established that MYST4 is localized into specialized cells of the ovary and testis. Because the majority of these cells are involved in male and female gametogenesis, MYST4 may contribute to important and specific acetylation events occurring during gametes and embryo development.

4.3 BACKGROUND

In eukaryotic cells, the tightly packed chromatin contained in the nucleus directs fundamental cellular processes. The regulation of chromatin conformation by specific structural proteins and their post-translational modifications have a major influence on transcription, repair, replication and recombination [1,2,3,4,5]. Histones are important for chromatin organization and their residues are constantly targeted by modification enzymes. One of the modifications implicates acetylation of specific lysine residues in core histones (H2A, H2B, H3 and H4). By its ability to remodel chromatin, histone acetylation influences the transcriptional state of chromosomal regions by controlling the accessibility of underlying genes, directly linking this regulatory mechanism with gene activation [6]. Acetylation of histones is also involved in the deposition of free histones onto newly synthesized DNA [reviewed in 7] and in the replacement of histones by protamines [8]. Because histone acetylases (HATs) and deacetylases (HDACs) are associated with crucial regulatory roles, their dysregulation is often involved in diseases such as cancer [9].

HATs are divided into 3 families: Gen5/PCAF (general control of amino-acid synthesis 5/ p300-CBP-associated factor), p300/CBP (Adenoviral E1A-associated protein/ CREB-binding protein) and MYST. Among these families, MYST is more divergent and not as well characterized. This protein family is also different with regard to domain organization, multiprotein complex formation and biological function [10,11]. MYST is an acronym of its four founding members: human MOZ (monocytic leukemia zinc finger protein), yeast Ybf2 (renamed Sas3, for something about silencing 3), yeast Sas2, and mammalian TIP60 (HIV Tat-interacting 60 kDa protein) [11]. MYST4, also called MOZ2 or MORF (monocytic leukemia zinc finger protein-related factor), is a member of the MYST family [12]. *In vitro* studies demonstrated that it preferentially acetylates free histones H2A, H3 and H4, as well as nucleosomal H3 and H4. Alternative splicing variants are found (MORF, MORF α and MORF β), but their expression, impact and function remain uncharacterized. The name MYST4 is now attributed to the longest of the splicing variant, MORF β . The sequences composing some of MYST4's domains are similar only to one other MYST

family member, MOZ. Both MOZ and MYST4 are involved in leukemogenesis [13,14,15]. Chromosomal abnormalities found in leukemia patients reveal that *MYST4* is rearranged and fused with the *CBP* gene [13,14,15], a translocation also associated with *MOZ* [16]. Additionally MYST4 can interact with RUNX1 (Runt-related transcription factor 1), a recurrent leukemia associated target [17]. In the mouse, its homologue Querkopf is thought to be implicated in cell differentiation in the cerebral cortex by regulating chromatin organization at some point during transcription. The malformations found in the cerebral cortex of mutant *querkopf* mice reveal that the gene is essential for normal embryonic neurogenesis [18]. Its involvement in gametogenesis and early embryogenesis is unknown, however preliminary mRNA studies revealed that *MYST4* transcripts are present in high amounts in bovine oocytes (S. McGraw, unpublished results) compared to other HATs [19].

Many members of the MYST family have distinct domains and diverse functions, including roles in epigenetic control, transcriptional regulation, DNA replication, DNA repair, chromatin assembly, cell cycle progression and cellular signalling (reviewed in 20). It has been suggested that MYST4 may also perform some of those functions, although since it has unique domains it may act differently from other MYST members [17]. Structural features found in MYST4 suggest that it could be a HAT with novel properties. However, most functions and characteristics attributed to MYST4 remain hypothetical and are only based on sequence analysis. The lack of proteomic and more thorough *in vivo* data are due to the absence of a functional MYST4 antibody.

In the study presented here, our aim was to characterize bovine *MYST4* and the combination of all *MYST4* splicing variants simultaneously (*MORF*, *MORF α* , *MORF β*) in various tissues, but more specifically in reproductive tissues and gametes. The transcriptional study revealed that *MYST4* was ubiquitously expressed in bovine somatic tissues. Unlike its mRNA, the MYST4 protein was present in some, but not all, of the eleven somatic tissues tested. In addition, MYST4 could be linked with important events that take place during folliculogenesis, embryo development, and spermatogenesis. *MYST4* mRNA levels were assessed in oocytes and embryos, as were protein expression and

localization. Valuable information was additionally obtained with the localization and expression of MYST4 protein in the ovary and testis.

4.4 RESULTS

4.4.1 MYST4 Sequence

Using polymerase chain reaction on oocyte cDNA, we obtained an amplified fragment of approximately 6600 bp (not shown). Sequencing revealed that it corresponded to the full-length bovine *MYST4* gene. This splicing variant is the longest of the three MYST4 isoforms and encoded 2054 amino acid residues (Fig. 4.1A). The three splicing variants contained exactly the same sequences, except that MORF and MORF α are 292 aa and 109 aa shorter than MYST4 (MORF β) (Fig. 4.1B). Alignment analysis also revealed that conservation between human and bovine MYST4 was nearly 95%. The human MYST4 sequence has 19 more amino acids, which can be found almost entirely in two glutamic acid-rich areas located in its acidic region. Bovine MYST4 contains various structural domains throughout its coding sequence. The most homologous domains were similar to those found in other proteins such as linker histones H1/H5, PHD zinc fingers and MYST histone acetylases (Fig. 4.1A). Additionally acidic and Ser/Met-rich regions were found. A transcriptional activation domain was also present in the C-terminal sequence of MYST4.

4.4.2 MYST4 mRNA in Somatic Tissues

We assessed the presence of transcripts for *MYST4* and for all *MYST4* isoforms simultaneously (*MORF*, *MORF α* and *MORF β*) by RT-PCR analysis in different bovine tissue samples, including brain, thymus, muscle, lung, heart, liver, kidney, spleen, testis, ovary, uterus and oocyte. The three splicing variant sequences were similar except for the gap present in *MORF* and *MORF α* compared to *MYST4* (Fig. 4.1B) which was restrictive for designing primers. Individual analysis using the different sets of primers for the splicing variants resulted in no or nonspecific amplification of *MORF* and *MORF α* , therefore they could not be investigated. Amplicons of expected sizes were generated for *MYST4* and all-*MYST4*-iso, as well as for the housekeeping gene *TUBULIN* (Fig. 4.2). The mRNA

transcripts for *MYST4* and all-*MYST4*-iso were present in all tissues tested. Although this was not a quantitative analysis, the amplifications for the thymus, spleen, testis and uterus gave more intense bands with the same amount of cycles/cDNA compared to the other samples with both the *MYST4* and all-*MYST4*-iso primers. However, the amplifications from the oocytes samples were amongst the most intense with the all-*MYST4*-iso primers, whereas they were ones of the lowest detected with the *MYST4* primers.

4.4.3 MYST4 Protein in Somatic Tissues

In order to characterize the distribution of MYST4, an antibody was raised against a peptide specific only to MYST4 and its isoforms. The same tissues that were used for mRNA transcript analysis were subjected to Western blotting. As shown in Fig. 4.3, one positive protein band of about 230 kDa associated to MYST4 was predominantly present in the lung, spleen and ovary, whereas the same protein was also present but faintly detected in the brain, testis, uterus and oocytes. In the heart a single sharp band of about 200 kDa was detected. This protein is presumably the MORF isoform, which has a calculated molecular weight of 197 kDa. Peptide-blocking assays established that our MYST4 antibody was specific for the MYST4 peptide used for antibody production since the single distinct band disappeared (not shown). β -ACTIN was used as a loading control, but since some tissue extracts lacked this specific isoform, the samples were additionally probed with an anti-TUBULIN antibody.

4.4.4 MYST4 Immunohistochemistry in Ovary

Since our Western blot experiments revealed that only a portion of the strong MYST4 signal in the ovary was associated with oocytes, immunolocalization experiments were performed on ovary sections to distinguish which other cell types expressed MYST4. In these tissue sections, MYST4 expression was confined to follicles and to blood vessels, as there was no other signal within the stroma. A closer look at primordial follicles (Fig. 4.4A) revealed that MYST4 was intensely expressed in the cytoplasm of the oocyte, whereas the nucleus remained negative. MYST4 was also present in the cytoplasm of the simple

squamous epithelium layer surrounding the oocyte, while cells in the proximity of the follicle wall were negative. In larger follicles, like those at the antral stage, granulosa cells adjacent to the oocyte and those covering the inside of the follicle strongly expressed MYST4 (Fig. 4.4C). The oocytes contained within these follicles displayed MYST4 in both their cytoplasm and nucleus (Fig. 4.4C). In large follicles MYST4 was not only present in granulosa cells, but also on the other side of the basal lamina, in the theca cells (Fig. 4.4E). While essentially all granulosa cells expressed MYST4 in their cytoplasm, only a portion of theca cells expressed MYST4. Within the theca cell population positive for MYST4, the majority displayed a strong signal for this protein in their nucleus, however a faint signal was also observed in some cell cytoplasm. Additionally ovary sections revealed that cells composing blood vessels also expressed MYST4 in their cytoplasm (Fig. 4.4G).

4.4.5 MYST4 mRNA Profiles in Oocytes and Embryos

The mRNA profiles for *MYST4* and all *MYST4* isoforms (simultaneously) were assessed in oocytes and throughout bovine *in vitro* embryo culture by quantitative RT-PCR. The *MYST4* variant and all-*MYST4*-iso exhibited a similar overall mRNA profile in oocytes and throughout early embryo development (Fig. 4.5). The highest relative levels of *MYST4* mRNA were found in immature GV and mature MII oocytes. Transcript levels measured in the oocyte stages as well as in the 2- and 4-cell stages did not differ significantly, but a significant reduction was observed in the 8-cell embryos. The relative mRNA levels were lowest in 8-cell, 16-cell and morula embryos but tended to increase in blastocysts (Fig. 4.5A).

The relative levels of all-*MYST4*-isoforms were also at their highest intensity in both oocyte stages studied (Fig. 4.5B). Thereafter, significant decreases were observed in 2-, 4-, 8- and 16-cell embryos. The transcript levels for the combined isoforms were lowest in 16-cell and morula embryos. These minimal levels were subsequently followed by a significant increase in transcripts at the blastocyst stage.

4.4.6 MYST4 Immunocytochemistry in Oocytes and Embryos

To evaluate the localization of MYST4 protein in bovine oocyte and embryo, immunolocalization experiments were performed on unfertilized bovine oocyte and throughout *in vitro* embryo development (Fig. 4.6). The immature oocyte strongly expressed MYST4 in its germinal vesicle (oocyte nucleus) and uniformly in its ooplasm (Fig. 4.6A). As the oocyte resumes its maturation, the GV breaks down (GVBD) and no nuclear membrane is noticeable at the metaphase I (MI) stage of meiosis. At that moment, MYST4 was not present on the chromatin but appeared to concentrate on the mitotic spindle and scattered in the ooplasm (Fig. 4.6B). In the *in vitro* matured oocyte (MII), MYST4 remained present throughout the ooplasm and along condensed chromosomes (Fig. 4.6C), but the first expelled polar body did not reveal any staining (Fig. 4.6D). During the subsequent cleavage stages, in 2-, 4-, 8- and 16-cell embryos, MYST4 was clearly expressed in the cytoplasm (Fig. 4.6E, F, G and H). However, nuclear localization during that period in blastomeres was not as obvious compared to GV oocytes. Compact morula embryos exhibited a similar MYST4 expression profile in the cytoplasm and nucleus (Fig. 4.6I). In early and expanding blastocysts, MYST4 was observed in both the cytoplasm and nucleus of cells composing the trophectoderm and inner cell mass (Fig. 4.6J and K). However, the staining intensities of the nuclei were not similar, with some showing strong signal whereas it was weaker or absent in others (Fig. 4.6J and K). For all stages, negative controls were performed with a peptide-blocking assay, of which an example is shown (Fig. 4.6L).

4.4.7 MYST4 Immunohistochemistry in Testis

To establish if MYST4 expression in testis could also be restricted to specific cell types, testis sections were immunostained with the MYST4 antibody (Fig. 4.7). In the first cross-section (Fig. 4.7A), MYST4 was only present in some seminiferous tubules whereas others did not show any staining. This strongly suggests that its expression is developmentally regulated and is stage-specific during spermatid differentiation (spermiogenesis). MYST4 appeared to localize in cells facing the lumen of the seminiferous tubules and was cell-specific during spermiogenesis. To investigate this hypothesis, seminiferous tubules at

different stages of spermatogenesis were closely observed (Fig. 4.7C to K). The spermatid differentiation process in bovine is divided in 14 described steps that include round (steps 1-7), elongating (steps 8-12) or elongated spermatids (steps 12-14) [21]. These various spermatids, from steps 1-12, are distributed in a specific manner within the seminiferous tubules. The seminiferous tubules are also divided into classes, called stages (I to XII), accordingly to the seminiferous epithelium cycle. Additionally, diverse types of germ cells (spermatogonia and spermatocytes) are distributed inside the different stages of the seminiferous epithelium cycle [21]. In seminiferous tubules containing primary spermatocytes and round spermatids (Fig. 4.7C and D), which correspond to stage VII of the seminiferous epithelium cycle, no MYST4 was detected. However, in seminiferous tubules cross-sections at stages VIII to XI, intense staining of the MYST4 protein was detected in elongating spermatids (Fig. 4.7F). At higher magnification, the image clearly revealed that only the heads (nucleus), and not the mid-sections, of elongating spermatids were stained by MYST4 antibody (Fig. 4.7G). In this section (Fig. 4.7F and G), MYST4 immunolocalization was clearly restricted to elongating spermatids, as no spermatocytes were stained. Further along spermatogenesis, in stages IV to VI of the seminiferous epithelium cycle, the elongated spermatids displayed no immunoreactivity to MYST4 (Fig. 4.7I). The elongated spermatid nuclei located on the inner wall facing the lumen as well as those inside the lumen were negative for MYST4 (Fig. 4.7J).

4.5 DISCUSSION

As a result of its unique structural domain organization as well as its presence in various multisubunit complexes [11], MYST4 is probably involved in the regulation of a variety of biological processes. Although it is established that MYST4 is a potent histone H3 and H4 acetylase [12], the functional consequences of this enzymatic activity remain unknown. Its specific function as a HAT remains ambiguous, but its involvement in chromosomal abnormalities found in leukemia patients [14,15,22] and its normal presence in neurogenesis development have already been established [18,23]. In this paper we aimed to characterize *MYST4* and the combination of all *MYST4* isoforms simultaneously (*MORF*,

MORF α , *MORF* β) in various tissues, but more specifically in reproductive tissues and in gametes.

Based on its sequence, the bovine MYST4 protein is highly similar to its human counterpart, with almost 95% homology. Bovine MYST4 contains the same structural domains that make MYST4 so unique and therefore we can assume that bovine and human MYST4 take part in the same cellular processes.

4.5.1 Expression of MYST4

A previous report revealed that human *MORF* is ubiquitously expressed in somatic tissues [12]. Transcript levels were high in tissues like heart, pancreas, testis and ovary, whereas they were barely detectable in the lung. In our study, we determined that the mRNA transcripts for the *MYST4* gene as well as for all *MYST4* isoforms were also ubiquitously present in all tissues tested, with different intensities.

Because the mRNA transcripts for the different splicing variants were present in each tissue tested, we thought they would parallel the protein levels. However, MYST4 protein detection was quite variable in the same tissues, ranging from high (lung, spleen and ovary) to undetectable (thymus, muscle, liver and kidney). Surprisingly, only one of the tissues (heart) revealed a specific band with a different molecular weight compared to the other tissues. Protein extracts from the heart displayed only one band which may be the shortest isoform, MORF.

4.5.2 MYST4 in female gametogenesis

Oocytes also expressed the MYST4 protein, albeit weakly, and thus could not account for the important levels found in the ovary extracts, suggesting that other cell types could express MYST4. Immunolocalization on ovary sections confirmed this by revealing that MYST4 was expressed in follicular cells (granulosa and theca) enclosing the oocyte, as well as in blood vessels. Although this is the first time that the MYST4 acetylase is

associated with folliculogenesis, various acetylation events occur within granulosa and theca cells during follicle formation and growth. Numerous experiments using ChIP (Chromatin immunoprecipitation) assays on these cells revealed that specific histone acetylation events in the promoter region of ovarian genes are affected by the increase in reproductive hormones [reviewed in 24]. *In vitro* culture of rat granulosa cells treated with FSH (follicle-stimulating hormone) enhances the transcriptional activation of the *SGK* (serum-glucocorticoid kinase) and the *FOS* (FBJ osteosarcoma oncogene) genes by increasing the acetylation of specific lysine residues on histone H3 [25]. In addition, granulosa cells obtained from monkeys treated with hCG and from human IVF (*in vitro* fertilization) patients also treated with hCG exhibited histone H3 acetylation in the regulatory regions of the *StAR* (steroidogenic acute regulatory protein) gene [26]. Furthermore, inhibition of HDACs in cultured human theca cells increased total histone H3 and H4 acetylation levels, along with mRNA transcription for CYP11A (cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1) and CYP17 (cytochrome P450, family 17) [27]. Given that the MYST4 proteins are restricted to certain specialized cells in the ovary and have a strong histone H3/H4 acetylation activity, they could regulate the transcription of specific genes during folliculogenesis. The functions of MYST4 in follicular cells may be somewhat distinctive since the protein is mainly nuclear in theca cells and cytoplasmic in granulosa cells. Dormant oocytes enclosed in primordial follicles also lacked MYST4 in their nucleus, but the oocytes contained in the larger follicles exhibited MYST4 in both cytoplasm and nucleus. Since dormant oocytes are deficient in transcription at this point [28] they may not require this HAT in their nucleus for regulatory processes, whereas growing oocytes are in a transcriptionally active state and thus necessitate enzymes responsible for chromatin remodeling.

Related mRNA profiles in oocytes and throughout embryo development were observed between *MYST4* and all-*MYST4*-iso. However, since higher levels of transcripts were measured with the all-*MYST4*-iso in oocytes compared to the subsequent embryo stages, whereas *MYST4* was equally present in the first four stages, we assume that the splicing variants *MORF* and/or *MORF* α are more abundant in the GV and MII oocytes compared to other embryo stages. Globally, a significant amount of all-*MYST4*-iso transcripts was lost

following each embryo division up to the 16-cell stage, followed by a slight increase in mRNA levels between morula and blastocyst embryos. High levels of transcripts in oocytes could be mRNA accumulated during oocyte growth and translated into protein in subsequent stages of development until the embryo is able to produce its own mRNA at the MET (maternal embryonic transition). However the immunolocalization study, although not quantitative, revealed that similar intensity of staining for cytoplasmic MYST4 was found throughout development. This could indicate that the protein has an extensive half-life or the transcripts produced by post-MET embryos are constantly being translated into new proteins and do not accumulate. Interestingly, GV oocytes contained the largest measured levels of *MYST4* transcripts and had the highest accumulation of the protein in its nucleus. Since there is still some active transcription in GV oocytes [29], MYST4 may potentially be implicated in this permissive chromatin state by co-regulating transcriptional complexes via its transcriptional activation domain. Surprisingly, during oocyte maturation when chromosomes are lined up along the equator at the metaphase-1 stage, MYST4 was located in the vicinity of the meiotic spindle rather than on chromosomes. Interaction with chromatin is expected, since MYST4 contains a H1/H5 domain that mediates self-association and interaction with core histones and the nucleosomes [11]. Because there is no nuclear membrane during MI in meiosis, there was no barrier to retain MYST4 at this location. Therefore it may be implicated in the meiotic spindle action to separate the chromosomes or in other related mechanisms. It is unlikely that it acetylates histones H3 and H4 at that point, since histones are globally deacetylated in oocytes during meiosis [30] and improper histone deacetylation in the course of meiosis is associated with aneuploidy and embryo death [31]. Alternatively, the α -TUBULIN proteins composing the microtubules could perhaps be a target for MYST4, since they are acetylated at different points in meiotic and mitotic divisions in mouse oocytes [32]; however, no studies have yet examined if MYST4 could acetylate α -TUBULIN. Although MYST4 appeared to be present in the nucleus from the 2-cell until the 16-cell stage embryo, no major accumulation was observed in the nucleus. In the morula and blastocyst stages, some nuclei appeared to have the same accumulation as that observed in oocytes. This nuclear accumulation may be associated to specific stages in the cell cycle and since there are more individual cells in those embryos, the chances of detecting this accumulation are increased. The presence of

MYST4 in the nucleus also coincides with the activation of specific genes involved in the delineation of the blastocyst inner cell mass and trophectoderm [33].

4.5.3 MYST4 in male gametogenesis

Since MYST4 was linked with reproductive cells in the ovary, we wondered if its presence in testis could have a similar function. Surprisingly, in this organ, MYST4 was restricted to specific cells. The antibody brightly stained only the nucleus of elongating spermatids found in stages VIII to XI of the seminiferous epithelium cycle, which normally enclose step-8 through -11 spermatids [21]. The spermatid differentiation process in bovine is divided in 14 described steps that include round (steps 1-7), elongating (steps 8-12) or elongated spermatids (steps 12-14) [21,34]. The adjacent seminiferous tubules of the same testis section, containing spermatids at different stages of development, were not immunoreactive. Because there are various nuclear modification events that occur during spermiogenesis, MYST4 may be a key player in one of them. In the nucleus of elongating spermatids at different stages, important acetylation processes occur to ensure proper histone displacement for their replacement by transition proteins and protamines [35,36,37]. During these processes, different residues of the core histones (H3, H4, H2A and H2B) are targets for acetylation. In mouse spermiogenesis, there are 16 reported steps, with steps 9 to 12 associated with the elongating spermatids [38]. Acetylation of histone H3 is limited to steps 10 and 11, whereas histone H4 is hyperacetylated from steps 8 to 11. For both H3 and H4, the intense staining seems homogeneously distributed over the nuclear region. Furthermore, the four potential sites of acetylation on histone H4 (Lys 5, 8, 12, and 16) were individually studied with specific antibodies and revealed to be all immunoreactive in steps 8 to 11 of the elongating spermatids [36].

Other acetylation events on histones H2A (steps 9 to 11) and H2B (steps 10 and 11) are also observed in elongating spermatids. To date, the only genes thought to be associated with histone H4 hyperacetylation in elongating spermatids prior to the histone-to-protamine exchange are all members of the Cdy (chromodomain protein, Y chromosome)-related family [38,39]. In the mouse, where two transcripts evolved for that gene, both *cdyl* (Cdy-

like) and *cdyl2* exhibit a ubiquitous, long transcript as well as a highly abundant, testis-specific short transcript [39]. In human, members include the *CDYL* and *CDYL2* genes which are ubiquitously expressed in tissues, and *CDY* which is an abundant testis-specific gene [39]. *CDY* and its homologs encode a HAT that acetylates free histones H4 and H2A [38]. By immunolocalization, it was shown that mouse *Cdyl* is abundantly expressed in the nuclei of elongating spermatids at the time histone H4 is hyperacetylated [38]. Although our immunolocalization experiments were not performed on individual elongating step sections, we could clearly distinguish that MYST4 was also only present in elongating spermatids during spermatogenesis. Furthermore, MYST4 is not only able to acetylate free H2A, H3 and H4 when used as substrates, but can efficiently acetylate nucleosomal histones as well [12]. With the new data obtained in our study added to previous reports on MYST4, strong evidence connects this protein with H2A, H3 and H4 acetylation during spermiogenesis. However, because some of the histone modifications mentioned above are also present at some other stages like spermatogonia and preleptotene spermatocytes, histone acetylases other than those of the *CDY* and MYST4 families are likely to be involved in spermatogenesis.

4.5.4 MYST4 in vivo characteristics

Although MYST4 was discovered several years ago, it has never been linked to the formation of a stable multisubunit HAT complex. Recently, MYST4 and its close relative MOZ (monocytic leukemia zinc finger) were characterized as part of a histone H3 specific HAT complex important for DNA replication [40]. This HAT complex also includes a member of the tumor suppressor family (ING5, inhibitor of growth 5), proteins usually associated with chromatin (BRPF 1/2/3) and an uncharacterized protein homologous to a subunit of a yeast acetyltransferase (Eaf6, Esa1-associated factor-6). Since this complex was only able to acetylate H3K14 in HeLa cells [40], it is unlikely to be involved in the acetylation of H4 in spermatids. However, transcripts from related BRFP family members are preferentially expressed within spermatocytes in the testis [41,42] and in oocytes [42], suggesting that BRFP proteins may be present and associated with MYST4 in other HAT complexes.

Although *MYST4* knock-outs are not yet available to determine whether the gene is essential in reproduction or other important processes, a mutant mouse for its homolog *querkopf* exists. The homozygous *querkopf* mice display about 10% of the normal coding mRNA compared to wild type [18]. These mutant mice show craniofacial abnormalities, retarded postnatal growth, defects in the central nervous system (Thomas 2000) and severe problems in adult neurogenesis (Merson 2006). These physiological failures are caused by the essential function attributed to Querkopf in neural stem cells [18,43] and in bone formation through its involvement with RUNX1 [17,44]. Because there is still partial expression of wild-type *querkopf* mRNA, these mice are still able to develop despite all their defects. However for the moment, no information about other malformations or problems in folliculogenesis, spermatogenesis or embryo development was reported for the homozygous mutant mice. Even though MYST4 and MOZ interact in different protein complexes, they specifically regulate diverse stem cell populations [11,17,40]. Through its complete deletion in mice, Moz revealed itself as an essential regulator of hematopoietic stem cell maintenance [18,45]. Compared to the Querkopf or MYST4 mutants, MOZ-null mice die before or at birth.

4.6 CONCLUSIONS

The work presented here reveals novel properties for the histone acetylase MYST4. The data and conclusions from bovine MYST4 will undoubtedly apply to the human protein since both sequences show extensive similarities. In addition to providing the first proteomic study of this poorly studied protein, this is the first report to link MYST4 with early gametogenesis. To our knowledge, MYST4 is the only HAT to be described in cells (elongating spermatids, oocyte, granulosa and theca cells) related to gamete formation in both male and female. The availability of a highly specific and functional antibody will now allow the use of techniques such as pull-down assay and chromatin immunoprecipitation, to identify protein complexes and isolate chromatin target sites associated with MYST4 in transcriptional regulation events in reproductive tissues and

other specific cell types. This antibody will also provide a new tool to study the implication of MYST4 in acute myeloid leukemia (AML).

4.7 METHODS

Unless otherwise stated, all materials were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

4.7.1 Oocyte Recovery and *In Vitro* Embryo Production

The procedures for oocyte recovery and *in vitro* embryo production have been described previously [46]. Using this culture system, more than 30% of inseminated oocytes routinely reached the blastocyst stage. Briefly, cumulus-oocyte complexes (COCs) were recovered from bovine slaughterhouse ovaries, matured in modified synthetic oviduct fluid (SOF) for 24 hrs, then transferred and fertilized in a modified Tyrode lactate medium. Following fertilization, putative zygotes were mechanically stripped of their cumulus cells, washed in PBS and transferred to modified SOF medium for embryo development. The 2-, 4-, 8-, and 16-cell embryos were collected at 36, 48, 72, and 108 hrs post-insemination, respectively, whereas morulae and blastocysts were collected after 6 and 8 d of development. At each stage, all embryos were washed 3 times in PBS, collected in pools of 20, frozen and stored at -80°C until RNA extraction. All oocyte and embryo pools used for RNA extractions were collected and analyzed in triplicates.

4.7.2 RNA Extraction and cDNA Preparation

For oocyte and embryo RNA extraction and cDNA preparation, *GFP* RNA was used as an external control [47,48]. Ten pg of exogenous *GFP* RNA containing a poly-A tail [46] was added to each pool of oocytes and embryos prior to RNA extraction. RNA extractions of the oocyte or embryo pools containing *GFP* RNA were then performed using the PicoPure

RNA isolation kit (Arcturus/Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA) and directly used for cDNA preparation as previously described [46].

Total RNA from bovine tissues was extracted using TriZol Reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. All RNA extracts used were treated with RNase-free DNase (Promega, Nepean, ON, Canada). cDNA synthesis was performed using Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) with 600 ng of total RNA and oligo-d(T)₁₂₋₁₈, as described by the manufacturer.

4.7.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Primers for all the genes analyzed are listed in Table 1 and were designed using bovine sequences when possible, or from a consensus derived from human and mouse sequences. The primers for *MYST4* were designed in a region specific to this variant (Fig. 4.1B), whereas the primers for all-*MYST4*-iso were designed in a downstream area common to all variants (not shown). Real-time PCR was performed on a Lightcycler apparatus (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) using SYBR Green incorporation as previously described [47]. Briefly, for each gene, a standard curve consisting of purified PCR product was included in the run. Each of the PCR reactions was performed using the equivalent of 0.5 oocyte/embryo. The annealing temperatures for each set of primers are listed in Table 1. The PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and sequenced. *GFP* mRNA was used as an external control to account for experimental errors due to techniques involved or materials used for RNA extraction and reverse transcription [46,47].

Standard PCR reactions (*MYST4*, all-*MYST4*-iso and *TUBULIN*) were performed using cDNA equivalent to 1 oocyte or 1 µl of first strand cDNA for somatic tissues, and *Taq* Gold polymerase (Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada) for 35 cycles as described by the manufacturer. For PCR amplification of the *MYST4* complete sequence, the cDNA equivalent to 5 oocytes was used with *Taq* Advantage 2 (Clontech, Mountain View, CA) following the manufacturer's indications.

4.7.4 Western Blotting

Proteins from brain, thymus, muscle, lung, heart, liver, kidney, spleen, testis, ovary, and uterus were extracted on ice in triple lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.02% NaN₃, 0.1% SDS, 1% NP40, 0.5 % deoxycholic acid and protease inhibitors (Roche) as previously described [47]. Bovine oocytes (n=100) were denuded, washed in PBS then frozen at -80 °C. Fifteen µg of each extract or 100 oocytes were lysed in 2x SDS loading buffer containing 6% β-mercaptoethanol at 95 °C for 5 min. Proteins were resolved on standard 6% SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Osmonics, Minnetonka, MN) using a semi-dry transfer apparatus (BioRad, Hercules, CA). Blotted membranes were blocked in TBST (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 125 mM NaCl and 0.1% Tween-20) containing 5% ECL Advance Blocking Agent (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) for 1 hr at room temperature. Membranes were then incubated with a 1:7500 dilution of MYST4 antibody with 3% ECL Advance Blocking Agent in TBST overnight at 4 °C. This purified anti-MYST4 was raised in rabbits against a 15-mer KLH-conjugated peptide (YGGLDGKGAPKYPSC) which is specific to bovine MYST4 (AgriSera AB, Vännäs, Sweden). The membranes were washed 1 x 15min and 4 x 5 min in TBST, then incubated with a peroxidase-conjugated antibody (Molecular Probes, Burlington, ON, Canada) diluted 1:200,000 in TBST-3% ECL Advance Blocking Agent for 45 min. Finally, membranes were washed 4 x 5 min in TBST followed by a 1 x 15 min wash in TBS before the chemiluminescent signal was revealed using ECL Advance Reagent (Amersham). To assess anti-MYST4 specificity, a peptide-blocking assay was carried out following the manufacturer's recommendations. The same protocol was used with the β-ACTIN antibody (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA) and the α-TUBULIN antibody (Sigma). Briefly, 15 µg of each extract were resolved on a 15% gel. A 1:10,000 dilution of β-ACTIN and 1:250,000 of α-TUBULIN antibodies were simultaneously incubated with the blotted membrane before being probed with the peroxidase-conjugated secondary antibody

4.7.5 Immunocytochemistry

Oocytes and embryos used for the immunocytochemistry experiments were obtained using the same method mentioned above. Immature germinal vesicle (GV) oocytes and mature metaphase II (MII) oocytes, 1-, 2-, 4-, 8-, 16-cell embryos, morulae and blastocysts, were fixed and permeabilized on poly-lysine slides as previously described [47] using 2% paraformaldehyde for 30 min at RT. After blocking in TBST-5% milk, the MYST4 antibody (1:1000 in wash solution containing 3% dry milk) was added. The cells were subsequently washed and incubated with a fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) diluted 1:1000 in wash solution with 3% dry milk, washed again and incubated with propidium iodide in PBS (final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 10 min. Negative controls were prepared with either the fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgG or with pre-immune serum derived from the same rabbit that produced the anti-MYST4. To assess anti-MYST4 specificity in oocytes and embryos, a peptide-blocking assay was carried out following the manufacturer's recommendations. The fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgG controls were used to set the background fluorescence.

4.7.6 Immunohistochemistry

Testis and ovary samples were fixed in Bouin fixation solution and mounted in paraffin blocks as described previously [49]. Briefly, non-specific sites were blocked with 1% BSA in PBS. The slides were incubated for 2 hrs at RT in the presence of anti-MYST4 (1:500), and tissue sections were then covered with a goat anti-mouse IgG coupled to biotin for 1 hr at RT. After carefully washing the slide, streptavidin-HRP was deposited on tissues for 30 min at room temperature and the immune complex was then revealed using 3,3'-diaminobenzidine (DAB). The slides were mounted in mowiol (Calbiochem, La Jolla, CA) and observed by light microscopy. For both ovary and testis, negative controls were carried out by peptide-blocking assay following the manufacturer's recommendations.

4.7.7 Statistical Analysis

The level of mRNA for each gene subjected to statistical analysis was normalized using the *GFP* external control [46,47,48]. The value obtained for each gene, within each pool of cDNA, was divided by the value obtained for GFP in the same cDNA pool. Data are presented as mean \pm SEM. Statistically significant differences in mRNA levels between each developmental stage were calculated by protected ANOVA (SAS Institute, Cary, NC), and treatment and replicate were included in the model. Differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ($P < 0.05$).

4.8 AUTHORS' CONTRIBUTIONS

SM designed the experiments, performed most experimental work and wrote the manuscript. GM carried out the immunohistochemistry. CV was involved in the biological sample collection, immunocytochemistry and statistical analysis. PL participated in the interpretation of the immunohistochemistry results. MAS supervised the study and participated in the design of experiments. All authors reviewed and approved the final manuscript.

4.9 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Isabelle Laflamme for her technical expertise. We also acknowledge Dr. Xiang-Jiao Yang and Dr. Jean-François Couture for their critical reading of this manuscript. SM is supported by an NSERC fellowship.

4.10 REFERENCES

1. Y Fan, T Nikitina, J Zhao, TJ Fleury, R Bhattacharyya, EE Bouhassira, A Stein, CL Woodcock, AI Skoultschi: **Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation.** *Cell* 2005, **123**:199-212.
2. J Wu, M Grunstein: **25 years after the nucleosome model: chromatin modifications.** *Trends Biochem Sci* 2000, **25**:619-23.
3. CE Brown, T Lechner, L Howe, JL Workman: **The many HATs of transcription coactivators.** *Trends Biochem Sci* 2000, **25**:15-9.
4. G Orphanides, D Reinberg: **A unified theory of gene expression.** *Cell* 2002, **108**:439-51.
5. PJ Horn, CL Peterson: **Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription.** *Science* 2002, **297**:1824-7.
6. SL Berger: **Histone modifications in transcriptional regulation.** *Curr Opin Genet Dev* 2002, **12**:142-8.
7. JE Brownell, CD Allis: **Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation.** *Curr Opin Genet Dev* 1996, **6**:176-84.
8. ME Christensen, GH Dixon: **Hyperacetylation of histone H4 correlates with the terminal, transcriptionally inactive stages of spermatogenesis in rainbow trout.** *Dev Biol* 1982, **93**:404-15.
9. S Timmermann, H Lehrmann, A Poleskaya, A Harel-Bellan: **Histone acetylation and disease.** *Cell Mol Life Sci* 2001, **58**:728-36.
10. MJ Carrozza, RT Utley, JL Workman, J Cote: **The diverse functions of histone acetyltransferase complexes.** *Trends Genet* 2003, **19**:321-9.
11. XJ Yang: **The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:959-76.
12. N Champagne, NR Bertos, N Pelletier, AH Wang, M Vezmar, Y Yang, HH Heng, XJ Yang: **Identification of a human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein.** *J Biol Chem* 1999, **274**:28528-36.
13. M Carapeti, RC Aguiar, JM Goldman, NC Cross: **A novel fusion between MOZ and the nuclear receptor coactivator TIF2 in acute myeloid leukemia.** *Blood* 1998, **91**:3127-33.
14. I Panagopoulos, T Fioretos, M Isaksson, U Samuelsson, R Billstrom, B Strombeck, F Mitelman, B Johansson: **Fusion of the MORF and CBP genes in acute myeloid leukemia with the t(10;16)(q22;p13).** *Hum Mol Genet* 2001, **10**:395-404.
15. A Murati, J Adelaide, MJ Mozziconacci, C Popovici, N Carbuccia, A Letessier, F Birg, D Birnbaum, M Chaffanet: **Variant MYST4-CBP gene fusion in a t(10;16) acute myeloid leukaemia.** *Br J Haematol* 2004, **125**:601-4.

16. J Borrow, VP Stanton, Jr., JM Andresen, R Becher, FG Behm, RS Chaganti, CI Civin, C Disteché, I Dube, AM Frischauf, D Horsman, F Mitelman, S Volinia, AE Watmore, DE Housman: **The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein.** *Nat Genet* 1996, **14**:33-41.
17. N Pelletier, N Champagne, S Stifani, XJ Yang: **MOZ and MORF histone acetyltransferases interact with the Runt-domain transcription factor Runx2.** *Oncogene* 2002, **21**:2729-40.
18. T Thomas, AK Voss, K Chowdhury, P Gruss: **Querkopf, a MYST family histone acetyltransferase, is required for normal cerebral cortex development.** *Development* 2000, **127**:2537-48.
19. S McGraw, C Robert, L Massicotte, MA Sirard: **Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development.** *Biol Reprod* 2003, **68**:383-9.
20. DE Sterner, SL Berger: **Acetylation of histones and transcription-related factors.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, **64**:435-59.
21. WE Berndson, C Desjardins: **The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis.** *Am J Anat* 1974, **140**:167-79.
22. JL Vizmanos, MJ Larrayoz, I Lahortiga, F Floristan, C Alvarez, MD Otero, FJ Novo, MJ Calasanz: **t(10;16)(q22;p13) and MORF-CREBBP fusion is a recurrent event in acute myeloid leukemia.** *Genes Chromosomes Cancer* 2003, **36**:402-5.
23. TD Merson, MP Dixon, C Collin, RL Rietze, PF Bartlett, T Thomas, AK Voss: **The transcriptional coactivator Querkopf controls adult neurogenesis.** *J Neurosci* 2006, **26**:11359-70.
24. HA LaVoie: **Epigenetic control of ovarian function: the emerging role of histone modifications.** *Mol Cell Endocrinol* 2005, **243**:12-8.
25. LM Salvador, Y Park, J Cottom, ET Maizels, JC Jones, RV Schillace, DW Carr, P Cheung, CD Allis, JL Jameson, M Hunzicker-Dunn: **Follicle-stimulating hormone stimulates protein kinase A-mediated histone H3 phosphorylation and acetylation leading to select gene activation in ovarian granulosa cells.** *J Biol Chem* 2001, **276**:40146-55.
26. LK Christenson, RL Stouffer, JF Strauss, 3rd: **Quantitative analysis of the hormone-induced hyperacetylation of histone H3 associated with the steroidogenic acute regulatory protein gene promoter.** *J Biol Chem* 2001, **276**:27392-9.
27. VL Nelson-DeGrave, JK Wickenheisser, JE Cockrell, JR Wood, RS Legro, JF Strauss, 3rd, JM McAllister: **Valproate potentiates androgen biosynthesis in human ovarian theca cells.** *Endocrinology* 2004, **145**:799-808.
28. T Fair, SC Hulshof, P Hyttel, T Greve, M Boland: **Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles.** *Mol Reprod Dev* 1997, **46**:208-15.
29. E Memili, T Dominko, NL First: **Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos.** *Mol Reprod Dev* 1998, **51**:36-41.
30. JM Kim, H Liu, M Tazaki, M Nagata, F Aoki: **Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis.** *J Cell Biol* 2003, **162**:37-46.

31. T Akiyama, M Nagata, F Aoki: **Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:7339-44.
32. G Schatten, C Simerly, DJ Asai, E Szoke, P Cooke, H Schatten: **Acetylated alpha-tubulin in microtubules during mouse fertilization and early development.** *Dev Biol* 1988, **130**:74-86.
33. J Adjaye, J Huntriss, R Herwig, A BenKahla, TC Brink, C Wierling, C Hultschig, D Groth, ML Yaspo, HM Picton, RG Gosden, H Lehrach: **Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells.** *Stem Cells* 2005, **23**:1514-25.
34. PR Tovich, P Sutovsky, RJ Oko: **Novel aspect of perinuclear theca assembly revealed by immunolocalization of non-nuclear somatic histones during bovine spermiogenesis.** *Biol Reprod* 2004, **71**:1182-94.
35. RE Braun: **Packaging paternal chromosomes with protamine.** *Nat Genet* 2001, **28**:10-2.
36. M Hazzouri, C Pivot-Pajot, AK Faure, Y Usson, R Pelletier, B Sele, S Khochbin, S Rousseaux: **Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases.** *Eur J Cell Biol* 2000, **79**:950-60.
37. ML Meistrich, PK Trostle-Weige, R Lin, YM Bhatnagar, CD Allis: **Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids.** *Mol Reprod Dev* 1992, **31**:170-81.
38. BT Lahn, ZL Tang, J Zhou, RJ Barndt, M Parvinen, CD Allis, DC Page: **Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:8707-12.
39. S Dorus, SL Gilbert, ML Forster, RJ Barndt, BT Lahn: **The CDY-related gene family: coordinated evolution in copy number, expression profile and protein sequence.** *Hum Mol Genet* 2003, **12**:1643-50.
40. Y Doyon, C Cayrou, M Ullah, AJ Landry, V Cote, W Selleck, WS Lane, S Tan, XJ Yang, J Cote: **ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation.** *Mol Cell* 2006, **21**:51-64.
41. P McCullagh, T Chaplin, J Meerabux, D Grenzeliass, D Lillington, R Poulsom, A Gregorini, V Saha, BD Young: **The cloning, mapping and expression of a novel gene, BRL, related to the AF10 leukaemia gene.** *Oncogene* 1999, **18**:7442-52.
42. C Pivot-Pajot, C Caron, J Govin, A Vion, S Rousseaux, S Khochbin: **Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:5354-65.
43. RL Rietze, H Valcanis, GF Brooker, T Thomas, AK Voss, PF Bartlett: **Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain.** *Nature* 2001, **412**:736-9.
44. JB Lian, E Balint, A Javed, H Drissi, R Vitti, EJ Quinlan, L Zhang, AJ Van Wijnen, JL Stein, N Speck, GS Stein: **Runx1/AML1 hematopoietic transcription factor contributes to skeletal development in vivo.** *J Cell Physiol* 2003, **196**:301-11.
45. T Katsumoto, Y Aikawa, A Iwama, S Ueda, H Ichikawa, T Ochiya, I Kitabayashi: **MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells.** *Genes Dev* 2006, **20**:1321-30.

46. C Vigneault, S McGraw, L Massicotte, MA Sirard: **Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition.** *Biol Reprod* 2004, **70**:1701-9.
47. S McGraw, C Vigneault, K Tremblay, MA Sirard: **Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development.** *Mol Reprod Dev* 2006, **73**:692-9.
48. S McGraw, C Vigneault, MA Sirard: **Temporal expression of factors involved in chromatin remodeling and in gene regulation during early bovine in vitro embryo development.** *Reprod* 2007, **Under Press.**
49. G Morin, C Lalancette, R Sullivan, P Leclerc: **Identification of the bull sperm p80 protein as a PH-20 ortholog and its modification during the epididymal transit.** *Mol Reprod Dev* 2005, **71**:523-34.

FIGURES

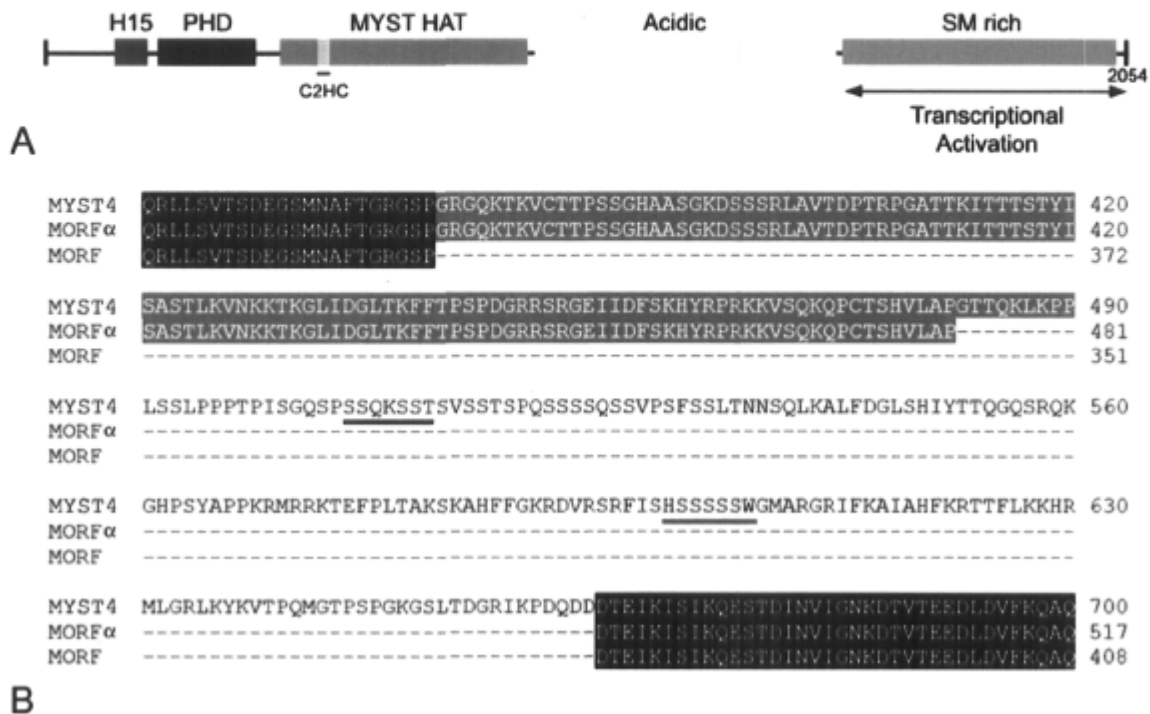


Figure 4.1 - Representation of Bovine MYST4.

A) Domain organization of MYST4. H15, linker histones H1- and H5-like domain; PHD, plant homeodomain zinc finger; C2HC, zinc finger; MYST HAT, conserved HAT domain characteristic of MYST family members; Acidic, glutamate/aspartate-rich region; SM-rich, serine/methionine-rich domain. MYST4 is composed of 2054 residues in which the N-terminal region and the SM-rich domain encode transcriptional repression and activation domains respectively. B) Schematic illustration of MYST4 showing the alternative MYST4 splicing variants MORF and MORF α . Conserved regions between either 2 or 3 sequences are highlighted in gray and black respectively. Regions used for *MYST4* primer designs are underlined in blue (forward) and in red (reverse). The number of residues in each sequence is indicated on the right. (Accession numbers: MYST4; [GenBank;XM_867653], MORF; [GenBank;XM_615480], MORF α ; [GenBank;XM_880818])

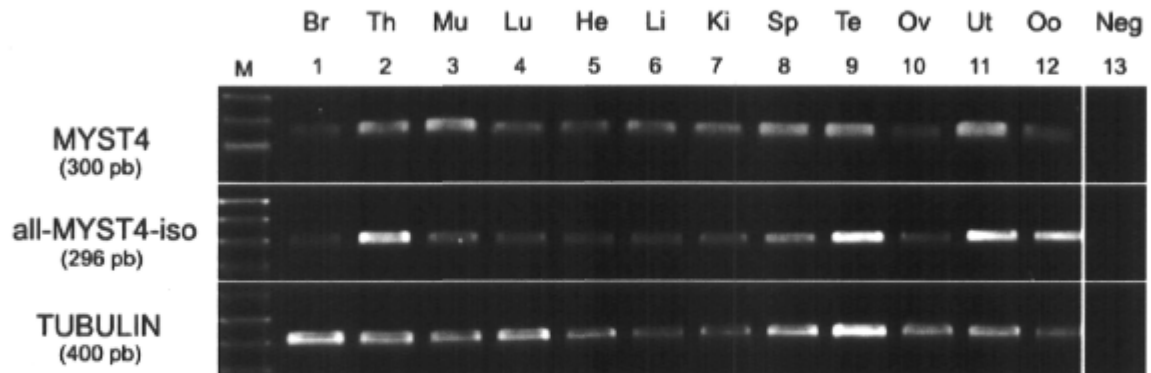


Figure 4.2 - RT-PCR analysis of MYST4 mRNA.

Bovine *MYST4* and all-*MYST4*-iso mRNA expression was investigated in different tissues. From left to right, Br, brain; Th, thymus; Mu, muscle; Lu, Lung; He, heart; Li, liver; Ki, kidney; Sp, spleen; Te, testicle; Ov, ovary; Ut, uterus; Oo, germinal vesicle stage oocytes; Ne, PCR negative control. Amplification of *TUBULIN* is shown as an internal control.

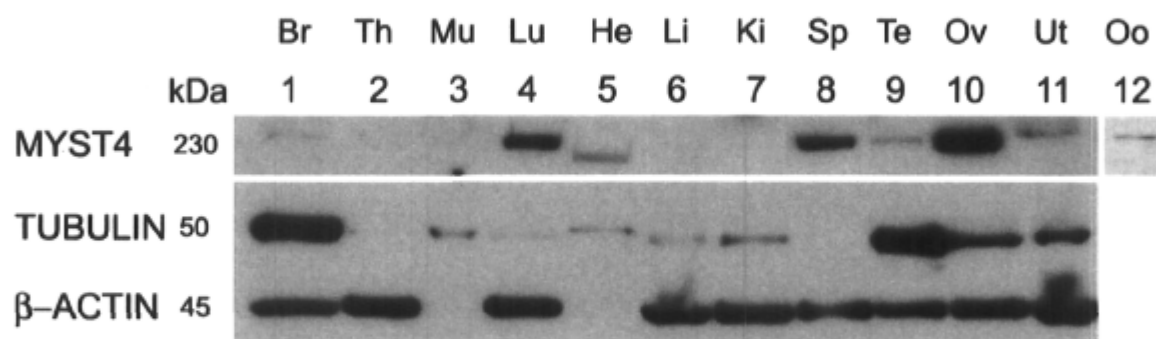


Figure 4.3 - Western blot analysis of MYST4 protein.

Protein extracts were subjected to SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose before being probed with an anti-bovine MYST4. From left to right, Br, brain; Th, thymus; Mu, muscle; Lu, Lung; He, heart; Li, liver; Ki, kidney; Sp, spleen; Te, testicle; Ov, ovary; Ut, uterus; Oo, germinal vesicle stage oocytes. TUBULIN and β -ACTIN antibodies were incubated simultaneously on the same membrane and were used as control.

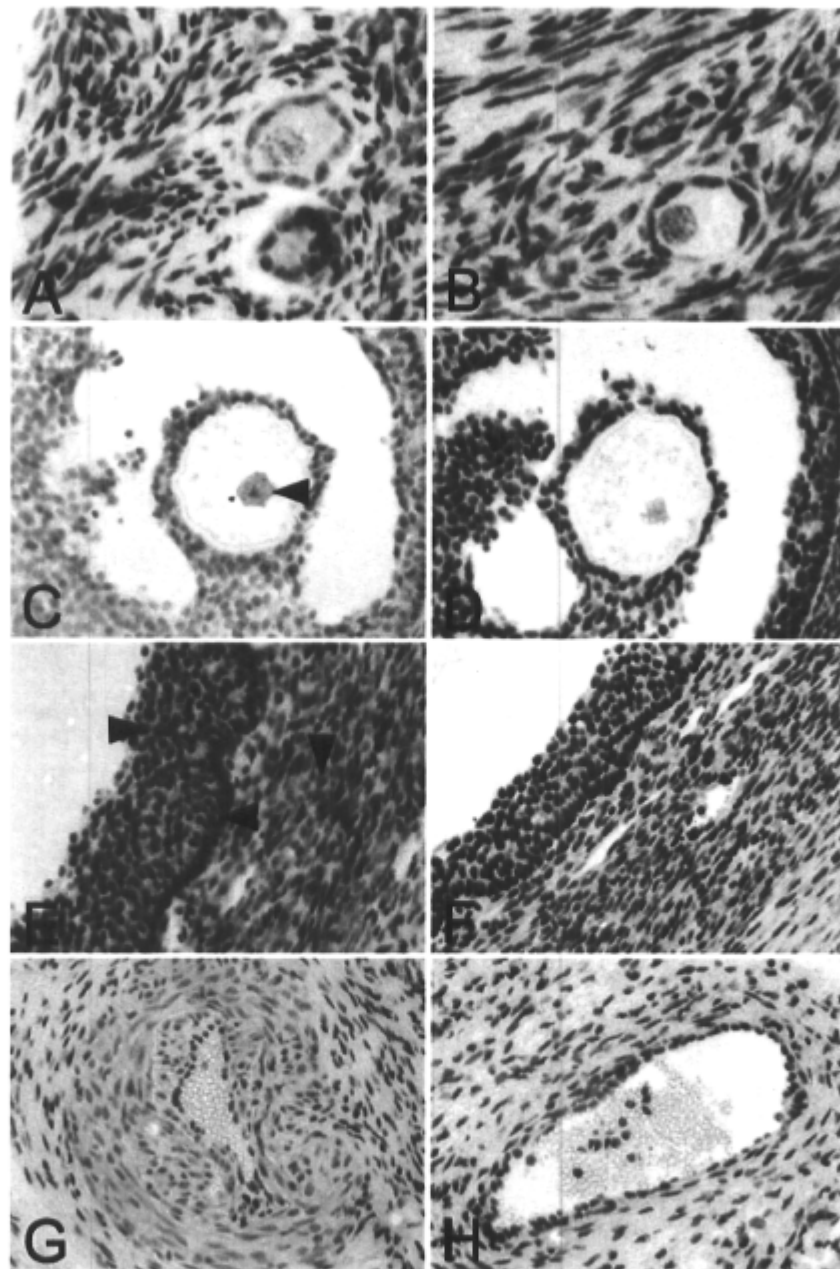


Figure 4.4 - Ovarian localization of MYST4 protein by immunohistochemistry.

Ovarian sections showing: primordial follicles (A, B); antral stage follicle, arrowhead showing oocyte nuclei (C, D); portion of large antral follicles, arrowheads indicating granulosa cells (right), theca (down) and basal lamina (left) (E, F) and blood vessels (G, H). Positive sections were incubated with anti-MYST4 (A, C, E, G,) and negatives were prepared by peptide-blocking assay (B, D, F, H). Original magnifications: 200x (C, D, E, F, G, H) and 400x (A, B).

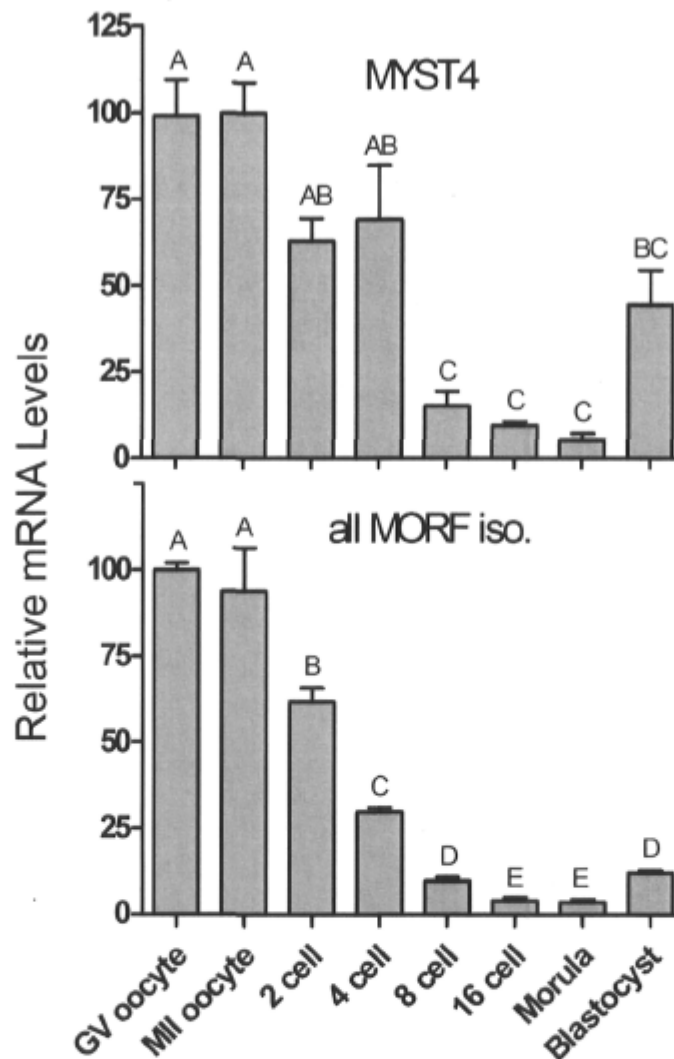


Figure 4.5 - Quantification of MYST4 and all-MYST4-iso in bovine oocytes and early embryos using real-time RT-PCR.

Each developmental stage was analyzed in triplicate using 0.5 oocyte or embryo per reaction. The relative mRNA levels shown represent the quantity of transcript corrected for the *GFP* value obtained for each pool. The highest level was attributed the relative value of 100. Shown is the relative mRNA abundance (mean \pm SEM). Different letters indicate a significant difference of relative mRNA abundance ($P < 0.05$).

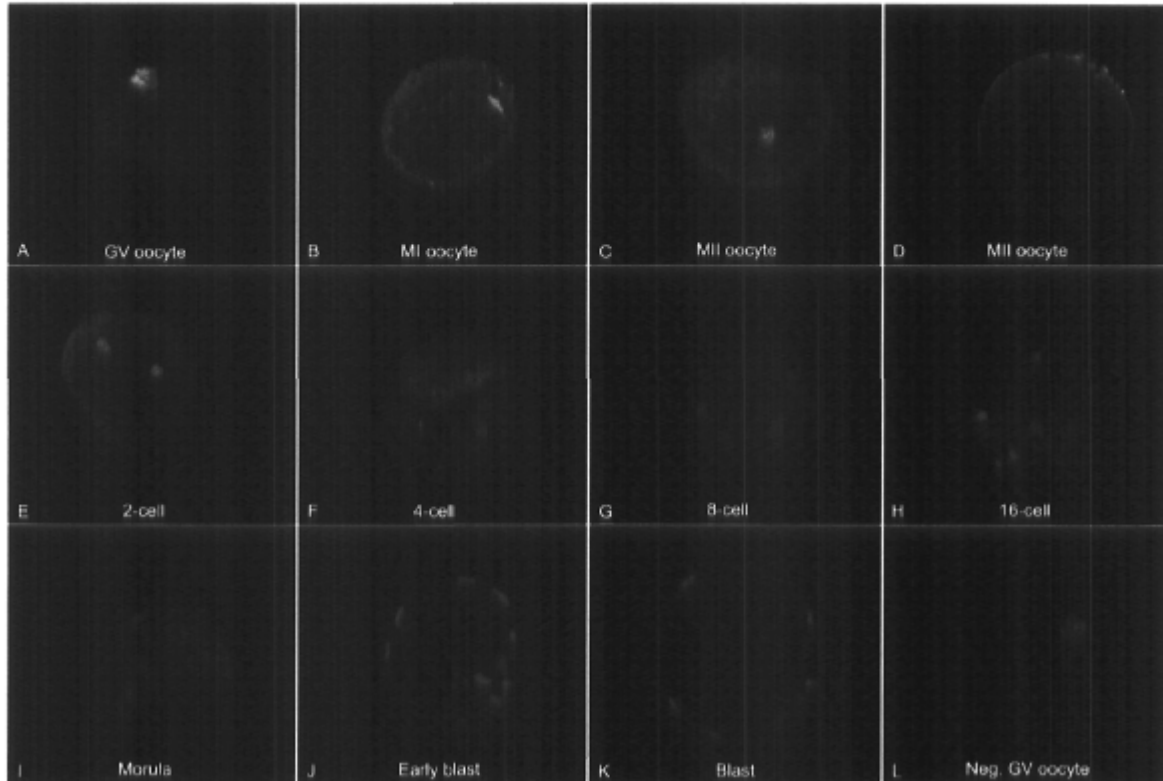


Figure 4.6 - Localization of MYST4 in oocyte and early embryo development.

Confocal representation of oocytes (GV, MI and MII) or embryos (2-, 4-, 8-, 16-cell, morula, early blastocyst and blastocyst) stained with an anti-MYST4 antibody (green signal) and with propidium iodide (red signal) to visualize the DNA. Original magnification 600x.

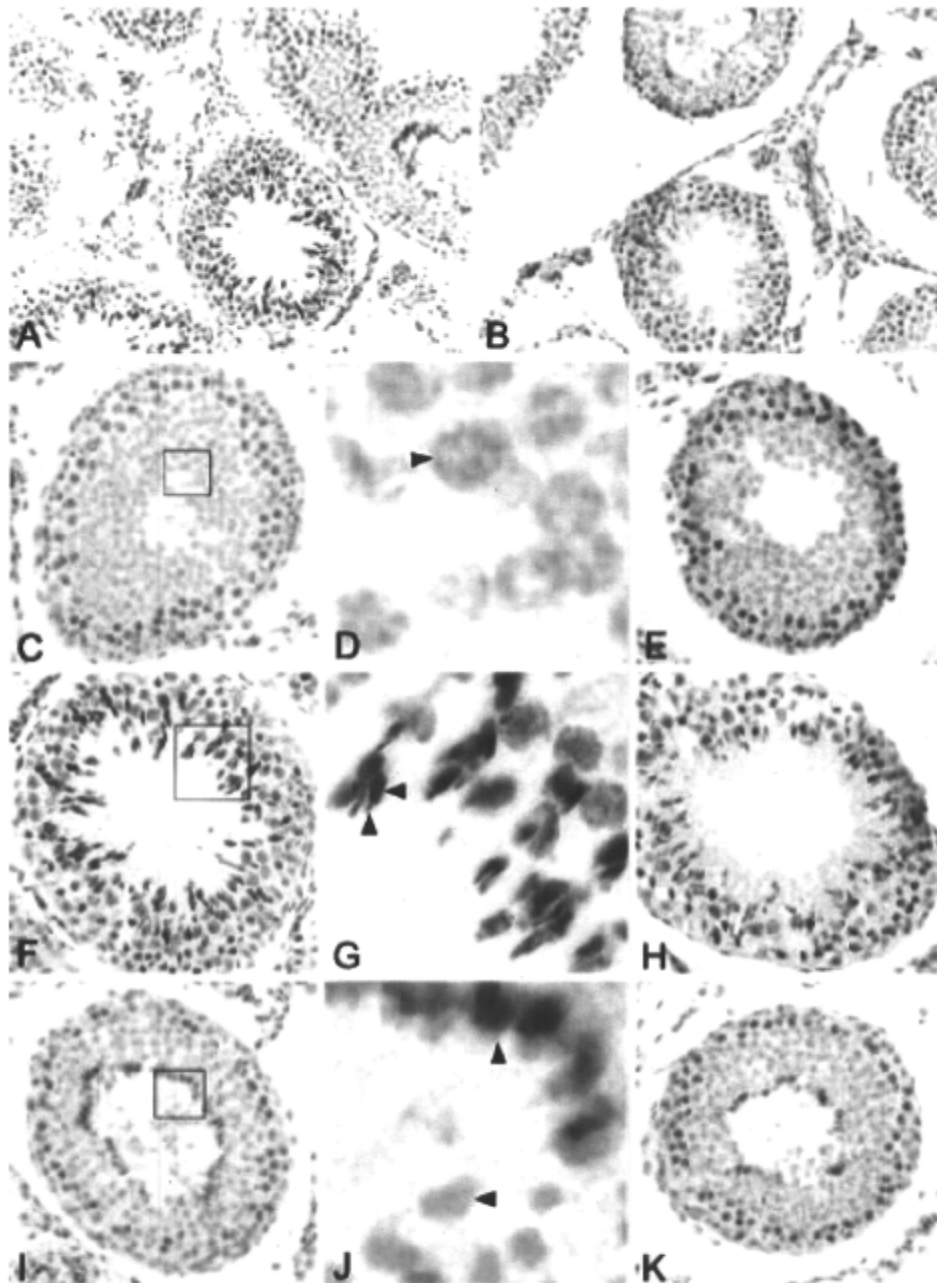


Figure 4.7 - Testicular localization of MYST4 protein by immunohistochemistry. Testicular sections showing seminiferous tubules (A, B), containing mostly: primary spermatocytes and round spermatids (C, D, E), round spermatids and elongating spermatids (F, G, H), round spermatids and elongated spermatids (I, J, K). Images D, G, K are enlargements of boxed sections in C, F, I respectively. In magnified sections, arrowheads indicate: round spermatocyte (D), nucleus (left) and tail (up) of an elongating spermatid (G) and nuclei of elongated spermatids located in inner (up) wall and inside (left) of the lumen (J). Positive sections were incubated with anti-MYST4 (A, C, D, F, G, I, J) and negatives were prepared by peptide-blocking assay (B, E, H, K). Original magnification 1000x (A, B).

Table

Table 1 -Primers used for RT-PCR experiments.

Gene	Primer sequences	Accession numbers	PCR products (bp)	T _M (°C)
<i>MYST4</i> (complete sequence)	Up 5'-ATGTTCTTTCACCCGAATGC-3' Low 5'-AAATAAATGGTGCCAACAAATG-3'	AF119231 NM_017479	6590	55
<i>MYST4</i>	Up 5'-AGTTCACAAAAGTCCAGCAC-3' Low 5'-GCTAGAGGAGGAGGAGTGAG-3'	AF119231 XM_880782	300	60
all- <i>MYST4</i> -iso	Up 5'-ACCTTCAGCCTTGCCAAACTG-3' Low 5'-TCTTTGGCTGTGAGAGATGC-3'	AF119231	296	60
<i>TUBULIN</i>	Up 5'-CTCTGCTGAGAAAGCCTACCA-3' Low 5'-CCACGTACCAGTGAACAAAGG-3'	BC018948	400	60

5 CHAPITRE # V : Caractérisation de l'histone H1FOO pendant le développement embryonnaire in vitro bovin.

**Serge McGraw, Christian Vigneault, Karine Tremblay
et Marc-André Sirard**

Cet article a été publié dans la revue "**Molecular Reproduction and Development**" sous la référence suivante: McGraw S, Vigneault C, Tremblay K, Sirard MA. Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. Mol Reprod Dev. 2006 Jun;73(6):692-9

5.1 RÉSUMÉ

Afin de comprendre l'implication potentielle de l'histone H1 ovocyte spécifique (H1FOO) dans la modulation de la chromatine, nous avons étudié ses profils d'ARNm et de protéine dans l'ovocyte et pendant le développement embryonnaire bovin précoce. Les plus hauts niveaux d'ARNm pour H1FOO ont été retrouvés dans l'ovocyte immature, pour ensuite diminuer de façon constante dans les stades de développement subséquents avant de devenir quasi absents après le stade 8-cellules. Les analyses d'immunocytochimie ont révélé que dans les ovocytes immatures et matures, ainsi que dans les embryons 1-, 2- et 4-cellules, H1FOO est cytoplasmique et nucléaire. Dans le cytoplasme, la protéine était distribuée uniformément, alors que dans le noyau on ne la retrouvait qu'au niveau de la chromatine. Dans les embryons 8- et 16-cellules, l'intensité de H1FOO diminuait uniquement dans le cytoplasme. Cependant, dans les stades morula et blastocyste, la protéine était totalement absente. Par sa position sur la chromatine, H1FOO pourrait non seulement être impliquée dans la conformation de la chromatine, mais pourrait aussi participer dans l'activation et la répression de gènes durant l'ovogénèse ainsi que dans le développement embryonnaire précédant l'activation du génome de l'embryon.

5.2 ABSTRACT

Linker histones H1 are involved in various mechanisms, such as chromatin organization and gene transcription. In different organisms, a unique subtype can be found in the oocyte, however its function remains unclear. To assess the potential involvement of this oocyte linker histone (*HIFOO*) in chromatin modulation, we have cloned and sequenced the bovine *HIFOO* cDNA and followed its mRNA profile by quantitative RT-PCR in the oocyte and throughout bovine early embryo development. The highest level of mRNA was found in the germinal vesicle (GV) oocyte and diminished constantly throughout embryo development. In the 16-cell embryo and blastocyst, respectively, the mRNA levels were 200 and 2000 times lower than in the GV oocyte. A specific antibody raised against bovine HIFOO was used to establish protein distribution in the oocyte and preimplantation embryo by immunocytochemistry. In the GV and metaphase II (MII) oocyte, as well as in the 1-, 2- and 4-cell embryo, HIFOO was localized in the cytoplasm and nucleus. The protein was uniformly spread within the cytoplasm, while it was concentrated onto the chromatin in the nucleus. In the 8- to 16-cell embryo, HIFOO's presence diminished in the cytoplasm, although it was still strongly expressed in nucleus. In the morula and blastocyst stages, the protein was totally lacking. By its position on chromatin, HIFOO could not only be involved in chromatin conformation but could also participate in activation or repression of genes during oogenesis and embryo development before embryonic genome activation.

5.3 INTRODUCTION

The involvement of histones in chromosome formation has been well described throughout the years. The bead-on-a-string model involving double-stranded DNA winding around nucleosomes is composed of the core histones H2A, H2B, H3 and H4, which creates the first level of compact chromatin. Then, the linker histone H1 interacts with the nucleosomes to cause the beads-on-a-string structure to coil into a higher order chromatin organization. For the most part, the expression of histone genes is associated with DNA synthesis and is controlled by specific transcriptional and post-transcriptional mechanisms. (Reviewed in Meshi et al. 2000). Despite the fact that histone proteins remain particularly conserved throughout evolution, various subtypes with significant sequence divergence can be observed between species.

Among the histone groups, members of the linker histone H1 protein family are the most divergent in their amino acid sequences. Various cell type and stage-specific variants of the linker histone H1 have been described and members include: the somatic variants H1s (H1a to H1e), the replacement variant H1^o and the germ cell variants H1t and H1FOO. This substantial diversity found inside the linker H1 family is unclear, but these variants reveal distinct profiles of expression throughout the differentiation and development stages (Khochbin 2001, Tanaka et al. 2001).

Linker histones are not only the structural proteins described earlier, they can also act as both specific repressors and activators of transcription (Sera and Wolffe 1998). Some even suggest that linker histone H1 could have a dual action mechanism, firstly by an overall repression of gene expression conferred by its higher order folding and stabilization capability, and secondly, by influencing the expression of specific genes by means of linker histone-nucleosome interaction (Georgel and Hansen 2001). To explore the *in vivo* role of individual H1s in mammalian development, double knockout mice for H1c/H1^o, H1d/H1^o and H1e/H1^o were generated (Fan et al. 2001). These mice developed and reproduced normally, and their chromatin revealed no significant changes in the ratio of H1 to nucleosomes, suggesting there is redundancy of function among somatic histone H1.

Although individual somatic subtypes of linker histone appear dispensable for cell survival, little is known about the functional role of the oocyte-specific H1FOO. In a number of organisms, substitution of the linker H1 subtypes during oogenesis and embryogenesis has been extensively documented. The sea urchin cleavage stage histones H1 (*cs-H1*) are synthesized during oogenesis and in the mature egg, where they form a large maternal pool. Levels are at the highest in the ovary, diminishing slightly in the egg and remaining constant thereafter up to 128-cell blastula embryo, where after it is rapidly degraded (Mandl et al. 1997). The histone B4 (or H1M) found in the frog is also a developmentally regulated linker histone whose presence is restricted to oogenesis and early embryogenesis (Smith et al. 1988). During oogenesis, *Xenopus* B4 emerges on the chromatin. It will remain there through the MBT (midblastula transition) where somatic histones variants are gradually accumulated to replace B4 within embryonic chromatin before the end of gastrulation (Dimitrov et al. 1993; Hock et al. 1993; Dworkin-Rastl et al. 1994).

In 2001, an oocyte linker histone H1 (*H1foo*), homologue to *cs-H1* and to *B4*, was discovered in the mouse (Tanaka et al. 2001). The linker *H1foo* mRNA is detectable in the mouse primary oocyte, and decreases after fertilization until disappearing at the 8-cell stage embryo, while the protein is present in the oocyte and disappears after the 2-cell stage embryo (Tanaka et al. 2001). Like *cs-H1* and *B4*, it is probably polyadenylated, judged by the consensus adenylation sequence signal present in its 3' untranslated region (UTR) (Tanaka et al. 2001). The *cs-H1*, *B4* and *H1foo* are maternally controlled in the early stages of embryo development and their disappearance occurs when the zygotic genome is being activated at the maternal-zygotic transition/midblastula transition (MZT/MBT). Since the discovery of H1FOO, it has been proposed that chromatin in the mammalian oocyte is composed of a mixture of H1FOO, H1c, and H1⁰, with H1FOO being the predominant linker histone at this stage (Fu et al. 2003).

We presume that other mammals should also express this gene, since it is also present in human oocytes (Tanaka et al. 2003). Thus far, the unique and specific involvement of mouse H1FOO in the oocyte and in early embryo development remains unclear. Previous

studies in the bovine have not revealed a histone H1FOO, but instead have observed an absence of somatic histone up to the 8-cell to 16-cell stage, when the MZT occurs (Smith et al. 1995). When nuclei expressing somatic H1 subtypes are fused with a bovine enucleated oocyte, immunoreactive H1 disappears rapidly and reappears only in the 8-cell to 16-cell stage embryo (Bordignon et al. 1999). Taken together, these studies indicate that a special type of linker histone is found during the period where minimal embryonic genome transcription occurs, when translation is mainly limited to maternal genes and when methylation patterns are being re-established. This evidence points towards a particular role of these special linker histones and a requirement to increase our efforts to understand it.

On this basis, our first objective was to validate if an oocyte-specific linker histone was present on the chromatin of the bovine oocyte. Our second objective was to explore the presence of H1FOO throughout early bovine embryo development and especially during embryonic genome activation where the somatic H1 are being incorporated onto the chromatin.

5.4 MATERIALS AND METHODS

All materials were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated.

5.4.1 Oocyte Recovery and In Vitro Embryo Production

The procedures for oocyte recovery and in vitro embryo production have been described previously (Vigneault et al. 2004). Using this culture system, over 30% of oocytes typically developed to the blastocyst stage. Briefly, bovine ovaries were collected in a commercial slaughterhouse and harvested for cumulus-oocyte complexes (COCs). Selected COCs were vortexed and then washed in a PBS solution to remove all cumulus

cells. Groups of 40 GV oocytes were then frozen and stored at -80°C until RNA extraction. Throughout in vitro embryo production, oocytes or embryos were cultured in 50 μL droplets of stage-appropriate mediums under mineral oil. Groups of 10 COCs were matured in modified synthetic oviduct fluid (SOF) for 24 h. Groups of 40 MII oocytes were denuded, washed in PBS, and stored at -80°C until RNA extraction. For in vitro fertilization, groups of 5 MII COCs were added to modified Tyrode lactate and cultured for 15-18 h. Following fertilization, presumptive zygotes were mechanically denuded by repeated pipetting, washed in PBS and transferred per group of 25-30 in modified SOF medium for embryo development. The 2-, 4-, 8-, 16-cell embryos were collected 36 h, 48 h, 72 h and 108 h post fertilization, respectively, and morulae and blastocysts were collected after 6 and 8 d of development. All were washed 3 times in PBS, collected in pools of 40, frozen and stored at -80°C until RNA extraction. To identify embryos of superior quality, all collected embryos used for the RNA extractions were derived from populations of embryos that had cleaved at 36 h post fertilization. All oocyte and embryo pools used for RNA extractions were collected and analyzed in triplicates.

5.4.2 RNA extraction and cDNA preparation

One pg of exogenous *GFP* RNA containing a poly-A tail (Vigneault et al. 2004) was added to each pool of oocytes and embryos before RNA extraction as an external control. Subsequently, the RNA extractions for pools of oocytes or embryos containing *GFP* RNA were performed using the Absolutely RNA™ Microprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The RNA was precipitated and used for cDNA preparation as previously described (Vigneault et al. 2004).

5.4.3 5' RACE and 3' RACE

Denuded GV stage oocytes were used to generate one 5' (1350 oocytes) and one 3' (400 oocytes) RACE cDNA (RLM-RACE) using the GeneRacer™ Kit version J (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Before RACE cDNA preparation, RNA extraction and precipitation was performed as referred to in the “RNA extraction and cDNA preparation”

section of this manuscript, but without the exogenous *GFP* RNA spiking. After RNA extraction, recommendations from the manufacturer were followed to produce the 5' and the 3' RACE cDNA. PCR amplifications were performed as described in the GeneRacer instruction manual using AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) amplification enzyme and *HIFOO* specific primers for 5' and 3' RACE (5'-AGATACCAAGGCCACAGGAAAAC-3', 5'-GGTATCTGCTTGGCGGCTCCCTCTT-3') and for 5' and 3' nested RACE PCR (5'-TGGCATCCCCACCAAGTCTTCAG-3', 5'-CCTTCTTTGACTCACTCGGCTTCT). The PCR reactions were executed on a PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Waltham, MA, USA) and conditions were: 1 denaturation cycle of 10 min at 95°C; 35 PCR cycles (Denaturation: 95°C for 1 min, Annealing: 55°C for 1 min, Extension: 72°C for 3 min) and 1 extension cycle for 10 min at 72°C. The PCR products were migrated on 1% agarose gel and the expected band was cut out of the gel and purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Mississauga, ON, CAN). Purified products were cloned into pGEM T easy vector (Promega, Madison, WI, USA) and sequenced.

5.4.4 Quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR)

The primers for histone *HIFOO* (5'-GCCGAGTGAGTCAAAGAAGG-3', 5'-GGTGACCGTGGATTTTGAAC-3') were designed from the complete bovine cDNA sequence (GenBank accession # DQ206443) obtained by 5' and 3' race and the primers for *GFP* (5'-GTAAACGGCCACAAGTTCAG-3', 5'-CACACCACAGAAGTAAGGTTCC-3') were designed from Cloning vector phGFP-S65T, complete sequence (GenBank accession # U43284). Real-time PCR was executed on a Lightcycler apparatus (Roche Diagnostics, Laval, QC, CAN) using SYBR green incorporation. For the two genes examined, *HIFOO* and *GFP*, a standard curve consisting of PCR products purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and quantified with a spectrophotometer, was included in the run. Each of the PCR reactions were performed using the equivalent of 1 oocyte/embryo, 0.25 µM of each primer, 3 mM MgCl₂ and 2 µL of Master SYBR Green mix (Roche). Standard PCR conditions for the Lightcycler (Roche) were used (McGraw et al. 2003; Vigneault et al. 2004). The annealing temperatures for *HIFOO* and *GFP* primers,

respectively, were 57°C and 59°C. The real-time PCR product specificity was confirmed by analysis of the melting curve given by the Lightcycler software (Roche). The PCR products were migrated on agarose gel electrophoresis and then sequenced.

The *GFP* external control was used to compensate for experimental errors caused by the technique or the materials used for the RNA extraction, precipitation and reverse transcription (Vigneault et al. 2004). This *GFP* exogenous control was preferred over rabbit globin mRNA (Temeles et al. 1994; De Sousa et al. 1998; Wrenzycki et al. 1999) because of impurities and mRNA contaminants possibly found in commercially available globin mRNA (stated by manufacturer). First we quantified by Q-PCR the exogenous *GFP* in each of the developmental pools. The sample showing the highest *GFP* level was designated as the reference pool. Then, each *GFP* value obtained for each pool (21 in total) was divided by the reference pool value to obtain a correction factor for that single pool. The Q-PCR value obtained for *HIFOO* in each pool was then divided by the correction factor calculated for that specific pool.

5.4.5 Western blotting

Proteins from heart, liver, lung and uterus, were extracted on ice by sonication in triple lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.02% NaN₃, 0.1% SDS, 1% NP40, 0.5 % deoxycholate acid and protease inhibitor (Roche)). The extracts were centrifuged at 13000 rpm at 4°C, the supernatants were retained and kept at -80°C. Bovine oocytes (n=100) were denuded and washed in PBS before being frozen at -80°C. Extracts were resolved on standard 12% SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Osmonics, Minnetonka, MN, USA) using a semi-dry transfer apparatus (BioRad, Hercules, CA, USA). Blotted membranes were blocked in a Tris-buffered saline solution with Tween (TBST) (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 125 mM NaCl and 0.05% Tween) containing 5% non-fat dry milk for 1 h at room temperature. Membranes were washed 4 x 5 min in TBST, then incubated with 1:15000 dilution of HIFOO antibody in 3% milk TBST solution for 1 h 30 min. This anti-HIFOO was raised in rabbits against a 15-mer peptide (CSVSKAASKKAEAEAG) KLH conjugated which is specific to the bovine histone

H1FOO (Agrisera, Sweden). The membranes were washed 1 x 15min and 4 x 5 min in TBST, then incubated with a peroxidase conjugated antibody (Molecular Probe, Burlington, ON, CAN) diluted in a 1:15000 working solution in 3% milk TBST for 1 h. Finally, membranes were washed 4 x 5 min in TBST followed by a 1 x 15 min wash in distilled water before the chemiluminescent signal was revealed using ECL reagent (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)

5.4.6 Immunolocalization

Oocytes and embryos used for the immunocytochemistry experiments were obtained using the same method mentioned above. GV and MII stage oocytes, 1-, 2-, 4-, 8-, 16-cell embryos, morula and blastocysts, were fixed and permeabilized on poly-lysine slides in 4% paraformaldehyde for 30 min at 37°C. Fixed samples were then washed 3 times for 5 min under continuous agitation with a TBS solution containing 0.1% Tween. The slides containing the fixed and permeabilized oocytes/embryos were kept at 4°C in PBS containing 0.1% sodium azide until immunocytochemistry procedures. Slides containing the fixed oocytes/embryos were rinsed with the wash solution (TBS with 0.5% Triton X-100), then incubated with the blocking solution (wash solution with 5% skim milk) for 1h. The H1FOO antibody was added (1:6000) in wash solution with 2% skim milk. The cells were then washed 3 times for 15 min, followed by incubation with a fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) diluted 1:1000 in wash solution with 2% skim milk. Fixed cells were washed three times for 10 min and then Propidium Iodide was added in PBS (final concentration of 100 µg/mL) for 10 min. The cells were washed twice for 10 min in TBST and mounted in mounting medium onto glass slides. Negative controls were prepared with either the fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgG, or with preimmune serum derived from the same rabbit that produced the anti-H1FOO. To assess anti-H1FOO specificity in the GV oocyte, a peptide blocking assay was carried out following the manufacturer recommendations. The fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgG controls were used to set the background fluorescence.

5.4.7 Statistical analysis

The level of *HIFOO* mRNA subjected to statistical analysis was normalized using the *GFP* external control as described previously. Data are presented as mean \pm SEM. Statistically significant differences in the mRNA level between each developmental stage were calculated by protected ANOVA (SAS Institute, Cary NC), and treatment and replicate were included in the model. Least significant differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ($P < 0.05$).

5.5 RESULTS

5.5.1 Bovine HIFOO Sequence

Given that *HIFOO* was still uncharacterized in the bovine, primers for PCR amplification were designed accordingly by the consensus between human and mouse *HIFOO* cDNA sequences. The primers were designed in the globular domain, which is established as the most conserved region of the oocyte-specific linker histone protein for many species (Tanaka et al. 2003). After uncovering a partial sequence for bovine *HIFOO*, specific primers were generated for 5' and 3' RACE PCR. The complete cDNA sequence was obtained revealing an open reading frame coding region of 1032 base pairs. This sequence encodes for a protein of 35.4 kDa that is composed of 344 amino acids, with an isoelectric point (pI) of 10.85. In length, bovine HIFOO is longer than its homologue found in the mouse, which is composed of 304 amino acids (915bp) for a total mass of 34 kDa. Human HIFOO is longer than the other two, its open reading frame codes for a 347 amino acid protein of 35.8 kDa (Tanaka et al. 2003). Analysis of bovine HIFOO in the 3'UTR (not shown), reveals a polyadenylation hexanucleotide sequence (AAUAAA) which is required for cytoplasmic polyadenylation and a deadenylation element (AUUUA), shown to control deadenylation (Voeltz and Steitz 1998).

Homology studies of the protein sequence using GeneStream ALIGN (Pearson 1997) uncovered 55.6% identity with the human HIFOO and 41.1% identity with mouse HIFOO,

whereas the human H1FOO protein shares only 42.3% homology with mouse H1FOO (Tanaka et al. 2003). However if the same analysis is confined to the globular domain (Fig. 5.1: from aa 59 to aa 128), bovine H1FOO protein displayed 82.9% and 74.3% homology to human H1FOO and mouse H1FOO, respectively. We also attempted to establish a consensus sequence between the 3 species, however only the globular domain (from aa 59 to aa 128) remained strongly (71.4%) homologous between species (Fig. 5.1).

5.5.2 H1FOO mRNA Levels

H1FOO mRNA levels was monitored throughout early embryo development, from the GV oocyte to the blastocyst (Fig. 5.2). Using the equivalent of a single oocyte or embryo per reaction, we were able to detect *H1FOO* transcripts in each of the developmental stages examined. The highest levels of transcripts were established in the GV oocyte. Significant *H1FOO* mRNA was lost during oocyte maturation as the MII oocyte conserves only 59% of the initial quantity of mRNA found at the GV stage. There was a constant decline throughout development to the 8-cell embryo. The relative mRNA levels compared to the initial amount found in the GV oocyte fell to 41%, 28% and 7% in the 2-, 4- and 8-cell embryos, respectively. As for the 16-cell embryo and blastocyst, *H1FOO* could still be detected, although the quantity plunged dramatically. *H1FOO* transcripts were 200 and 2000 times less abundant in the 16-cell embryo and blastocyst, respectively, compared to the levels found in the GV oocyte.

5.5.3 H1FOO Protein Distribution

In order to characterize the distribution of H1FOO in bovine early embryo development, a specific antibody against H1FOO was raised according to the bovine H1FOO sequence. To establish the antibody specificity, a western blot of different bovine tissues was carried out (Fig. 5.3). In all the tissues probed with the antibody, H1FOO was only detected in the oocyte. No H1FOO cross-reactivity was detected in protein extracted from granulosa cells, heart, liver, lung and uterus. The single and sharp band detected in the oocytes was established at 36kDa, which corresponds to the theoretical molecular weight of 35.4kDa.

5.5.4 H1FOO Immunolocalization

To assess the localization of histone H1FOO protein in the bovine oocyte and embryo, immunolocalization experiments were conducted. First we evaluated the specificity of our antibody (Fig. 5.4). Anti-H1FOO displayed staining in both the cytoplasm and the nucleus of GV oocytes (Fig. 5.4a). To determine if this localization was specific, different negative controls were prepared. Hybridization of GV oocytes with only the second antibody (Fig. 5.4b), the peptide blocking assay (Fig. 5.4c) or the rabbit preimmune serum showed no signal, thus revealing that the staining present in the GV oocyte with the anti-H1FOO was specific. Then we defined the protein localization profile for H1FOO in the unfertilized bovine oocyte and throughout the preimplantation embryo development (Fig. 5.5). In the GV oocyte (Fig. 5.5a), H1FOO was strongly expressed in the germinal vesicle of the preovulated oocyte and uniformly distributed in the ooplasm. In the *in vitro* matured MII oocyte (Fig. 5.5b), H1FOO was still distributed throughout the ooplasm and on the condensed chromosomes; in addition its presence was brightly marked on the first polar body. Following fertilization, the oocyte pronucleus and the second polar body of the 1-cell embryo (Fig. 5.5c) intensely expressed H1FOO, while the protein was still evenly distributed throughout the embryo cytoplasm. Similar to the 1-cell embryo, the 2- and 4-cell embryos (Fig. 5.5d,e) expressed H1FOO on both the chromatin and cytoplasm. In the 2-cell embryo, the polar body was still expressing H1FOO (not shown). Further along embryo development, in the 8- to 16-cell embryo (Fig. 5.5f,g), H1FOO's presence diminished in the cytoplasm, although it was still strongly associated with the chromatin. In the morula (Fig. 5.5h) embryo and at the blastocyst (Fig. 5.5i) stage protein levels were below the detection limit.

Because this investigation was accomplished using *in vitro* cultured embryos, we are aware that the mRNA and protein profiles for H1FOO could differ somewhat from *in vivo* derived embryos. Expression patterns of individual genes have been found to be affected by *in vitro* culture conditions (Lonergan et al. 2003).

5.6 DISCUSSION

The observations described in this study demonstrate that H1FOO is present in the bovine oocyte and throughout early *in vitro* embryo development. In several respects, the bovine *H1FOO* gene described here is similar to the histone *H1FOO* found in the mouse and human.

Like both human and mouse *H1FOO*, the bovine counterpart also contains in its 3'UTR the polyadenylation hexanucleotide sequence (AAUAAA), which is required for cytoplasmic polyadenylation. Cytoplasmic polyadenylation, is known to regulate maternally stored mRNA by inducing translation through the increase of their poly(A) tail length during oocyte maturation (Reviewed in de Moor et al. 2005). There was also a deadenylation element (AUUUA) found in the 3'UTR of *H1FOO* of the three mammalian species, human, mouse and bovine. This element, first considered as a promoter of RNA degradation in several systems (Chen and Shyu 1995), has been shown to control deadenylation during *Xenopus* early embryo development (Voeltz and Steitz 1998). However, in culture cells deadenylation is known to precede mRNA decay (Chen and Shyu 1995). These 3'UTR elements found in *H1FOO* are not present in the other H1 variants, and thus are most probably involved in the control of H1FOO gene expression in oocytes and early embryos. The gene expression of the somatic *H1* members is normally controlled by an RNA hairpin element (or stem-loop) in the 3'UTR region of histone mRNA (Dominski and Marzluff 1999).

Stocked *H1FOO* mRNA decreased substantially and constantly during *in vitro* development. The disappearance of maternal *H1FOO* mRNA at the 16-cell embryo stage correlates with embryonic genome activation, at which time the embryo is triggered to generate its own mRNA. Our protein studies using an antibody raised specifically against a portion of the bovine H1FOO protein have revealed a single protein band, whereas mouse anti-H1FOO revealed a major 42 kDa band, as well as a minor 37 kDa in GV oocytes up to the 2-cell stage (Tanaka et al. 2001). Further investigation uncovered that this could be due to alternative splicing of the primary *H1foo* transcript generating two alternatively encoded proteins: H1FOO α (304 amino acids) and H1FOO β (246 amino acids) (Tanaka et al. 2005).

These two forms are similar in sequences, except that *HIFOOβ* has a shorter C-terminal tail. The antibody against bovine H1FOO did not reveal two isoforms since it was designed to recognize a portion of the C-terminal tail that is lacking in mouse *HIFOOβ*. One band was detected at 36 kDa in bovine GV oocyte, which corresponds to the major H1FOO 42 kDa band found in the mouse. Immunoreactive H1FOO was detected in the GV oocyte and throughout embryo development until the MZT at the 8- to 16-cell stage. During this time, H1FOO was strongly associated with the chromatin before vanishing completely in the morula embryo. During the MZT, H1FOO disappears rapidly as somatic forms of histone H1 (H1s) are starting to be incorporated on the embryonic chromatin (Smith et al. 1995). Furthermore in bovine embryos reconstructed by nuclear transfer, somatic forms of histone H1 became undetectable shortly after fusion to reappear on the chromatin of 8- to 16-cell embryos (Bordignon et al. 1999). Comparable results were observed in the mouse around the MZT at the 2-cell stage (Stein and Schultz 2000; Tanaka et al. 2001). However unlike the mouse, the immunoreactive H1FOO was not only associated with the chromatin in the bovine, it was also detected in the bovine ooplasm. Furthermore, although the protein is expressed with less intensity in the cytoplasm compared to the chromatin, H1FOO is homogeneously present in the cytoplasm of the bovine GV oocyte.

Why do bovine oocytes and embryos accumulate H1FOO in cytoplasm whereas it is undetected in mouse cytoplasm? Our study has shown that a large amount of H1FOO protein was present on the chromatin of the extruding first and second polar body and other studies have demonstrated that linker H1FOO is also detected on swollen sperm heads during fertilization (Tanaka et al. 2001). However, since somatic histones in the mouse become visible on the chromatin at the 2-cell stage (time of MZT), H1FOO is most likely no longer needed after and therefore large stocks are not required in the oocyte. However, MZT occurs much later in the bovine at the 8- to 16-cell embryo, and consequently H1FOO is not only required for the initial steps of embryo formation, but also for several subsequent cleavage events. The presence of H1FOO in the cytoplasm could represent the stockpile required for these cleavage events. Newly formed linker proteins could correlate with the constant decay of *HIFOO* mRNA seen in our study.

During ICSI or somatic cell nuclear transfer, sperm protamines and somatic histone H1 are rapidly replaced by mouse H1FOO (Gao et al. 2004). In the ISCI experiments, H1FOO is rapidly detected within 5 min on the condensed sperm chromatin, while oocytes fixed 30 min postinjection revealed presence of H1FOO on decondensed sperm chromatin. These results tend to strengthen that H1FOO is most probably involved in histone-protamine transition before the onset of DNA replication. Furthermore, somatic linker H1 histones are known for their transcription activating and repressing abilities, so H1FOO could also play a similar role in the oocyte and early embryo. It would allow the expression or repression of specific genes during embryo growth until the MZT, at which time they are replaced by the somatic histones. Thus, by conformational changes, H1FOO could restrict the access of transcriptional factors on certain part of the DNA, which could keep a number of differentiation genes repressed and/or allow oocyte specific genes to be activated.

5.7 CONCLUSION

This study has shown that H1FOO indeed exists in the bovine oocyte and was largely accumulated in the oocyte cytoplasm and onto the chromatin. H1FOO decreased significantly throughout early development to the 8 to 16-cell stage, where afterwards, the protein could no longer be detected. This disappearance correlates with the activation of the bovine genome and subsequent replacement with somatic forms of the linker histone. This histone may play important roles in activation or repression of genes and the appropriate transformation and remodeling of chromatin during early embryo development.

5.8 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Isabelle Laflamme for technical assistance. Dr. Claude Robert and Dr. Susan Novak for critical reading of the manuscript, and Dr. Novak for statistical advice.

5.9 REFERENCES

- Bordignon V, Clarke HJ, Smith LC. 1999. Developmentally regulated loss and reappearance of immunoreactive somatic histone H1 on chromatin of bovine morula-stage nuclei following transplantation into oocytes. *Biol Reprod* 61(1):22-30.
- Chen CY, Shyu AB. 1995. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20(11):465-470.
- de Moor CH, Meijer H, Lissenden S. 2005. Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 16(1):49-58.
- De Sousa PA, Westhusin ME, Watson AJ. 1998. Analysis of variation in relative mRNA abundance for specific gene transcripts in single bovine oocytes and early embryos. *Mol Reprod Dev* 49(2):119-130.
- Dimitrov S, Almouzni G, Dasso M, Wolffe AP. 1993. Chromatin transitions during early *Xenopus* embryogenesis: changes in histone H4 acetylation and in linker histone type. *Dev Biol* 160(1):214-227.
- Dominski Z, Marzluff WF. 1999. Formation of the 3' end of histone mRNA. *Gene* 239(1):1-14.
- Dworkin-Rastl E, Kandolf H, Smith RC. 1994. The maternal histone H1 variant, H1M (B4 protein), is the predominant H1 histone in *Xenopus* pregastrula embryos. *Dev Biol* 161(2):425-439.
- Fan Y, Sirotkin A, Russell RG, Ayala J, Skoultchi AI. 2001. Individual somatic H1 subtypes are dispensable for mouse development even in mice lacking the H1(0) replacement subtype. *Mol Cell Biol* 21(23):7933-7943.
- Fu G, Ghadam P, Sirotkin A, Khochbin S, Skoultchi AI, Clarke HJ. 2003. Mouse oocytes and early embryos express multiple histone H1 subtypes. *Biol Reprod* 68(5):1569-1576.
- Gao S, Chung YG, Parseghian MH, King GJ, Adashi EY, Latham KE. 2004. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Dev Biol* 266(1):62-75.
- Georgel PT, Hansen JC. 2001. Linker histone function in chromatin: dual mechanisms of action. *Biochem Cell Biol* 79(3):313-316.
- Hock R, Moorman A, Fischer D, Scheer U. 1993. Absence of somatic histone H1 in oocytes and preblastula embryos of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 158(2):510-522.
- Khochbin S. 2001. Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* 271(1):1-12.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Moreira PM, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP. 2003. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 69(4):1424-1431.

- Mandl B, Brandt WF, Superti-Furga G, Graninger PG, Birnstiel ML, Busslinger M. 1997. The five cleavage-stage (CS) histones of the sea urchin are encoded by a maternally expressed family of replacement histone genes: functional equivalence of the CS H1 and frog H1M (B4) proteins. *Mol Cell Biol* 17(3):1189-1200.
- McGraw S, Robert C, Massicotte L, Sirard MA. 2003. Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol Reprod* 68(2):383-389.
- Meshi T, Taoka KI, Iwabuchi M. 2000. Regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Plant Mol Biol* 43(5-6):643-657.
- Pearson WR. 1997. Identifying distantly related protein sequences. *Comput Appl Biosci* 13(4):325-332.
- Sera T, Wolffe AP. 1998. Role of histone H1 as an architectural determinant of chromatin structure and as a specific repressor of transcription on *Xenopus* oocyte 5S rRNA genes. *Mol Cell Biol* 18(7):3668-3680.
- Smith LC, Meirelles FV, Bustin M, Clarke HJ. 1995. Assembly of somatic histone H1 onto chromatin during bovine early embryogenesis. *J Exp Zool* 273(4):317-326.
- Smith RC, Dworkin-Rastl E, Dworkin MB. 1988. Expression of a histone H1-like protein is restricted to early *Xenopus* development. *Genes Dev* 2(10):1284-1295.
- Stein P, Schultz RM. 2000. Initiation of a chromatin-based transcriptionally repressive state in the preimplantation mouse embryo: lack of a primary role for expression of somatic histone H1. *Mol Reprod Dev* 55(3):241-248.
- Tanaka M, Hennebold JD, Macfarlane J, Adashi EY. 2001. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development* 128(5):655-664.
- Tanaka M, Kihara M, Hennebold JD, Eppig JJ, Viveiros MM, Emery BR, Carrell DT, Kirkman NJ, Meczekalski B, Zhou J, Bondy CA, Becker M, Schultz RM, Misteli T, De La Fuente R, King GJ, Adashi EY. 2005. H1FOO is coupled to the initiation of oocytic growth. *Biol Reprod* 72(1):135-142.
- Tanaka Y, Kato S, Tanaka M, Kuji N, Yoshimura Y. 2003. Structure and expression of the human oocyte-specific histone H1 gene elucidated by direct RT-nested PCR of a single oocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 304(2):351-357.
- Temeles GL, Ram PT, Rothstein JL, Schultz RM. 1994. Expression patterns of novel genes during mouse preimplantation embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 37(2):121-129.
- Vigneault C, McGraw S, Massicotte L, Sirard MA. 2004. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biol Reprod* 70(6):1701-1709.
- Voeltz GK, Steitz JA. 1998. AUUUA sequences direct mRNA deadenylation uncoupled from decay during *Xenopus* early development. *Mol Cell Biol* 18(12):7537-7545.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. 1999. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev* 53(1):8-18.

FIGURES

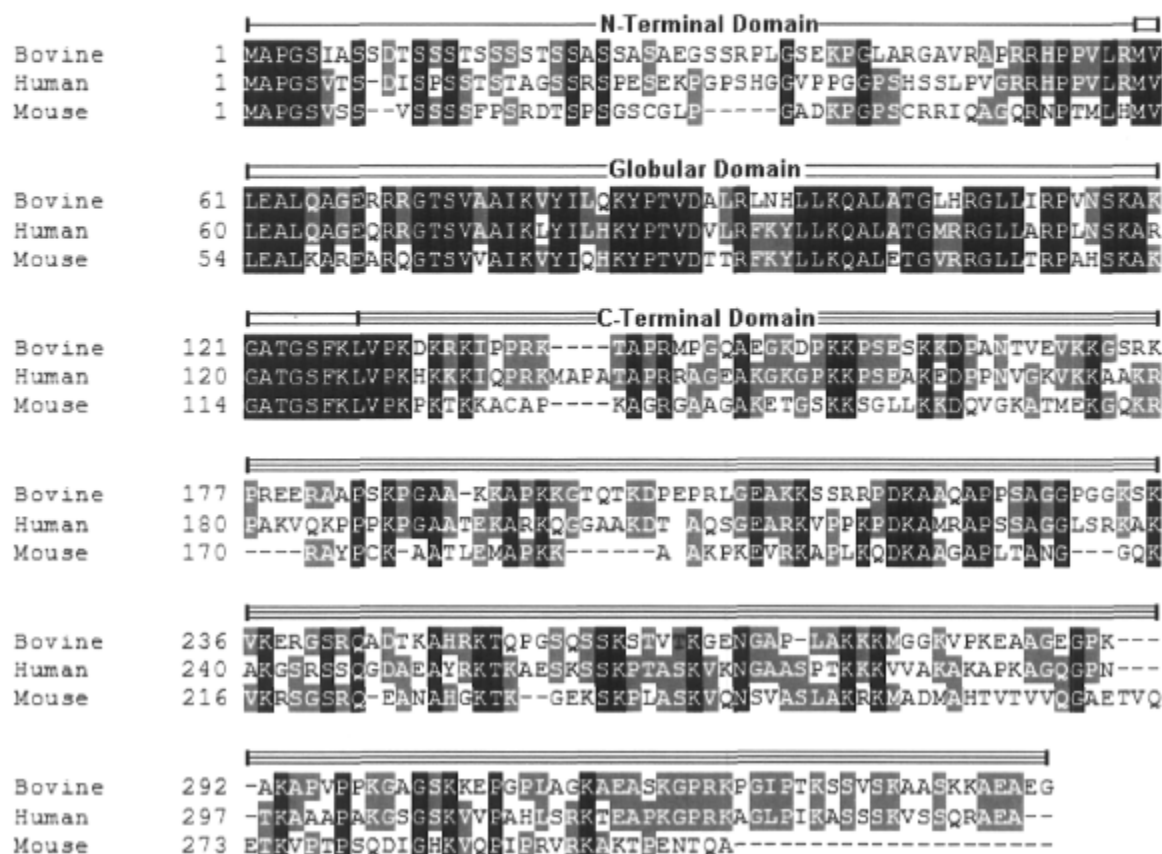


Figure 5.1. Comparison of bovine, human and mouse predicted H1FOO protein sequences. Identical amino acids between the three species are shaded black, whereas amino acids conserved between only two species are shaded gray. The N-terminal, globular and C-terminal domains of H1FOO are identified. (Gene bank accession number : human NP_722575, mouse NP_612184)

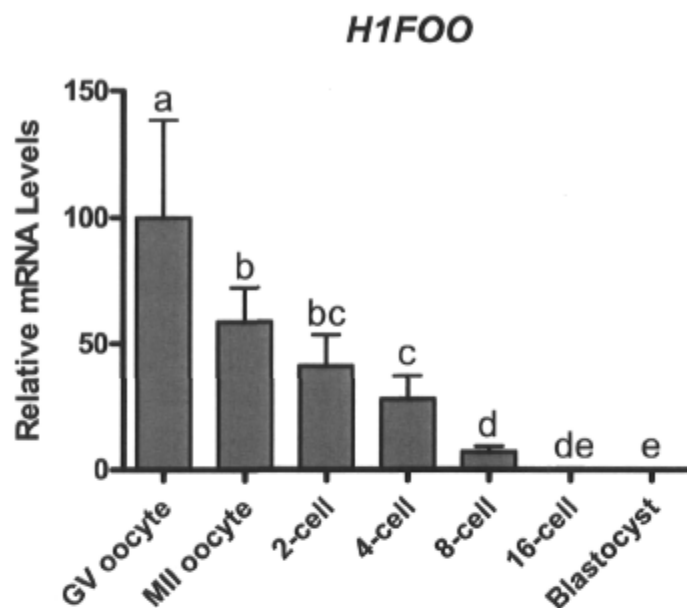


Figure 5.2. Quantification of H1FOO mRNA in bovine oocytes and early embryos using real-time RT-PCR. Each developmental stage was performed in triplicate using 1 oocyte or embryo per reaction. The relative mRNA levels shown represent the quantity of transcript corrected with the *GFP* value obtained for each pool. The highest level, found in the oocyte, was attributed with the value 100. Shown is the relative mRNA abundance (mean \pm SEM). Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

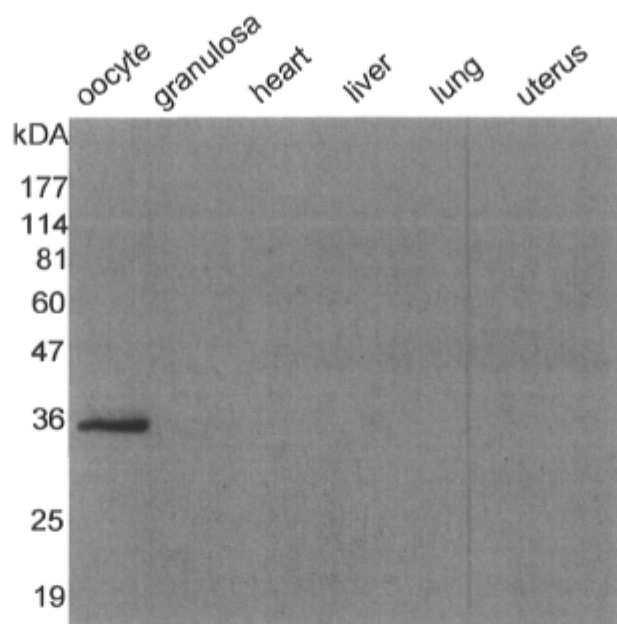


Figure 5.3. Immunoblotting analysis of HIFOO in different bovine cell lysates. From left to right, 100 GV oocytes, 7000 granulosa cells and 15 μ g of protein extracts from heart, liver, lung and uterus were subjected to SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose before being probed with a bovine anti-HIFOO.

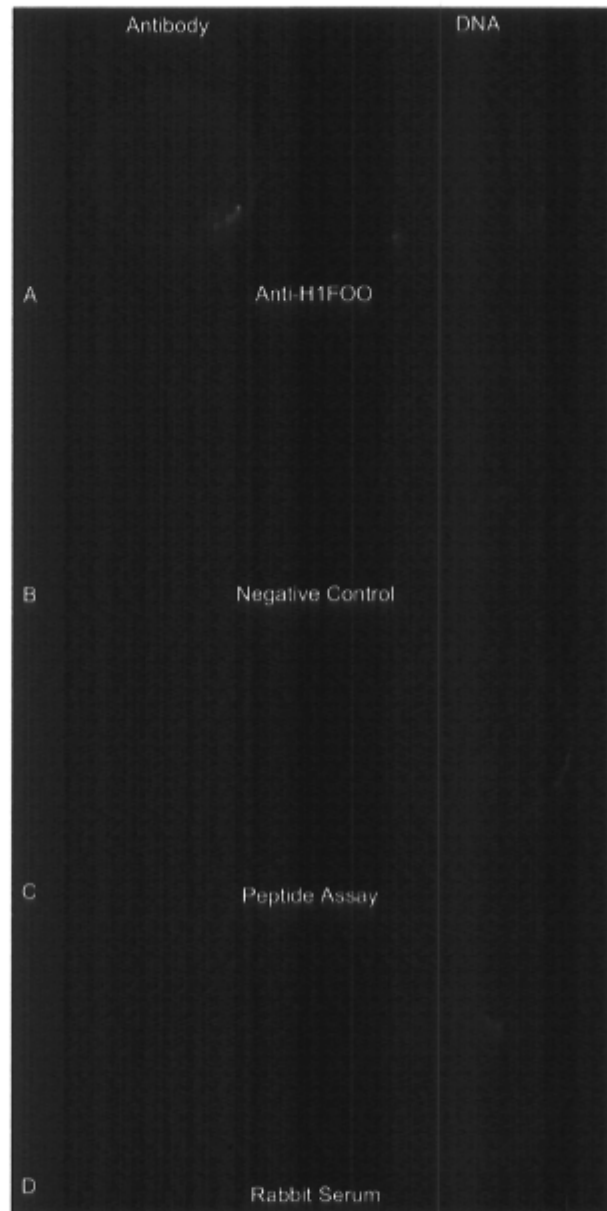


Figure 5.4. Anti-H1FOO specificity. Confocal representation of GV oocytes hybridized with a) anti-H1FOO, b) fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgG (negative control), c) peptide blocking assay and d) rabbit preimmune serum (left). DNA was stained with propidium iodide (right). Original magnification x600.

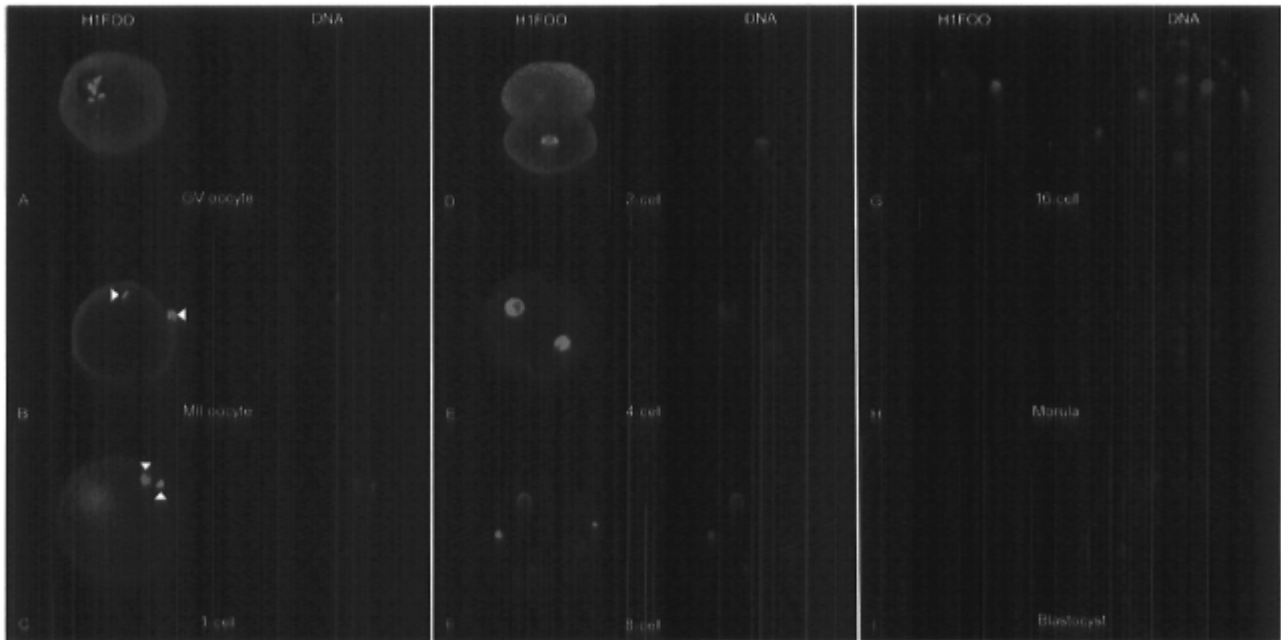


Figure 5.5. Localization of histone H1FOO in oocyte and early embryo development. Confocal representation of oocytes (GV and MII) or embryos (2-, 4-, 8-, 16-cell, morula and blastocyst) stained with an anti-H1FOO antibody (left) and with propidium iodide (right) to visualize the DNA. In the MII oocytes, the arrow head pointing right represents the condensed chromosomes, whereas the left arrow head corresponds to the first polar body. In the 1-cell embryo, the arrow head pointing down illustrates the oocyte pronucleus while arrow pointing up shows the second polar body. Original magnification x600.

**6 CHAPITRE # VI : L'incorporation de l'histone H1FOO
ovocyte spécifique dans des cellules somatiques n'altère pas
l'expression génique mais affecte les modifications post-
traductionnelles des histones.**

**Serge McGraw, Christian Vigneault, Karine Tremblay,
Vilceu Bordignon et Marc-André Sirard.**

Cet article n'a pas encore été soumis pour publication.

6.1 RÉSUMÉ

Afin d'établir si l'histone H1 ovocyte spécifique (H1FOO) a le potentiel de réguler la transcription de certains transcrits d'ARNm, un plasmide incluant la séquence codante de H1FOO bovine a été introduit dans des cellules somatiques par transfection transitoire. Des observations par immunocalisation ont révélé que la présence de H1FOO dans le noyau des cellules cause une diminution majeure des histones H1 somatiques (H1s). Toutefois, malgré la faible présence des H1s sur la chromatine somatique des cellules-H1FOO, les niveaux de transcrits d'ARNm des différents sous-types de *H1* (*H1^o*, *H1.1*, *H1.2*, *H1.4* et *H1.5*) sont demeurés comparables avec ceux des cellules contrôles. Une évaluation globale de l'expression génique par biopuce, entre les cellules-H1FOO et cellules contrôles, a révélé que l'insertion de H1FOO ne cause aucune altération des niveaux de transcrits. Cependant des changements mineurs dans les modifications post-traductionnelles de l'histone H3 ont été observés par immunobuvardage dans les cellules-H1FOO. Ensemble, ces observations préliminaires suggèrent que l'histone H1FOO ne peut réguler l'expression génique par elle-même, mais qu'elle est quand même impliquée dans la modulation de la structure de la chromatine.

6.2 ABSTRACT

Although recent studies have shed some light on particular roles and functions of H1 linker histones, their precise implication in gene regulation remains poorly understood. This is especially true for the oocyte-specific histone H1 subtype (H1FOO). To establish if this subtype is able to regulate distinct mRNA transcripts, a plasmid containing the full-length cDNA sequence for bovine *H1FOO* was introduced in somatic cells by transient transfection. Immunolocalization procedures revealed that the presence of H1FOO in the cell nucleus caused a major decrease in somatic H1 (H1s). Even though H1s proteins were faintly present on the somatic chromatin of H1FOO cells, the mRNA transcript levels for different *H1* subtypes (*H1^o*, *H1.1*, *H1.2*, *H1.4* and *H1.5*) remained comparable to those of the control cells. Evaluation of global gene expression by microarray, between H1FOO and control cells, did not uncover any alterations in transcript levels caused by the insertion of H1FOO, although minor changes in histone H3 post-translational modifications were observed by Western blot in the H1FOO cells. Together, these preliminary observations suggest that H1FOO, by itself, does not regulate gene expression but is involved in the modulation of chromatin structure.

6.3 INTRODUCTION

The contribution of histone proteins to DNA compaction is essential for higher order chromatin organization. A first level of compaction is initiated when double stranded DNA wraps around a histone core (2 of each: H2A, H2B, H3 and H4) to generate a configuration known as the nucleosome. Then, a linker histone H1 molecule attaches to the outer nucleosomal structure to stabilize the superior helix configuration (Carruthers et al. 1998; Carruthers and Hansen 2000). Specific residues of core or linker histones can be post-transcriptionally altered by modifications such as methylation, phosphorylation and/or acetylation. The mechanisms regulating the majority of these individual modifications remain unclear. However, several of these alterations are known to play critical roles in gene expression activation or repression (Jenuwein and Allis 2001).

Multicellular organisms display various subtypes of linker histones H1. In mammals, a total of eight cell type- and stage-specific variants have been identified. Members composing the H1 family include somatic H1s (named H1.1-5 or H1a-e), differentiation-specific H1^o, testis-specific H1t and oocyte-specific H1FOO (Wolfe and Grimes 1993; Parseghian and Hamkalo 2001; Tanaka et al. 2001; McGraw et al. 2006). H1 variants share structural similarities, like a highly conserved globular domain (Drabent et al. 1995). However, they display different mRNA and/or protein expression profiles throughout the differentiation and development stages of mammalian development (Khochbin 2001; Fu et al. 2003; McGraw et al. 2006).

In addition to their structural involvement in chromatin conformation and compaction, linker histones are also involved in the regulation of gene expression. For instance, incorporation of H1 into chromatin represses the transcription of nucleosomal templates by restricting the mobility of histone octamers (Ura et al. 1997). This repressive nucleosomal structure, caused by the addition of H1, selectively inhibits the transcription of genes like the oocyte-type 5S rRNA (Sera and Wolffe 1998). It was thought that linker histones were essential for chromatin compaction and gene regulation, but deletion of one or two of the H1 genes revealed no particular phenotype in mouse (Fan et al. 2001). However, the

simultaneous removal of three H1 subtypes brings embryo development to a halt, confirming that they are fundamental in mammals (Fan et al. 2003). Microarray studies on embryonic stem (ES) cells derived from these triple-null embryos revealed that gene regulation was altered for a number of genes (Fan et al. 2005). They also found that the acetylation and methylation state of certain histone residues was modified in the triple-null ES cells.

In the oocyte, chromatin is composed of a mixture of three histone H1 variants: H1FOO, H1c (H1.2) and H1^o (Fu et al. 2003). H1FOO is very abundant in the oocyte (Tanaka et al. 2001; McGraw et al. 2006) and may be the predominant form of linker histone (Clarke et al. 1992; Tanaka et al. 2001; Fu et al. 2003). This specialized protein remains present on the chromatin after fertilization but disappears during early embryo development (mouse; 2-cell and bovine; 16-cell) (Tanaka et al. 2001; McGraw et al. 2006), and is replaced by other H1s variants (Clarke et al. 1992; Smith et al. 1995). Since H1FOO was discovered, many hypotheses regarding its role and function in the oocyte have been formulated. Some implied that it might control transcription by altering chromatin structure during oogenesis, acting as a specific gene repressor (Tanaka et al. 2001), while others suggested that it could be involved in nuclear remodeling (Teranishi et al. 2004), maternal germ line programming, or restructuring of the male pronucleus (Tanaka et al. 2005). All these functions suggest that H1FOO can remodel the chromatin and might act in conjunction with other factors to repress a variety of somatic transcripts. Nevertheless, its precise implication in development remains to be elucidated.

We believe that H1FOO may be involved in the control of a subclass of genes and/or histone modifications in oocytes and early embryo development. In this preliminary study, using bovine somatic cells overexpressing bovine H1FOO protein, we sought to examine the involvement of H1FOO in gene regulation and histone modifications. To this end, mRNA expression of control and H1FOO-transfected cells were compared by microarray analysis. Furthermore, we tested different core histone modifications to assess whether the presence of H1FOO in the chromatin of somatic cells induced any specific alterations.

6.4 MATERIALS AND METHODS

All materials were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) unless otherwise stated.

6.4.1 H1FOO plasmid preparation

Briefly, the full-length cDNA sequence for bovine H1FOO was generated by polymerase chain reaction (PCR) from oocyte cDNA as previously described (McGraw et al. 2006) and inserted into pGEM-T easy vector system (Promega, Madison, WI). The resulting pGEM-H1FOO plasmid was transformed into DH5 α super-competent cells, and a single colony was grown in Luria-Bertani (LB) broth and used for plasmid extraction using QIAprep spin Miniprep kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). The open reading frame (ORF) of H1FOO was then subcloned into pCMS-EGFP (enhanced green fluorescent protein) (Clontech, Mountain View, CA) using EcoRI (New England Biolabs, Ipswich, MA). pCMS-H1FOO-EGFP was transformed and grown as described for pGEM-H1FOO and finally extracted with Plasmid Maxi kit (Qiagen). The clones were sequenced to ensure that the exact H1FOO sequence (NCBI reference number NM_001035372) was inserted into pCMS-EGFP.

6.4.2 Expression of H1FOO in fibroblast cells

Fibroblast cells were isolated from the ear of a 70-day-old fetal calf and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT), 0.5% penicillin/streptomycin and maintained at 38.5 °C under 5% CO₂. Cells (4th passage) were grown in 6-well plates until they reached 70% confluency and were then transfected using 2 μ g of plasmid and 3 μ l of FuGENE (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) for 48 hrs according to the manufacturer's recommendations. Cells transfected with either pCMS-H1FOO-EGFP or pCMS-EGFP (negative control) were frozen before or after being sorted using a fluorescence-activated cell sorter (FACS; Epics Elite ESP, Beckman Coulter, Miami, FL; equipped with a 15mW Argon Ion Laser at 488nm). Sorted cells (> 91% purity) were then washed with PBS by centrifugation and

stored at -80 °C. Under these conditions, between 24 and 30% of the transfected cell population expressed EGFP (determined by FACS) at 48 hrs post-transfection.

6.4.3 Western blotting

Following cell sorting, transfected pCMS-EGFP and pCMS-H1FOO-EGFP cells were lysed in 2x SDS loading buffer containing 6% β -mercaptoethanol at 95 °C for 5 min. Samples were resolved on standard 12% (for H1FOO) or 15% (for H3) SDS-PAGE gels, and transferred onto nitrocellulose membranes (Osmonics, Minnetonka, MN) as previously described with minor modifications (McGraw et al. 2006; McGraw et al. 2007). Briefly, the membrane was incubated with a dilution of the primary antibody (anti-H1FOO, 1:200,000; anti-H3 tri-methyl lysine 9 (meH3K9), 1:5,000; anti-H3 acetyl lysine 9 (acH3K9), 1:5,000; and anti-H3 tri-methyl lysine 4 (meH3K4), 1:20,000) (anti-H1FOO from Agrisera AB, Vännäs, Sweden, all others from Abcam inc., Cambridge, MA) in TBST (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 125 mM NaCl and 0.1% Tween-20) containing 4% ECL blocking reagent (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) overnight at 4 °C. They were then probed with a peroxidase-conjugated antibody (Molecular Probes, Burlington, ON, Canada) diluted 1:200,000 in TBST-3% ECL blocking reagent for 1 hr. Finally, proteins were revealed using ECL Advance reagent (Amersham Biosciences). Prior to antibody incubation (meH3K9, acH3K9, meH3K4) nitrocellulose membranes were stained with Ponceau Red to confirm equal loading of proteins from H1FOO and control cells.

6.4.4 Immunolocalization

At 24 hrs post-transfection, cells were trypsinized, plated onto glass slides and cultured for another 24 hrs. They were then washed with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at 37 °C. Fixed samples were washed 3 times for 5 min under continuous agitation with TBST 0.1%. For a complete description of the immunolocalization protocols please refer to (McGraw et al. 2007). DNA was stained with DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) (1 μ g/ml).

6.4.5 Reverse transcription (RT) and quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR)

Total RNA was extracted with RNeasy Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. cDNA synthesis was performed with Omniscript (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) using 200 ng of total RNA from both cell groups (FACS) (in triplicate) (Vigneault et al. 2004). The RNA was primed with a mix of 0.4 μ l of oligo dT(18) (50 mM) and 4 μ l of random decamers (50 mM) (Ambion, Austin, TX) for linker H1 Q-PCRs or with only 0.4 μ l of oligo dT(18) (50 mM) for the Affymetrix validation study. Primer sequences are listed in Table 1 and were designed using bovine sequences when possible, or from a consensus derived from human and mouse sequences. Q-PCR was performed on a LightCycler apparatus (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) using SYBR green incorporation as previously described (McGraw et al. 2003; McGraw et al. 2006). Briefly, a standard curve prepared from purified PCR amplicon for each gene was included in the run. Each PCR reaction contained 1 μ l of the respective RT mixture. The annealing temperature for each primer set is listed in Table 1. Q-PCR amplicon specificity was confirmed by analysis of the melting curve obtained with the Lightcycler software (Roche). The amplicon specificity was confirmed visually by the presence of a single amplicon band on agarose gel electrophoresis and by direct sequencing. Bovine *GAPDH* was used as an internal control to account for experimental errors due to the techniques involved or the materials used for RNA extraction and reverse transcription.

6.4.6 Affymetrix microarray hybridization

The experiments described in this section were conducted following the GeneChip expression analysis technical manual recommendations (Affymetrix, Santa Clara, CA) as well as other manufacturer's recommendations. Total RNA extraction of pCMS-EGFP and pCMS-H1FOO-EGFP unsorted cells was carried out with Trizol (Invitrogen). 20 μ g of RNA was used as template for preparing cDNA fragments with T7-oligo-d(T)24 primers using SuperScript II enzyme (Invitrogen). Biotinylated RNA was prepared from the cDNA through *in vitro* transcription (Enzo RNA transcript labeling kit; Affymetrix). The quantity

and quality of RNA and cDNA were measured and controlled by micro-capillary electrophoresis (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). 15 μ g of cDNA obtained from pCMS-EGFP (control cells) and pCMS-H1FOO-EGFP (H1FOO cells) cells were cleaved to get fragments of 30 to 200 bp, and then hybridized to biochips (GeneChip Bovine Genome Array; Affymetrix) for 16 hrs at 45 °C with rotation. After hybridization, the biochips were passed under Fluidic (Fluidic Station 400; Affymetrix) to remove non-specific signals and for streptavidin-phycoerythrin (SAPE) antibody labeling. The biochips were then scanned (GeneArray Scanner; Affymetrix) and the images obtained were analyzed with Microarray Suite 5.0 (Affymetrix) and GeneSpring (Silicon Genetix, Redwood City, CA) softwares.

6.4.7 Affymetrix microarray data analysis

Because only one series of slides (one for control cells and one for H1FOO cells) was prepared, no statistical analysis could be performed. Instead, genes were selected if they exhibited at least a two-fold increase or decrease in signal intensity. The cutoff value for the detection signal was set at >200 of intensity on a least one chip. Various genes corresponding to our criteria were further investigated by Q-PCR to validate our microarray results.

6.4.8 Affymetrix microarray validation

The microarray results were validated by Q-PCR to determine if selected genes were truly differentially expressed in pCMS-EGFP and pCMS-H1FOO-EGFP cells. Primers and information about the genes chosen for validation are described in Table 1. Transfected cells sorted by FACS were used for cDNA preparation and Q-PCR analysis as described in earlier sections.

6.4.9 Bovine developmental microarray hybridization

We also used a home-made bovine oocyte- and early embryo-specific cDNA array containing more than 2,000 ESTs (expressed sequence tags) obtained from different SSH (Suppression Subtractive Hybridization) of bovine oocytes, embryos and somatic tissues (for a complete description, see Sirard et al. 2005) to explore H1FOO effects on transcription. The total RNA content from pCMS-EGFP and pCMS-H1FOO-EGFP sorted cells was extracted with the PicoPure RNA isolation kit (Arcturus, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). RNA quantity and quality was assessed by micro-capillary electrophoresis with the Bioanalyzer (Agilent Technologies). 40 ng of total RNA from control and H1FOO cells was reverse transcribed and amplified by 2 rounds of T7 using the RiboAmp HS RNA Amplification Kit (Arcturus) according to the manufacturer's instructions with a slight modification. In the second round of *in vitro* transcription (IVT), the IVT master mix was replaced by modified amino-allyl UTPs (Ambion). Array probes were prepared with 5 µg of amplified amino-allyl RNA (aRNA). The aRNA was indirectly labeled with Alexa Fluor 555 or 647 reactive dyes (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. The labeled aRNA was purified using the Picopure RNA extraction kit (Arcturus) and eluted in 15 µl of elution buffer. Each probe was quantified using the Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). An equal amount of labeled RNA was used for each hybridization.

Labeled purified probes were heated at 90 °C for 5 min, and then 65 µl of SlideHyb #1 buffer (Ambion) was added. Slides containing the probe mix were hybridized for 18 hrs at 50 °C. Hybridizations were performed in the Array-Booster using the Advacard AC3C (The Gel Company, San Francisco, CA). Slides were then washed twice with 2X SSC-0.5% SDS at 50 °C for 15 min and twice with 0.5X SSC-0.5% SDS at 50 °C for 15 min. Slides were rinsed three times in 1X SSC and three times in distilled water prior to centrifugation (1,200g) at room temperature for 5 min. To minimize the effects of dye incorporation, the dyes were reversed (dye swap) for a duplicate hybridization (technical replication). Slides were scanned using the VersArray ChipReader System (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) and were analyzed using the ChipReader and ArrayPro Analyzer software (Media Cybernetics, San Diego, CA).

6.4.10 Statistical analysis

The level of mRNA measured for each gene was subjected to statistical analysis after being normalized using *GAPDH* as an internal control. The value obtained for each gene, within each pool of cDNA, was divided by the value obtained for *GAPDH* in the same cDNA pool. Data are presented as mean \pm SEM. Statistically significant differences in mRNA levels between pCMS-H1FOO-EGFP and pCMS-EGFP were calculated by protected ANOVA (SAS Institute, Cary, NC), and treatment and replicate were included in the model. Differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ($P < 0.05$).

6.5 RESULTS

6.5.1 H1FOO expression in somatic cells

Cells transfected with the pCMS-H1FOO-EGFP plasmid (H1FOO cells) as well as the empty pCMS-EGFP plasmid (control cells) were investigated to establish the presence of H1FOO. First, we showed by Q-PCR that only H1FOO cells expressed *H1FOO* transcripts (Fig. 6.1a). Western blot experiments confirmed that only the cells expressing *H1FOO* mRNA were able to synthesize H1FOO protein (Fig. 6.1b). The H1FOO protein detected in transfected somatic cells showed the same molecular weight (~ 36 kDa) as endogenous H1FOO detected in bovine oocytes (McGraw et al. 2006).

6.5.2 Immunocytochemistry

Prior to determining the localization of H1FOO in somatic H1FOO cells, we first examined if the anti-H1FOO cross-reacted with unspecific proteins in cells transfected with the control plasmid (Fig. 6.2). In all the cells that incorporated the control plasmid and expressed EGFP, as in cells that did not uptake any plasmid (no EGFP expression), no anti-H1FOO staining was visible (Fig. 6.2a-c). Conversely, every cell that was transfected with

pCMS-H1FOO-EGFP and expressed EGFP was positive for anti-H1FOO staining (Fig. 6.2d-f). Because the *EGFP* and *H1FOO* genes were under the control of different promoters in the expression vector, cells could have expressed only one of the two genes. However, cells in the close vicinity of H1FOO-expressing cells remained negative for EGFP expression and anti-H1FOO staining (Fig. 6.2e-g). Cells positive for H1FOO were investigated with an antibody against somatic H1s (Clarke et al. 1992; Bordignon et al. 1999) to determine the effect of H1FOO on the other nuclear linker histones. Unexpectedly, cells that expressed H1FOO exhibited a significantly reduced amount of somatic H1 compared to untransfected cells (Fig. 6.2g-i).

6.5.3 Expression of histone mRNA

Since the proportion of nuclear H1s histones was affected by the presence of H1FOO, we sought to establish if this decrease in linker proteins was associated with the down-regulation of *H1s* and *H1^o* mRNA transcripts. Transfected cells containing oocyte-specific H1FOO revealed a tendency to have decreased expression for *H1^o*, *H1.1*, *H1.2* and *H1.5*, whereas *H1.4* expression was not affected. However, statistical analysis of the quantification for these different H1 variants established that there were no significant differences in mRNA levels between control and H1FOO cells (Fig. 6.3).

6.5.4 Affymetrix microarray

Messenger mRNA from pCMS-EGFP and pCMS-H1FOO-EGFP transfected cells was used to generate DNA for hybridization to the Affymetrix microarray containing over 23,000 bovine transcripts. From all of those transcripts, about 1,100 demonstrated variations in expression according to the restriction imposed (see Affymetrix microarray data analysis) (Table 2). Surprisingly, the presence of H1FOO only increased the levels of one transcript, casein beta (*CSN2*), which was enhanced by about 3-fold. A global decrease, with an average fold change of 2.26 ± 0.23 (mean \pm SD) was observed for all of the other affected transcripts in cells expressing H1FOO.

Four genes were selected to validate the results obtained with the Affymetrix slide. Microarray results indicated that two of these genes were down-regulated in H1FOO cells (*PPP1CC*; protein phosphatase 1 and *HMGB1*; high mobility group box 1), one was up-regulated in the same cells (*CSN2*; casein beta), while the fourth gene remained constant in both transfections (*GAPDH*; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Q-PCR analysis performed on sorted control and H1FOO cells showed that these four genes demonstrated an expression pattern similar to the results obtained with the Affymetrix chip. Compared to the control cells, transcript levels found in H1FOO cells had a tendency to be slightly higher for *CSN2* and lower for *PPP1CC* and *HMGB1*, while *GAPDH* intensity remained similar in both cell transfections (Fig. 6.4). However, these differences were not statistically significant.

6.5.5 Bovine embryo microarray

Since no somatic gene seemed to be affected by the presence of the oocyte-specific linker histone H1FOO in somatic cells, we sought to determine if some genes preferentially expressed in the oocyte could have been affected in these somatic cells. The mRNA from pCMS-EGFP and pCMS-H1FOO-EGFP cells was used to produce probes that were hybridized to a home-made microarray slide composed of over 2,000 ESTs preferentially expressed in oocytes and blastocysts. Results obtained using this microarray did not reveal visible effect on gene expression, since none of the 2,000 ESTs exhibited a 2-fold ratio variation (Fig. 6.5).

6.5.6 Histone modifications

Severe decrease of linker H1 protein expression has also been associated with histone residue modifications (Fan et al. 2005). To assess if the removal of a proportion of H1s by the presence of H1FOO in the nucleus of somatic cells had an effect on histone modification, three different histone marks associated with transcriptional regulation (Fischle et al. 2003; Schotta et al. 2004; Nishida et al. 2006; Yuan et al. 2006) were tested

by Western blot. Antibodies against the acetylated form of H3K9, as well as the methylated forms of H3K9 and H3K4 revealed that these specific modifications were present in both control and H1FOO cells. Although no major changes were observed, we noticed a slight variation that could possibly be associated with the presence of H1FOO protein in somatic cells (Fig. 6.6). The methylated state of H3K9 seemed more abundant in H1FOO cells when compared to control cells, whereas the same protein extracts revealed that the levels of acetylated H3K9 and methylated H3K4 appeared weaker in H1FOO cells.

6.6 DISCUSSION

Recent work involving the triple deletion of H1 variants in ES cells revealed a direct interrelation between chromatin configuration conferred by H1 histones and transcriptional regulation (Fan et al. 2005). Although single H1s and H1^o histones are not fundamentally essential, the relevance of linker histones in mammalian development no longer raises any doubts. Even if the implication of the oocyte-specific H1FOO has yet to be associated with gene regulation events during oocyte growth and embryo development, we think that it could play a similar role as other H1 proteins.

To examine its *in vivo* influence on gene regulation, H1FOO was transiently overexpressed in somatic cells normally devoid of this protein. This approach was chosen since novel or classical strategies to impair H1FOO activity in the bovine oocyte are rather impossible. Bovine oocytes already contain large amounts of H1FOO protein (McGraw et al. 2006), consequently the destruction of its transcripts by RNAi would not significantly affect its content in the oocyte. Other classical strategies to perturb its function, like mutagenesis or knockout, remain rather impossible in the bovine model because of the cost or the time periode required.

6.6.1 Effects of H1FOO on somatic H1 in cell nucleus

Overexpression of H1FOO in somatic cells caused the disappearance of a large fraction of the immunoreactive nuclear H1s. The observed displacement of somatic H1s is similar to the one noted during somatic cell nuclear transfer (SCNT) protocols (Gao et al. 2004). Following the introduction of somatic nuclei into an enucleated mouse oocyte, H1foo can be detected within 5 min on the chromatin of the inserted cell (Gao et al. 2004). After only a few hours, immunoreactive H1s can no longer be detected on the somatic chromatin inside the ooplasm (Bordignon et al. 1999; Bordignon et al. 2001; Gao et al. 2004). In this study, the H1FOO-cells were not completely devoid of the other H1 proteins, as they remained faintly positive for H1s. Since these cells did not differ from control cells in *H1s* and *H1^o* mRNA expression, we suspect that H1 proteins can still be synthesized in the cytoplasm and compete for nuclear importation as well as for chromatin incorporation.

The binding capacity of linker histones may also be involved in H1s displacement by H1FOO. Using the FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) technique, a recent study revealed that the different H1 variants bind to chromatin with different affinities (Th'ng et al. 2005). These intensities can be separated in 3 groups: 1) low affinity (H1.1 and H1.2), 2) intermediate affinity (H1.3 and H1^o) and 3) high affinity (H1.4 and H1.5). As for H1FOO, FRAP studies showed that it has stronger binding properties compared to H1^o. Since the globular domain of H1FOO is more positively charged than other somatic H1, it may confer tighter interactions with DNA, which stabilize binding of H1FOO to chromatin (Becker et al. 2005). They suggest that for histone H1FOO, H1.2 and H1^o, the globular and/or N-terminal domains are essentially responsible for chromatin binding modulation. Whereas chromatin binding by H1.1, is regulated by phosphorylation (Hendzel et al. 2004; Lu and Hansen 2004)

An unknown mechanism independent of binding affinity is likely contributing to the replacement of H1s by H1FOO in oocytes (Becker et al. 2005). Although this active process is still hypothetical, some evidence indicate that it might involve protein degradation, since treatment of SCNT embryos with a proteasome inhibitor partially inhibits the H1s-to-H1FOO transition (Gao et al. 2004). Because H1 histones have a half-

life of several hours (80 to 100 hrs) (Sakagami et al. 1982; Rechsteiner et al. 1985; Wu et al. 1986) but disappear from the nuclei of cells used in SCNT after just a few hours, an active protein degradation process could be involved. In our transfected H1FOO cells, the increased affinity of H1FOO for chromatin may possibly contribute to the replacement of H1s histones. As for the oocyte, there may be complementary factors or processes involved in the removal or degradation of somatic linker histones.

6.6.2 Effects of H1FOO on gene expression

Linker histone H1 was first associated with the organization of the highly condensed structure required for proper DNA folding (Widom 1989). Since then, various other functions have also been attributed to it. Among these, H1 was shown to interfere with nucleosome mobility (Pennings et al. 1994), reduce transient nucleosomal DNA exposure (Polach and Widom 1995; Juan et al. 1997), inhibit DNA replication (De et al. 2002) and act as a general transcriptional repressor by blocking binding sites for transcription factors (Laybourn and Kadonaga 1991; Juan et al. 1997). In unicellular eukaryotes, like *Tetrahymena* (Hellauer et al. 2001) or yeast (Shen and Gorovsky 1996), elimination of H1 did not corroborate with the notion that H1 is a repressor of global transcriptional activity. Microarray analysis showed only a modest increase (less than 50%) of expression for a subset of genes in strains lacking H1 (Hellauer et al. 2001). However, in these unicellular organisms, linker H1 is dispensable. To develop and to progress normally, higher eukaryotes must maintain a certain ratio of histone H1 per nucleosome (Fan et al. 2003). When this ratio is insufficient, embryos simply stop developing. Regardless of the different chromatin abnormalities, ES cells can still be isolated from these embryos and cultured. Expression levels in these cells only differed positively or negatively by 2-fold for merely 29 genes (Fan et al. 2005). These combined results refute the hypothesis that linker H1 is a general repressor of transcription.

In this preliminary study, we attempted to discover if exogenous histone H1FOO is able to regulate the transcription of a subset of genes in somatic cells. If so, this would mean that H1FOO could be involved in the global repression of transcription observed in the grown

oocyte and early embryos, prior to the MZT. We have found that global expression seemed slightly affected in cells expressing H1FOO, however Q-PCR validation of the Affymetrix slide results confirmed that no somatic gene levels were significantly different from the controls. Since somatic H1 had mostly disappeared from the somatic chromatin, specific genes potentially controlled by H1s could have been affected in a positive or negative manner. In H1FOO cells, the eliminated H1s are presumably replaced by H1FOO present in the nuclei. Because single, double and triple depletion of histone H1s variants revealed that nucleosome/H1s ratios are most likely involved in chromatin functions (Fan et al. 2001; Fan et al. 2003; Fan et al. 2005), introduction of H1FOO might have restored “normal” ratios in these cells. These normal ratios combined with the remaining H1s could have prevented major changes in specific somatic genes.

Because H1FOO is likely the predominant linker H1 in oocytes (Clarke et al. 1992; Tanaka et al. 2001; Fu et al. 2003), some suggest that one of its functions may be to modulate the expression of oocyte-specific genes. We wondered if the mere insertion of H1FOO could promote the expression of transcripts that are preferentially present in oocytes or embryos. However, none of the 2,000 ESTs included on the Bovine embryo chip yielded at least a 2-fold expression variation. In an attempt to explain these results, we thought of 3 different possibilities. First, even if H1FOO conferred small variations upon nucleosomes that enabled the regulation of particular genes, potentially important factors or proteins present in the oocyte and required for this “oocyte” gene regulation are absent in somatic cells. Second, faint presence of the other H1s on the somatic chromatin may be enough to obstruct gene-regulating events controlled by H1FOO. Third, H1FOO is simply not involved in the regulation of transcription.

6.6.3 Modification of histone residues in H1FOO cells

In chromatin, linker H1 specifically represses acetylation of core histones. This inhibition originates from a steric barrier generated by the tails of linker H1 and not by the condensation of the chromatin fiber (Herrera et al. 2000). In some cases, removal or perturbation of this H1 obstacle appears to be necessary for the acetylation of histone tails

in chromatin. In one report, the reorganization of nucleosomal H1 before H3 acetylation seemed to be achieved by accessory proteins included in the multiprotein complex associated with PCAF (P300/CBP-associated factor), a histone acetyltransferase (HAT) (Herrera et al. 2000). They also demonstrated that uncomplexed PCAF inefficiently acetylates H3 residues in nucleosomes containing H1 histones, but is nonetheless able to acetylate neighboring nucleosomes that are not bound by H1. Our H1FOO cells exhibited a slight decrease in H3-K9 acetylation, which could possibly indicate that the addition of H1FOO is problematic for one or more HAT complexes. Acetylation of H3-K9 is well characterized and is associated with permissive chromatin during active transcription (Agalioti et al. 2002; Roh et al. 2005). Prior to its acetylation, it has been suggested that demethylation of H3-K9 is required (Yamane et al. 2006). Methylation of this residue is frequently linked to transcriptional repression of developmental genes and heterochromatin (Tachibana et al. 2002; Stancheva 2005). Transfected H1FOO cells exhibited relatively more of H3-K9 methylation, whereas H3-K4 methylation seemed less intense when compared to control cells. Compared to methylation of H3-K9, addition of tri-methyl groups on H3-K4 is localized on the transcription start sites of practically all active genes (Santos-Rosa et al. 2002; Schneider et al. 2004). Although only minimal global variations were observed for these three histone post-translational modifications, these results indicate that regions in the chromatin of H1FOO cells could be transcriptionally less permissive.

6.7 CONCLUSION

The preliminary work presented here reveals that when oocyte-specific H1FOO is inserted into somatic cells, it is able to displace the vast majority of nuclear somatic H1s. Although microarray analysis revealed a transcription repression tendency for hundreds of transcripts, no significant differences were observed between H1FOO and control cells. Also, we confirmed that insertion of this distinct linker histone on somatic chromatin did not promote the expression of genes preferentially expressed in oocytes. However, the expression of H1FOO conferred minor alterations for particular histone H3 modifications. These specific histone H3 post-transcriptional modifications are all associated with

chromatin that is less permissive to transcription, indicating that gene regulation could be affected in some way. Further investigation of other histone post-transcriptional modifications could give more information on the role of H1FOO in chromatin function. Some genes, not represented on our microarray slides, could still be under the control of H1FOO. However, if we make a parallel with somatic H1s, the number of genes affected could be very low.

6.8 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Maud Vallée, Catherine Gravel and Isabelle Dufort for their involvement in the generation of the Bovine embryo microarray. We also acknowledge Dr. Hugh Clarke for the somatic H1 histone antibody. This work was supported by funds from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). S. McGraw is supported by an NSERC studentship.

6.9 REFERENCES

- Agalioti T, Chen G, Thanos D. 2002. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* 111(3):381-392.
- Becker M, Becker A, Miyara F, Han Z, Kihara M, Brown DT, Hager GL, Latham K, Adashi EY, Misteli T. 2005. Differential *in vivo* binding dynamics of somatic and oocyte-specific linker histones in oocytes and during ES cell nuclear transfer. *Molecular biology of the cell* 16(8):3887-3895.
- Bordignon V, Clarke HJ, Smith LC. 1999. Developmentally regulated loss and reappearance of immunoreactive somatic histone H1 on chromatin of bovine morula-stage nuclei following transplantation into oocytes. *Biology of reproduction* 61(1):22-30.
- Bordignon V, Clarke HJ, Smith LC. 2001. Factors controlling the loss of immunoreactive somatic histone H1 from blastomere nuclei in oocyte cytoplasm: a potential marker of nuclear reprogramming. *Developmental biology* 233(1):192-203.
- Carruthers LM, Bednar J, Woodcock CL, Hansen JC. 1998. Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. *Biochemistry* 37(42):14776-14787.
- Carruthers LM, Hansen JC. 2000. The core histone N termini function independently of linker histones during chromatin condensation. *The Journal of biological chemistry* 275(47):37285-37290.
- Clarke HJ, Oblin C, Bustin M. 1992. Developmental regulation of chromatin composition during mouse embryogenesis: somatic histone H1 is first detectable at the 4-cell stage. *Development (Cambridge, England)* 115(3):791-799.
- De S, Brown DT, Lu ZH, Leno GH, Wellman SE, Sittman DB. 2002. Histone H1 variants differentially inhibit DNA replication through an affinity for chromatin mediated by their carboxyl-terminal domains. *Gene* 292(1-2):173-181.
- Drabent B, Franke K, Bode C, Kosciessa U, Bouterfa H, Hameister H, Doenecke D. 1995. Isolation of two murine H1 histone genes and chromosomal mapping of the H1 gene complement. *Mamm Genome* 6(8):505-511.
- Fan Y, Nikitina T, Morin-Kensicki EM, Zhao J, Magnuson TR, Woodcock CL, Skoultchi AI. 2003. H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing *in vivo*. *Molecular and cellular biology* 23(13):4559-4572.
- Fan Y, Nikitina T, Zhao J, Fleury TJ, Bhattacharyya R, Bouhassira EE, Stein A, Woodcock CL, Skoultchi AI. 2005. Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* 123(7):1199-1212.
- Fan Y, Sirotkin A, Russell RG, Ayala J, Skoultchi AI. 2001. Individual somatic H1 subtypes are dispensable for mouse development even in mice lacking the H1(0) replacement subtype. *Molecular and cellular biology* 21(23):7933-7943.
- Fischle W, Wang Y, Allis CD. 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Current opinion in cell biology* 15(2):172-183.

- Fu G, Ghadam P, Sirotkin A, Khochbin S, Skoultchi AI, Clarke HJ. 2003. Mouse oocytes and early embryos express multiple histone H1 subtypes. *Biology of reproduction* 68(5):1569-1576.
- Gao S, Chung YG, Parseghian MH, King GJ, Adashi EY, Latham KE. 2004. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Developmental biology* 266(1):62-75.
- Hellauer K, Sirard E, Turcotte B. 2001. Decreased expression of specific genes in yeast cells lacking histone H1. *The Journal of biological chemistry* 276(17):13587-13592.
- Hendzel MJ, Lever MA, Crawford E, Th'ng JP. 2004. The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin in vivo. *The Journal of biological chemistry* 279(19):20028-20034.
- Herrera JE, West KL, Schiltz RL, Nakatani Y, Bustin M. 2000. Histone H1 is a specific repressor of core histone acetylation in chromatin. *Molecular and cellular biology* 20(2):523-529.
- Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science (New York, NY)* 293(5532):1074-1080.
- Juan LJ, Utley RT, Vignali M, Bohm L, Workman JL. 1997. H1-mediated repression of transcription factor binding to a stably positioned nucleosome. *The Journal of biological chemistry* 272(6):3635-3640.
- Khochbin S. 2001. Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* 271(1):1-12.
- Laybourn PJ, Kadonaga JT. 1991. Role of nucleosomal cores and histone H1 in regulation of transcription by RNA polymerase II. *Science (New York, NY)* 254(5029):238-245.
- Lu X, Hansen JC. 2004. Identification of specific functional subdomains within the linker histone H1 C-terminal domain. *The Journal of biological chemistry* 279(10):8701-8707.
- McGraw S, Robert C, Massicotte L, Sirard MA. 2003. Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biology of reproduction* 68(2):383-389.
- McGraw S, Vigneault C, Sirard MA. 2007. Temporal expression of factors involved in chromatin remodeling and in gene regulation during early bovine in vitro embryo development. *Reproduction (Cambridge, England)* 133(3):597-608.
- McGraw S, Vigneault C, Tremblay K, Sirard MA. 2006. Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. *Molecular reproduction and development* 73(6):692-699.
- Nishida H, Suzuki T, Kondo S, Miura H, Fujimura Y, Hayashizaki Y. 2006. Histone H3 acetylated at lysine 9 in promoter is associated with low nucleosome density in the vicinity of transcription start site in human cell. *Chromosome Res* 14(2):203-211.
- Parseghian MH, Hamkalo BA. 2001. A compendium of the histone H1 family of somatic subtypes: an elusive cast of characters and their characteristics. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 79(3):289-304.
- Pennings S, Meersseman G, Bradbury EM. 1994. Linker histones H1 and H5 prevent the mobility of positioned nucleosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(22):10275-10279.
- Polach KJ, Widom J. 1995. Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation. *Journal of molecular biology* 254(2):130-149.

- Rechsteiner M, Wu LH, Miller AO. 1985. RBC-mediated microinjection of chromatin components into cultured mammalian cells. *Bibliotheca haematologica*(51):142-149.
- Roh TY, Cuddapah S, Zhao K. 2005. Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. *Genes & development* 19(5):542-552.
- Sakagami H, Mitsui Y, Murota S, Yamada M. 1982. Effect of growth stage on histone H1 metabolism in human diploid fibroblasts. *Journal of cellular physiology* 110(2):213-218.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419(6905):407-411.
- Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nature cell biology* 6(1):73-77.
- Schotta G, Lachner M, Peters AH, Jenuwein T. 2004. The indexing potential of histone lysine methylation. *Novartis Foundation symposium* 259:22-37; discussion 37-47, 163-169.
- Sera T, Wolffe AP. 1998. Role of histone H1 as an architectural determinant of chromatin structure and as a specific repressor of transcription on *Xenopus* oocyte 5S rRNA genes. *Molecular and cellular biology* 18(7):3668-3680.
- Shen X, Gorovsky MA. 1996. Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription in vivo. *Cell* 86(3):475-483.
- Sirard MA, Dufort I, Vallee M, Massicotte L, Gravel C, Reghenas H, Watson AJ, King WA, Robert C. 2005. Potential and limitations of bovine-specific arrays for the analysis of mRNA levels in early development: preliminary analysis using a bovine embryonic array. *Reproduction, fertility, and development* 17(1-2):47-57.
- Smith LC, Meirelles FV, Bustin M, Clarke HJ. 1995. Assembly of somatic histone H1 onto chromatin during bovine early embryogenesis. *The Journal of experimental zoology* 273(4):317-326.
- Stancheva I. 2005. Caught in conspiracy: cooperation between DNA methylation and histone H3K9 methylation in the establishment and maintenance of heterochromatin. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 83(3):385-395.
- Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y. 2002. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & development* 16(14):1779-1791.
- Tanaka M, Hennebold JD, Macfarlane J, Adashi EY. 2001. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development (Cambridge, England)* 128(5):655-664.
- Tanaka M, Kihara M, Hennebold JD, Eppig JJ, Viveiros MM, Emery BR, Carrell DT, Kirkman NJ, Meczekalski B, Zhou J, Bondy CA, Becker M, Schultz RM, Misteli T, De La Fuente R, King GJ, Adashi EY. 2005. H1FOO is coupled to the initiation of oocytic growth. *Biology of reproduction* 72(1):135-142.
- Teranishi T, Tanaka M, Kimoto S, Ono Y, Miyakoshi K, Kono T, Yoshimura Y. 2004. Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer. *Developmental biology* 266(1):76-86.

- Th'ng JP, Sung R, Ye M, Hendzel MJ. 2005. H1 family histones in the nucleus. Control of binding and localization by the C-terminal domain. *The Journal of biological chemistry* 280(30):27809-27814.
- Ura K, Kurumizaka H, Dimitrov S, Almouzni G, Wolffe AP. 1997. Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression. *The EMBO journal* 16(8):2096-2107.
- Vigneault C, McGraw S, Massicotte L, Sirard MA. 2004. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biology of reproduction* 70(6):1701-1709.
- Widom J. 1989. Toward a unified model of chromatin folding. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry* 18:365-395.
- Wolfe SA, Grimes SR. 1993. Histone H1t: a tissue-specific model used to study transcriptional control and nuclear function during cellular differentiation. *Journal of cellular biochemistry* 53(2):156-160.
- Wu RS, Panusz HT, Hatch CL, Bonner WM. 1986. Histones and their modifications. *CRC critical reviews in biochemistry* 20(2):201-263.
- Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y. 2006. JHDM2A, a JmJc-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* 125(3):483-495.
- Yuan GC, Ma P, Zhong W, Liu JS. 2006. Statistical assessment of the global regulatory role of histone acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome biology* 7(8):R70.

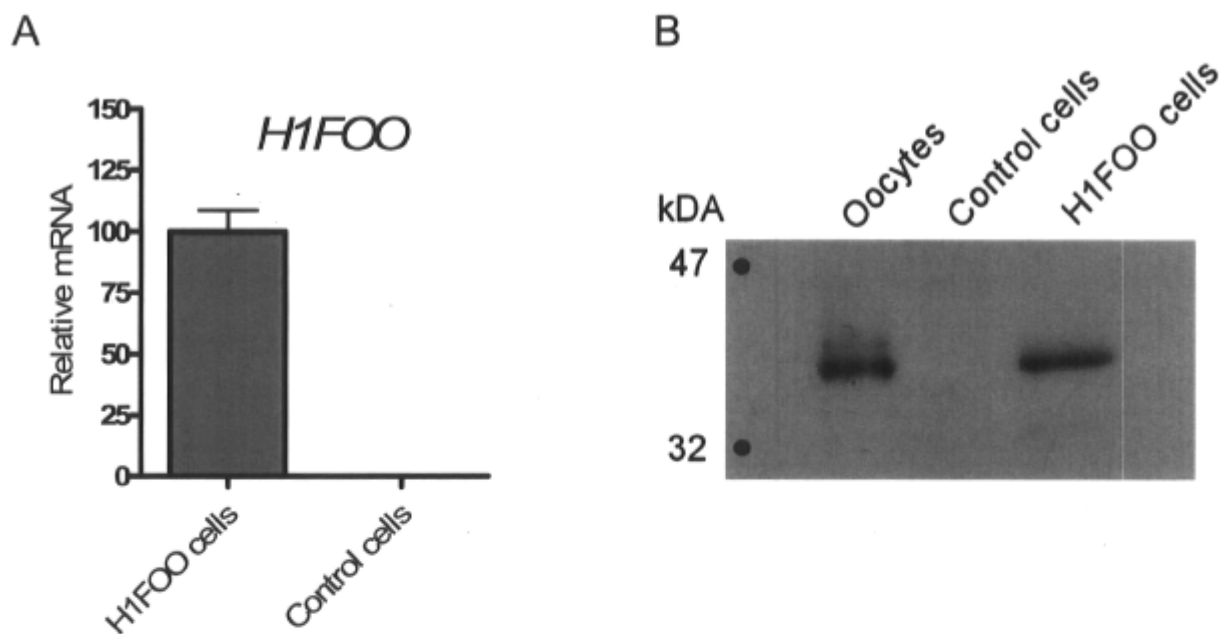


Figure 6.1. Expression of H1FOO in transfected somatic cells. A) Quantification by Q-PCR of *H1FOO* mRNA in cells transfected with pCMS-H1FOO-EGFP (H1FOO cells) or pCMS-EGFP (control cells). The relative mRNA levels (mean \pm SEM) shown represent the quantity of transcript corrected for the *GAPDH* value obtained for each cell sample. The highest level was attributed the relative value of 100. B) Western blot analysis of H1FOO protein in H1FOO and control cells. Protein extracts were subjected to SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose before being probed with an anti-bovine H1FOO. From left to right: oocytes (n = 50), control cells (5 μ g) and H1FOO cells (5 μ g).

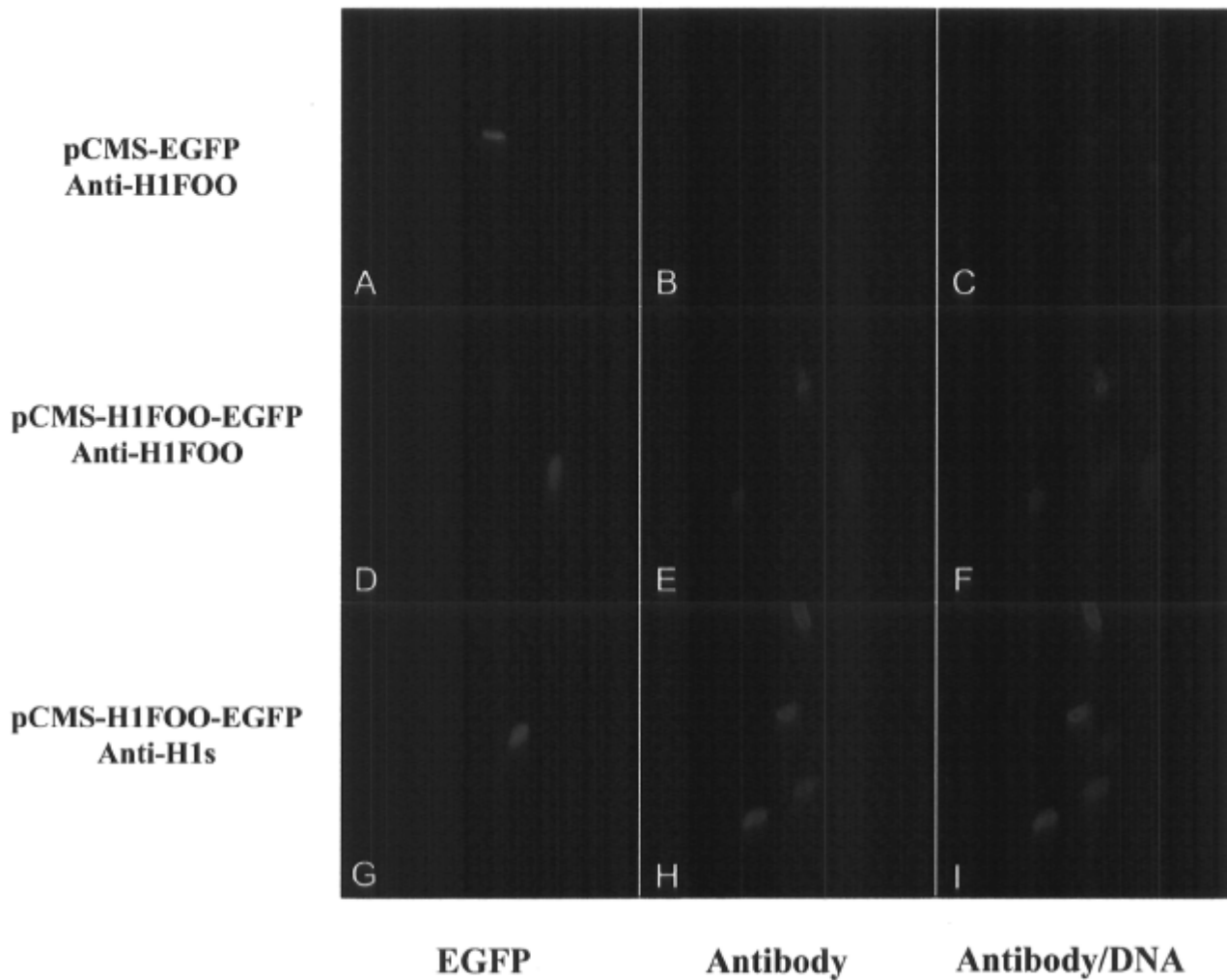


Figure 6.2. Localization of linker histones in somatic cells expressing H1FOO. Confocal representation of fibroblast cells transfected with pCMS-H1FOO-EGFP (A, D) or pCMS-EGFP (G) (green signal) and stained with antibodies against either H1FOO (B, E) or somatic H1s (H) (red signal). DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) (blue signal) was used to visualize cell DNA and results were merged with histone staining of the corresponding cells (C, F, I). Original magnification 600X.

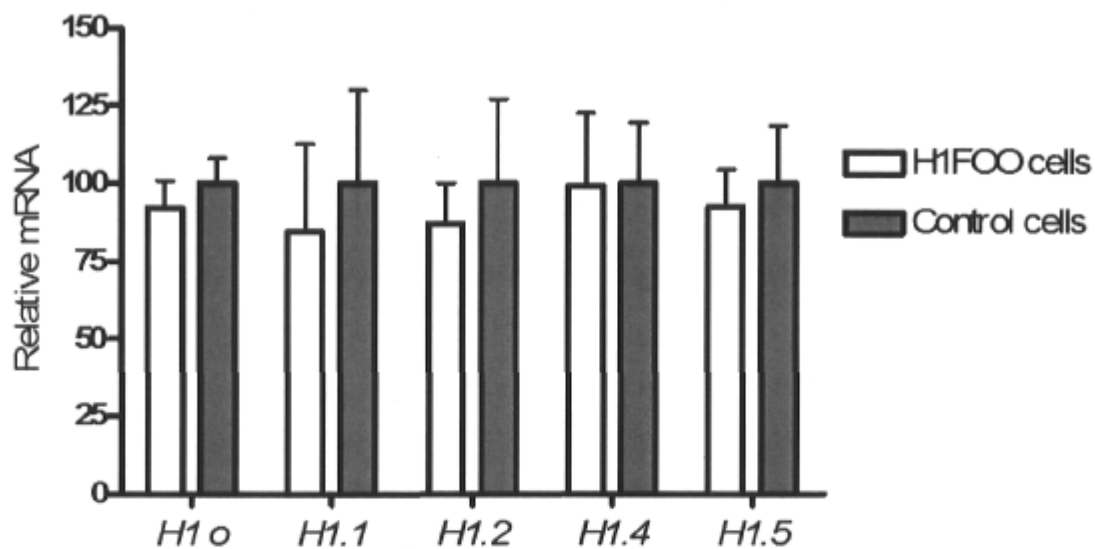


Figure 6.3. Quantification of linker H1o, H1.1, H1.2, H1.4 and H1.5 mRNAs in somatic cells expressing H1FOO. The relative mRNA levels (mean \pm SEM) shown represent the quantity of transcript corrected with the *GAPDH* value obtained for each cell sample by Q-PCR. Bars in gray represent pCMS-H1FOO-EGFP cells (H1FOO cells) whereas white bars stand for pCMS-EGFP cells (control cells). For each histone gene, the highest level was attributed the relative value of 100.

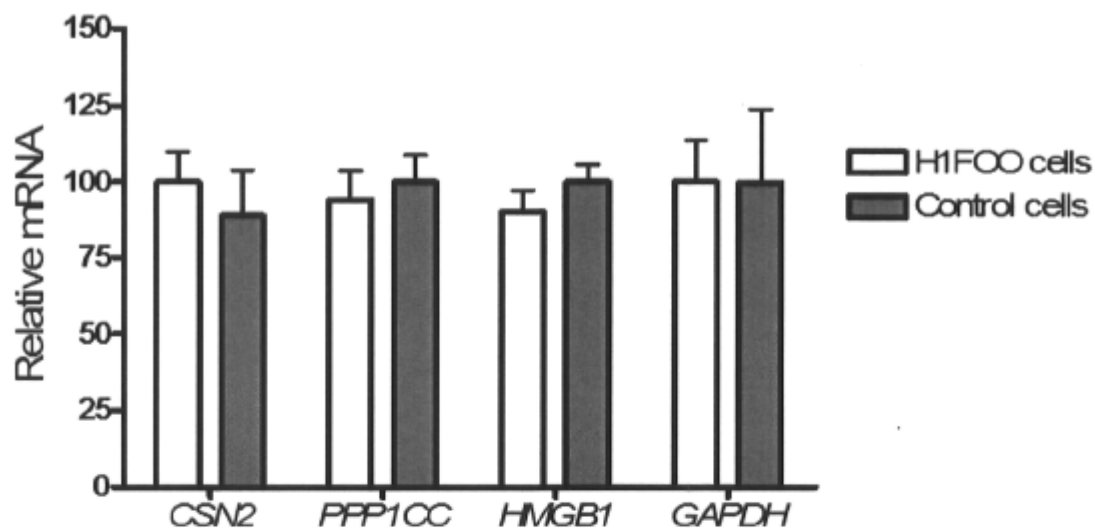


Figure 6.4. Validation of differentially expressed genes obtained on the Affymetrix microarray. Quantification by Q-PCR of *CSN2*, *PPP1CC*, *HMGB1* and *GAPDH* mRNA in somatic cells expressing H1FOO. The relative mRNA levels (mean \pm SEM) shown represent the quantity of transcript corrected with the *GAPDH* value acquired for each cell sample. Gray bars represent pCMS-H1FOO-EGFP cells (H1FOO cells) whereas white bars represent pCMS-EGFP cells (control cells). For each histone gene, the highest level between H1FOO and control cells was attributed the relative value of 100.

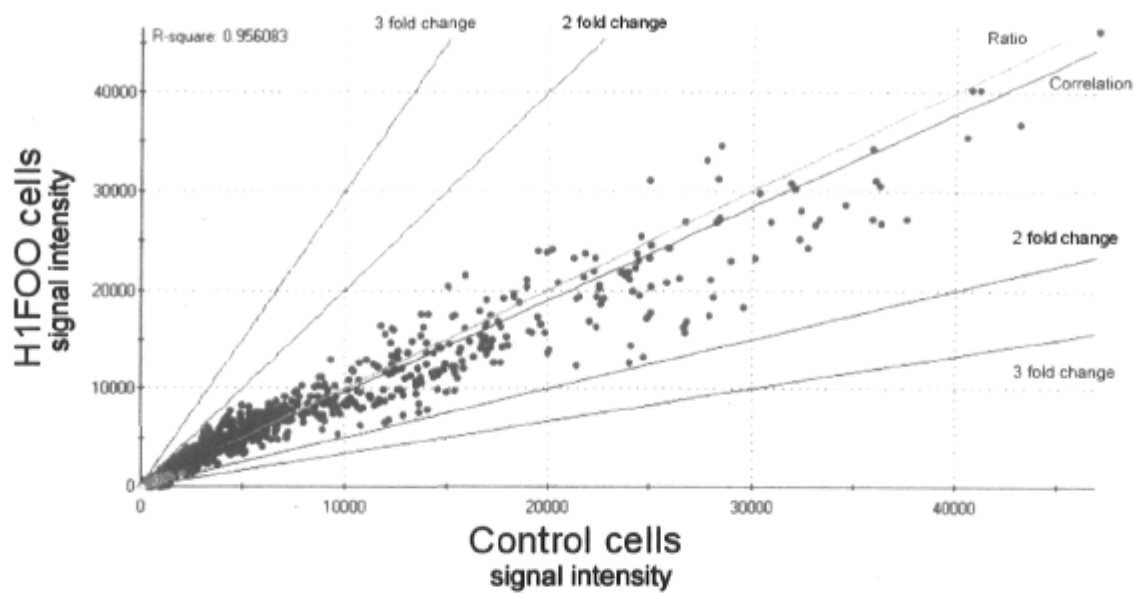


Figure 6.5. Analysis of the bovine embryo microarray. Scatter plot results for the signal intensities between pCMS-H1FOO (H1FOO cells) (y axis) and pCMS-EGFP (control cells) (x axis). In the graph, blue lines represent the limits of 2 and 3-fold expression changes between H1FOO and control cells, the green line represents the ratio and the pink line corresponds to the correlation. The red dots symbolize the signal intensities for each gene.

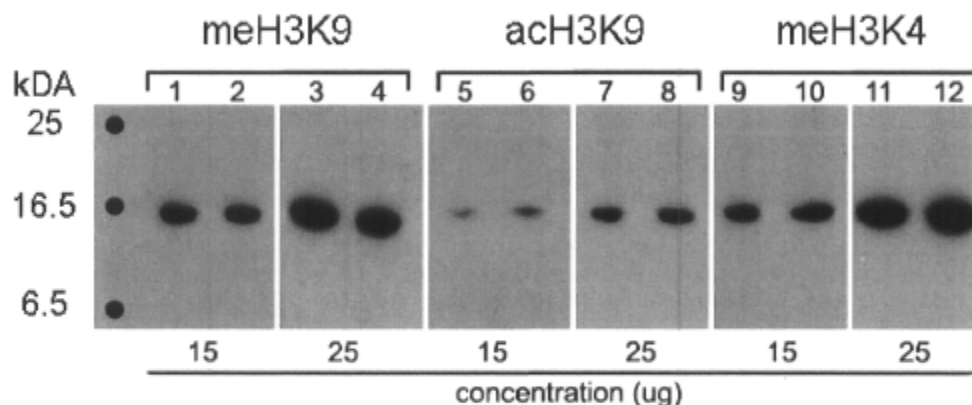


Figure 6.6. Histone H3 post-translational modifications in cells expressing H1FOO. Protein extracts from the same_FACS samples of pCMS-H1FOO-EGFP (lanes 1, 3, 5, 7, 9, and 11) or pCMS-EGFP (lanes 2, 4, 6, 8, 10, and 12) were resolved by SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose. Membranes were then probed with antibodies against H3 trimethyl lysine 9 (meH3K9), H3 acetyl lysine 9 (acH3K9) and H3 tri-methyl lysine 4 (meH3K4). The three different anti-H3 immunoblots within the same protein concentration (15 or 25 µg) were prepared from protein extracts migrated simultaneously on the same SDS-PAGE gel.

TABLES

Table 1. Primers Used for PCR Experiments.				
Gene	Primer sequences	GenBank accession number	PCR amplicon length (bp)	T_M (°C)*
<i>H1⁰</i>	Up 5'-tccaagaagtccacagaccac-3' Low 5'-gcgttctcaccacacctgta-3'	NM_001076487	137	60
<i>H1.1</i>	Up 5'-tggcaagaaggcgaagaag-3' Low 5'-tgttacctggtttcggtgc-3'	XM_870488	340	60
<i>H1.2</i>	Up 5'-tcaagaagaaggctgccaaa-3' Low 5'-ttgagcgcagctaaagaca-3'	XM_591742	131	60
<i>H1.4</i>	Up 5'-aaaccgctaagacgacctg-3' Low 5'-ttggctacctgggctatt-3'	XM_594072	145	60
<i>H1.5</i>	Up 5'-gagaccgctcctgcagaaa-3' Low 5'-gcagccaaagaaaggccat-3'	XM_605694	185	60
<i>H1FOO</i>	Up 5'- gccgagtgagtcaagaagg-3' Low 5'-ggtgaccgtggatttgaac-3'	NM_001035372	325	57
<i>CSN2</i>	Up 5'-ggcatatctctctgggatag-3' Low 5'-tccaaagtgaaggaggctatg-3'	BC111172	272	53
<i>PPP1CC</i>	Up 5'-ttacctgttctctgggacta-3' Low 5'-aacctccatgacagcagaata-3'	BC123502	269	53
<i>HMGB1</i>	Up 5'-attgaagacatggcaaagg-3' Low 5'-ttcccttagctcggatg-3'	BC102929	325	57
<i>GAPDH</i>	Up 5'-ccaacgtgtctgttgatctga-3' Low 5'-gagctgacaaagtggctgtgag-3'	BC102589	218	57

* T_M: Melting temperature

Table 2. Summary of Affymetrix Microarray Analysis of Gene Expression in H1FOO Cells

Symbol	Gene name	GenBank accession number	Signal intensity		Fold-change
			Control cells	H1FOO cells	
CSN2*	casein beta	M64756.1	2214	6628	2.99
PPP1CC	protein phosphatase 1	AW659556	1742	752	2.32
UGP2	UDP-glucose pyrophosphorylase 2	NM_174212.1	1708	828	2.06
EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	NM_174310.2	1555	695	2.24
TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	NM_182788.1	1441	683	2.11
ATP2C1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, type 2C #1	NM_175785.2	1376	660	2.08
GNAI1	adenylate cyclase-inhibiting G alpha protein	NM_174324.2	1288	466	2.76
NTS	neurotensin	NM_173945.2	1003	427	2.35
VDP	vesicle docking protein p115	NM_174845.1	957	460	2.08
UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	NM_174211.2	844	423	2.00
RAP1A	RAP1A, member of RAS oncogene family	CK777410	837	363	2.31
ARPP-19	cAMP-regulated phosphoprotein	M33618.1	752	325	2.31
NDUFB2	NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex, 2	CK959706	738	348	2.12
HMGB1	high-mobility group box 1	BP107600	720	315	2.29
GAPDH**	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AV610889	10726	9358	1.15

* Gene with increased expression in H1FOO cells

** Gene with stable expression in H1FOO and control cells

Genes in bold letters were used in Q-PCR experiments to validate Affymetrix microarray results

7 CHAPTITRE #VII: CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'objectif général de cette thèse était d'étudier des facteurs potentiellement impliqués dans le remodelage de la chromatine de l'ovocyte et du jeune embryon, afin d'identifier des éléments jouant un rôle important durant cette période cruciale du développement.

Comme nous avons pu le percevoir dans le chapitre I, la croissance et le développement de l'ovocyte nécessitent l'instauration d'une multitude de facteurs, qui sont fondamentaux pour l'acquisition de la compétence au développement. Cette compétence est non seulement nécessaire au développement de l'ovocyte et de l'embryon, mais également pour la production d'une progéniture normale viable (Duranton and Renard 2001; Sirard 2001; Trounson et al. 2001). Les éléments nécessaires à ce processus sont accumulés sous forme de protéines et d'ARNm durant la croissance de l'ovocyte (Rodman and Bachvarova 1976). Depuis quelques années, notre laboratoire a mis beaucoup d'efforts afin de mettre à jour certains de ces gènes (Coenen et al. 2004; Dode et al. 2006; Massicotte et al. 2006; Mourot et al. 2006; Robert et al. 2000; Robert et al. 2001; Robert et al. 2003; Robert et al. 2002; Vallee et al. 2005; Vallee et al. 2006). Cependant, malgré les nombreuses études reliées à la compétence de l'ovocyte, on ignore toujours comment ce processus unique est favorisé. En effet, comment la chromatine de l'ovocyte en croissance peut-elle servir de plan, à la fois pour la transcription de gènes ovocytaires spécifiques, et pour la transcription de gènes dits housekeeping ou somatiques. Même si les circonstances particulières derrière un tel mécanisme demeurent élusives, elles doivent nécessairement faire intervenir différents éléments qui modulent les fonctions transcriptionnelles de la chromatine. À un certain point pendant le cheminement dans l'ovocyte, la synthèse de transcrits cesse (Fair et al. 1996; Memili et al. 1998; Tomek et al. 2002) et demeure éteinte jusqu'à l'activation du génome embryonnaire (Figure 1.2). À travers les différentes étapes comprises entre la synthèse active d'ARNm dans l'ovocyte et dans la MET, la chromatine doit subir de nombreux

changements et remodelages afin de contrôler son activité transcriptionnelle. C'est dans cette optique particulière que les gènes étudiés pendant mon doctorat ont été sélectionnés. Le but était de faire le lien entre la présence de leur transcrit ou protéine, et les différents événements reliés aux remodelages de la chromatine.

Parmi les catégories de protéines ou complexes pouvant remodeler la chromatine, nos recherches ont ciblé particulièrement des gènes pouvant modifier cette dernière de façon covalente ou structurale. Les différents types d'histones ainsi que les modifications qui leur sont apportées ont été considérablement étudiées dans l'ovule et le jeune embryon, toutefois les protéines ainsi que les complexes responsables de ces diverses modifications épigénétiques ont reçu beaucoup moins d'attention. Ces différentes modifications permettent de spéculer sur l'état transcriptionnel d'une région marquée.

Prenons comme exemple l'hyperacétylation du résidu H3-K9. Cette modification est associée avec des régions de chromatine transcriptionnellement active (euchromatine), tandis que son hypoacétylation et son hyperméthylation indiquent plutôt que la région est inactive (hétérochromatine) (Biel et al. 2005). En utilisant les profils d'ARNm de 6 des 22 gènes que l'on a étudiés dans le chapitre II et III, on peut stipuler sur le processus de modification de H3-K9. Les modifications apportées sur H3-K9 ont été surtout étudiées par immunocytochimie, dans l'ovocyte et le jeune embryon de diverses espèces. Chez la chèvre, la chromatine de l'ovocyte en GV présente des signes intenses d'acétylation de H3-K9, cependant avec la reprise de la méiose l'intensité de cette marque épigénétique s'estompe (Tang et al. 2007). Cette diminution n'est que temporaire puisque l'intensité augmente à nouveau sur la chromatine et sur le premier globule polaire expulsé de l'ovocyte mature (MII). Chez le bovin, cette intensité est maintenue jusqu'au stade 4-cellules puis on décèle une phase d'hypoacétylation qui perdure jusqu'au stade 16-cellules (Santos et al. 2003). Une des enzymes responsables de l'acétylation des résidus de H3-K9 se nomme GCN5. Nous avons démontré que pendant la période comprise entre l'ovocyte en GV et le blastocyste, les transcrits codant pour GCN5 sont relativement stables (Chapitre II). Cependant les niveaux relatifs d'ARNm de GCN5 ont tendance à corroborer avec les analyses protéiques de H3-K9 acétylée, puisqu'on retrouve la plus haute

concentration de son transcrit avec le retour du marquage en MII et la plus faible concentration avec la perte du marquage au stade 8-cellules (Chapitre II). Ce gène est essentiel chez la drosophile puisque sa perte entraîne une interruption de l'acétylation de H3-K9, ce qui cause le blocage de l'ovogenèse et l'arrêt du développement embryonnaire (Carre et al. 2005). Comme vu dans le chapitre I, l'acétylation est une réaction complètement réversible et catalysée par les HDACs (Biel et al. 2005). La perte d'acétylation de H3-K9 pendant la reprise de la méiose ovocytaire du mouton (Tang et al. 2007) ainsi que de la souris (Kim et al. 2003) doit nécessairement faire appel à certaines de ces HDACs. Cette réaction spécifique, soit l'enlèvement des groupements acétyls de H3-K9, serait provoquée par un complexe renfermant les enzymes HDAC1/HDAC2 (Shi et al. 2003), deux enzymes présentes dans l'ovocyte et dans les jeunes embryons de souris (Segev et al. 2001). Chez le bovin, les patrons d'ARNm que nous avons tracés pour ces deux gènes sont très similaires au profil protéique de la souris, c'est-à-dire, que les niveaux sont plus faibles dans l'ovocyte et dans les premiers clivages mais s'accroissent plus loin dans le développement (Chapitre II). Pendant cette période de développement, il y a une coexistence des résidus H3-K9 méthylés et acétylés sur la chromatine. Chez la souris, la forme méthylée de H3-K9 est présente dans l'ovocyte en GV ainsi que dans l'œuf fécondé, mais comparativement à H3-K9 acétylée, on ne la détecte pas sur le génome paternel décondensé (Yeo et al. 2005). L'intensité du marquage de H3-K9 di-méthylée est plutôt faible dans les premiers stades de clivages embryonnaires bovins, mais elle s'amplifie à partir de l'embryon 16-cellules (Santos et al. 2003). La mono- et di-méthylation de H3-K9 pendant le développement embryonnaire sont principalement sous le contrôle d'un complexe hétérodimérique formé de EHMT1 et EHMT2 (Tachibana et al. 2002; Tachibana et al. 2005). Ces deux protéines s'avèrent essentielles puisqu'elles sont impliquées dans la répression de gènes développementaux dans l'euchromatine (Tachibana et al. 2002). Nos analyses quantitatives révèlent que de hauts niveaux d'expression pour ces deux HKMTs sont mesurés avant la MET bovine, comparativement à ceux retrouvés par la suite (Chapitre III). Les modifications épigénétiques que ces gènes apportent sont peut-être plus importantes dans l'ovocyte et dans les premiers stades embryonnaires, même si les embryons ont un marquage plutôt faible pour H3-K9 di-méthylée. L'activation du génome embryonnaire pourraient déclencher l'expression de d'autres HKMTs impliquées dans la

di-méthylation de H3-K9. Comme mentionné auparavant, il y a une coexistence entre l'acétylation et la mono- et di-méthylation de H3-K9 sur la chromatine de l'ovocyte immature et l'embryon. Préalablement à leur acétylation, les résidus di-méthylés de H3-K9 doivent être d'abord déméthylés (de la Cruz et al. 2005). Les enzymes impliquées dans la déméthylation des histones ont été caractérisées tout récemment (JMJA et JMJD2B) (Klose et al. 2006; Yamane et al. 2006), mais leur présence dans l'ovocyte demeurait inconnue. Nous avons démontré que l'ARNm de ces deux gènes est bel et bien présent dans l'ovocyte et pendant le développement du jeune embryon (Chapitre III). De plus, leur profil coïncide avec les diminutions de di-méthylations de H3-K9 retrouvées dans les embryons 2-, 4-, et 8-cellules. Les niveaux accumulés dans l'ovocyte serviraient à la production de protéines nécessaires pour dégager les résidus H3-K9 de leur di-méthylation suite à la fécondation dans les stades 2- à 8-cellules.

À partir de la fonctionnalité de ces gènes, en associant leurs profils d'expression d'ARNm avec les modifications apportées sur H3-K9 dans l'ovocyte et dans le jeune embryon, il est possible de tracer une représentation du déroulement épigénétique pendant cette période. Par exemple, si on résume l'exemple mentionné ci-haut, l'hypothèse serait que : chez le bovin GCN5 est responsable de l'acétylation de H3-K9 dans l'ovocyte et le jeune embryon. GCN5 serait entre autre responsable de l'augmentation de cette modification sur la chromatine de l'ovocyte en MII, puis la réduction du marquage observée dans les clivages successifs serait causée par la diminution de cette protéine dans l'embryon. En parallèle, l'action du complexe HDAC1/HDAC2 déacétylerait les résidus de H3-K9 de l'ovocyte pendant la reprise de la méiose et serait aussi relié au maintien du faible niveau d'acétylation perçu durant les premiers stades de clivages. Toujours de façon analogue, le complexe EHMT1/EHMT2 contrôlerait la di-méthylation de H3-K9 sur la chromatine de l'ovocyte ainsi que pendant la fécondation. Dans les clivages subséquents à la fécondation, les déméthylases JMJA et JMJD2B confèreraient un état d'hypométhylation aux résidus H3-K9, jusqu'au moment où la di-méthylation reviennent s'installer sur la chromatine des embryons en période de MET.

La mise en place d'une telle représentation globale de facteurs épigénétiques impliqués dans la modulation des fonctions de la chromatine dans l'ovocyte et du jeune embryon peut aussi servir de piste afin d'expliquer différentes anomalies reliées aux modifications covalentes des histones. Par exemple, les embryons issus de protocoles de transfert nucléaire (TN) sont reconnus pour porter certaines anomalies épigénétiques entre autre sur leur résidu H3-K9 (Santos et al. 2003). Les embryons bovins TN compris entre les stades 2-cellules et blastocystes, démontrent une hyperméthylation et une hyperacétylation des résidus de H3-K9. Tracer le profil des 6 gènes (*GCN5*, *HDAC1*, *HDAC2*, *EHMT1*, *EHMT2*, *JMJ1A* et *JMJD2B*) potentiellement impliqués dans la régulation des modifications de H3-K9 pendant cette période pourrait s'avérer utile afin d'accroître notre compréhension sur l'activité du remodelage de la chromatine dans les embryons TN. Quelques études chez le buffle ont exploité ce concept afin de comparer, entre les embryons normaux et TN, les niveaux d'expression de gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine (Beyhan et al. 2007; Suteevun et al. 2006). Par exemple, dans le cas de HAT1, les embryons 2-cellules TN révèlent des niveaux plus faibles de transcrits comparativement aux embryons produits par FIV. Cependant, au stade blastocyste les niveaux des embryons TN surpassent ceux des embryons de FIV (Suteevun et al. 2006). Puisque HAT1 est impliquée dans la modification des histones cytoplasmiques destinées à l'ADN nucléaire (Kleff et al. 1995; Parthun et al. 1996) et potentiellement dans un complexe retrouvé à la fourche de réplication de la chromatine (Ruiz-Garcia et al. 1998), ces deux fonctions particulières pourraient être touchées dans ces embryons TN. Une étude démontre que le type cellulaire ainsi que l'efficacité des ces cellules en TN ont un impact direct sur les niveaux d'ARNm quantifiés pour différents gènes (Beyhan et al. 2007). Dans les blastocystes TN, le niveau de transcrits pour HDAC1 est plus faible lorsqu'on utilise des cellules jugées inefficaces en TN, tandis qu'avec des cellules dites efficaces en TN le niveau est essentiellement le même que dans des blastocystes FIV. Donc dans cet exemple particulier, l'efficacité des cellules en TN pourrait jouer un rôle important sur les niveaux de déacétylation des histones de l'embryon. Les anomalies épigénétiques retrouvées dans les embryons produits par TN ne résultent sûrement pas de la transcription erronée d'un seul gène, mais c'est en déterminant ceux qui sont fautifs qu'on réussira à tracer un portrait plus précis de la situation.

Je demeure conscient que l'interprétation de profils d'ARNm est hautement spéculative puisque l'intensité du messenger ne fait pas toujours foi de la présence protéique (Gygi et al. 1999). Il en est de même pour la signification de la diminution des niveaux de transcrits qui n'indique pas nécessairement qu'il y a eu traduction, mais qu'il pourrait aussi y avoir une dégradation de l'ARNm (Bachvarova et al. 1985). La demi-vie d'une protéine peut aussi fausser notre interprétation puisqu'elle peut parfois être longue et perdurer même après l'absence du messenger. Comme par exemple dans le cas du gène MATER, le niveau d'ARNm est extrêmement élevé dans l'ovocyte en GV mais chute drastiquement dans l'ovule mature et demeure faible jusqu'à sa disparition dans la morula (Pennetier et al. 2006). Par contre la quantité de protéine MATER reste sensiblement la même pendant toute cette période et on la détecte toujours dans le blastocyste éclos. Il arrive souvent que les patrons protéique et transcriptionnel d'un gène varient de façon comparable, comme dans le cas mentionné ci-haut pour HDAC1 et HDAC2 (Chapitre II; Segev et al. 2001). Nous avons aussi observé que les profils d'ARNm et de protéine pour HIFOO étaient très similaires dans le développement embryonnaire (Chapitre V).

Il est exact que l'analyse des transcrits par des techniques de biologie moléculaire (ex : Q-PCR, biopuce, SSH) n'est pas la procédure idéale si l'on veut associer une action concrète à un gène. Cependant ces techniques nous permettent d'utiliser des petites quantités de matériel de départ grâce aux méthodes d'amplification souvent nécessaires dans leur protocole. Les études en protéomique demandent généralement d'importantes quantités de protéines, chose souvent ardue et même impossible lorsqu'on travaille avec des ovules et embryons. Par exemple l'identification par spectrométrie de masse de protéines séparées sur gel en 2-dimensions demande quelque milliers d'ovocytes (Massicotte et al. 2006). La détection par immunobuvardage demande beaucoup moins de matériel, généralement une centaine d'ovocytes est suffisant pour identifier notre protéine d'intérêt (Chapitre IV et V), mais cette technique ne cible qu'un gène à la fois. L'immunocytochimie est une bonne alternative pour remédier au problème de quantité puisqu'on peut vérifier la présence de notre protéine d'intérêt dans un seul ovocyte ou embryon. Cette méthode nécessite cependant des anticorps sensibles et hautement spécifiques. Pour nous, un des facteurs les plus limitant pour les techniques nécessitant un anticorps spécifique au gène d'intérêt est la

disponibilité d'anticorps compatibles avec les séquences bovines. Il en demeure que la meilleure façon d'étudier la fonctionnalité d'un gène est de complètement le déléter en produisant des animaux « knock-out ». Cette technique n'est pas avantageuse lorsqu'on travaille chez une espèce comme le bovin, puisque la production de tels animaux devient extrêmement coûteuse et exige énormément de temps. Chez les espèces où le « knock-out » est pratiquement impensable, une approche alternative peut être utilisée afin d'étudier certains gènes pendant la période de développement in vitro de l'embryon : les ARN interférences (ARNi) (Svoboda et al. 2000). Cette méthode n'empêche pas complètement la production de l'ARNm du gène cible, mais diminue significativement sa présence. Cette technique a été utilisée dans notre laboratoire sur des ovocytes de bovin afin de réduire la production de Cycline B1 (Paradis et al. 2005). L'injection de RNAi dans les ovocytes a causé une diminution de 90% des transcrits de la Cycline B1, ce qui a eu comme effet de rendre indétectable la protéine résultante. Nous utilisons présentement cette même technique afin de neutraliser la production de certains facteurs de transcription. Un de ces gènes, HMGN2, est responsable d'augmenter l'efficacité de l'initiation de la transcription (Paranjape et al. 1995). Cette protéine, qui est cytoplasmique dans l'ovocyte, devient nucléaire avec l'arrivée de la MET (travaux non publiés, Christian Vigneault). En détruisant l'importante quantité de transcrits retrouvés pour HMGN2 dans l'ovocyte immature, on espère empêcher son renouvellement et sa translocation au noyau. Une réduction ou une absence de HMGN2 dans le noyau nous permettrait d'évaluer son effet sur la transcription des embryons post-MET. Cependant, pour ce faire, il faut que l'accumulation de protéines maternelles ait fortement diminuée ou complètement disparue avec l'arrivée du stade 8-cellules. La présence de la protéine d'intérêt dans l'ovocyte représente un des aspects limitant de cette technique et pourrait compromettre les résultats escomptés.

Malgré certains désavantages associés aux techniques de biologie moléculaire, le profilage de transcrits spécifiques dans l'ovocyte et l'embryon se révèle une procédure efficace afin de postuler sur la présence d'un gène, ainsi que pour trouver des candidats intéressants pour une caractérisation plus poussée. L'approche utilisée nous a donc permis de profiler rapidement l'expression de plusieurs gènes à partir d'infimes quantités d'ARNm

d'ovocytes et d'embryons. C'est à partir des résultats obtenus par cette approche que nous avons décidé de caractériser plus en détails l'acétylase MYST4. Une analyse préliminaire en utilisant les mêmes échantillons que ceux utilisés dans l'étude exposée dans le chapitre II nous a permis de déterminer que MYST4 est très abondante dans l'ovocyte en GV et MII comparativement à certains stades embryonnaires. De plus, les transcrits de MYST4 dans ces stades sont environ 500 et 3500 fois plus abondants que ceux de GCN5 et HAT1 respectivement. L'étude protéique de MYST4 ne s'est pas faite sans embuches, car aucun des 4 différents anticorps commerciaux offerts contre MYST4 n'était fonctionnel, tant chez le bovin que chez la souris. Nous avons alors dû faire produire notre propre anticorps à partir d'une région ciblée de MYST4 bovin. Nos études protéiques ont pu associer de nouvelles fonctions à cette histone acétylase (Chapitre IV); entre autre, MYST4 est consignée à l'intérieur de certaines cellules spécialisées et impliquées dans la gamétogenèse. Même si elle semble a priori exprimée de façon relativement constante dans l'ovocyte et dans le jeune embryon, on remarque que dans certains stades, la protéine démontre une expression intense en proximité de la chromatine. Dans l'ovocyte en MI, on s'étonne de voir que MYST4 n'est pas localisée sur la chromatine, mais est plutôt distribuée à travers le fuseau mitotique. L'ovocyte en MI ne démontre pas (souris : Kim et al. 2003) ou peu (mouton : Tang et al. 2007) de résidus histones acétylés sur la chromatine. Il semble y avoir une différence évolutive sur les niveaux d'acétylation de la chromatine pendant la reprise de la méiose. Il en demeure que cette même chromatine doit être hypoacétylée étant donné qu'une déacétylation fautive au cours de la méiose est associée avec l'aneuploïdie et la mort embryonnaire (Akiyama et al. 2006). Il y a quand même certaines protéines qui sont acétylées pendant cette période. Les microtubules, plus spécifiquement les α -Tubulin, portent cette modification durant le cycle cellulaire et ce serait signe de stabilité (Wolf and Spanel-Borowski 1995). Cependant très peu de données sont disponibles sur les enzymes responsables de cette réaction. Le réarrangement et la fusion de MYST4 avec d'autres gènes sont associés avec des anomalies chromosomiques (Murati et al. 2004; Panagopoulos et al. 2001), mais il reste à éclaircir si ces troubles sont entraînés par une instabilité des chromosomes. Si tel est le cas, MYST4 pourrait potentiellement jouer un double rôle, un peu comme HDAC6 qui déacétyle les histones ainsi que les α -Tubulin (Matsuyama et al. 2002).

L'implication possible de MYST4 dans la transition histone-protamine dans les spermatocytes en élongation fut une surprise. Aucune autre HAT n'avait été impliquée auparavant avec la formation des gamètes mâles et femelles. Puisque CDYL est la seule autre HAT à être associée à l'acétylation des H4 lors de la transition histone-protamine de la spermatogenèse (Lahn et al. 2002), il sera intéressant dans le futur d'essayer de déterminer si CDYL et MYST4 interagissent entre elles à travers un même complexe. La Dre. Anne Kathrin Voss, qui est impliquée dans le projet des souris MYST4 mutantes, m'a confié qu'ils avaient découvert récemment que MYST4 était nécessaire dans d'autres fonctions et processus développementaux que ceux déjà mentionnés dans leur publication (Merson et al. 2006; Thomas et al. 2000). Cependant, elle m'a aussi mentionné qu'à première vue, les souris mutantes mâles et femelles ne semblent pas avoir de problème de fécondité. Cependant, lors de la mise-bas les mères ont de la difficulté à donner naissance. Après avoir subi la perte majeure des transcrits MYST4 (90%), ces souris réussissent à se développer même avec une panoplie d'anomalies (Thomas et al. 2000; Merson et al. 2006). Ceci démontre que l'enzyme MYST4 n'est peut être pas nécessaire à la survie, mais qu'elle joue quand même un rôle principal dans la régulation de plusieurs processus cellulaires.

L'étude que nous avons effectuée sur MYST4 en combinaison avec les autres publications sur ce gène démontrent bien que cette HAT semble posséder des propriétés qui lui sont propres (Champagne et al. 1999). Malgré plusieurs tentatives, aucun anti-MYST4 fonctionnel et spécifique n'avait été produit, ce qui a considérablement retardé la recherche sur ce gène depuis sa découverte. Nos efforts procurent cet outil hautement prisé. Il est présentement à l'essai dans le laboratoire du Dr. Yang, la même équipe qui a initialement découvert ce gène (Champagne et al. 1999).

Pour ce qui est de l'étude de H1FOO, nous avons plutôt investigué une protéine qui a le potentiel d'altérer la chromatine de par sa structure même, au lieu d'étudier une enzyme qui génère des modifications épigénétiques aux histones de la chromatine. Certaines indications nous permettaient de croire qu'elle pourrait jouer un rôle capital dans la régulation de l'expression génique chez l'ovocyte et le jeune embryon. Premièrement, elle est l'une des 3 histones H1 présentes sur la chromatine de l'ovocyte (H1FOO, H1c et H1^o)

(Fu et al. 2003; Tanaka et al. 2001). Deuxièmement, la grande quantité de H1FOO retrouvée dans l'ovocyte disparaît pendant la MET (Chapitre V), ce qui coordonne avec l'incorporation dans la chromatine des histones H1s (Clarke et al. 1992; Smith et al. 1995; Tanaka et al. 2001). Troisièmement, les histones H1s sont impliquées dans la régulation de l'expression génique (Fan et al. 2005; Sera and Wolffe 1998).

Pour valider notre hypothèse, on a surexprimé H1FOO dans des cellules somatiques dépourvues de cette protéine afin de voir l'effet qu'elle aurait sur l'expression génique. Cependant, nos analyses par biopuces et Q-PCR nous ont révélé que l'insertion de H1FOO dans des cellules somatiques n'est pas suffisant pour modifier l'expression génique, et ce malgré le délogement quasi total des H1s (Chapitre VI). L'insertion de H1FOO a quand même eu un impact sur la modulation de la chromatine, puisque 3 modifications covalentes de l'histone H3 ont été légèrement affectées. Globalement, les changements post-traductionnels apportés par H1FOO sur la chromatine somatique indiquent que celle-ci adhère à un état transcriptionnellement moins permissif.

Au début de ce projet, nous avons aussi émis l'hypothèse que lors d'un protocole de transfert nucléaire, l'ovocyte énucléé n'était pas capable de remplacer complètement les histones H1s du noyau somatique par ses propres H1FOO. Cette situation aurait pu être une des causes des problèmes de reprogrammation épigénétiques détectés dans les embryons TN. Par contre, la démonstration que les H1s étaient rapidement remplacées par H1FOO dans 100% des cellules insérées dans les ovocytes énucléés (Gao et al. 2004) venait contredire notre présomption. Après avoir obtenu nos résultats de biopuces (Affymetrix), on a voulu comparer sur ces dernières l'expression des blastocystes NT reconstruits à partir de nos cellules H1FOO et nos cellules contrôles. Puisque nos résultats préliminaires de biopuces révélaient que H1FOO semblait avoir remodelé la chromatine et altéré l'expression génique, nous avons voulu déterminer si une différence d'expression de transcrits serait décelée dans les blastocystes H1FOO. La détection de niveaux différents dans les blastocystes H1FOO versus les contrôles aurait pu s'expliquer par une pré-reprogrammation de la chromatine de la cellule H1FOO avant le transfert nucléaire. Cependant, avec les résultats des biopuces Affymetrix qui ne se confirmaient pas par Q-

PCR, le projet de transfert nucléaire a été mis sur glace. Dans les quelques expériences de transfert nucléaire que nous avons effectuées, les taux de fusions, de clivages et de développement étaient sensiblement les mêmes avec les cellules H1FOO ou contrôles. Avec les résultats d'immunobuvardage qui démontrent que H1FOO a provoqué des légers changements (Chapitre VI) qui correspondent avec un état de transcription moins permissif, les niveaux d'expression de certains gènes pourraient être affectés à long terme.

Les travaux effectués au cours de mon doctorat auront également permis d'associer pour une première fois, avec l'ovocyte et le jeune embryon, plusieurs gènes impliqués ou responsables de modifications épigénétiques retrouvées sur la chromatine. Plusieurs d'entre eux démontrent des profils très intéressants et mériteraient une caractérisation plus approfondie. Les gènes qui ont une plus grande intensité relative en ARNm dans les stades pré-MET (chapitre III) sont particulièrement intéressants car ils pourraient être associés aux remodelages de la chromatine et à la régulation génique pendant la période pré-MET. Je pense que le concept de surexpression et d'analyse par biopuces mis en place pour H1FOO serait propice pour analyser des HKMTs avec des transcrits principalement présents avant la MET. La surexpression de gènes comme EHMT1 et EHMT2, impliqués dans la répression de transcrits développementaux par leur action sur H3-K9 (Tachibana et al. 2002; Tachibana et al. 2005), pourraient nous informer sur le potentiel de ces enzymes à affaiblir ou invalider la synthèse de certains gènes somatiques absents ou faiblement présents dans l'ovocyte. Une telle transformation impliquerait un remodelage substantiel de la chromatine de ces cellules. D'ailleurs, il y a présentement un projet en développement dans notre laboratoire qui utilisera l'approche de surexpression afin d'incorporer des gènes ovocytaires (Vallee et al. 2005; Vallee et al. 2006) à l'intérieur de cellules somatiques afin de leur attribuer un certain degré de reprogrammation.

Un autre projet qui serait intéressant serait de réduire les transcrits de JARID1B par RNAi. Puisque son expression est largement activée dans l'embryon 8-cellules, ce gène serait un candidat parfait pour la technique de RNAi. Son inhibition partiel, ou même quasi total permettrait de déterminer si son activité de répression (Lu et al. 1999; Yamane et al. 2007) est nécessaire pour le développement du jeune embryon. La comparaison par biopuce

d'embryons inactivés pour JARID1B versus les embryons contrôles révélerait quels gènes sont affectés par cette enzyme pendant l'activation du génome embryonnaire. De plus, la découverte récente qui révèle que JARID1B est capable de déméthyliser les résidus H3-K4 tri-méthylés rend ce candidat encore plus intéressant, puisque pratiquement tous les gènes actifs présentent des H3-K4 tri-méthylés sur leurs sites de départ de transcription (Santos-Rosa et al. 2002; Schneider et al. 2004).

Plusieurs opportunités de projets découlent de notre étude sur MYST4 (Chapitre IV). On pourrait par exemple effectuer de la co-immunoprécipitation (pull-down) de MYST4 afin de déterminer avec quelles protéines elle s'associe pour produire un complexe catalytique. Son affinité pour ING5 dans le complexe acétylant H3-K14 (Doyon et al. 2006) ne doit surement pas être le seul puisqu'elle semble être responsable de l'acétylation des histones H4 des spermatides en élongation (Chapitre IV). Pour déterminer si MYST4 interagit avec certaines histones des différentes régions de la chromatine, on pourrait isoler ces segments par la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine. L'analyse des différents tissus des souris mutantes pour MYST4 pourrait établir si les anomalies observées aux divers endroits sont causées par l'absence totale de la protéine ou bien seulement par sa réduction. Cet anticorps offrira également un nouvel outil de recherche pour l'étude de MYST4 dans la leucémie myéloïde.

Pour ce qui est du projet H1FOO, je pense que nos résultats préliminaires soulèvent beaucoup de questionnements. Il faudrait déterminer si d'autres modifications épigénétiques sur les histones sont affectées par la présence de H1FOO dans les cellules somatiques. La détermination du ratio d'histone H1 par nucléosome ainsi que le pourcentage de chacune des H1 présente sur la chromatine des cellules H1FOO seraient intéressants afin de mesurer l'étendue du remplacement des H1s. L'approche choisie, soit celle des transfections transitoires, s'est révélée très efficace pour l'expression de H1FOO dans les cellules somatiques. Il se peut par contre que la période d'insertion de cette histone dans la chromatine ait été trop courte pour que l'on puisse noter un effet marquant sur l'expression génique, et ce même si le temps de transfection employé (48 h) était celui qui démontrait l'intensité protéique la plus forte pour H1FOO. Pour remédier à cette

situation, la génération de transfectants stables permettrait d'examiner l'effet de l'insertion de H1FOO à long terme dans la chromatine d'une cellule somatique. Avec cette méthode, on pourrait examiner si la transcription de cellules H1FOO est affectée après plusieurs cycles de réplication et de divisions cellulaires. Une façon d'augmenter la sensibilité de notre analyse de biopuce (lame Affymetrix) serait de trier préalablement par FACS nos cellules H1FOO (PCMS-H1FOO-EGFP) et contrôles (PCMS-EGFP) afin d'avoir des populations plus pures pour les hybridations. Lors de notre analyse initiale (lames Affymetrix), nous avons utilisé des populations de cellules H1FOO et contrôles non pures, ce qui a pu avoir comme effet de masquer les variations d'expression subtiles.

Le remodelage de la chromatine joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique. Chez l'ovocyte et le jeune embryon, ce processus fondamental est impliqué entre autre dans la reprogrammation du génome. Toutefois, malgré l'élaboration d'ébauches tentant d'expliquer la logistique d'un tel processus, il manque encore énormément de pièces pour compléter cet immense casse-tête. L'association de facteurs épigénétiques avec cette période développementale est essentielle si on pense un jour dévoiler comment leurs modifications modulent les différentes fonctions de la chromatine.

7.1 BIBLIOGRAPHIE

- Akiyama T, Nagata M, Aoki F. 2006. Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(19):7339-7344.
- Bachvarova R, De Leon V, Johnson A, Kaplan G, Paynton BV. 1985. Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental biology* 108(2):325-331.
- Beyhan Z, Forsberg EJ, Eilertsen KJ, Kent-First M, First NL. 2007. Gene expression in bovine nuclear transfer embryos in relation to donor cell efficiency in producing live offspring. *Molecular reproduction and development* 74(1):18-27.
- Biel M, Wascholowski V, Giannis A. 2005. Epigenetics--an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. *Angewandte Chemie (International ed)* 44(21):3186-3216.
- Carre C, Szymczak D, Pidoux J, Antoniewski C. 2005. The histone H3 acetylase dGcn5 is a key player in *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Molecular and cellular biology* 25(18):8228-8238.
- Champagne N, Bertos NR, Pelletier N, Wang AH, Vezmar M, Yang Y, Heng HH, Yang XJ. 1999. Identification of a human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein. *The Journal of biological chemistry* 274(40):28528-28536.
- Clarke HJ, Oblin C, Bustin M. 1992. Developmental regulation of chromatin composition during mouse embryogenesis: somatic histone H1 is first detectable at the 4-cell stage. *Development (Cambridge, England)* 115(3):791-799.
- Coenen K, Massicotte L, Sirard MA. 2004. Study of newly synthesized proteins during bovine oocyte maturation in vitro using image analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Molecular reproduction and development* 67(3):313-322.
- de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas MA. 2005. Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* 27(2):164-175.
- Dode MA, Dufort I, Massicotte L, Sirard MA. 2006. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Molecular reproduction and development* 73(3):288-297.
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ, Cote J. 2006. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Molecular cell* 21(1):51-64.
- Duranthon V, Renard JP. 2001. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 55(6):1277-1289.
- Fair T, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1996. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. *Molecular reproduction and development* 43(4):503-512.

- Fan Y, Nikitina T, Zhao J, Fleury TJ, Bhattacharyya R, Bouhassira EE, Stein A, Woodcock CL, Skoultschi AI. 2005. Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* 123(7):1199-1212.
- Fu G, Ghadam P, Sirotkin A, Khochbin S, Skoultschi AI, Clarke HJ. 2003. Mouse oocytes and early embryos express multiple histone H1 subtypes. *Biology of reproduction* 68(5):1569-1576.
- Gao S, Chung YG, Parseghian MH, King GJ, Adashi EY, Latham KE. 2004. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Developmental biology* 266(1):62-75.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and cellular biology* 19(3):1720-1730.
- Kim JM, Liu H, Tazaki M, Nagata M, Aoki F. 2003. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *The Journal of cell biology* 162(1):37-46.
- Kleff S, Andrulis ED, Anderson CW, Sternglanz R. 1995. Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 270(42):24674-24677.
- Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. 2006. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nature reviews* 7(9):715-727.
- Lahn BT, Tang ZL, Zhou J, Barndt RJ, Parvinen M, Allis CD, Page DC. 2002. Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(13):8707-8712.
- Lu PJ, Sundquist K, Baeckstrom D, Poulson R, Hanby A, Meier-Ewert S, Jones T, Mitchell M, Pitha-Rowe P, Freemont P, Taylor-Papadimitriou J. 1999. A novel gene (PLU-1) containing highly conserved putative DNA/chromatin binding motifs is specifically up-regulated in breast cancer. *The Journal of biological chemistry* 274(22):15633-15645.
- Massicotte L, Coenen K, Mourot M, Sirard MA. 2006. Maternal housekeeping proteins translated during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Proteomics* 6(13):3811-3820.
- Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, Osada H, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Horinouchi S, Yoshida M. 2002. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO journal* 21(24):6820-6831.
- Memili E, Dominko T, First NL. 1998. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Molecular reproduction and development* 51(1):36-41.
- Merson TD, Dixon MP, Collin C, Rietze RL, Bartlett PF, Thomas T, Voss AK. 2006. The transcriptional coactivator Querkopf controls adult neurogenesis. *J Neurosci* 26(44):11359-11370.
- Mourot M, Dufort I, Gravel C, Algriany O, Dieleman S, Sirard MA. 2006. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Molecular reproduction and development* 73(11):1367-1379.
- Murati A, Adelaide J, Mozziconacci MJ, Popovici C, Carbuccia N, Letessier A, Birg F, Birnbaum D, Chaffanet M. 2004. Variant MYST4-CBP gene fusion in a t(10;16) acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 125(5):601-604.
- Panagopoulos I, Fioretos T, Isaksson M, Samuelsson U, Billstrom R, Strombeck B, Mitelman F, Johansson B. 2001. Fusion of the MORF and CBP genes in acute myeloid leukemia with the t(10;16)(q22;p13). *Human molecular genetics* 10(4):395-404.

- Paradis F, Vigneault C, Robert C, Sirard MA. 2005. RNA interference as a tool to study gene function in bovine oocytes. *Molecular reproduction and development* 70(2):111-121.
- Paranjape SM, Krumm A, Kadonaga JT. 1995. HMG17 is a chromatin-specific transcriptional coactivator that increases the efficiency of transcription initiation. *Genes & development* 9(16):1978-1991.
- Parthun MR, Widom J, Gottschling DE. 1996. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* 87(1):85-94.
- Pennetier S, Perreau C, Uzbekova S, Thelie A, Delaleu B, Mermillod P, Dalbies-Tran R. 2006. MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. *BMC developmental biology* 6:26.
- Robert C, Barnes FL, Hue I, Sirard MA. 2000. Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. *Molecular reproduction and development* 57(2):167-175.
- Robert C, Gagne D, Bousquet D, Barnes FL, Sirard MA. 2001. Differential display and suppressive subtractive hybridization used to identify granulosa cell messenger rna associated with bovine oocyte developmental competence. *Biology of reproduction* 64(6):1812-1820.
- Robert C, Gagne D, Lussier JG, Bousquet D, Barnes FL, Sirard MA. 2003. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction (Cambridge, England)* 125(3):437-446.
- Robert C, Hue I, McGraw S, Gagne D, Sirard MA. 2002. Quantification of cyclin B1 and p34(cdc2) in bovine cumulus-oocyte complexes and expression mapping of genes involved in the cell cycle by complementary DNA macroarrays. *Biology of reproduction* 67(5):1456-1464.
- Rodman TC, Bachvarova R. 1976. RNA synthesis in preovulatory mouse oocytes. *The Journal of cell biology* 70(1):251-257.
- Ruiz-Garcia AB, Sendra R, Galiana M, Pamblanco M, Perez-Ortin JE, Tordera V. 1998. HAT1 and HAT2 proteins are components of a yeast nuclear histone acetyltransferase enzyme specific for free histone H4. *The Journal of biological chemistry* 273(20):12599-12605.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419(6905):407-411.
- Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W, Dean W. 2003. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol* 13(13):1116-1121.
- Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nature cell biology* 6(1):73-77.
- Segev H, Memili E, First NL. 2001. Expression patterns of histone deacetylases in bovine oocytes and early embryos, and the effect of their inhibition on embryo development. *Zygote (Cambridge, England)* 9(2):123-133.
- Sera T, Wolffe AP. 1998. Role of histone H1 as an architectural determinant of chromatin structure and as a specific repressor of transcription on *Xenopus* oocyte 5S rRNA genes. *Molecular and cellular biology* 18(7):3668-3680.

- Shi Y, Sawada J, Sui G, Affar el B, Whetstine JR, Lan F, Ogawa H, Luke MP, Nakatani Y, Shi Y. 2003. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature* 422(6933):735-738.
- Sirard MA. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55(6):1241-1254.
- Smith LC, Meirelles FV, Bustin M, Clarke HJ. 1995. Assembly of somatic histone H1 onto chromatin during bovine early embryogenesis. *The Journal of experimental zoology* 273(4):317-326.
- Suteevun T, Smith SL, Muenthaisong S, Yang X, Pampai R, Tian XC. 2006. Anomalous mRNA levels of chromatin remodeling genes in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. *Theriogenology* 65(9):1704-1715.
- Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM. 2000. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development (Cambridge, England)* 127(19):4147-4156.
- Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y. 2002. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & development* 16(14):1779-1791.
- Tachibana M, Ueda J, Fukuda M, Takeda N, Ohta T, Iwanari H, Sakihama T, Kodama T, Hamakubo T, Shinkai Y. 2005. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes & development* 19(7):815-826.
- Tanaka M, Hennebold JD, Macfarlane J, Adashi EY. 2001. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development (Cambridge, England)* 128(5):655-664.
- Tang LS, Wang Q, Xiong B, Hou Y, Zhang YZ, Sun QY, Wang SY. 2007. Dynamic Changes in Histone Acetylation during Sheep Oocyte Maturation. *J Reprod Dev.*
- Thomas T, Voss AK, Chowdhury K, Gruss P. 2000. Querkopf, a MYST family histone acetyltransferase, is required for normal cerebral cortex development. *Development (Cambridge, England)* 127(12):2537-2548.
- Tomek W, Torner H, Kanitz W. 2002. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 37(2):86-91.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones G. 2001. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction (Cambridge, England)* 121(1):51-75.
- Vallee M, Gravel C, Palin MF, Reghenas H, Stothard P, Wishart DS, Sirard MA. 2005. Identification of novel and known oocyte-specific genes using complementary DNA subtraction and microarray analysis in three different species. *Biology of reproduction* 73(1):63-71.
- Vallee M, Robert C, Methot S, Palin MF, Sirard MA. 2006. Cross-species hybridizations on a multi-species cDNA microarray to identify evolutionarily conserved genes expressed in oocytes. *BMC genomics* 7:113.
- Wolf KW, Spanel-Borowski K. 1995. Acetylation of alpha-tubulin in different bovine cell types: implications for microtubule dynamics in interphase and mitosis. *Cell biology international* 19(1):43-52.

- Yamane K, Tateishi K, Klose RJ, Fang J, Fabrizio LA, Erdjument-Bromage H, Taylor-Papadimitriou J, Tempst P, Zhang Y. 2007. PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Molecular cell* 25(6):801-812.
- Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y. 2006. JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* 125(3):483-495.
- Yeo S, Lee KK, Han YM, Kang YK. 2005. Methylation changes of lysine 9 of histone H3 during preimplantation mouse development. *Molecules and cells* 20(3):423-428.

Le retour du balancier....