

## Master 2 Reproduction et Développement Stage de recherche 2024-2025

Stage proposé par

**Nom et adresse du Laboratoire ou de l'Unité :**

Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier  
Université de Montpellier, CNRS UMR5535  
1919 route de Mende, 34090 Montpellier

**Téléphone :** 0434359728

**Mail :** [maud.borensztein@igmm.cnrs.fr](mailto:maud.borensztein@igmm.cnrs.fr)

**Site internet :** <https://www.igmm.cnrs.fr>

**Directeur du Laboratoire ou de l'Unité :** Etienne Schwob

**Intitulé de l'équipe d'accueil : Reprogrammation épigénétique et Développement**

**Prénom et NOM du Responsable de l'équipe : Maud BORENSZTEIN**

**Résumé du thème de recherche de l'équipe** (une dizaine de lignes maximum)

L'équipe « Reprogrammation Epigénétique et Développement » a ouvert en 2021 à l'Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM), avec le soutien de la FRM, de l'ATIP-Avenir, et de l'Université de Montpellier. L'équipe s'intéresse aux mécanismes épigénétiques qui régulent l'expression des gènes au cours du développement des mammifères, tels que l'inactivation du chromosome X et l'empreinte génomique. Nous possédons une grande expertise dans le développement pré et post-implantatoire murin, la lignée germinale, la dissociation de cellules uniques et l'immunochirurgie à partir d'embryons murins et humains, le séquençage d'ARN de cellules uniques, l'analyse bio-informatique, l'analyse de la chromatine par CUT&RUN et l'hybridation in situ (FISH) d'ARN naissants dans les embryons, ce qui sera fondamental pour le projet.

<https://www.igmm.cnrs.fr/team/reprogrammation-epigenetique-et-developpement/>

**Titre du projet de stage :**

**Role of the heterochromatin organising protein Ki-67 in female early mouse development**

**Prénom, NOM, téléphone et adresse e-mail du Responsable du stage : Maud BORENSZTEIN**  
[maud.borensztein@igmm.cnrs.fr](mailto:maud.borensztein@igmm.cnrs.fr)

**Projet de stage :** (une vingtaine de lignes maximum)

Heterochromatin, crucial for genome organisation, is epigenetically inherited across cell divisions, and conserved in eukaryotes. Heterochromatin, primarily forming on repeated genomic regions, is characterised by high local DNA density, DNA methylation and repressive histone marks. The inactive X-chromosome in females also undergoes heterochromatinization in order to be transcriptionally silent. This epigenetic mechanism leads to dosage compensation between sexes and is absolutely required for embryonic development (Borensztein et al, 2017a).

Our collaborator, Dr Daniel Fisher (IGMM) has shown that Ki-67 genetic ablation has no impact on cell proliferation, but instead leads to loss of key heterochromatin characteristics along with genome-wide effects on gene expression (Valverde et al, 2023). Conversely, increasing the levels of Ki-67 triggers formation of ectopic and aberrant heterochromatin throughout the nuclear space. In the light of these effects of Ki-67 loss, the fact that the *Mki67* mutant mice were viable and fertile was surprising (Sobecki et al, 2019). However, basal levels of Ki-67 persisted. To definitively answer the critical question of

## Master 2 Reproduction et Développement Stage de recherche 2024-2025

whether Ki-67 is required for mouse development, the Fisher lab recently generated and shared with us a double CRISPR-Cas9-mediated deletion of 25kb, resulting in a mutant mouse lacking the entire open reading frame of Ki-67 (Ki-67 $\Delta$ , unpublished). Our preliminary results show that homozygous Ki-67 $\Delta$  mice are not only viable but also fertile, even though their numbers are slightly below the anticipated values (15% versus 25% expected,  $p=0.01$ ). An intriguing observation emerges upon analysis of this sub-viability of Ki-67 $\Delta$  mice: female offspring are born at far below the expected frequency (8% versus 25% expected,  $p=0.0009$  Kruskal Wallis), whereas male viability is unaffected. Moreover, early data show that female embryos and newborns have reduced weight and abnormal placental development. These important results suggest a sex-specific defect in embryonic development, potentially linked to X-chromosome inactivation, thus affecting dosage compensation and survival of female embryos. One study already suggested that heterochromatinization of the inactive X-chromosome could require Ki-67 (in a human cancer cell line).

Very few proteins have a sex-specific effect during mammalian development and the *in vivo* role of Ki-67 in the X-chromosome inactivation dynamic process and early development has never been assessed. The objectives of this Master project are to characterise the absence of Ki-67 protein in pre-implantation female development and random X-chromosome inactivation. The student will collect embryos at different early developmental times, study their developmental stages and extra-embryonic tissue development (trophectoderm). Combined immunofluorescence and nascent RNA-FISH for X-linked gene will be performed. The student will ask whether Ki-67 is required for silencing of the inactive X-chromosome and/or for maintenance of its silent heterochromatic state later in development.

Better understanding of the function of Ki-67 is critical in regard to its extensive use as a biomarker in cancerology, more especially if Ki-67 could present sex-specific functions. This Master project is based on exciting preliminary results and has the potential to open new fields of research into the roles of Ki-67, epigenetics and development.

### Techniques mises en œuvre par le stagiaire :

Culture d'embryons de souris préimplantatoire  
Immunofluorescence  
RNA-FISH  
Single embryo RT-qPCR

### Publications du Responsable de stage au cours des 5 dernières années :

Farhadova S\*, Ghousein A\*, Charon F, Surcis C, Gomez-Velazques M, Roidor C, Di Michele F, **Borensztein M**, De Sario A, Esnault C, Noordermeer D, Moindrot B, Feil R. *The long non-coding RNA Meg3 mediates imprinted gene expression during stem cell differentiation*. **Nucleic Acids Res.** 2024 Apr; doi: 10.1093/nar/gkae247.

Moyano Rodriguez Y, **Borensztein M**. *X-chromosome inactivation: a historic topic that's still hot*. **Development.** 2023 Nov 15;150(22):dev202072. doi: 10.1242/dev.202072. PMID: 37997921

Roidor C.\*, Syx L.\*, Beyne E., Zielinski D., Teissandier A., Lee C., Walter M., Servant N., Chebli K., Bourc'his D., Surani M.A., **Borensztein M**<sup>†</sup>. Spatio-temporal X-linked gene reactivation and site-specific retention of epigenetic silencing in the mouse germline. **BiorXiv.** 2023, doi: 10.1101/2023.04.25.532252. <sup>†</sup> **corresponding author**

Galupa R, Picard C, Servant N, Nora EP, Zhan Y, van Bommel JG, El Marjou F, Jouhannau C, **Borensztein M**, Ancelin K, Giorgetti L, Heard E. *Inversion of a topological domain leads to restricted changes in its gene expression and affects interdomain communication*. **Development.** 2022, 149:dev200568. doi: 10.1242/dev.200568. Epub 2022 May 6.

Glaser J, Iranzo J, **Borensztein M**, Marinucci M, Gualtieri A, Jouhannau C, Teissandier A, Gaston-Massuet C, Bourc'his D. *The imprinted Zdf2 gene finely tunes control of feeding and growth in neonates*. **Elife.** 2022 ;11:e65641. doi: 10.7554/eLife.65641.

## Master 2 Reproduction et Développement Stage de recherche 2024-2025

**Borensztein M**<sup>†</sup>. *Investigating the inner cell mass of the mouse blastocyst by combined immunofluorescence staining and RNA fluorescent in situ hybridization. **Methods in Molecular Biology**, 2021, doi:10.1007/978-1-0716-0958-3\_11.*

<sup>†</sup> **corresponding author**

Ranisavljevic N, **Borensztein M**, Ancelin K. *Understanding chromosome structure during early mouse development by single-cell Hi-C analysis. **Methods in Molecular Biology**, 2021, doi: 10.1007/978-1-0716-0958-3\_19.*

Collombet S\*, Ranisavljevic N\*, Nagano T\*, Varnai C, Shisode T, Leung W, Pilot T, Galupa R, **Borensztein M**, Servant N, Fraser P, Ancelin K, Heard E. *Parental-to-embryo transition in chromosome organisation during early embryogenesis. **Nature**, 2020, 580, 142-146; doi: 10.1038/s41586-020-2125-Z.*

<b>Autres informations :</b>
------------------------------

**Etudiants actuellement en thèse ou en M2 dans l'équipe d'accueil.** Pour chaque étudiant indiquez le nom du responsable de thèse, l'année du début de la thèse et l'Ecole Doctorale de rattachement

- Clara Roidor, 3<sup>e</sup> année de thèse, début de thèse novembre 2021. Responsable Maud Borensztein, Ecole Doctorale CBS2
- Chaïmâa Belhaouari, étudiante en M2, Master IDIL, Université de Montpellier

**Etudiants ayant préparé ou soutenu leur thèse ou leur M2 dans l'équipe d'accueil au cours des six dernières années.** Pour chaque étudiant indiquez le nom du responsable de l'étudiant, l'année du début de la thèse et de fin de la thèse, l'Ecole Doctorale de rattachement et le devenir de l'étudiant.

**Etudiants en Master supervisés depuis l'ouverture de l'équipe en 2021**

- Lucie Bonnefon Craponne 2022, Université de Grenoble, supervision : M. Borensztein  
Actuellement IE au CNRS
- Laurine Jacob 2022, Université de Montpellier, supervision : Y. Moyano Rodriguez, M. Borensztein. Etudiante en thèse à l'Imperial College, Londres, UK

**Cette proposition de stage s'adresse-t-elle spécifiquement à un étudiant scientifique, médecin ou vétérinaire ou bien est-il ouvert à tous les profils ?**

Pas de profil spécifique.

**Ce sujet peut-il donner lieu à une thèse ?**

A discuter ultérieurement