



HAL
open science

Réorganisation de l'épigénome associé à la spermiogénèse

Jerome Govin

► **To cite this version:**

Jerome Govin. Réorganisation de l'épigénome associé à la spermiogénèse. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00104147

HAL Id: tel-00104147

<https://theses.hal.science/tel-00104147>

Submitted on 5 Oct 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier-Grenoble 1
Chimie et Science du Vivant
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

THÈSE

Pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Joseph Fourier
Discipline Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Jérôme GOVIN

Le 29 septembre 2006

Réorganisation de l'épigénome au cours de la spermiogénèse

Jury

Pr. Pierre COUBLE	Rapporteur
Pr. Eric GILSON	Rapporteur
Dr. Robert FEIL	Examineur
Dr. Saadi KHOCHBIN	Directeur de thèse
Pr. Stefan NONCHEV	Président du Jury

Thèse préparée au sein du laboratoire
Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation
Unité INSERM U U309
Institut Albert Bonniot
Université Joseph Fourier-Grenoble I

A Marion,

A ma famille,

REMERCIEMENTS

Je remercie les Professeurs Pierre Couble et Eric Gilson d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse, ainsi que le Docteur Robert Feil et le Professeur Stefan Nonchev d'avoir accepté de lire et évaluer ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Docteur Saadi Khochbin. Saadi, ton accompagnement sur mesure a rythmé ces quatre années de travail au son de nos nombreuses discussions. Merci pour ta confiance, tes patientes réponses à mes nombreuses questions, scientifiques ou non. Ton investissement dans nos projets et ton entière disponibilité ont créé un cadre de travail unique.

Je rends également hommage à l'ensemble des personnes qui a été impliqué dans mes travaux de thèse. Sophie et Cécile, merci pour nos interactions quotidiennes. Sandrine, Christine, Roberte et Martine merci pour toute votre aide.

Ces travaux n'auraient pas pu être réalisés sans Jérôme Garin, Myriam Ferro et Lauriane Kuhn (Inserm EMR 0201, CEA, Grenoble). Merci à vous pour votre investissement dans l'ensemble de mes projets !

Cette thèse a été saluée par l'union la plus improbable, entre Savoie, Isère et Haut Doubs... Benoît et Cyril se reconnaîtront de leur patrie respective... merci pour toutes nos discussions !

Les anciens sont une source inépuisable de sagesse et de conseils... André et Christophe, merci pour tout !

Je remercie naturellement toutes les personnes de l'équipe « Chromatine et Expression des gènes », ainsi que celles de l'unité U309 et de l'Institut Albert Bonniot, pour le cœur mis dans chacune de nos discussions, et dans la résolution de mes problèmes scientifiques et administratifs !

Je n'oublierai pas les personnes qui ont œuvré dans l'ombre de la science, celles qui permettent de s'évader dans les montagnes pour mieux revenir au labo. Merci à vous, Samuel, Aline, Eric, Marlène, la p'tite Marion (et la grande aussi !!), Stéphane, Nico, Fleur, Pascal et tous les autres. Le dernier mot sera en l'honneur de Laurent, sans qui cette aventure scientifique n'aurait pas été la même... merci pour tout !

Table des matières

Table des Figures.....	5
------------------------	---

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I. Structure de la chromatine	6
I.1. Etapes historiques de la découverte de la chromatine	6
I.2. Le nucléosome, élément de base de la chromatine.....	8
<i>I.2.1. La découverte du nucléosome</i>	<i>8</i>
<i>I.2.2. Les histones de cœur.....</i>	<i>9</i>
<i>I.2.3. Les histones de liaison</i>	<i>10</i>
I.3. Organisation fonctionnelle de la chromatine	11
I.4. Conclusion.....	13
II. Dynamique et plasticité de l'épigénome.....	13
II.1. Qu'est-ce que l'épigénome ?	13
II.2. La méthylation de l'ADN.....	14
<i>II.2.1. Les ADN méthyltransférases (DNMT).....</i>	<i>14</i>
<i>II.2.2. Un rôle fonctionnel répresseur chez les eucaryotes.....</i>	<i>16</i>
<i>II.2.3. Méthylation de l'ADN et répression de la transcription.....</i>	<i>16</i>
<i>II.2.4. Méthylation de l'ADN et empreinte parentale</i>	<i>17</i>
<i>II.2.5. Comment déméthyle ?</i>	<i>18</i>
II.3. Les modifications post traductionnelles des histones	19
<i>II.3.1. Une grande variété de modifications.....</i>	<i>19</i>
<i>II.3.2. Quel rôle fonctionnel ?.....</i>	<i>23</i>
<i>II.3.3. Vers de véritables voies de signalisation.....</i>	<i>25</i>
II.4. Les variants d'histone	26
<i>II.4.1. Qu'est-ce qu'un variant d'histone ?</i>	<i>26</i>
<i>II.4.2. Les variants d'histone de liaison.....</i>	<i>27</i>
<i>II.4.3. Les variants d'H2A</i>	<i>27</i>
<i>II.4.4. Les variants d'H3.....</i>	<i>31</i>
II.5. Dynamique d'assemblage et de positionnement des nucléosomes sur la chromatine.....	33
<i>II.5.1. Assemblage et désassemblage de la chromatine</i>	<i>33</i>
<i>II.5.2. Mobilisation des nucléosomes par les facteurs de remodelage</i>	<i>37</i>
II.6. L'intégration de signaux multiples crée l'épigénome.....	39
III. Quel épigénome est transmis par le gamète mâle?	39
III.1. Déroulement de la spermatogenèse des mammifères	40
<i>III.1.1. Organisation générale du testicule adulte</i>	<i>40</i>
<i>III.1.2. Déroulement de la spermatogenèse</i>	<i>40</i>
<i>III.1.3. Les cycles de la spermatogenèse</i>	<i>43</i>

III.2. Remodelage de la chromatine lors de la spermatogenèse	43
III.2.1. <i>Mise en place de la structure chromatinienne spermatique finale.....</i>	43
III.2.2. <i>Les variants d'histone.....</i>	46
III.2.3. <i>Une abondance de modifications post traductionnelles</i>	50
III.2.4. <i>Les acteurs connus du remodelage chromatinien.....</i>	53
III.3. L'épigénome du spermatozoïde	54
III.3.1. <i>Transmission de l'empreinte paternelle.....</i>	55
III.3.2. <i>L'organisation chromatinienne des spermatozoïdes</i>	56
III.3.3. <i>Les divers types d'ARN présents au sein des spermatozoïdes</i>	57
III.3.4. <i>Quel est le devenir de l'épigénome transmis par le spermatozoïde ?.....</i>	58
IV. Objectifs et plan de travail.....	60
IV.1. Études bibliographiques.....	60
IV.2. Dynamique de l'épigénome au cours de la spermiogénèse	60
IV.3. Caractérisation des facteurs impliqués dans la réorganisation de l'épigénome lors de la spermiogénèse	60
V. Études bibliographiques	61
V.1. Rôle des histones dans le remodelage de la chromatine au cours de la spermiogénèse.....	61
V.1.1. <i>Résumé</i>	61
V.1.2. <i>Revue publiée.....</i>	61
V.2. Expression d'histones H3 spécifiques du testicule dans des cellules somatiques	72
V.2.1. <i>Principaux résultats</i>	72
V.2.2. <i>Article publié.....</i>	73

CHAPITRE II : RESULTATS

I. Dynamique de l'épigénome au cours de la spermiogénèse	77
I.1. Reprogrammation de l'hétérochromatine péricentrique au cours de la spermiogénèse murine.....	78
I.1.1. <i>Principaux résultats</i>	78
I.1.2. <i>Article en révision</i>	80
I.2. Restructuration de la chromatine des régions de contrôle de l'empreinte parentale (ICR) lors de la spermiogénèse	136
I.2.1. <i>Principaux résultats</i>	136
I.2.2. <i>Article en révision</i>	138
I.3. Rôle fonctionnel de la phosphorylation de la sérine 1 de l'histone H4 au cours de la spermiogénèse.....	169
I.3.1. <i>Principaux résultats</i>	169
I.3.2. <i>Article sous presse</i>	170
I.3.3. <i>Résultats complémentaires</i>	202
II. Caractérisation des facteurs impliqués dans la réorganisation de l'épigénome lors de la spermiogénèse.....	204
II.1. Brdt compacte la chromatine acétylée lors de la spermiogénèse	205

II.1.1.	<i>Principaux résultats</i>	205
II.1.2.	<i>Article publié</i>	206
II.2.	HSP70.2 participe au remodelage post méiotique de la chromatine	225
II.2.1.	<i>Principaux résultats</i>	225
II.2.2.	<i>Article soumis</i>	227
II.3.	Caractérisation de deux chaperons d'histones spécifiques du testicule	254
II.3.1.	<i>Identification de nouveaux chaperons d'histones</i>	254
II.3.2.	<i>Caractérisation fonctionnelle de Npm3</i>	255
II.3.3.	<i>Caractérisation fonctionnelle de NAP1L4</i>	256
II.3.4.	<i>NAP1L4 chaperonne H2AL2</i>	257
II.3.5.	<i>Npm3 et NAP1L4 lient spécifiquement la zone 22-29 d'H3</i>	258
II.3.6.	<i>Protocoles des méthodes développées</i>	259

CHAPITRE III : DISCUSSION

I.	Le code des histones et celui de leurs variants reprogramment l'épigénome au cours de la spermiogénèse	262
I.1.	Dialogue entre les modifications d'H4	262
I.1.1.	<i>Dynamique d'acétylation des histones</i>	262
I.1.2.	<i>H4S1P régule l'hyperacétylation d'H4</i>	263
I.1.3.	<i>H4S1P, un interrupteur épigénétique ?</i>	265
I.2.	Un code pour les variants d'histone ?	266
I.2.1.	<i>Tous les variants connus sont présents lors de la spermiogénèse</i>	266
I.2.2.	<i>Identification de nouveaux variants d'histone</i>	267
I.3.	Reprogrammation de l'hétérochromatine péricentrique	267
I.3.1.	<i>L'hétérochromatine péricentrique porte un code des histones original</i>	267
I.3.2.	<i>Une nouvelle structure de l'ADN, non nucléosomale, organise l'hétérochromatine péricentrique dans les spermatides condensées.</i>	269
I.3.3.	<i>De nouveaux variants d'histone sont présents dans la structure non nucléosomale</i>	269
I.4.	Etat de la chromatine des régions de contrôle de l'empreinte parentale (ICR). 271	
I.4.1.	<i>ICR soumises à empreinte maternelle et paternelle ont un statut épigénétique équivalent dans les cellules somatiques</i>	271
I.4.2.	<i>Statut épigénétique des ICR au cours de la spermatogénèse</i>	272
I.4.3.	<i>Quelles marques sont associées aux ICR dans le spermatozoïde ?</i>	272
II.	Aspects fonctionnels de reprogrammation de l'épigénome au cours de la spermatogénèse	273
II.1.	Rôle fonctionnel de l'hyperacétylation des histones	273
II.1.1.	<i>Acétylation des histones et compaction de la chromatine</i>	273
II.1.2.	<i>Acétylation des histones et reprogrammation de l'épigénome</i>	274
II.1.3.	<i>Acétylation des histones comme marque de dégradation</i>	275
II.2.	Incorporation et extraction des histones de la chromatine	276
II.2.1.	<i>Quels chaperons d'histone ?</i>	276
II.2.2.	<i>Quel est le rôle de la nucléoplasmine 3 au cours de la méiose ?</i>	277
II.2.3.	<i>NAP1L4 favoriserait l'incorporation de variants d'histone</i>	278
II.3.	Et les autres protéines basiques ?	280

III. Conséquences d'une dérégulation de l'épigénome spermatique.....	282
III.1. Les risques de l'assistance médicale à la procréation.....	282
III.2. Épigénome spermatique et cancer.....	283
CHAPITRE IV : CONCLUSION GENERALE.....	285
CHAPITRE V : BIBLIOGRAPHIE.....	287
CHAPITRE VI : ANNEXE	311

Table des Figures

CHAPITRE I : INTRODUCTION

- Figure I.1 **Frise représentant l'histoire de la chromatine**
- Figure I.2.1 **Trente années d'observation du nucléosome**
- Figure I.2.2 **Le nucléosome et ses constituants**
- Figure I.2.3 **Structure d'une histone de liaison**
- Figure I.3.1 **Les niveaux d'organisation de la chromatine**
- Figure II.2.1 **Méthylation de l'ADN**
- Figure II.2.3 (A) **Mécanismes de répression par méthylation de l'ADN**
- Figure II.2.3 (B) **Structure et fonction des protéines liant l'ADN méthylé**
- Figure II.3.1 **Modifications post traductionnelles des histones**
- Figure II.3.1 (C) **Nomenclature de dénomination des modifications post traductionnelles**
- Figure II.3.1 (D) **Principales Histones Acétyltransferases (HAT) eucaryotes**
- Figure II.3.1 (E) **Les histones déacétylases (HDAC)**
- Figure II.3.1 (F) **Méthylation et déméthylation des lysines des histones**
- Figure II.3.2 (A) **Modifications identifiées sur la surface du nucléosome.**
- Figure II.3.2 (B) **Les lecteurs du code histones.**
- Figure II.3.3 **Exemple de voies de signalisation du code des histones**
- Figure II.4.1 **Récapitulatif des variants d'histones connus.**
- Figure II.4.3 **Alignements de séquence des variants d'H2A**
- Figure II.4.4 **Alignements de la séquence des variants d'H3**
- Figure II.5.2 **Propriétés des facteurs de remodelage**
- Figure III.1.1 **Organisation du testicule adulte**
- Figure III.1.2 **Déroulement de la spermatogénèse**
- Figure III.1.3 **Les cycles de la spermatogénèse**
- Figure III.2.1 **Composants de la chromatine au cours de la spermatogénèse**
- Figure III.2.2 **Alignements de principaux variants d'histones spécifiques du testicule**
- Figure III.3.1 **Principes généraux de l'empreinte parentale**
- Figure III.3.2 **Représentation schématique de l'organisation chromatinienne des spermatozoïdes**

CHAPITRE II : RESULTATS

- Figure I.3.3 **Exclusion entre H4S1P et H4ac**
- Figure I.3.3 (D) et (E) **H4S1P limite l'accessibilité de la queue N terminale d'H4**
- Figure II.3.2 **Caractérisation fonctionnelle de Npm3**
- Figure II.3.3 **Caractérisation fonctionnelle de NAP1L4**
- Figure II.3.3 (F) et (G) **Purification des complexes NAP1L4**
- Figure II.3.5 **NAP1L4 et Npm3 lient spécifiquement les acides aminés 21-29 d'H3**

CHAPITRE I : INTRODUCTION

« A eukaryotic chromosome made out of self assembling 70 Å units, which could perhaps be made to crystallize, would necessitate rewriting of our textbooks on cytology and genetics ! I have never read a such naïve paper supporting to be of such fundamental significance. Definitely it should not be published anywhere !”

Reviewer anonyme du magazine *Nature*, commentant les premières images de nucléosomes (Woodcock *et coll.*, 1976).

I. Structure de la chromatine

I.1. Etapes historiques de la découverte de la chromatine

L’histoire de la chromatine commença en 1871 avec les travaux de Frédéric Miescher, qui purifia une substance riche en phosphate à partir de pus de patients, baptisée nucléine (Miescher, 1871). Poursuivant ses études sur de la nucléine extraite de sperme de saumon, Miescher montra que la nucléine est constituée d’une substance basique, de nature protéique, et d’une substance acide, riche en phosphate. Dès 1874, la nucléine intéressa d’autres scientifiques. Albrecht Kossel purifia en 1884 une fraction protéique soluble dans l’acide à partir de noyaux érythrocytaires de poulet, baptisée « histones » (Kossel, 1911).

Le développement des techniques microscopiques et de nouveaux types de coloration a permis à Flemming de visualiser un matériel nucléaire dense, qu'il nomma chromatine en référence au terme grec *khroma*, signifiant coloré. Il suggéra également que chromatine soit la nucléine précédemment décrite chimiquement (voir la frise historique Figure I.1 et Flemming, 1882). Cette idée fut soutenue par Hertwig, qui travaillait sur la fertilisation des œufs d'oursins et proposa que chromatine et nucléine soient une seule et même substance. Hertwig suggéra que la nucléine soit également responsable de la transmission des caractères héréditaires lors de la fécondation.

En 1896, Wilson proposa que la composante acide de la chromatine soit le support de l'information génétique (Wilson, 1896), mais la simplicité apparente de l'ADN conforta le monde scientifique vers la théorie des Protéines-Gènes. En effet, Levene et London quantifièrent la quantité des quatre bases azotées en 1929, et leur présence en quantité équivalente conduisit à la théorie du tétranucléotide (Stedman et Stedman, 1947). L'ADN fut compris comme étant formé de l'agrégation de petits tétranucléotides composés d'un exemplaire de chaque base azotée, et dont la simplicité ne peut expliquer d'aucune façon la diversité inhérente à la transmission des caractères héréditaires. Par contre, l'hétérogénéité des protéines présentes au sein de la nucléine suggérait une complexité suffisante pour les considérer comme codant de l'information génétique, ou autrement dit pour les considérer à l'origine de l'hérédité des caractères phénotypiques. Chaque caractère phénotypique, appelé gène à cet époque, serait codé par une protéine, donnant naissance à la théorie Protéine-Gène.

A la fin des années 30, la situation devint confuse. La théorie Protéine-Gène resta fermement ancrée et défendue par de nombreux chercheurs, mais les progrès techniques, notamment en ultracentrifugation et en viscosimétrie, commencèrent à convaincre les biochimistes de la nature macromoléculaire des acides nucléiques. Frederick Griffith découvrit en 1928 que des bactéries d'une souche non pathogène le deviennent si elles sont mises en présence de bactéries pathogènes tuées par la chaleur. Ainsi, il mit en évidence que des bactéries étaient capables d'échanger entre elles une information codante. Oswald Avery s'efforça d'identifier le support de cette information, et conclut que seuls les acides nucléiques pouvaient avoir cette propriété (Avery *et coll.*, 1944). Enfin, Alfred Hershey et Martha Chase effectuèrent des marquages radioactifs du phage T2. Ils remarquèrent qu'un marquage au soufre ^{35}S radioactif, incorporé uniquement au sein des protéines, n'était pas transmis aux bactéries infectées, alors que du phosphate ^{32}P radioactif, spécifique des

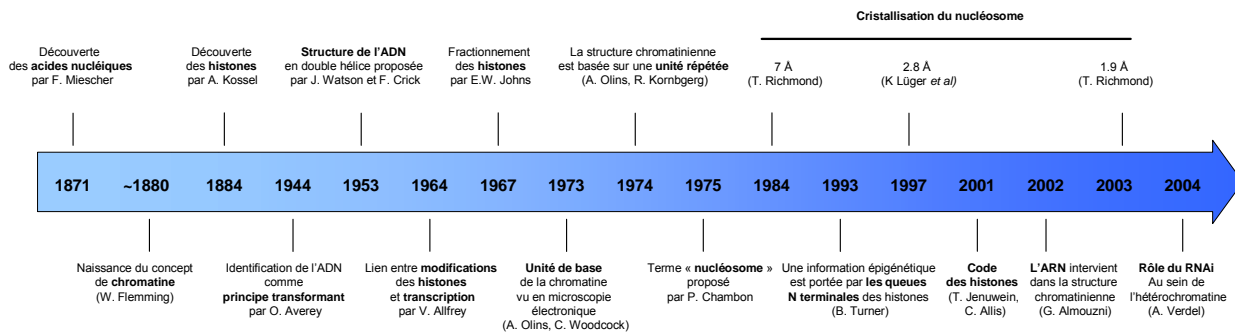


Figure I.1 Frise représentant l'histoire de la chromatine

Récapitulatif des grandes étapes qui ont conduit à la conception actuelle de la chromatine. Adapté de (Olins et Olins, 2003). Se référer à (Olins et Olins, 2003) pour toutes les références jusqu'à 2001. En 2002 (Maison *et coll.*, 2002), en 2003 (Richmond et Davey, 2003), en 2004 (Verdel *et coll.*, 2004).

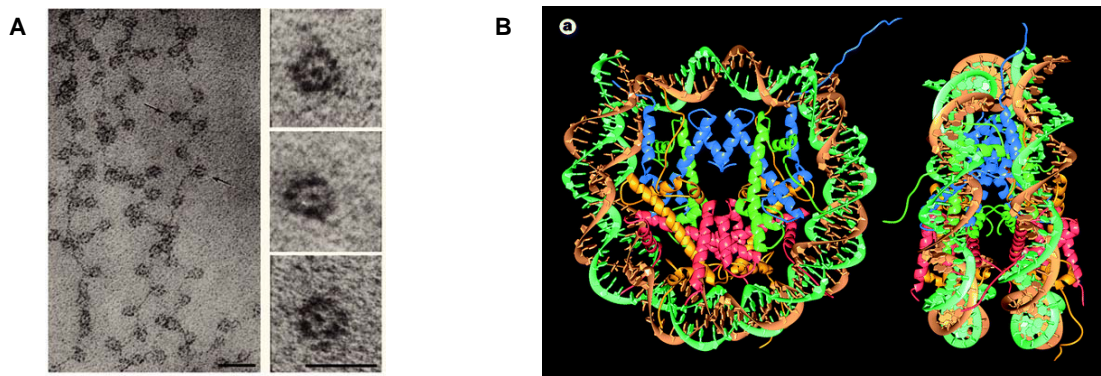


Figure I.2.1 Trente années d'observation du nucléosome

(A) **Visualisation d'une fibre de chromatine** (Olins et Olins, 2003). A gauche : collier de perles typique observé à faible force ionique (barre d'échelle de 30 nm). A droite, nucléosome individuels obtenus après digestion à la nucléase micrococcale (barre d'échelle 10 nm).

(B) **Nucléosome cristallisé à 2,8 Å** (Luger *et coll.*, 1997). Les 4 paires d'histones sont situés au centre et entouré de 146 paires de base d'ADN. Le nucléosome est vu de face à gauche, de profil à droite. Se reporter à la partie I.2.2 pour plus de détails.

acides nucléiques l'était. Ils montrèrent ainsi que les acides nucléiques sont le support de l'hérédité chez les phages.

En 1950, Erwin Chargaff montra que l'ADN est un polymère. Chaque monomère, appelé nucléotide, est constitué d'une base azotée, d'un glucide appelé désoxyribose et d'un groupement phosphate. Il montra également que les quatre bases azotées de l'ADN ne sont pas présentes en quantité équimolaire, et que leur proportion dépend de l'organisme considéré (Chargaff, 1950). En outre, le taux d'adénine est égal à celui de la thymine, ainsi que de la cytosine et la guanine.

La structure de l'ADN proposée par Waston et Crick en 1953 acheva de définir l'ADN comme macromolécule codante (Watson et Crick, 1953). Des améliorations successives dans les techniques de purification des histones ont ensuite permis de révéler leur fantastique conservation chez tous les eucaryotes et cette absence de variété les rendit définitivement incompatibles avec la théorie Protéine-Gène (Fitzsimmons et Wolstenholme, 1976). Plus de cinquante ans après la découverte de la chromatine, le support de l'hérédité est attribué à l'ADN et non aux histones.

Cependant, restreindre le support de l'hérédité à l'ADN est très limitant, car cela ne permet pas d'expliquer comment deux cellules d'un même organisme, contenant donc le même génome, sont différentes et comment elles transmettront leurs caractères différenciés à leur descendance. Cinquante ans après avoir sacré l'ADN support des informations héréditaires, le champ de recherche de l'épigénétique bouscule ce dogme et complexifie la simplicité apportée par le pouvoir codant de l'ADN (voir Introduction II).

I.2. Le nucléosome, élément de base de la chromatine

I.2.1. La découverte du nucléosome

De grandes avancées concernant la structure de la chromatine ont rythmé les années 1970. Les premières données claires furent obtenues grâce à l'action de nucléases, intentionnées ou accidentelles, qui découpent l'ADN de la chromatine en série de fragments multiples de 180-200 paires de base (Williamson, 1970). Une digestion poussée permit d'isoler l'ADN en complexe avec des protéines (Sahasrabudde et Van Holde, 1974), dont le poids moléculaire total fut évalué à 200 kD par ultracentrifugation analytique. Ce type de structure s'opposa à une précédente théorie, soutenant que les histones forment un manteau continu autour de l'ADN (DuPraw, 1974).

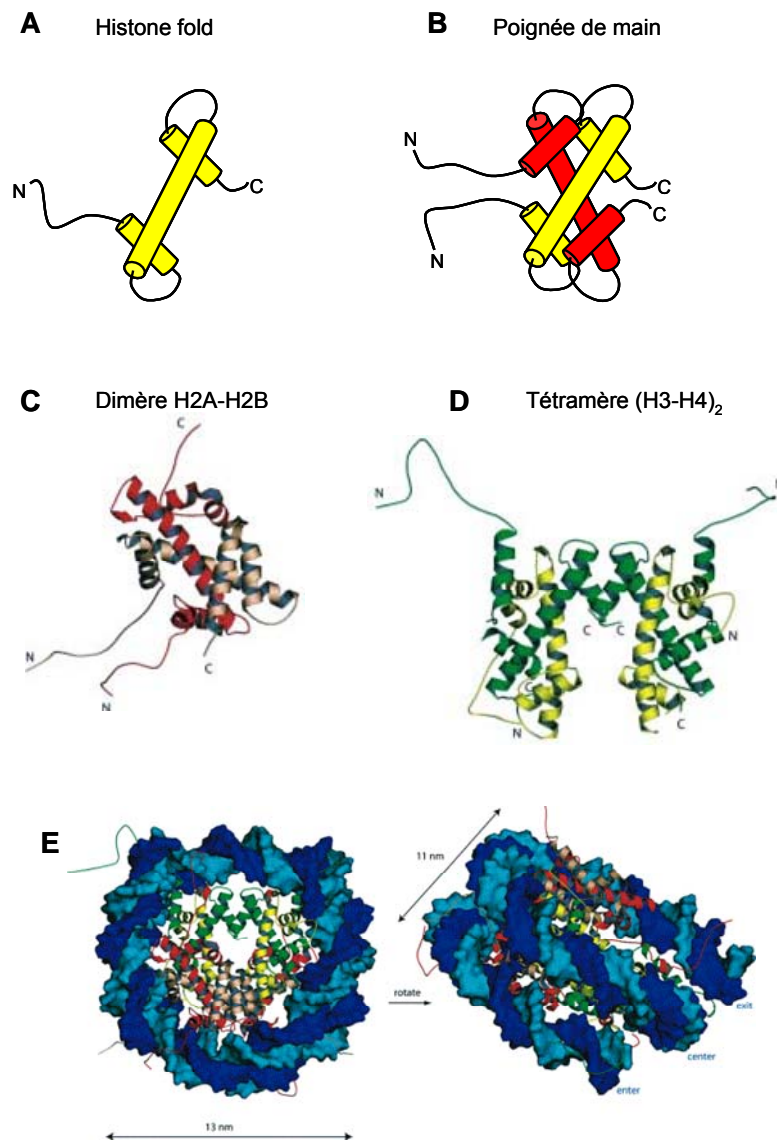


Figure 1.2.2 Le nucléosome et ses constituants

(A) **Repliement d'une histone de cœur en « histone fold »**. Les cylindres représentent des hélices α .

(B) **Schématisation d'une interaction dite en poignée de main entre deux « histones fold »**. Ce type d'interaction est impliqué dans la formation des dimères H2A-H2B et des interactions H3-H4.

(C) **Structure d'un dimère H2A-H2B**, respectivement en rouge et violet (Khorasanizadeh, 2004). L'interaction en forme de poignée de main est nettement visible.

(D) **Structure d'un tétramère H3-H4**, respectivement en vert et jaune (Khorasanizadeh, 2004).

(E) **Structure du nucléosome**. L'ADN s'enroule d'1,7 tours autour de la particule de cœur. Le nucléosome a une forme de cylindre trapu, de 13 nm de diamètre et de 11 nm d'épaisseur. Le nucléosome est présenté de face à gauche, et de côté à droite. Les couleurs des histones sont décrites en (C) et (D), et chaque brin d'ADN est dans une teinte de bleu différente. Adapté de (Khorasanizadeh, 2004).

Les progrès en microscopie électronique conduirent à la découverte des particules de base et de leur enchaînement en collier de perle (voir Figure I.2.1 et Olins et Olins, 1974 ; Oudet *et coll.*, 1975).

La stœchiométrie des histones fut révélée par Kornberg et Thomas en 1974 (Kornberg, 1974). Synthétisant l'avancée de ce champ de recherche, Kornberg proposa alors une unité de base comprenant deux cents paires de bases d'ADN en complexe avec quatre paires d'histones (Kornberg, 1974), baptisée nucléosome par Pierre Chambon en 1975 (Oudet *et coll.*, 1975).

1.2.2. Les histones de cœur

En 1965, Phillips et Johns identifièrent 5 histones majoritaires, grâce à des extractions acides qui limitent les protéolyses (Phillips et Johns, 1965). Kornberg montra en 1974 (Kornberg, 1974) que la particule de cœur du nucléosome est formée par l'association de 4 paires d'histones, dénommés H2A, H2B, H3 et H4, autour desquels s'enroulent 146 paires de bases (pb) d'ADN. Le séquençage de ces protéines a montré qu'elles sont petites (100 à 130 acides aminés), que leur richesse en lysine et arginine explique leur basicité, et qu'elles ont été très conservées au cours de l'évolution.

La structure de la particule de cœur du nucléosome a été résolue par Richmond en 1984 à une résolution de 7 Å (Richmond *et coll.*, 1984). Moudrianakis proposa une structure de l'octamère d'histones à 3,3 Å en 1985 (Burlingame *et coll.*, 1985). La particule de cœur du nucléosome fut cristallisée à une résolution de 2,8 Å par Luger en 1997 (voir Figure I.2.1 B et Luger *et coll.*, 1997), et à 1,9 Å en 2003 (Richmond et Davey, 2003). Chaque histone de cœur contient une zone globulaire centrale, qui se structure en 3 hélices α afin de former « l'histone fold » (Figure I.2.2 A). Ce domaine permet de former des hétérodimères H2A-H2B et H3-H4 par une interaction dite « poignée de main » (voir Figure I.2.2 B).

En l'absence d'ADN et à une force saline modérée (150 mM NaCl), H3 et H4 s'associent en tétramère alors qu'H2A et H2B restent sous forme de dimère (voir Figure I.2.2 C et D et Lusser et Kadonaga, 2004). A forte force saline (2M NaCl), l'octamère d'histones se reconstitue naturellement *in vitro* (Lusser et Kadonaga, 2004). H3 joue un rôle pivot dans la structuration générale du nucléosome car un axe de symétrie traverse le nucléosome au niveau de l'interface entre les deux molécules d'H3 (Luger *et coll.*, 1997). Outre son hétérodimérisation avec H4, H3 est également à l'interface entre les dimères d'H2A-H2B.

146 pb d'ADN sont enroulées autour du cœur protéique du nucléosome (voir Figure I.2.2 E). Il est positionné par un ensemble d'interactions électrostatiques et de liaisons hydrogène entre les groupements phosphate de l'ADN et les histones, et par des contacts non polaires avec le sucre désoxyribose de l'ADN et les histones (Khorasanizadeh, 2004). Notons qu'aucun contact n'existe entre les bases azotées et les histones, ce qui explique l'absence générale de spécificité de séquence des histones sur l'ADN.

Les parties N terminales des histones, appelées queues N terminales, sortent du cylindre plat et compact formé par les domaines globulaires. Elles ne présentent aucun signe particulier de structuration, excepté le fait que les queues d'H3 et H2B sortent *via* le sillon mineur de l'ADN. Les queues N terminales sont clairement exposées à l'extérieur de la partie centrale, ce qui leur confère une grande accessibilité : ceci est à mettre en relation avec les nombreuses modifications post traductionnelles retrouvées sur ces acides aminés (Khorasanizadeh, 2004).

1.2.3. Les histones de liaison

Une cinquième histone est l'histone de liaison, nommé H1, dont il existe 10 isoformes (H1.1 à H1.5, H1°, H1T, H1T2, H1LS, H1oo). En 1978, une digestion ménagée de la chromatine permit à Simpson et al d'obtenir des particules appelées chromatosomes (Simpson, 1978). Ces particules sont constituées d'une particule de cœur de nucléosome contenant 160 pb d'ADN et d'une histone de liaison.

Les histones de liaison comportent trois parties : une courte zone N terminale riche en lysine, un domaine globulaire central, et une très longue queue C terminale non structurée. Contrairement aux extrémités, le domaine globulaire est très conservé, et est structuré par un motif dit « wing-hélice » (voir Figure I.2.3). Il serait positionné à l'endroit où l'ADN entre et sort du nucléosome, et n'interagit pas avec les histones de cœur (Zhou *et coll.*, 1998). Les extrémités N et C terminales interviendraient dans l'organisation internucléosomale et la structuration de la chromatine à des niveaux supérieurs.

Contrairement aux histones de cœur, aucune histone de liaison n'est à elle seule essentielle à la survie cellulaire. L'inactivation de plusieurs gènes codant des histones de liaison a révélé une certaine redondance entre les différentes isoformes, ainsi qu'un mécanisme de régulation complexe entre histones de liaison et structure chromatinienne (pour revue Khochbin, 2001 ; Robinson et Rhodes, 2006).

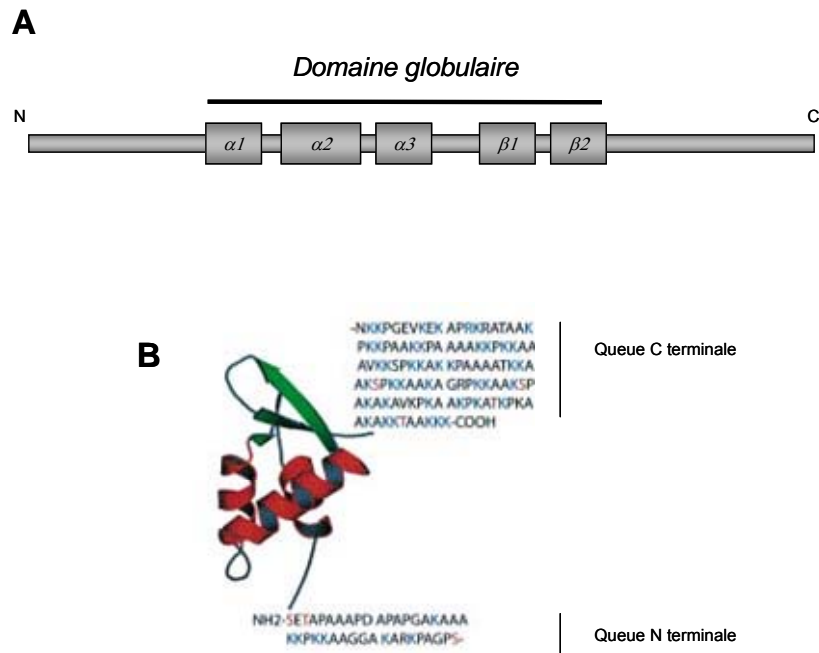


Figure I.2.3 **Structure d'une histone de liaison**

(A) **Schématisation d'une histone de liaison.** Une zone globulaire central est structurée par trois hélices α et deux feuillets β , en forme de « wing helix fold ». Les zones N et C terminales ne sont pas structurées.

(B) **Structure atomique d'une histone de liaison.** La structure du variant d'histone H5 est représenté (Ramakrishnan *et coll.*, 1993). Les acides aminés des zones N et C terminales d'H1 humain ont été indiquées. Leur richesse en lysines, sérines et thréonines est illustrée en les colorant en bleu ou rouge. D'après (Khorasanizadeh, 2004).

I.3. Organisation fonctionnelle de la chromatine

~ *Dix kilomètres de fil de pêche dans une orange*

Une interprétation rapide des dimensions de l'ADN et de la taille moyenne d'une cellule illustre la nécessité de structurer l'ADN, et donc la chromatine, à différents niveaux. Une cellule humaine contient environ 3 milliards de paires de base d'ADN, ce qui représente un cylindre d'un mètre de long de 2 nm de diamètre et donc un volume de $3 \mu\text{m}^3$ (ADN sous forme B). Un noyau moyen mesure 10 μm de diamètre pour un volume de $500 \mu\text{m}^3$. Bien que le volume de l'ADN soit 160 fois inférieur à celui de son contenant, il est facilement imaginable que le mètre d'ADN doit être structuré d'une manière très fine pour être fonctionnellement valide dans un noyau si petit. Mis à notre échelle, cela reviendrait à nous demander de faire entrer 10 km de fil de pêche dans une orange... le tout sans nœud, et en pouvant retrouver n'importe quelle section de fil pour exprimer un gène !

~ *Les différents niveaux de structuration de la chromatine*

Le nucléosome constitue un premier niveau de structuration de la chromatine. Le deuxième niveau est formé par le collier de perle, appelé fibre de 11 nm (voir Figure I.2.1 A et I.3.1 A).

Les niveaux supérieurs d'organisation des fibres de chromatine ont été visualisés dans différentes conditions salines (Thoma *et coll.*, 1979). A une force saline basse, la chromatine se structure en collier de perles. A une force saline plus élevée (100 mM NaCl), elle forme un cylindre irrégulier d'environ 30 nm de large, communément appelé fibre de 30 nm. Cette fibre de 30 nm a été observée par microscopie électronique par de nombreux groupes, mais sa structure intrinsèque est seulement en cours de résolution.

En 2006 un modèle de fibre de 30 nm en hélice à un brin et un modèle à deux brins s'opposent (voir Figure I.3.1 A). Le modèle en hélice à un seul brin s'appuie sur la cristallisation d'un tétranucléosome (Dorigo *et coll.*, 2004 ; Schalch *et coll.*, 2005), mais l'absence d'histone de liaison remet en cause sa validité. Un modèle d'hélice à deux brins est défendu par des données de microscopie électronique (Robinson *et coll.*, 2006 ; Robinson et Rhodes, 2006). Cependant, ces modèles ne sont pas forcément exclusifs : la chromatine pourrait adopter une structure plus compacte en présence d'histones de liaison, et lâche en leur absence, par exemple au niveau de région promotrice active (Robinson et Rhodes, 2006).

A

Hélice à un brin

Hélice à deux brins

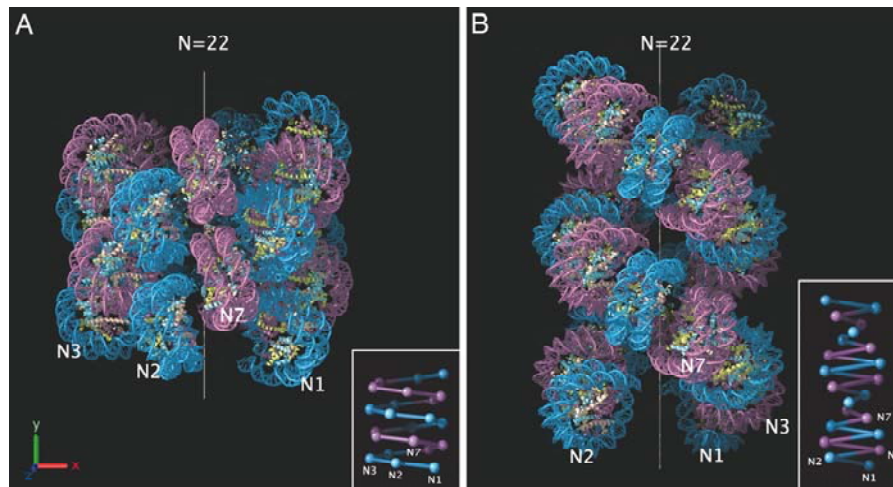
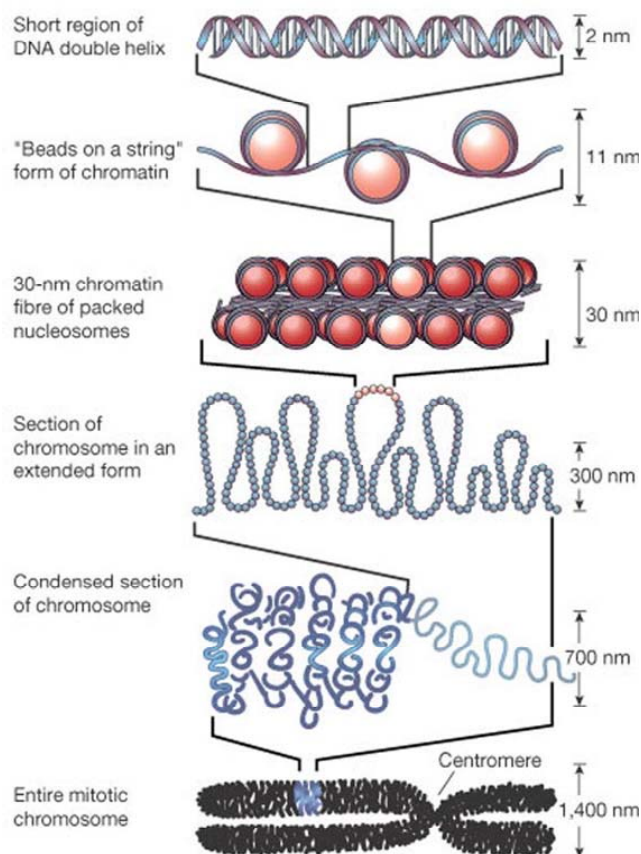
**B**

Figure I.3.1 Les niveaux d'organisation de la chromatine

(A) **Modélisation de la fibre de 30 nm.** Le modèle de gauche, en hélice à un brin, est soutenu par les dernières données cristallographique obtenues par (Robinson *et coll.*, 2006), et s'oppose au modèle de droite, en hélice à deux brins (Schalch *et coll.*, 2005).

(B) Le niveau d'organisation de base est le nucléosome (voir Figure I.2.2). Le collier de perles de nucléosomes se structure en fibre de 30 nm (voir Figure I.3.1 A et B). Cette fibre se structure elle-même à différents niveaux, le niveau le plus compacté étant le chromosome métaphasique. Une échelle approximative est indiquée à droite de chaque niveau d'organisation. Tiré de (Felsenfeld et Groudine, 2003).

Les niveaux supérieurs d'organisation des fibres de chromatine sont moins connus, car moins accessibles par les méthodes actuelles d'investigation. On suppose que la fibre de 30 nm forme de grandes boucles, elles mêmes repliées en sous domaines chromosomiques, détectables en interphase (Figure I.3.1 B). Ainsi des domaines sous-chromosomiques peuvent être distingués dans des cellules humaines (Cremer et Cremer, 2001 ; Taddei *et coll.*, 2004).

Enfin, le chromosome métaphasique observé en mitose représente le niveau de compaction maximal (voir Figure I.3.1 B).

~ *Compartmentation fonctionnelle de la chromatine*

La chromatine n'est pas organisée de manière chaotique au sein du noyau. En 1928, Heitz remarqua que certaines zones du noyau cellulaire sont plus denses que d'autres, et introduit le terme d'euchromatine, représentant la chromatine lâche, et d'hétérochromatine, représentant les zones denses et compactes. Par la suite, l'euchromatine a été décrite comme associée à une transcription active des gènes, alors que la transcription est très réprimée au sein de l'hétérochromatine. On distingue l'hétérochromatine facultative, caractérisée par une structure chromatinienne compacte, très peu favorable à la transcription mais dont l'état est réversible. L'hétérochromatine constitutive regroupe quant à elle une grande partie des séquences répétées du génome, notamment au niveau des centromères et péricentromères. Chez les mammifères, les centromères et régions péricentromériques s'associent généralement entre elles, formant des foyers appelés chromocentres (pour revue Taddei *et coll.*, 2004).

Le nucléole constitue un compartiment chromatinien particulier : la transcription des gènes ribosomiaux est regroupée en son centre, dit composant fibrillaire. La structuration des ARN ribosomiaux s'effectue à proximité, dans le compartiment fibrillaire dense, et la maturation finale des ribosomes a lieu dans la zone extérieure du nucléole, le compartiment granulaire (Shaw et Jordan, 1995 ; Raska, 2003).

Les télomères, situés aux extrémités des chromosomes, adoptent une structuration particulière qui protège l'ADN de la machinerie de réparation des cassures doubles brins. Chez la levure, les télomères se regroupent en quelques foyers présents à proximité de l'enveloppe nucléaire (Funabiki *et coll.*, 1993 ; Gotta *et coll.*, 1996). Chez les mammifères, les télomères seraient distribués de manière aléatoire au sein du noyau (Luderus *et coll.*, 1996). Cependant, des études basées sur de

l'imagerie en temps réel ont montré une association transitoire de deux ou trois télomères dans des fibroblastes humains (Molenaar *et coll.*, 2003).

Enfin, l'enveloppe nucléaire interagit avec la chromatine et est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes. L'inactivation du gène codant un de ses principaux constituants, la lamine A, conduit à une désorganisation de l'hétérochromatine centromérique (Sullivan *et coll.*, 1999). Il est intéressant de noter que l'émerine, un des composants de la matrice nucléaire, est nécessaire à l'import et l'intégration du génome du VIH au sein de la chromatine (Jacque et Stevenson, 2006).

I.4. Conclusion

L'information génétique portée par l'ADN est organisée au sein de la chromatine, dont le niveau d'organisation est à mettre en relation avec la nature des zones considérées (densité de gènes, présence de séquences répétées) et de leur état transcriptionnel. Depuis deux décennies, une dimension nouvelle, épigénétique, s'ajoute à l'aspect purement structural de la chromatine. La partie suivante s'appliquera à en décrire les principaux aspects, illustrée de quelques exemples choisis.

II. Dynamique et plasticité de l'épigénome

II.1. Qu'est-ce que l'épigénome ?

Il est couramment admis que la mitose transmet un ensemble de gènes identiques d'une cellule mère à ses deux cellules filles. Cependant, la biologie du développement et l'étude de la différenciation cellulaire nous indiquent que deux cellules contenant la même séquence d'ADN peuvent présenter des phénotypes différents. Ces différences phénotypiques sont également transmises au cours de la division cellulaire.

Ainsi, une information non codée par la séquence de l'ADN existe, et participe à la détermination du devenir cellulaire. Cette information, dite épigénétique, est définie par les

changements stables et héréditaires (par la mitose et/ou la méiose) qui ne sont pas associés à une modification de la séquence d'ADN (Wu et Morris, 2001). Par épigénome nous évoquerons l'ensemble des marques épigénétiques transmises au cours de la division cellulaire.

Le champ épigénétique regroupe plusieurs axes. Les prions sont un exemple d'information épigénétique : la conformation spécifique d'une protéine peut être transmise à une cellule fille, notamment la protéine Prp dont la conformation Prp-sp est à l'origine de l'encéphalopathie spongiforme (Ross *et coll.*, 2005). Par ailleurs, la chromatine est également porteuse de nombreuses informations épigénétiques. La méthylation des cytosines de l'ADN, les modifications post traductionnelles des histones, la présence de variants d'histone conditionnent la fonctionnalité de la chromatine et interagissent avec l'ensemble des processus cellulaires.

II.2. La méthylation de l'ADN

La méthylation des cytosines sous forme de 5-méthylcytosine (m^5C) est retrouvée dans le génome de tous les vertébrés, des plantes à fleurs, certains champignons et invertébrés, ainsi que chez les protistes et dans de nombreuses souches bactériennes (pour revue Goll et Bestor, 2005). Le taux de méthylation semble corrélé à la taille des génomes, car cette modification est beaucoup plus abondante dans les génomes de grande taille, comme chez les plantes par exemple.

La méthylation d'un carbone 5 d'une cytosine est une réaction très peu favorable en solution, (Chen *et coll.*, 1991). Cette modification est ajoutée à l'ADN par une famille de protéines très conservées, appelées DNA cytosine-5 méthyltransférase (DNMT). Les DNMT utilisent le S- adénosyl-L-méthionine pour déposer un groupement méthyl sur le carbone 5 d'une cytosine (Figure II.2.1 A) et déforment localement l'ADN afin d'avoir accès à la cytosine ciblée (Figure II.2.1 B). Les sites de méthylation sont presque toujours situés au niveau d'enchaînements 5' CG 3', appelés îlots CpG. Notons que cette séquence conduit à une symétrie parfaite de méthylation sur les deux brins de l'ADN. La méthylation de l'ADN est une modification essentielle à la survie des cellules eucaryotes supérieures, car la suppression des DNMT est létale (Li *et coll.*, 1992 ; Okano *et coll.*, 1999).

II.2.1. Les ADN méthyltransférases (DNMT)

Trois familles de DNMT, appelées DNMT1 à 3 ont été identifiées.

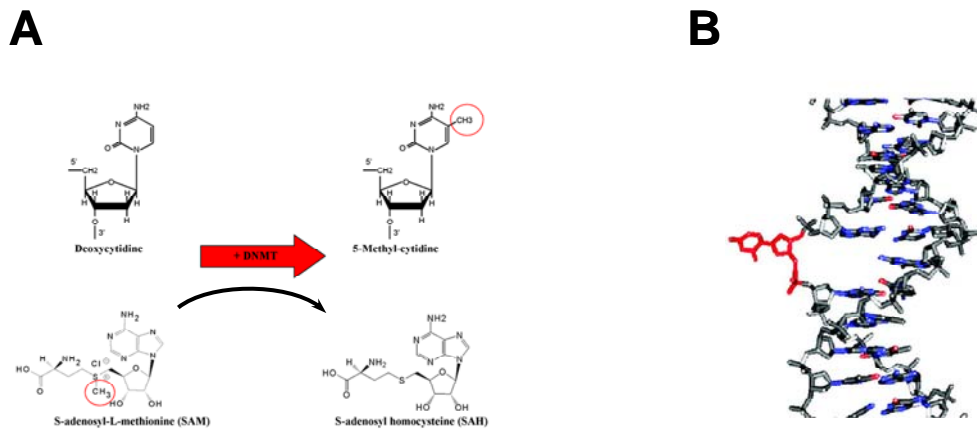


Figure II.2.1 Méthylation de l'ADN

(A) **Mécanisme réactionnel.** Le carbone 5 d'une cytosine est méthylié à partir du substrat S-adenosyl-L-méthionine. Cette réaction est catalysée par les ADN methyl transférase (DNMT).

(B) La cytosine est sortie de l'hélice par les DNMT, afin pouvoir méthyler son carbone 5. Tiré de (Goll et Bestor, 2005).

~ ***DNMT1 et réplication***

Lors de la réplication, DNMT1 copie les marques de méthylation du brin matrice sur le brin néosynthétisé. En effet, DNMT1 interagit avec les composants de la machinerie de réplication. Il copierait les marques de méthylation au cours de la propagation de la fourche de réplication (Rountree *et coll.*, 2000), et permettrait la maintien des marques de méthylation existantes dans les cellules filles.

~ ***DNMT3 et méthylation de novo***

DNMT3A et 3B sont impliquées dans la méthylation de nouveaux îlots CpG, notamment lors du développement des cellules germinales et lors de l'embryogénèse précoce (Goll et Bestor, 2005). DNMT3L est une DNMT like qui ne contient pas d'activité DNMT intrinsèque, mais qui interagit physiquement avec DNMT3A et 3B et module leur activité catalytique (Suetake *et coll.*, 2004). L'inactivation de DNMT3L conduit notamment à un blocage en méiose chez le mâle, et à une réactivation de rétrotransposons (Bourc'his et Bestor, 2004).

Le domaine PWWP de DNMT3A est responsable de son ciblage vers les péricentromères (Ge *et coll.*, 2004). La mutation de ce domaine entraîne une maladie chez l'homme appelée ICF (Shirohzu *et coll.*, 2002), caractérisée par une hypométhylation de l'hétérochromatine péricentromérique et une instabilité chromosomique. Des données de cristallisation suggèrent que ce domaine interagit directement avec l'ADN, sans reconnaître de séquence spécifique (Qiu *et coll.*, 2002). Certains facteurs de transcription seraient également capables de cibler une activité DNMT au niveau de promoteurs. La répression du gène *p21* nécessite l'action de Myc, qui recruterait DNMT3A au niveau du promoteur de *p21*. L'activité de DNMT3A est nécessaire à la répression de *p21* car une mutation ponctuelle de DNMT3a abolit cette répression (Brenner *et coll.*, 2005).

~ ***DNMT2 méthyle un ARNt***

Enfin DNMT2 est la DNMT qui a été la mieux conservée au cours de l'évolution (Goll et Bestor, 2005). Le substrat de DNMT2 est resté longtemps inconnu, et il a été montré récemment que DNMT2 méthyle un ARN de transfert particulier (Goll *et coll.*, 2006). Le rôle fonctionnel de cette méthylation est encore mal compris (Jeltsch *et coll.*, 2006).

II.2.2. Un rôle fonctionnel répresseur chez les eucaryotes

La méthylation de l'ADN a un rôle différent chez les organismes procaryotes et eucaryotes. Chez les bactéries, la méthylation de l'ADN est un véritable mécanisme de défense contre les infections de phages, permettant la discrimination entre l'ADN endogène et l'ADN de l'agent infectieux (Goll et Bestor, 2005).

Chez les organismes eucaryotes, la méthylation joue un rôle régulateur de l'expression des gènes, et stabilise le génome en limitant l'activation des transposons. La majeure partie de l'ADN méthylié eucaryote est formée de séquences répétées. Les transposons constituent 45% du génome humain (Smit et Riggs, 1996). Leur méthylation inactive l'expression des gènes nécessaire à leur propagation, limitant ainsi les risques de mutagenèse par insertion dans une zone codante (pour revue Goll et Bestor, 2005). En effet, l'invalidation de DNMT chez *Arabidopsis thaliana* et chez la souris conduit à la réactivation des gènes codés dans les transposons (Bourc'his et Bestor, 2004 ; Lippman *et coll.*, 2004). A long terme, la méthylation constitutive des transposons conduit à leur inactivation totale, car une déimination spontanée mute les cytosines méthylées en thymines.

La méthylation de l'ADN est également un point clé de la régulation de l'expression des gènes. 76% des promoteurs des gènes humains contiennent des îlots CpG (Davuluri *et coll.*, 2001) et leur méthylation est une marque forte de répression de la transcription. La méthylation de l'ADN est impliquée dans les phénomènes dits d'empreinte parentale.

II.2.3. Méthylation de l'ADN et répression de la transcription

La méthylation d'un site peut réprimer directement la transcription en bloquant la fixation de facteur de transcription (Figure II.2.3 A et Watt et Molloy, 1988). De nombreux sites de méthylation sont retrouvés à l'intérieur même des gènes, au niveau d'introns et d'exons (Klose et Bird, 2006). Cette méthylation perturberait l'étape d'allongement de l'ARN par l'ARN polymérase II car l'introduction d'un site de méthylation ectopique dans une zone transcrite baisse le taux de transcription du gène (Lorincz *et coll.*, 2004).

Un autre mode de répression fait appel à une famille de protéines, appelée MBP (*Methyl CpG Binding Protein*), capable de reconnaître les îlots CpG méthylés. Tous les membres de cette famille, à l'exception de Kaiso, reconnaissent l'ADN méthylié grâce à un domaine spécifique appelé MBD pour *Methyl CpG Binding Domain* (Figure II.2.3 A et B).

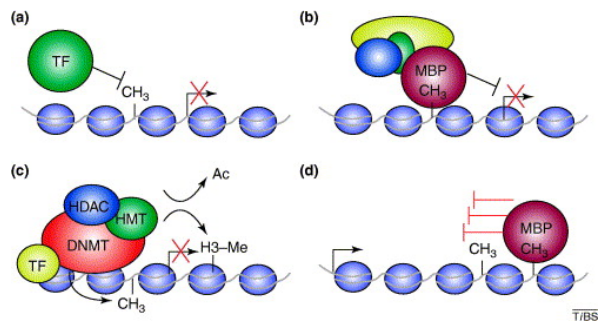


Figure II.2.3 (A) Mécanismes de répression par méthylation de l'ADN

(a) la méthylation de l'ADN empêche la fixation d'un facteur de transcription (TF), et bloque directement l'activation de la transcription.

(b) des protéines reconnaissant l'ADN méthylé, appelées MBP, se lient aux sites méthylés et recrutent des complexes répresseurs de la transcription.

(c) la méthylation de l'ADN par les DNMT est couplée au dépôt de modifications post traductionnelles d'histones répressives (déacétylation par les HDAC, méthylation par les HMT).

(d) la méthylation de l'ADN dans le corps d'un gène bloque sa transcription en affectant l'étape d'allongement de l'ARN. Les MBP recrutées peuvent avoir un effet direct ou indirect sur l'ARN polymérase et le contexte chromatinien environnant.

Tiré de (Klose et Bird, 2006).

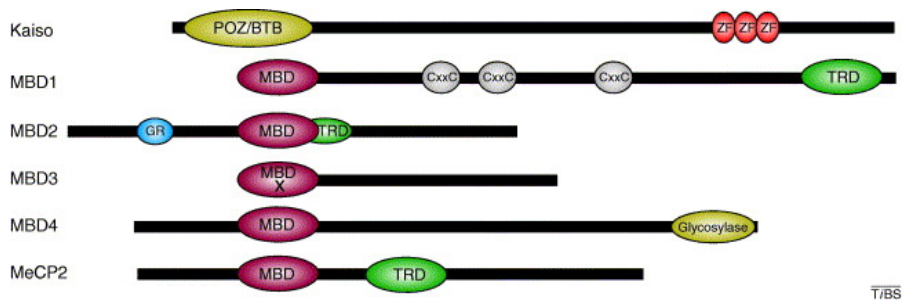


Figure II.2.3 (B) Les protéines liant l'ADN méthylé

Kaiso est une MBP typique car reconnaît l'ADN méthylé grâce à un domaine à doigt de zinc, et réprime la transcription via son domaine POZ/BTB.

Les autres MBP partagent un domaine de liaison de l'ADN méthylé commun, appelé MBD. MBD1 contient également trois domaines liant le zinc (CxxC), impliqué dans la liaison de dinucléotides CpG non méthylés, et un domaine répresseur de la transcription dans sa partie carboxy terminale (TRD). Le domaine MBD de MBD2 se superpose partiellement à son domaine répresseur (TRD). Le domaine MBD de MBD3 est très conservé, mais certaines mutations ne lui permettent pas de reconnaître l'ADN méthylé. MBD4 possède un domaine glycosylase important pour ses fonctions associées à la réparation de l'ADN. Enfin, MeCP2 est le membre fondateur de la famille de MBD, et contient un domaine MBD et un domaine répresseur TRD.

Tiré de (Klose et Bird, 2006).

Historiquement la protéine fondatrice de cette famille est MeCP2, un répresseur fort de l'expression de certains gènes neuronaux. Une mutation de cette protéine est à l'origine du syndrome de Rett, maladie neurologique se traduisant par un comportement proche de celle de l'autisme et par des problèmes psychomoteurs. MeCP2 contrôle *in vivo* le taux de transcription de certains gènes exprimés dans le cerveau, via le complexe répresseur *Sin3A* (Tudor *et coll.*, 2002 ; Nuber *et coll.*, 2005).

MBD1 réprime la transcription via une modification post traductionnelle d'histone, la méthylation de la lysine 9 de l'histone 3. Lors de la réplication, MBD1 reconnaît l'ADN méthylé et recruterait l'enzyme SETDB1, qui méthylerait H3K9 (Sarraf et Stancheva, 2004).

MBD2 est impliqué dans la tumorigénèse (Sansom *et coll.*, 2003), et dans la différenciation des lymphocytes T helper lors de leur activation. MBD2 réprime la transcription de plusieurs gènes en se fixant sur une séquence méthylé de leurs promoteurs et en recrutant le complexe répresseur NURD (Hutchins *et coll.*, 2002).

Le rôle de MBD3 est mal connu, d'autant plus que son domaine MBD ne lui permet pas de reconnaître l'ADN méthylé. MBD4 est impliquée dans la répression des gènes (Kondo *et coll.*, 2005) et la réparation de l'ADN (Hendrich *et coll.*, 1999 ; Wong *et coll.*, 2002).

Kaiso reconnaît l'ADN méthylé sans domaine MBD. Trois domaines à doigt de zinc sont responsables de cette propriété. Kaiso interagit avec le complexe N-CoR, et cible ainsi ce complexe répresseur au niveau des zones méthylées (Yoon *et coll.*, 2003). Deux protéines similaires à Kaiso, ZBTB4 et ZBTB38, reconnaissent également l'ADN méthylé et sont associées à une répression de la transcription (Filion *et coll.*, 2006).

II.2.4. Méthylation de l'ADN et empreinte parentale

La méthylation de l'ADN est également impliquée dans les phénomènes dits d'empreinte parentale (pour revue Delaval et Feil, 2004). Elle est responsable d'une régulation différentielle de l'expression des deux allèles d'un petit nombre de gènes regroupés en cluster (Morison *et coll.*, 2005). Ainsi, certaines zones sont dites soumises à empreinte maternelle car seuls certains allèles maternels sont exprimés, et les allèles paternels correspondants sont réprimés. De la même manière, on parle d'empreinte paternelle lorsque les allèles d'origine paternelle sont exprimés alors que les allèles maternels sont réprimés (Delaval et Feil, 2004 ; Morison *et coll.*, 2005).

L'étude détaillée de certains loci fait ressortir que l'état de méthylation d'une région régulatrice, appelée ICR (*Imprinting Control Region*), est au sommet de la cascade de régulation. La méthylation de l'ICR d'un allèle empêcherait la fixation de facteurs de régulation, capable de se fixer sur un ICR non méthylé. De plus, le niveau de méthylation de chaque ICR est corrélé aux modifications post traductionnelles des histones associées (Umlauf *et coll.*, 2004).

II.2.5. Comment déméthyliser ?

La question d'une déméthylation des îlots CpG méthylés est soumise à une forte controverse, car aucune enzyme à activité déméthylase de l'ADN n'est connue. Si la méthylation n'est pas recopiée à chaque réplication, des divisions successives permettent une dilution progressive des marques de méthylation. Ainsi, une activité déméthylase ne semble pas indispensable à la reprogrammation de cette marque épigénétique. Cependant, après la fécondation, le génome paternel est presque entièrement déméthylé avant la première division cellulaire : cette déméthylation active prouve l'existence d'un complexe possédant une telle activité (Morgan *et coll.*, 2005). De plus, une déméthylation active dans des cellules en culture a été mise récemment en évidence, impliquant un récepteur nucléaire et la machinerie de réparation des cassures doubles brins (Kress *et coll.*, 2006).

La déméthylation d'une cytosine peut se dérouler de manière directe, en retirant le groupement méthyl seul, ou indirecte en excisant la totalité de la base azotée, ou du nucléotide. La difficulté chimique d'une excision directe réside dans l'extrême stabilité de la liaison carbone-carbone entre le groupement méthyl et le carbone 5 de la cytosine. Une telle activité a été attribuée à MBD2 (Bhattacharya *et coll.*, 1999), mais l'existence de cette activité a été remise en question (Ng *et coll.*, 1999). De plus cette protéine est absente des ovocytes et ne peut être responsable de la déméthylation du pronoyau mâle (Santos *et coll.*, 2002). Des dioxygénases sont capables de retirer les groupements méthyls attachés sur l'azote 3 de la cytidine (Duncan *et coll.*, 2002), mais la liaison N-C est moins stable qu'une liaison C-C (Morgan *et coll.*, 2005).

Toutes les voies d'excision indirecte impliquent les mécanismes de réparation de l'ADN (excision et remplacement de bases azotées). L'action conjointe de la TDG (*thymine DNA glycosylase*) et de MBD4 répare les mésappariements T:G nés de la désamination passive des cytosines méthylées en thymine. L'action de ces deux protéines permet l'excision de la thymine et son remplacement par une cytosine. Cependant, ces protéines ont une activité très faible sur 5meCpG, et l'activité déméthylase est toujours présente au sein d'ovocytes dépourvus de MBD4

(Morgan *et coll.*, 2005). Néanmoins des enzymes capables de déaminer les cytidines pourraient créer un mésappariement T:G, reconnu et réparé par une voie indépendante de MBD4.

Enfin l'îlot CpG entier peut être remplacé : une telle activité a été décrite, mais les enzymes impliquées ne sont pas identifiées (Weiss *et coll.*, 1996).

Ces mécanismes contournent la stabilité de la liaison C-C et permettent de moduler la méthylation de l'ADN à des loci précis. Ils apparaissent néanmoins mal adaptés à la déméthylation générale du pronoyau mâle car ils impliquent la reconnaissance, l'excision et le remplacement d'un grand nombre de bases azotées (Morgan *et coll.*, 2005).

II.3. Les modifications post traductionnelles des histones

II.3.1. Une grande variété de modifications

Les histones de cœur sont porteuses d'un grand nombre de modifications post traductionnelles, dont la diversité passe par l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la sumoïlation et la biotinylation des lysines, la méthylation des arginines, la phosphorylation des sérines et thréonines, mais aussi l'ADP ribosylation des acides glutamiques (voir Figure II.3.1 A, pour revue Khorasanizadeh, 2004 ; voir Figure II.3.1 A, pour revue Margueron *et coll.*, 2005 ; Nightingale *et coll.*, 2006).

La figure II.3.1 B présente un bilan récent des sites modifiés au sein des histones. Plus de cinquante acides aminés sont modifiés parmi les histones de cœur chez l'homme. Certains acides aminés, tel la lysine 12 de l'histone H4 peuvent être détectés sous six états différents (non modifié, acétylé, mono- di- ou tri- méthylé, ou biotinilé) et le nombre de combinaisons possibles au sein d'un seul nucléosome est évalué à plus d'un milliard de milliards de combinaisons (10^{18}). Une uniformisation de la dénomination des modifications a été proposée (Turner, 2005) et cette nomenclature sera utilisée dans la suite de ce manuscrit (voir Figure II.3.1 C).

Parmi l'ensemble des modifications décrites, la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination font l'objet des recherches les plus poussées. Les enzymes responsables de la dynamique d'acétylation et de méthylation des histones sont les mieux décrites actuellement et seront détaillées dans les parties suivantes

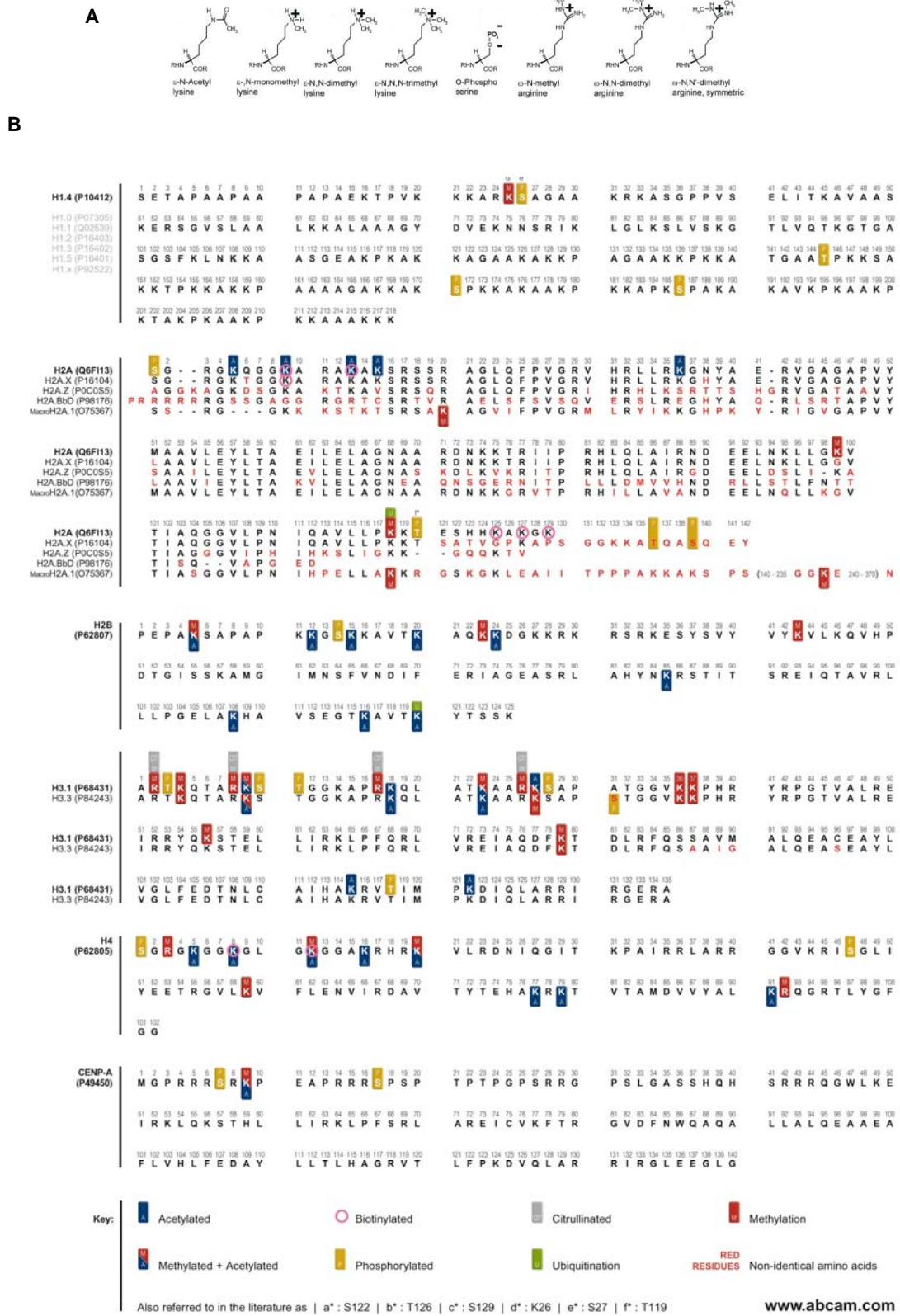


Figure II.3.1 Modifications post traductionnelles des histones

(A) Structure atomique de quelques modifications post traductionnelles d'acides aminés. Les Charges résiduelles sont indiquées. Adapté de (Khorasanizadeh, 2004).

(B) Ensemble des modifications post traductionnelles des histones et variants d'histones identifiées à ce jour chez l'homme. Liste disponible sur www.abcam.com.

~ *Les histone acétyltransférases (HAT)*

La dynamique d'acétylation des lysines est très rapide, et naît de l'équilibre entre les *histone acétyltransférases* (HAT) et *histone déacétylases* (HDAC). Les HAT sont divisées en 4 familles principales : la superfamille des GNAT (GCN5, related Nacetyltransferase), la superfamille MYST, p300/CBP et les récepteurs nucléaires et coactivateurs (voir Figure III.3.1 D et Marmorstein et Roth, 2001 ; voir Figure III.3.1 D et Carrozza *et coll.*, 2003). Les HAT nucléaires intervenant dans la transcription sont dites de type A (Gcn5, PCAF), alors que les HAT cytoplasmiques sont dites de type B. Les HAT de type A ont été décrites historiquement comme cofacteur de la transcription (voir partie II.3.2 de l'introduction), mais elles sont également impliquées dans les processus de répression de l'expression des gènes, la réparation de l'ADN et la progression du cycle cellulaire.

La superfamille des GNAT regroupe les HAT similaires à Gcn5 et à PCAF. Gcn5 acétyle préférentiellement H3 *in vitro* (Yang *et coll.*, 1996 ; Wang *et coll.*, 1997). PCAF est homologue à Gcn5, et interagit avec p300/CBP (Yang *et coll.*, 1996). Il est associé à l'activation de la transcription et acétyle les histones des promoteurs en cours d'activation. Hat1 et Hat2 font partie de la famille GNAT, et acétylent les histones néosynthétisées avant leur incorporation à la chromatine (Verreault, 2000). Enfin, Elp3 est une HAT de la famille GNAT, découverte chez la levure et conservée au sein de l'évolution (Wittschieben *et coll.*, 1999). Cette HAT est associée à l'ARN polymérase II et jouerait un rôle dans l'allongement de la transcription.

La superfamille MYST a été nommée avec les initiales de ses membres fondateurs MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et Tip60. Les HAT de cette famille sont impliquées dans des fonctions cellulaires très diverses. Tip60 est impliqué dans la réparation de l'ADN et l'apoptose (Col *et coll.*, 2005 ; Murr *et coll.*, 2006) et dans l'activation de certains gènes (Yamamoto et Horikoshi, 1997). Ybf2/Sas3 et Sas2 interviennent dans la répression transcriptionnelle, notamment des loci HML chez la levure, et dans le maintien de la structure hétérochromatique des télomères chez la levure (pour revue Carrozza *et coll.*, 2003) HBO1 joue un rôle dans l'initiation de la réplication (Burke *et coll.*, 2001). MOF est présente au sein du complexe MSL et acétyle spécifiquement H4K16 (Smith *et coll.*, 2000). MOF est notamment impliquée dans le phénomène dit de compensation de dose de la drosophile, qui implique un doublement de la transcription du chromosome X chez le mâle pour compenser l'absence d'un deuxième chromosome sexuel.

Modifying group	Amino acid(s) modified	Level of modification	Abbreviation for modification	Examples of modified residues
Acetyl-	Lysine	mono-	ac	H3K9ac
Methyl-	Arginine	mono-	me1	H3R17me1
	Arginine	di-, symmetrical	me2s	H3R2me2s
	Arginine	di-, asymmetrical	me2a	H3R17me2a
	Lysine	mono-	me1	H3K4me1
	Lysine	di-	me2	H3K4me2
	Lysine	tri-	me3	H3K4me3
	Phosphoryl-	Serine or threonine	mono-	ph
Ubiquityl-	Lysine	mono-	ub1	H2BK123ub1
SUMOyl-	Lysine	mono-	su	H4K5su
ADP ribosyl-	Glutamate	mono-	ar1	H2BE2ar1
	Glutamate	poly-	arn	H2BE2arn

Figure II.3.1 (C) **Nomenclature de dénomination des modifications post traductionnelles (Turner, 2005)**

Histone acétyltransférase	Substrat	Facteurs
<i>Famille GNAT</i>		
HAT1	H4	C-MYB
GCN5	H3, H4	
PCAF	H3, H4	HMG17, P53, MYOD, E2F, TFIIE, TFIIF
<i>P300/CBP</i>		
P300/CBP	H2A, H2B, H3, H4	HMG1, P53, c-MYB, NFκB, GATA1, EKLF, TFIIE, TFIIF, SP1, AML1
<i>Famille MYST</i>		
MOZ	H3	AML1
MORF	H2A, H3, H4	
TIP60	H2A, H3, H4	
<i>Récepteurs nucléaires et co-Activateurs</i>		
ACTR	H3, H4	
TFIIIC90	H3, H4	
TAFII250	H3, H4	TFIIE

Figure II.3.1 (D) **Principales Histones Acétyltransférases (HAT) eucaryotes**

La plupart des HAT agit au sein de complexes protéiques, qui potentialisent et régulent l'activité HAT de l'enzyme (Sternier et Berger, 2000). Pas moins de treize complexes HAT ont été purifiés à ce jour, avec de nombreux croisements entre complexes dus à la présence de sous unités communes (Carrozza *et coll.*, 2003). Par exemple le complexe SAGA de levure contient Gcn5 et participe à l'activation de la transcription, tout comme le complexe NuA4, contenant la HAT Esa1 (famille MYST). Le complexe homologue humain de SAGA, appelé STAGA est recruté sur la chromatine lors d'une irradiation aux rayons UV, supposant un rôle dans la réparation de l'ADN (Brand *et coll.*, 2001).

~ *Les histones déacétylases (HDAC)*

Des analyses phylogénétiques ont subdivisé les HDAC en quatre classes (voir Figure III.3.1 E) : la classe I regroupe les protéines homologues à Rpd3 (levure), et correspond aux HDAC1, 2, 3 et 8 humaines. La classe II contient les protéines homologues à Hda1 (levure), ce qui correspond aux HDAC4, 5, 6, 9 et 10 humaines. Les protéines homologues à Sir2 (levure) sont regroupées au sein de la classe III (protéines sirtuines 1 à 7 chez l'homme). Enfin une dernière classe, IV, contient HDAC11 (pour revue Gregoret *et coll.*, 2004 ; Holbert et Marmorstein, 2005).

Les HDAC de classe I présentent un domaine catalytique très conservé qui couvre deux tiers de la protéine (Khochbin *et coll.*, 2001). HDAC1 et HDAC2 font partie de plusieurs complexes répresseurs de la transcription, dont Sin3, NuRD et CoREST (Knoepfler et Eisenman, 1999 ; You *et coll.*, 2001). Bien que les domaines catalytiques de ces deux enzymes soient très proches (similaires à 82%), elles semblent avoir des fonctions cellulaires indépendantes car l'inactivation de chaque gène ne conduit pas au même phénotype (Takami *et coll.*, 1999). HDAC3 n'est pas retrouvé au sein des complexes impliquant HDAC1 et 2, mais fait partie du cœur des complexes SMRT et N-CoR (Khochbin *et coll.*, 2001). Malgré l'appartenance à des complexes répresseurs différents, les trois HDAC de classe I sont surexprimés dans des cancers. De nombreux médicaments anticancéreux inhibant les HDAC de classe I sont en développement, tel que SAHA et PXD101, actuellement en essais cliniques de phase II (Kelly *et coll.*, 2005).

Les HDAC de classe II sont caractérisées par une taille nettement supérieure à celles de classe I. Les HDAC4, 5, 7 et 9 constituent la sous classe IIa. Elles font parties des complexes de répression qui modulent l'effet de facteurs de transcription tels que MEF2, NF-AT3c, BCoR et Runx3 (Khochbin *et coll.*, 2001 ; Yang et Gregoire, 2005). La classe IIb contient HDAC6 et HDAC10.

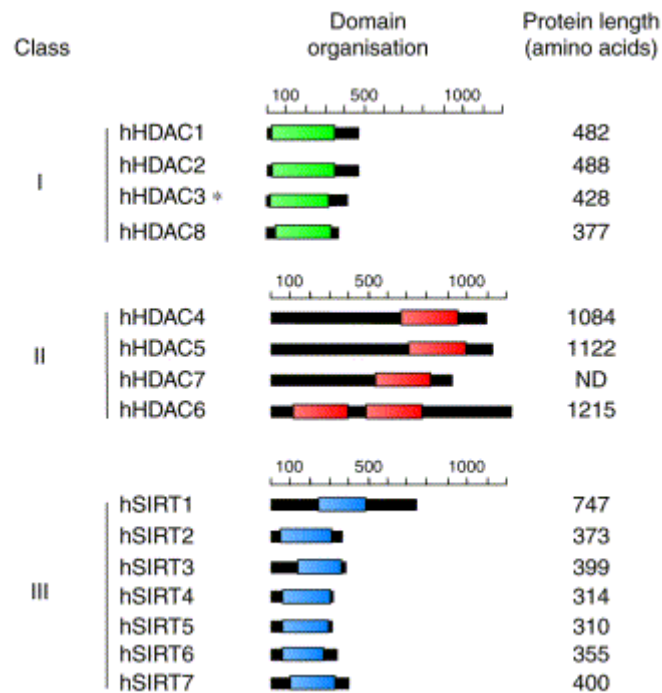


Figure II.3.1 (E) **Les histones déacétylases (HDAC)**

Les HDAC sont réparties en trois classes, basées sur leur homologie avec un membre fondateur de levure. Les HDAC de classe I sont homologues à RPD3, celles de classe II à HDA1 et de classe III à SIR2. Les domaines colorés représentent le domaine déacétylase. La longueur de chaque protéine a été indiquée.

D'après (Khochbin *et coll.*, 2001)

HDAC6 est très particulière car elle contient deux domaines déacétylases et un domaine Znf-UBP capable de lier l'ubiquitine (Verdel et Khochbin, 1999 ; Seigneurin-Berny *et coll.*, 2001). HDAC6 est majoritairement cytoplasmique mais effectue une navette constante entre noyau et cytoplasme (Verdel *et coll.*, 2000). Cependant le substrat majoritaire d'HDAC6 est la tubuline (Hubbert *et coll.*, 2002 ; Zhang *et coll.*, 2003), soulignant l'importance fonctionnelle des HDAC sur des substrats non histones. Malgré une forte similarité avec HDAC6, HDAC10 se démarque par son interaction avec les HDAC 1, 2, 3, 4, 5 et 7, intervenant sans doute dans la répression de la transcription.

Les HDAC de classe III, appelées sirtuines, utilisent le NAD comme cofacteur de leur activité déacétylases. La déacétylation d'une lysine par une sirtuine utilise une molécule de NAD, et produit du nicotinamide et un O acetyl ADP ribose (Avalos *et coll.*, 2005). Les sirtuines sont impliquées dans l'établissement et le maintien de la structure répressive présente au niveau des télomères. De plus, la protéine fondatrice de cette classe, Sir2, est impliquée dans le maintien de l'intégrité du génome et dans la voie de réparation de l'ADN (Palladino *et coll.*, 1993).

Le profil d'expression d'HDAC11 rappelle les HDAC de classe II, mais son étude phylogénétique a conduit à la placer à l'origine d'une nouvelle classe d'HDAC. HDAC 11 interagit avec HDAC6 (Gao *et coll.*, 2002), mais n'a été retrouvée dans aucun complexe répresseur connu. Sa fonction serait donc différente de celle des HDAC décrites ci dessus.

~ *Les histones méthyltransférases (HMT)*

A l'opposé de l'acétylation, la méthylation est une marque beaucoup plus stable (Trojer et Reinberg, 2006). De plus, les lysines peuvent être mono, di ou tri méthylées, et les arginines mono et diméthylées de manière symétrique ou asymétrique (voir Figure II.3.1 A).

La méthylation des histones est médiée par des *Histones MethylTransferases* (HMT) : les *lysine methyltransferase* (HKMT) méthylent les lysines et les *protein arginine methyltransferase* (PRMT) les arginines. A l'exception de l'enzyme Dot1, toutes les HKMT possèdent un domaine catalytique SET. La spécificité de l'action des HKMT, ainsi que le nombre de méthyl ajouté dépend de la nature de chaque enzyme et de ses cofacteurs (voir Figure II.3.1 F, Su et Tarakhovsky, 2006). Par exemple, la HKMT ESET diméthyle H3K9 lorsqu'elle est seule, mais son association avec MAM entraîne la triméthylation du même résidu (Su et Tarakhovsky, 2006).

Les HKMT Ezh2 et PR-SET7, qui méthylent respectivement H3K27 et H4K20, sont considérés comme des régulateurs épigénétiques clés car ces marques sont déposées sur de grandes régions

The diagram shows two histone tails, H3 and H4, with their respective methyltransferase and demethylase enzymes. H3 has several lysine residues (K4, K9, K27, K36, K79) and H4 has K20. The enzymes are listed in columns for each histone, with methyltransferases on the left and demethylases on the right.

H3		H4	
	Histone lysine methyltransferases	Histone lysine demethylases	
K4	SET9, SET1, MLL1/HRX/ALL1, MLL2/HRX2, MLL3/HRX2, ASH1, SMDY3, Meisetz/PRDM7	LSD1	
K9	SUV39H1, SUV39H2, G9a, EuHMTase, SETDB1/ESET, RIZ1/PRDM2	LSD1, JmjC-proteins	
K27	EZH1/2	?	K20
K36	SET2/HYPB, NSD1	JmjC-proteins	PR-SET7 (mono), SUV4-20H1, SUV4-20H2 (di/tri)
K79	DOT1	?	?

Figure II.3.1 (F) Méthylation et déméthylation des lysines des histones

Les principales HKMT et déméthylases des lysines des histones H3 et H4 sont indiquées. D'après (Trojer et Reinberg, 2006)

chromosomiques et sont transmises de génération en génération (Trojer et Reinberg, 2006). Ceci s'oppose à l'action transitoire et localisée des HKMT d'H3K4 et H3K36, associée à l'initiation et au maintien de la transcription d'un gène (Mellor, 2006).

Les PRMT jouent un rôle prépondérant dans la dynamique de l'expression des gènes. PRMT1 et CARM1 catalysent la diméthylation asymétrique des arginines, ce qui est lié à une activation de la transcription. Par contre PRMT5 diméthyle H4R3 de manière asymétrique dans un contexte de répression de la transcription (Wysocka *et coll.*, 2006). Bien que les effets cellulaires de la méthylation des arginines des histones soient encore mal compris, leur rôle semble être fondamental au cours du développement embryonnaire, la prolifération et la différenciation cellulaire.

~ *La déméthylation des histones*

La déméthylation des histones a été mise en évidence il y a plus de 20 ans (Paik et Kim, 1973), mais les enzymes possédant cette activité déméthylases sont décrites depuis peu.

PAD4 convertit les arginines méthylées en citrulines (Cuthbert *et coll.*, 2004 ; Wang *et coll.*, 2004), ce qui est associé à une répression de la transcription. Cependant, l'action de PAD4 conduit à la modification de la séquence de l'histone, remplaçant les arginines par des citrulines.

Une activité déméthylant les lysines a récemment été attribuée à LSD1 (Shi *et coll.*, 2004), capable de déméthyliser H3K4 ou H3K9 dans des contextes cellulaires différents. LSD1 fait notamment partie du complexe CoREST, et participe à son action répressive de la transcription. Cependant, LSD1 diméthyle H3K9 lors d'un traitement par des androgènes, jouant un rôle activateur de la transcription.

Enfin, la famille des protéines contenant un domaine JmJC a récemment été décrite comme contenant une activité déméthylase. JHDM1, JHDM2A, JHDM3A et JMJD2A sont capables de déméthyliser la lysine 9 et/ou 36 d'H3, sous une forme di ou triméthylée suivant l'enzyme considérée (Chen *et coll.*, 2006 ; Whetstine *et coll.*, 2006 ; Yamane *et coll.*, 2006). La découverte de cette famille de protéine élargit considérablement les voies de signalisation impliquant une activité déméthylase car soixante-neuf protéines contiennent un domaine JmJC chez l'homme.

II.3.2. Quel rôle fonctionnel ?

Les modifications des histones semblent avoir un effet subtil sur la structure générale du nucléosome. Une structure de nucléosome reconstitué avec des histones porteuses de nombreuses

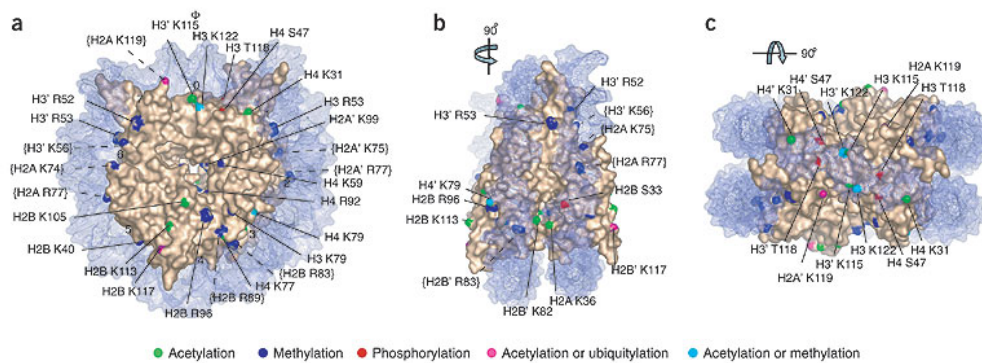


Figure II.3.2 (A) **Modifications identifiées sur la surface du nucléosome.**

Les modifications des résidus situés à la surface du nucléosome sont indiquées par le code couleur suivant : acétylation en vert, phosphorylation en rouge, méthylation en bleu, acétylation ou ubiquitination en violet, acétylation ou méthylation en bleu clair. L'ADN est représenté en bleu clair, et le nombre de tour de l'hélice est indiqué. Φ représente l'axe Dyad. (a) (b) et (c) représentent le nucléosome sous différentes vues. Tiré de (Cosgrove *et coll.*, 2004).

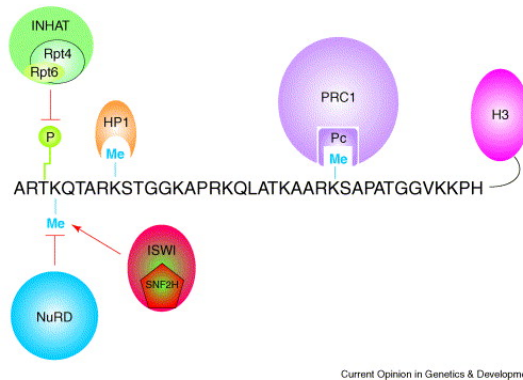


Figure II.3.2 (B) **Les lecteurs du code histones.**

L'histone H3 est utilisée comme modèle. HP1 lie les formes di et triméthylées d'H3K9, tandis que PC reconnaît spécifiquement H3K27me2-3. Les liaisons de NuRD et INHAT sont très défavorisées en présence d'H3K4me2 et H3T3P. Enfin, la sous unité ATPase Snf2h du complexe ISWI reconnaît H3K4me3. Adapté de (Margueron *et coll.*, 2005).

modifications a été résolue (Harp *et coll.*, 1996) et est quasi identique à celle obtenue avec des histones non modifiées. Ceci suggère que les modifications des histones n'agissent pas directement en restructurant le nucléosome, mais de manière plus subtile (Khorasanizadeh, 2004).

Certaines modifications sont retrouvées sur la partie globulaire du nucléosome, au niveau des résidus qui interagissent avec l'ADN (Cosgrove *et coll.*, 2004). La position des résidus modifiés sur la surface latérale du nucléosome semble suivre le cheminement de l'ADN au tour de l'octamère d'histones, impliquant phosphorylation, acétylation et méthylation (voir Figure II.3.2 A). Certains complexes sont capables de mobiliser les nucléosomes le long de la fibre de chromatine (voir Introduction II.5) et pourraient soulever l'ADN et rendre les résidus latéraux de la particule de cœur accessibles aux enzymes capables de les modifier. Ceci induirait une mobilité différentielle du nucléosome sur sa fibre de chromatine, qui peut faciliter ou nuire à l'expression d'un gène.

Certaines modifications d'histones sont reconnues par des domaines spécifiques. Ainsi, les bromodomaines sont capables de reconnaître une lysine acétylée, et les chromodomaines une lysine méthylée. Les domaines de certaines protéines sont capables de différencier l'environnement de chaque résidu modifié. Par exemple, le chromodomaine d'HP1 reconnaît spécifiquement une di ou tri méthylation d'H3K9 (Maison et Almouzni, 2004) et le chromodomaine de la protéine Polycomb (PC) lie spécifiquement H3K27me₂₋₃ (Cao *et coll.*, 2002 ; Wang *et coll.*, 2004).

Les modifications d'histones permettent la fixation de certains facteurs, mais empêchent également la liaison de certains complexes : en effet la liaison de NuRD et du complexe INHAT est fortement affaiblie par, respectivement, une triméthylation d'H3K4 et une phosphorylation d'H3T3 (voir Figure II.3.2 B). Enfin, une modification sur un acide aminé adjacent peut éjecter un facteur lié via une autre modification. Par exemple Aurora B phosphoryle H3S10 lors de la mitose, et il a été montré récemment que cela induit une éviction d'HP1, dont le site de liaison est situé sur la lysine adjacente H3K9 (Fischle *et coll.*, 2005 ; Hirota *et coll.*, 2005).

Il a été proposé que les combinaisons de modifications constituent un code, lu et interprété par une machinerie spécifique, capable elle-même d'agir sur les modifications (Turner, 1993 ; Strahl et Allis, 2000 ; Fischle *et coll.*, 2003). Cette hypothèse a été synthétisée et proposée par David Allis en 2000, qui l'a baptisé « code des histones ».

II.3.3. Vers de véritables voies de signalisation

L'analyse des réseaux de modifications des histones, des facteurs capables de les reconnaître et de les modifier, conduit à la description de véritables voies de signalisation.

~ Dialogue des modifications des histones au cours de la transcription

L'activation de la transcription d'un gène implique un dialogue fin entre les modifications portées par les queues N terminales des histones et les facteurs capables de lire ces signaux, qui seront modifiés lors de leur interprétation. Lors de l'initiation de la transcription, les histones sont acétylées par les complexes HAT SAGA ou NuA4 (Vignali *et coll.*, 2000 ; Metivier *et coll.*, 2003). Cette acétylation permettrait le recrutement de TAF250 (Jacobson *et coll.*, 2000), et de complexes de remodelage tels que SWI/SNF. Ces complexes mobiliseraient les nucléosomes adjacents au point de les désassembler (Boeger *et coll.*, 2003 ; Reinke et Horz, 2003). Enfin, les sous unités Spt3 et Spt8 des complexes HAT assurent le recrutement de TBP, initiant l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription.

Un véritable dialogue est instauré entre les queues N terminales des histones (voir Figure II.3.3). Chez la levure, H2B est ubiquitinilé par Rad6 et Bre1 sur H2BK123 (Sun et Allis, 2002 ; Henry *et coll.*, 2003). L'ubiquitination d'H2B permet la méthylation d'H3K4 et H3K79 par Set1 et Dot1. Cette méthylation implique également les ATPases du protéasome Rpt6 et Rpt8 (Ezhkova et Tansey, 2004). Ce recrutement se ferait de manière indépendante du protéasome lui-même mais leur activité ATPase pourrait faciliter la méthylation d'H3K4 et H3K79. Chez la levure, la méthylation d'H3K4 est également liée à une acétylation transitoire H4K8, liée au désassemblage des nucléosomes (Morillon *et coll.*, 2005).

L'allongement des ARNm est également régulé par les modifications des histones. L'HMT Set2 est associée très fortement à l'ARN polymérase II, et méthyle H3K36 lors du passage d'un nucléosome (Mellor, 2006). Cette méthylation est fondamentale car elle permet le recrutement d'une protéine à chromodomaine, Eaf3. Eaf3 est membre d'un complexe HDAC (Rpd3 chez la levure), qui efface les marques d'acétylation sur H3 et H4 après le passage de l'ARN polymérase. Ceci prévient un recrutement ectopique de protéines à bromodomains, qui pourrait conduire à une initiation ectopique de la transcription (Joshi et Struhl, 2005).

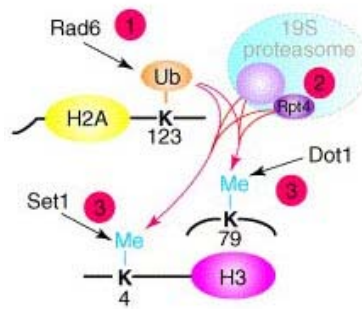


Figure II.3.3 Exemple de voies de signalisation du code des histones

Chez la levure, l'ubiquitination d'H2BK123 par Rad6 (1) entraîne la méthylation d'H3K4 et H3K79, respectivement par Set1 et Dot1 (3). Cette méthylation implique également la présence de Rpt4 et Rpt6, deux sous unités ATPases du complexe 19S du protéasome(3). Tiré de (Margueron *et coll.*, 2005).

~ *Domaines chromatiniens et modifications post traductionnelles*

Plusieurs domaines chromatiniens contiennent des modifications épigénétiques très différentes. Les histones présentes au niveau des gènes actifs de l'euchromatine sont hyperacétylées, et méthylées sur H3K4, K36 et K79. En revanche, l'hétérochromatine constitutive contient des marques d'H3K9me3, H3K27me1 et H4K20me3.

L'hétérochromatine facultative et les promoteurs des gènes réprimés sont enrichis en H3K9me2, H3K27me3 et H4K20me1 (pour revue Sarma et Reinberg, 2005).

Le processus d'inactivation du chromosome X chez les mammifères est un exemple caractéristique de dialogue épigénétique conduisant à l'inactivation d'une région de 160 mégabases. Cette inactivation débute par une perte des marques euchromatiques (H4ac H3K9ac, H3K4me2-3) (Keohane *et coll.*, 1996 ; Chaumeil *et coll.*, 2002). Des nouvelles modifications épigénétiques sont alors rapidement détectées : H3K27me3, H3K9me2, H4K20me1 et H2Aub1 (de Napoles *et coll.*, 2004). Le variant d'histone macroH2A serait alors incorporé, aidant à réprimer la transcription (Angelov *et coll.*, 2003 ; Chakravarthy *et coll.*, 2005 ; Doyen *et coll.*, 2006). Enfin, l'ADN est méthylé au niveau des promoteurs des gènes réprimés par un mécanisme inconnu (Heard, 2005).

L'étude des marques épigénétiques portées par les histones lors de l'activation de la transcription ou de l'inactivation d'un domaine chromosomique entier révèle de véritables voies de signalisation, dont la compréhension est encore balbutiante. En guise de conclusion, nous retiendrons que les histones sont porteuses d'une multitude de signaux entrelacés, dont la diversité et la dynamique soulignent la finesse de la régulation de l'information épigénétique au cours de la vie cellulaire.

II.4. Les variants d'histone

II.4.1. Qu'est-ce qu'un variant d'histone ?

Le problème posé par la définition d'un variant d'histone est le choix d'une histone dite de référence. L'ensemble de la communauté scientifique a longtemps considéré les histones incorporées lors de la réplication comme histone de référence, malgré certaines légères variations de séquences (Marzluff *et coll.*, 2002). Les ARN des histones de référence, majoritairement incorporés

		Variants	
Histones	H1	H1.1-H1.5, H1°	H1t, H1t2, HILS1, H1oo
	H3	H3.1, H3.2, H3.3, CENP-A	H3t
	H2A	H2A.X, H2A.Z, macroH2A, H2Abbd	TH2A
	H2B		TH2B, TSH2B, H2BFWT
		Ubiquitaire	Tissu spécifique

Figure II.4.1 Récapitulatif des variants d'histones connus.

Les variants exprimés de manière ubiquitaire et spécifiques d'un tissu ont été séparés. Aucun variant d'H4 n'est connu.

lors de la réplication, ne contiennent pas d'introns et ne sont pas polyadénylés. Par contre, certains ARN de variants d'histone seraient épissés et polyadénylés.

Cependant, des travaux récents remettent cette définition en cause car H3.1 et H3.2 auraient un rôle différent bien qu'ils soient tous les deux incorporés lors de la réplication et que leurs ARN ne contiennent pas d'intron et ne soient pas polyadénylés (Hake et Allis, 2006).

On peut néanmoins distinguer des histones exprimées de manière ubiquitaire, ou spécifique d'un tissu (voir Figure II.4.1). Le testicule présente notamment une grande variété de variants d'histone (voir Introduction III.2.2 et Govin *et coll.*, 2004).

II.4.2. Les variants d'histone de liaison

Dix isoformes d'histones de liaison ont été décrites à ce jour (voir Figure II.4.1). La majeure partie des variations est présente dans les zones N et C terminales et la région globulaire centrale est la plus conservée (Khochbin, 2001). Les gènes codants ces isoformes auraient évolué de manière à lier l'expression de ces variants aux signaux contrôlant la prolifération cellulaire. Ainsi des isoformes différentes des variants d'histone de liaison sont détectées à différents stades de différenciation. Chez le xénope, le variant B4 est présent au début du développement dans des cellules à division rapide. Par contre, les cellules en phase de différenciation finale sont enrichies en variant H1^o, mais cet enrichissement est perdu en cas de dédifférenciation, par exemple lors de la régénération du foie après ablation chirurgicale (Gjerset *et coll.*, 1982).

Ainsi, on peut différencier les variants exprimés dans un contexte embryonnaire, de réplication ou de différenciation. Pourtant, aucun rôle fonctionnel distinct ne semble se dégager pour chaque isoforme (mis à part les variants spécifiques du testicule, qui seront discutés dans la partie III.2.2) : des expériences d'inactivation de gènes indiquent que les grandes fonctions cellulaires, telle que la transcription, ne sont pas modifiées en l'absence de variants d'histone, mais laissent supposer un rôle épigénétique encore mal compris, agissant probablement au niveau de l'organisation et de la structuration globale de la chromatine (Khochbin, 2001).

II.4.3. Les variants d'H2A

Il existe quatre variants ubiquitaires d'H2A, et un variant spécifique du testicule. Les variants H2A.Z, H2A.X et macroH2A sont présentés ci-dessous (voir Figure II.4.3). Un quatrième variant

	1	10	20	30	40	
H2A	SG	..RGKQGCK	KARAKAKTR	SSRAGLQ	FPVGRVHR	LLR.KGNYSERV
H2AX	SG	..RGKTGGK	KARAKAKSR	SSRAGLQ	FPVGRVHR	LLR.KGHYAERV
H2AZ	AG	GKAGKDS	GKAKTKAV	SRSQRAGLQ	FPVGRVHR	HLKSRRTSHGR
macroH2A1SSRGGKK	KSTKTSSR	AKAGVIF	FPVGRMLR	YIK.KGHPKYRIG
	50	60	70	80	90	
H2A	PVY	LAAVLE	YLTAEI	LELAGNA	ARDNKK	TRITPRHLQLAIRNDEELNKL
H2AX	PVY	LAAVLE	YLTAEI	LELAGNA	ARDNKK	TRITPRHLQLAIRNDEELNKL
H2AZ	AVY	SAAVLE	YLTAEV	LELAGNA	SKDLK	VKRITPRHLQLAIRGDEELDSL
macroH2A1	PVY	MAAVLE	YLTAEI	LELAGNA	ARDNKK	GRVTPRHILLAVANDEELNQL
	100	110	120			
H2A	GRVTIA	GGVLPNI	QAVLLP	KKTES	HHKAKGK.....
H2AX	GGVTIA	GGVLPNI	QAVLLP	KKSSAT	...VGP	KAPAVGKKA
H2AZ	K.ATI	AGGVIP	HHKSLI	GKKGQQ	KTV.....
macroH2A1	KGVTIA	GGVLPNI	HPPELL	AKKRGS	KGKLEAI	IITPPAKKA
						KSPSQKKPV
H2A					
H2AX					
H2AZ					
macroH2A1		AKKT				

Figure II.4.3 Alignements de séquence des variants d'H2A

Les fold histones seulement ont été alignés. Le domaine non histone extra terminal de macroH2A a été coupé.

ubiquitaire, H2ABbd, serait appauvri au niveau du chromosome X inactif chez les femelles, mais ses fonctions sont encore mal connues (Gautier *et coll.*, 2004).

~ ***H2A.Z facilite l'initiation de la transcription***

Le variant H2A.Z est présent chez les mammifères, les oiseaux (H2A.F), la drosophile (H2Av), *C elegans*, les oursins (H2AZ/F), différents champignons dont *Tetrahymena* (H2Ahv1) et la levure (Htz1) (Raisner *et coll.*, 2005). Chez la drosophile, le variant d'histone H2Av regroupe les fonctions attribuées à H2A.Z et H2A.X (voir partie suivante). Les variants homologues à H2A.Z ont été très conservés au cours de l'évolution.

La structure des nucléosomes contenant H2A.Z a été résolue (Suto *et coll.*, 2000). Les informations structurales suggèrent que H2A.Z remplacerait les deux molécules d'H2A d'un nucléosome, car la présence d'un dimère H2AZ-H2B et H2A-H2B est peu favorable. Ainsi, l'incorporation d'un premier dimère H2A.Z-H2B pourrait faciliter le remplacement du deuxième dimère H2A-H2B (Suto *et coll.*, 2000). En outre, une histidine présente à la surface des nucléosomes contenant H2A.Z lie un ion métallique divalent (Suto *et coll.*, 2000). Ceci pourrait altérer la structure locale de la chromatine à un niveau supérieur, et modifier le recrutement spécifique de certains facteurs.

La distribution d'Htz1 a été évaluée à l'échelle d'un génome entier chez *Saccharomyces cerevisiae*. Htz1 est enrichi dans les promoteurs de gènes et peu présent dans les régions réprimées tels que les domaines subtélomériques (Guillemette *et coll.*, 2005 ; Raisner *et coll.*, 2005). Ainsi, H2A.Z favoriserait une activation de la transcription. Une étude précise a montré qu'H2A.Z empêche le maintien d'un état répressif de la chromatine. En effet, le taux d'enrichissement d'Htz1 au niveau de chaque gène est corrélé à son taux de transcription, de telle manière que le départ d'Htz1 favorise l'activation immédiate de la transcription (Zhang *et coll.*, 2005). Ainsi, l'incorporation d'Htz1 se ferait au niveau d'un promoteur inactif ou peu actif et l'activation du promoteur serait facilitée par le départ d'Htz1, qui exposerait l'ADN aux facteurs de transcription (Zhang *et coll.*, 2005).

La déposition d'H2A.Z est dirigée par un signal codé par l'ADN et l'acétylation de la queue N terminale des histones (Raisner *et coll.*, 2005 ; Zhang *et coll.*, 2005). Le complexe d'assemblage d'Htz1 a été purifié chez la levure, et sa sous unité catalytique est Swr1 (Mizuguchi *et coll.*, 2004). La sous unité Swc2 lie également H2A.Z et est essentielle à son dépôt dans la chromatine (Wu *et*

coll., 2005). La protéine à double bromodomaines Bdf1 est présente au sein du complexe : elle ciblerait l'insertion d'H2A.Z en reconnaissant une acétylation d'H3 et/ou d'H4.

Le complexe Tip60 de la drosophile est homologue au complexe Swr1 (Kusch *et coll.*, 2004), et incorpore le variant H2Av. Il convient de se demander à quel point ces mécanismes sont conservés chez les mammifères, car H2A.Z affiche une distribution hétérochromatique et interagirait avec HP1 (Rangasamy *et coll.*, 2003 ; Fan *et coll.*, 2004). Le complexe mammifère SRCAP serait homologue au complexe SWR1, et incorpore *in vitro* H2A.Z à la chromatine. Cependant son activité n'a pas encore été montrée *in vivo* (Ruhl *et coll.*, 2006). Enfin, Les composants des complexes Tip60 et SRCAP combinent les sous unités des complexes Swr1 et NuA4, ce qui renforce le lien entre acétylation des histones et déposition d'H2A.Z (Raisner *et coll.*, 2005).

~ **H2A.X et la réparation des cassures double brins de l'ADN**

Le variant H2A.X est présent au sein de l'ensemble du règne animal. C'est la seule histone H2A présente chez la levure, chez certains champignons et chez le parasite *Giardia* (Malik et Henikoff, 2003). L'extrémité carboxy-terminale d'H2A.X contient 20 acides aminés de plus qu'H2A, et notamment le motif très conservé SQE (Li *et coll.*, 2005). La phosphorylation de cette sérine 139 est une marque forte, associée à la fonction de ce variant (voir ci-dessous). Chez les mammifères, un motif SQ ou TQ est présent en amont de ce motif (position 136 pour le résidu phosphorylable) et peut également être phosphorylé (Rogakou *et coll.*, 2000). Enfin, une cassette GKK située quelques résidus en amont a également été très conservée au cours de l'évolution, ce qui suppose un rôle fonctionnel important de ces trois acides aminés et de leurs modifications post traductionnelles (Li *et coll.*, 2005).

Une phosphorylation massive d'H2A.X sur sa sérine 139 a lieu lors de la réparation d'une cassure double brins de l'ADN. La forme phosphorylée d'H2A.X, appelée γ H2A.X est détectée dans tous les contextes cellulaires mettant en jeu des cassures double brins : agression par des agents extérieurs, apoptose, réplication, recombinaison des zones V(D)J lors de la maturation des lymphocytes et recombinaison homologue lors de la méiose (voir Introduction III). Trois kinases de la famille des PI3 kinases peuvent phosphoryler H2A.X : ATM, DNA-PK et ATR (Stiff *et coll.*, 2004).

La phosphorylation d'H2A.X pourrait avoir un rôle direct d'ouverture de la chromatine. Sa sérine 139 est située au niveau du site de fixation des histones de liaison et sa phosphorylation

pourrait entraîner l'ouverture de la fibre de 30 nm, en chassant les histones de liaison (Li *et coll.*, 2005).

γ H2A.X n'est pas impliquée dans le recrutement initial des facteurs essentiels à la réparation des cassures doubles brins, mais dans leur accumulation (Celeste *et coll.*, 2003). Il est reconnu par Arp4, sous unité commune des complexes de remodelage NuA4, Ino80 et Swr1 (Downs *et coll.*, 2004). Ces complexes permettraient alors de modifier la structure de la chromatine, de telle sorte que la réparation de l'ADN puisse avoir lieu.

~ *macroH2A réprime la transcription*

MacroH2A (mH2A) est un variant d'H2A contenant une région carboxy-terminale de très grande taille (20 kD) (Pehrson et Fried, 1992). On retrouve deux isoformes alléliques, mH2A1 et mH2A2, identiques à 80% (Chadwick *et coll.*, 2001 ; Costanzi et Pehrson, 2001). L'ARN transcrit du gène mH2A1 subit un épissage différentiel conduisant aux formes mH2A1.1 et mH2A1.2, exprimées spécifiquement dans certains tissus (Chadwick *et coll.*, 2001).

Le variant mH2A est associé à une répression forte de la transcription, et serait notamment enrichi au sein du chromosome X inactif (Costanzi et Pehrson, 1998 ; Costanzi et Pehrson, 2001). De plus, mH2A est détecté dans des foyers hétérochromatiques apparaissant dans les cellules quiescentes ou sénescents (Grigoryev *et coll.*, 2004 ; Zhang *et coll.*, 2005).

MacroH2A a un effet répresseur de la transcription à deux niveaux. *In vitro*, il a été montré qu'il bloque l'action de la HAT p300, ce qui bloque la cascade de modifications post traductionnelles des histones nécessaires à l'initiation de la transcription (Doyen *et coll.*, 2006). Cet effet a été confirmé *in vivo*, car les nucléosomes contenant mH2A sont moins acétylés que ceux contenant H2A (Chakravarthy *et coll.*, 2005), et l'interaction de mH2A avec HDAC1 et HDAC2 minimise l'acétylation des histones voisines. De plus, mH2A bloque l'action de complexes de remodelage de la chromatine, nécessaire à la mobilisation des nucléosomes lors de la transcription (Doyen *et coll.*, 2006). La boucle L1 de macroH2A, située entre les deux premières hélices α du fold histone, serait responsable de ce blocage.

Le domaine C terminal de mH2A, appelé couramment domaine macro, a été cristallisé par plusieurs groupes (Chakravarthy *et coll.*, 2005 ; Kustatscher *et coll.*, 2005). Le domaine macro de mH2A1.1 est capable de lier un métabolite produit lors de la déacétylation par les sirtuins (HDAC de classe III), appelé O-acetyl-ADP-ribose. Par contre, le domaine macro de mH2A1.2 n'est pas

capable de lier ce métabolite. Les conséquences fonctionnelles de cette liaison ne sont pas encore comprises, mais cette interaction renforce les liens entre métabolisme cellulaire et indexation des informations épigénétiques au sein de la chromatine.

II.4.4. Les variants d'H3

Cinq isoformes distinctes d'H3 sont présentes chez les mammifères, H3.1, H3.2, H3.3, H3t et CENP-A (voir Figure II.4.4).

Le plupart des organismes eucaryotes ont un variant d'H3 spécifique du centromère, appelé Cse4 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, CID chez la drosophile et CENP-A chez l'homme. *Saccharomyces cerevisiae* possède uniquement Cse4 et H3.3. Les plantes, insectes, xénopes et oiseaux ont, en plus d'H3.3, un variant dénommé H3.2, exprimé et incorporé à la chromatine lors de la réplication. H3.2 et H3.3 diffèrent uniquement de quatre acides aminés.

Chez les mammifères, deux autres variants d'H3 existent : H3.1 a une cystéine en position 96 à la place de la sérine d'H3.2. H3t est exprimé uniquement lors de la spermatogenèse (voir Introduction III.2.2) et possède quatre acides aminés différents d'H3.1. Les différences observées entre les variants d'H3 semblent mineures, mais une sélection positive très forte pèse sur chaque histone (Marzluff *et coll.*, 2002). Chaque différence, même minime, est sans aucun doute liée à une conséquence fonctionnelle importante.

~ CENP-A définit les centromères

Les variants d'H3 spécifiques des centromères (cenH3) sont un des piliers de la construction des centromères, car indispensables à la formation des kinétochores, eux-mêmes responsables de l'attachement des microtubules et de la ségrégation chromosomique lors de la mitose et de la méiose (Blower et Karpen, 2001). En outre, les centromères ne sont pas définis par une séquence d'ADN spécifique mais par la présence des cenH3, ce qui a servi historiquement à leur cartographie chez les plantes et les animaux (Henikoff et Ahmad, 2005). L'incorporation des cenH3 se produirait de manière indépendante de la réplication (Amor *et coll.*, 2004) et des approches biochimiques récentes ont permis de purifier un complexe d'incorporation (Foltz *et coll.*, 2006 ; Okada *et coll.*, 2006). Cependant, les chaperons moléculaires capables de différencier H3 et CENP-A ne sont pas encore connus.

	1	10	20	30	40	50
H3.1	-ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPH-RYRPGTVALRE					
H3.2	-ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPH-RYRPGTVALRE					
H3.3	-ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPSTGGVKKPH-RYRPGTVALRE					
H3t	-ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPH-RYRPGTVALRE					
CENP-A	GPRRRSRKPEAPRRRSPTSPTPGPSRR-GPSLGASSHQHSRRRQG--WLKE					
	60	70	80	90	100	
H3.1	IRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAODFKT--DLRFOSAVMALQEAACEAYL					
H3.2	IRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAODFKT--DLRFOSAVMALQEAASEAYL					
H3.3	IRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAODFKT--DLRFOSAIIGALQEAASEAYL					
H3t	IRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAODFKT--DLRFOSAVMALQEAACEAYL					
CENP-A	IRKLOKSTHLLIRKLPFSRLAREICVKFTRGVDFNWQAQALLALQEAAEAFL					
	110	120	130			
H3.1	VGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA---					
H3.2	VGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA---					
H3.3	VGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA---					
H3t	VGLFEDTNLCVIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA---					
CENP-A	VHLFEDAYLLTLHAGRVTLPKDVQLARRIRGLEEGLG					

Figure II.4.4 Alignements de la séquence des variants d'H3

~ ***H3.3 mémorise l'état transcriptionnel***

Le variant d'histone H3.3 est enrichi dans les zones de transcription active chez les insectes, les plantes et les hommes (Ahmad et Henikoff, 2002 ; McKittrick *et coll.*, 2004 ; Chow *et coll.*, 2005). H3.3 est chaperonné par une protéine spécifique, HIRA, qui le différencie des autres H3 et favorise son incorporation dans les régions transcriptionnellement actives (Tagami *et coll.*, 2004).

Ce variant est enrichi en marques de transcription active, à savoir une hyperacétylation et une diméthylation d'H3K36 et H3K79 (Hake *et coll.*, 2006).

H3.3 est codé par deux gènes, *H3.3A* et *H3.3B* et *H3.3A* a été invalidé lors d'une approche de mutation par insertion. Chez des souris homozygotes, cette invalidation cause une létalité néonatale, un retard de croissance, des déficiences neuromusculaires et une baisse de la fertilité masculine (Couldrey *et coll.*, 1999). L'enrichissement observé d'H3.3 dans les zones transcriptionnellement active suggère que ces problèmes de développement soient liés à une altération du patron d'expression des gènes.

~ ***H3.1 et H3.2 portent des marques différentes***

H3.1 et H3.2 ont été longtemps confondus, mais l'étude de leurs modifications post traductionnelles suggèrent des rôles distincts (Hake *et coll.*, 2006). H3.2 est méthylé sur H3K27 et serait impliqué dans la répression de l'expression des gènes, alors que H3.1 possède des marques associées à l'activation des gènes (H3K14ac) et à la répression de la transcription (H3K9me2).

~ ***L'hypothèse du « code barre des histones »***

Des protéines très similaires dévoilent ainsi des modifications post traductionnelles très différentes. Les cenH3 sont spécifiques des centromères. H3.3 est associé à une transcription active, tandis qu'H3.1 et H3.2 auraient des rôles différents encore mal compris (Hake et Allis, 2006).

De plus, le mode de sélection de variants aussi proches est encore mal compris. Des chaperons spécifiques reconnaissent H3.1 et H3.3, respectivement par CAF-1, et HIRA (Tagami *et coll.*, 2004). Les acides aminés 87 à 90 constitueraient un domaine de reconnaissance (Ahmad et Henikoff, 2002), mais comment expliquer que H3.1 et H3.2, qui diffèrent d'un seul acide aminé, aient un rôle fonctionnel différent (Hake et Allis, 2006) ?

David Allis et al ont étendu récemment la portée du code des histones (« histone code »), en introduisant la notion de « code barre » des histones (Hake et Allis, 2006). David Allis suppose que

chaque variant d'H3 a un rôle spécifique et porte une information épigénétique particulière. La répartition des variants d'histone au sein de la chromatine indexerait l'information épigénétique. Cette hypothèse peut naturellement être étendue à tous les variants d'histone, mais suppose des mécanismes d'assemblage et de régulation encore inconnus.

II.5. Dynamique d'assemblage et de positionnement des nucléosomes sur la chromatine

L'ensemble des événements de la vie cellulaire, tels que la réplication, la transcription ou encore le maintien de l'intégrité du génome, implique une réorganisation très dynamique de la chromatine. Par exemple, le passage d'une fourche de réplication implique une décompaction locale de la chromatine, le désassemblage des nucléosomes, puis le dépôt de nouveaux nucléosomes sur les deux brins néosynthétisés. De plus, les histones sont des protéines très basiques, et sont chaperonnées par un ensemble de protéines spécifiques, appelées chaperons d'histones.

Cette partie s'attachera à décrire les voies d'assemblage et de désassemblage de la chromatine, ainsi que la régulation de la mobilité des nucléosomes au sein de la fibre de chromatine.

II.5.1. Assemblage et désassemblage de la chromatine

~ La nucléoplasmine

Trois isoformes de nucléoplasmines ont été décrites, appelées Npm1, Npm2 et Npm3.

L'ovocyte de xénope contient assez d'histones pour structurer le génome de 10 000 cellules somatiques (Woodland et Adamson, 1977 ; Akey et Luger, 2003). Le risque d'agrégation y est donc particulièrement élevé. Ce stock d'histones attend d'être incorporé à la chromatine paternelle et à l'ensemble de la chromatine lors des premières divisions embryonnaires. Chez le xénope, Npm2 stocke les dimères H2A-H2B qui seront incorporés au pronoyau mâle, et au cours des premières divisions de l'embryon (Woodland et Adamson, 1977 ; Akey et Luger, 2003). Ce rôle serait conservé chez la souris (Burns *et coll.*, 2003). En effet les souris femelles invalidées pour ce gène sont stériles. Après la fécondation, le pronoyau mâle est bien décondensé, mais des problèmes de structuration des nucléoles sont probablement responsables de la mort des embryons (Burns *et coll.*,

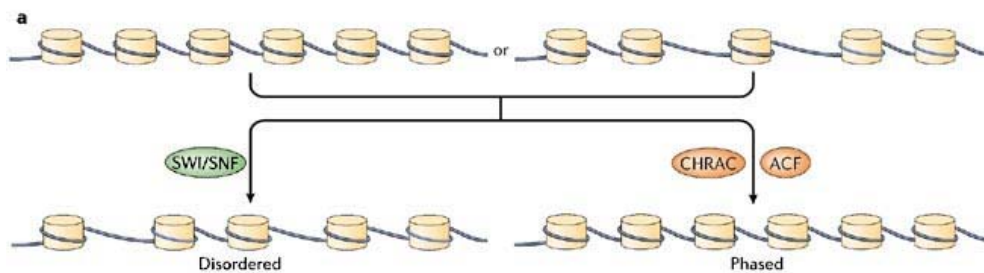


Figure II.5.2 **Propriétés des facteurs de remodelage**

Les facteurs de remodelage de la famille SWI/SNF (gauche) et ISWI (CHRAC et ACF par exemple, à droite), ont des effets opposés lors de tests *in vitro*. Les facteurs de type SWI/SNF déplacent les nucléosomes régulièrement espacés de manière aléatoire, alors que les facteurs de type ISWI ordonnent des nucléosomes de manière régulière. Chaque type d'action est adapté à un contexte physiologique différent (voir le texte pour plus de détails).

Tiré de (Saha *et coll.*, 2006)

2003). De plus, la nucléoplasmine serait une protéine essentielle à la reprogrammation de l'épigénome du zygote (Tamada *et coll.*, 2006).

La fonction de chaperons d'histones de Npm1 et Npm3 est moins bien comprises. En effet, ces deux protéines sont localisées majoritairement dans le nucléole des cellules somatiques, où elles participent à la synthèse et maturation des ribosomes. Npm1 serait également impliqué dans la duplication des centrosomes, et dans la régulation de la transcription (Eirin-Lopez *et coll.*, 2006).

~ ***FACT chaperonne H2A-H2B lors de la transcription***

Le complexe FACT (*Facilitates Chromatin Transcription*) a été identifié lors d'un crible cherchant les facteurs facilitant l'action de l'ARN polymérase II (Belotserkovskaya *et coll.*, 2003). Il est formé des sous unités Pob3 et Spt16. FACT chaperonne les histones H2A-H2B (Belotserkovskaya et Reinberg, 2004), et permettrait leur éviction avant le passage de l'ARN polymérase (Pavri *et coll.*, 2006). FACT participerait ensuite à la reconstitution des nucléosomes après le passage du complexe de transcription (Belotserkovskaya *et coll.*, 2003).

Il est également associé à la sous unité α de l'ADN polymérase (Wittmeyer et Formosa, 1997), et une mutation de *SPT16* bloque les cellules en début de phase S (Rowley *et coll.*, 1991).

~ ***Les NAP chaperonnent les dimères d'H2A H2B lors de la réplication***

Les NAP (*nucleosome assembly protein*) sont capables de reconstituer *in vitro* des nucléosomes à partir d'histones libres. Les NAP chaperonneraient préférentiellement les histones H2A-H2B.

Deux formes, NAP1 et NAP2, existent chez la levure, et cinq gènes (NAP1L1 à NAP1L5) ont été identifiés chez les mammifères. Il est intéressant de noter que les gènes mammifères codant les NAP sont localisés dans des clusters soumis à empreinte parentale.

Chez la levure, une invalidation de *NAP1* conduit à une dérégulation de 10% des gènes, et 35% des gènes dérégulés sont situés sur un cluster du chromosome IV (Ohkuni *et coll.*, 2003). L'invalidation du gène *NAP1L2* chez la souris conduit à un arrêt du développement embryonnaire au milieu de la gestation, associé à une surproduction de cellules neurales (Rogner *et coll.*, 2000). Ainsi, *NAP1L2* interviendrait dans la régulation de la prolifération cellulaire.

La distribution de NAP1 varie au cours du cycle cellulaire : présent dans le cytoplasme en phase G2, NAP1 est présent dans le noyau lors de la phase S (Ito *et coll.*, 1996). Son interaction avec KAP114, un membre de la famille des importines, permettrait l'import nucléaire des histones H2A

et H2B nouvellement synthétisés, avant de les incorporer à la chromatine (Chang *et coll.*, 1997 ; Mosammaparast *et coll.*, 2002 ; Okuwaki *et coll.*, 2005).

La localisation de NAP1 serait régulée par la présentation ou le masquage de séquence d'import et d'export nucléaire (Park et Luger, 2006). Des jeux de phosphorylation conditionneraient l'accessibilité de ces séquences par Kap114 (import nucléaire) et Crm1 (export nucléaire).

Enfin, NAP1 extrait *in vitro* les dimères H2A-H2B de nucléosomes, ce qui suggère une implication dans le désassemblage de la chromatine en amont de la fourche de réplication (Park *et coll.*, 2005).

~ *La famille CAF1 : assemblage d'H3-H4 au cours de la réplication*

Le complexe CAF1 (*chromatin assembly factor I*) compte trois sous unités, appelées p150, p60 et p48 chez l'homme. Chez la levure, leurs protéines homologues sont codées par les gènes *Cac1*, *Cac2* et *Cac3*.

p150 prend en charge les histones H3 et H4 nouvellement synthétisées dans le cytoplasme. Cette sous unité interagit avec la karyopherine K123, ce qui permet l'import d'H3 et d'H4 au sein du noyau (Loyola et Almouzni, 2004). Le complexe CAF-1 s'associe alors avec PCNA au niveau de la fourche de réplication, et assemblerait deux dimères H3-H4 (Verreault *et coll.*, 1996 ; Tagami *et coll.*, 2004). Le rôle de CAF1 est essentiel chez l'homme car sa déplétion entraîne un arrêt de la réplication (Hoek et Stillman, 2003). Néanmoins, plusieurs voies d'assemblage coexistent probablement, suggérant une coopération avec plusieurs facteurs présentés ci-dessous (Asf1 et HIRA, voir Sharp *et coll.*, 2001 ; Sutton *et coll.*, 2001).

La purification du complexe CAF1 indique que H3 et H4 seraient associées en dimère (Tagami *et coll.*, 2004 ; Benson *et coll.*, 2006). De plus, la séparation des tétramères parentaux en deux dimères permettrait la copie des marques épigénétiques : après réplication, chaque tétramère nouvellement incorporé pourrait contenir un ancien et un nouvel exemplaire d'H3 et d'H4.

L'importance de CAF1 dans la dynamique de l'épigénome est confirmée par l'inactivation des gènes *Cac* chez la levure, qui conduit à une perte de l'état hétérochromatinien de certaines régions du génome. Chez l'homme, p150 est associé à une fraction d'HP1 lors de la réplication de l'hétérochromatine (fin de phase S) et faciliterait sa réorganisation après le passage de la fourche de réplication (Quivy *et coll.*, 2004). De plus, CAF1 interagit avec MBD1 (Reese *et coll.*, 2003) et pourrait faciliter sa réassociation avec la chromatine après réplication (Sarraf et Stancheva, 2004 ;

Wallace et Orr-Weaver, 2005). De cette manière CAF1 assure le dépôt des marques épigénétiques caractéristiques et pérennise l'état hétérochromatinien d'une région (Polo et Almouzni, 2006).

~ *Asf1 chaperonne H3 et H4*

Des études biochimiques chez la drosophile ont identifié Asf1 comme une sous unité du complexe d'assemblage de la chromatine couplé à la réplication (Tyler *et coll.*, 2001). Asf1 a un rôle proche de celui de CAF1 : il chaperonne H3 et H4, et est impliqué dans leur déposition au sein de la chromatine dans un contexte de réplication et de réparation de la chromatine (Ehrenhofer-Murray, 2004). Par contre, il n'est pas capable de déposer seul les histones au sein de la chromatine et agirait conjointement avec CAF1. Asf1 serait également impliqué dans le désassemblage de la chromatine avant le passage de la fourche de réplication (Adkins et Tyler, 2004).

Asf1 interagit avec HIRA, un autre chaperon chargé de la déposition des histones dans un complexe indépendant de la réplication (voir ci-dessous). Ainsi, Asf1 pourrait stocker transitoirement les histones, avant de les confier à CAF1 ou HIRA (Loyola et Almouzni, 2004).

Enfin, un rôle transcriptionnel a récemment été découvert : Asf1 serait responsable de l'éviction et de la redéposition des histones après le passage de la polymérase lors de la transcription (Schwabish et Struhl, 2006).

~ *HIRA est le chaperon d'H3.3*

Les gènes codant les protéines HIR/HIRA ont été identifiés historiquement chez la levure en tant que régulateurs négatifs de l'expression des histones (Sherwood et Osley, 1991). Sa déplétion, réalisée dans des extraits d'œufs de xénopes, ne nuit pas à l'assemblage de la chromatine couplé à la réplication, mais bloque l'assemblage de la chromatine indépendant de la réplication (Ray-Gallet *et coll.*, 2002). Enfin, la purification des complexes associés à H3.1 et H3.3 a démontré la spécificité de CAF1 pour H3.1 et de HIRA pour H3.3 (Tagami *et coll.*, 2004). Ainsi, HIRA serait chargé de la déposition active d'H3.3 au niveau des gènes transcrits.

Son activité pourrait également être liée à d'autres événements cellulaires. Chez la drosophile, une mutation ponctuelle d'HIRA affecte la déposition d'H3.3 dans le pronoyau mâle après fécondation (Loppin *et coll.*, 2005).

II.5.2. Mobilisation des nucléosomes par les facteurs de remodelage

Les nucléosomes sont des entités très stables dont la mobilité est très réduite. Les chapérons d'histones décrits dans la partie précédente favorisent la formation des nucléosomes *in vitro* et *in vivo*, mais les répartissent de manière aléatoire le long de la fibre de chromatine (voir Figure II.5.2). L'action de facteurs de remodelage permet d'établir un espacement constant des nucléosomes, car ils mobilisent les nucléosomes le long de la fibre de chromatine (Almouzni et Mechali, 1988). Lors de l'activation de la transcription, d'autres facteurs de remodelage désorganisent l'espacement des nucléosomes, exposant ainsi les séquences régulatrices aux protéines effectrices.

Cinq familles de facteurs de remodelage sont distinguées chez les organismes eucaryotes : Swi/Snf, Iswi, NURD/Mi2/CHD, Ino80 et SWR1. Tous les facteurs de remodelage possèdent une sous unité ATPase, qui constitue le moteur du complexe et la base de leur classification. Historiquement, les facteurs de remodelage ont été décrits comme capables de mobiliser les nucléosomes le long de la fibre de chromatine, mais leurs activités ont été étendues récemment à l'éviction d'histones de la fibre de chromatine, et au dépôt de variants d'histone (SWR1-C, voir partie II.4.3 H2A.Z).

~ La famille SWI/SNF

Les facteurs de la famille Swi/Snf désorganisent l'espacement régulier des nucléosomes au niveau des promoteurs des gènes (Boeger *et coll.*, 2003 ; Martens et Winston, 2003 ; Reinke et Horz, 2003). Les séquences d'ADN régulatrices sont ainsi accessibles aux facteurs d'initiation de la transcription. Après acétylation des histones du promoteur par les complexes HAT NuA4 et/ou SAGA, le complexe Swi/Snf est recruté par le bromodomaine de sa sous unité ATPase (Hassan *et coll.*, 2002). Certaines sous unités des complexes Swi/Snf contiennent plusieurs bromodomains et reconnaissent spécifiquement certains résidus acétylés (Kasten *et coll.*, 2004).

Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer comment l'action de SWI/SNF rend l'ADN accessible. Le glissement d'un nucléosome implique la rupture simultanée de quatorze liaisons ADN-histones. Le modèle actuel propose qu'un surplus d'ADN soit poussé à l'entrée du nucléosome. Ce bourrelet d'ADN serait glissé le long du nucléosome, de la même manière que l'on chasse un pli sur un vêtement. Ainsi la majorité des liaisons ADN-histones n'est pas rompue simultanément car le glissement de l'ADN le long du nucléosome implique la cassure transitoire d'un petit nombre de liaisons H (Zofall *et coll.*, 2006).

~ ***La famille ISWI***

La famille Iswi est définie par la sous unité ATPase du complexe ACF/CHARC (Loyola et Almouzni, 2004). Le complexe homologue chez l'homme, appelé RSF (*Remodeling and Spacing factor*), cumulerait les fonctions de chaperons d'histones et de facteur de remodelage, puisqu'il est capable à lui seul d'incorporer des nucléosomes de manière régulière lors de l'assemblage de la chromatine (Loyola *et coll.*, 2001). Le mécanisme d'action des complexes ISWI est globalement identique à celui de la famille SWI/SNF.

La sous unité ATPase du complexe Iswi contient également deux domaines de reconnaissance des histones, un domaine SANT et un domaine SLIDE, qui fixeraient respectivement les queues N terminales des histones et l'ADN qui sort du nucléosome (Grune *et coll.*, 2003).

~ ***La famille Mi2/NURD/CHD***

Le complexe NURD induit une répression forte de la transcription, médiée notamment par l'action des HDAC présentes au sein du complexe. La sous unité ATPase du complexe NURD contient également un chromodomaine, ce qui participerait à son ciblage vers les zones à réprimer. De plus, MBD3 a été identifiée comme membre des complexes NURD/Mi2 par plusieurs groupes, ce qui suggère un ciblage vers les régions méthylées. MBD2 pourrait également être intégrée à certains de ces complexes (Bowen *et coll.*, 2004).

~ ***Les complexes Ino80 et SWR1***

Le complexe Ino80, que certains classent dans la superfamille Swi/Snf, est impliqué dans la réparation des cassures doubles brins (Morrison *et coll.*, 2004 ; van Attikum *et coll.*, 2004). Nhp10 reconnaît γ H2A.X, et cible l'action du complexe au niveau de la cassure. Ino80 désassemblerait alors la chromatine afin de faciliter l'accès à l'extrémité de l'ADN lésé. (Li *et coll.*, 2005).

Le complexe SWR1 permet la déposition du variant H2A.Z, et régule ainsi l'initiation de la transcription. Il pourrait également jouer un rôle dans la réparation des cassures doubles brins, en remplaçant γ H2A.X par une version non phosphorylée (Cairns, 2004). Il serait également impliqué dans le remodelage général de la chromatine, associé à la réparation des cassures doubles brins (Downs *et coll.*, 2004).

II.6. L'intégration de signaux multiples crée l'épigénome

Cette deuxième partie a présentée les mécanismes impliqués dans le dépôt, le maintien et l'enlèvement de marques régulant le programme d'expression des gènes et la vie cellulaire. Naturellement, l'ensemble de ces processus sont entrelacés et s'autorégulent de manière intégrée. A titre d'exemple, le chaperon CAF1 est une véritable plateforme épigénétique. Ses partenaires ne sont pas les mêmes lors de la réplication de l'euchromatine et de l'hétérochromatine, et son interaction avec HP1, SETDB1 et MBD1 permettrait de transmettre l'identité épigénétique des séquences répétées. Citons également le dialogue complexe entre modifications post traductionnelles des histones (acétylation de H4 et H2A, méthylation d'H3K4), variants d'histone (départ d'H2A.Z et dépôt d'H3.3), chaperons d'histones (Asf1, CAF1, NAPI, FACT) et complexe de remodelage (Swi/Snf) lors de l'initiation de la transcription.

III. Quel épigénome est transmis par le gamète mâle?

La gamétogenèse est l'un des seuls événements de la vie cellulaire caractérisés par une reprogrammation intégrale de l'épigénome : le programme épigénétique des cellules germinales est complètement effacé et remplacé par un programme capable de créer tous les types cellulaires nécessaires à la construction d'un organisme.

Différenciés à outrance, les spermatozoïdes ne contiennent presque plus de cytoplasme, et sont réduits à un noyau très compact, un flagelle et une zone riche en mitochondries destinées à fournir l'énergie nécessaire à leur déplacement. Leur différenciation, appelée spermatogenèse, est caractérisée par une restructuration totale de la chromatine, conduisant à la structure nucléaire unique des spermatozoïdes.

III.1. Déroulement de la spermatogenèse des mammifères

III.1.1. Organisation générale du testicule adulte

Le testicule mature est entouré d'une gaine de tissu conjonctif appelé albuginée (voir Figure III.1.1 A). Des cloisons divisent le parenchyme testiculaire en plusieurs lobules, qui contiennent les tubes séminifères. Lieu de production des gamètes mâles, les tubes séminifères, ont une structure hélicoïdale, et leurs deux extrémités sont ouvertes dans le *rete testis*. Cette zone collecte l'ensemble des spermatozoïdes et les délivre à l'épididyme.

Le compartiment interstitiel est richement vascularisé, et contient des cellules de Leydig, des cellules mésenchymateuses, des macrophages, des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les cellules de Leydig produisent des hormones stéroïdes, et notamment les androgènes et la testostérone.

Les tubes séminifères contiennent les cellules germinales (voir ci-dessous), et des cellules somatiques dites « de Sertoli » (voir Figure III.1.1 B et C). Les cellules de Sertoli sont reliées entre elles par des jonctions spécialisées, qui établissent la barrière hémato-testiculaire. La méiose se réalise dans ce compartiment privilégié, protégé de l'influence des cellules du système immunitaire. Enfin, des cellules musculaires lisses, dites péritubulaires myoïdes, facilitent la circulation des spermatozoïdes dans les tubes séminifères par des contractions péristaltiques.

III.1.2. Déroulement de la spermatogenèse

La spermatogenèse se déroule en trois phases majeures. La phase pré-méiotique est caractérisée par la maturation des cellules germinales souches. La méiose permet le brassage du patrimoine génétique et sa répartition en quatre cellules haploïdes. Enfin, la différenciation terminale des spermatozoïdes a lieu lors de la spermiogénèse (voir Figure III.1.2).

~ *La phase pré-méiotique*

Les cellules germinales souches, appelées spermatogonies, sont localisées à proximité de l'épithélium séminifère. Les spermatogonies de type A prolifèrent par mitose afin d'assurer leur renouvellement, et certaines se différencient en spermatogonies de type B. Les spermatogonies de type B sont caractérisées par plusieurs nucléoles et une forte activité transcriptionnelle, permettant de synthétiser les protéines nécessaires à l'étape suivante. Elles sont les dernières à se diviser par

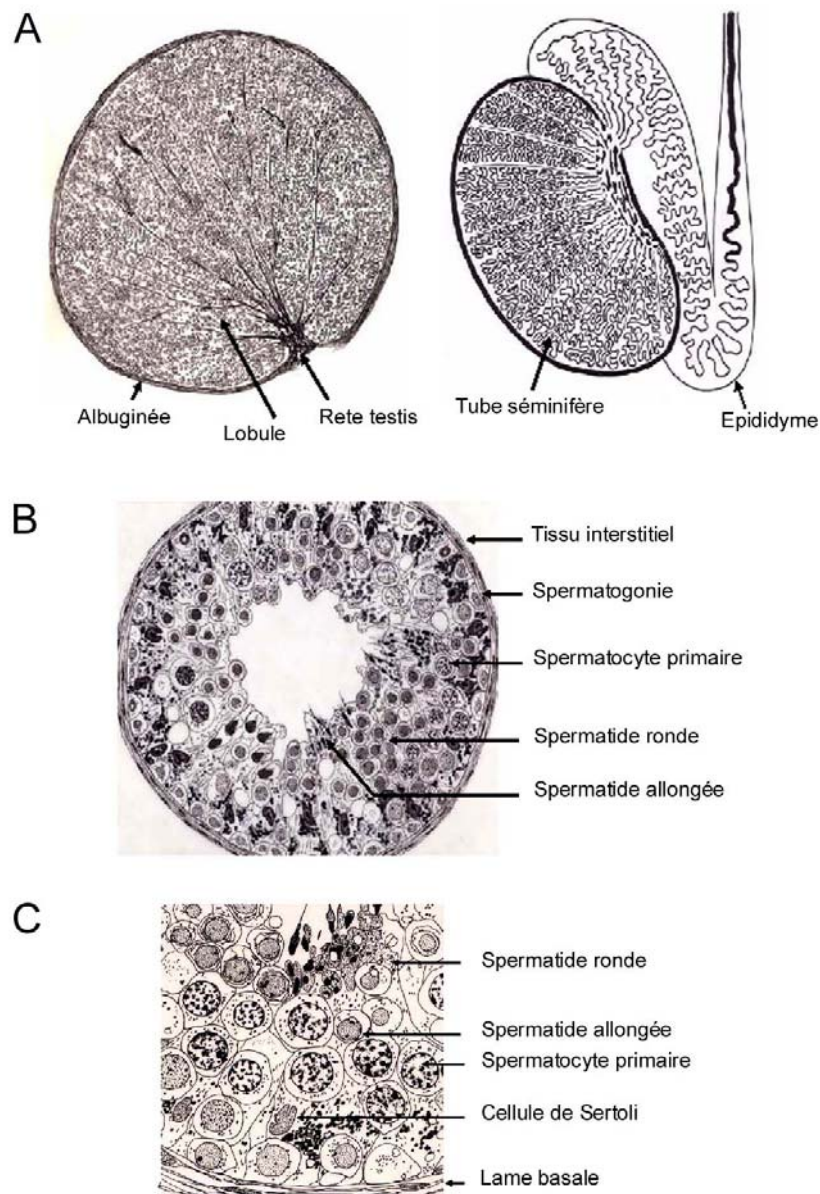


Figure III.1.1 **Organisation du testicule adulte**

(A) Coupe transversale d'un testicule humain. Dessin d'une coupe en paraffine x2,5.

(B) Organisation des tubes séminifères dans le testicule humain. Dessin semi-schématique.

(C) Portion de l'épithélium séminifère dans un tube séminifère. Dessin sur la base d'une coupe semi-fine x900.

mitose. Cette division produit les premières cellules de la seconde phase –la méiose– qui migrent vers le lumière du tube.

~ *La méiose*

La méiose est une succession de deux divisions particulières produisant quatre cellules haploïdes à partir d'une cellule diploïde. Ce processus est très délicat car 35 à 40% des spermatocytes engagés dans la méiose meurent chez des jeunes hommes.

Les cellules germinales franchissant cette étape sont appelées spermatocytes. La prophase de la première division méiotique (prophase I) est très longue, et est subdivisée en 5 étapes successives : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse. La duplication de l'ADN a lieu au tout début du stade leptotène, appelé préleptotène. Les chromosomes se condensent durant le stade leptotène, et les éléments latéraux des complexes synaptonémaux sont assemblés. Les chromosomes homologues s'apparient lors du stade zygotène grâce à l'assemblage des éléments centraux des complexes synaptonémaux. Lors du stade pachytène, la recombinaison homologue brasse l'information génétique entre les chromosomes d'une même paire. De plus, transcription et traduction augmentent lors de ce stade pour préparer l'étape suivante. Les complexes synaptonémaux se rompent lors du stade diplotène, ce qui sépare les chromosomes homologues. L'enveloppe nucléaire disparaît pendant la diacinèse. Après s'être alignés sur la plaque métaphasique, les deux chromosomes homologues de chaque paire sont séparés et migrent vers un pôle différent durant l'anaphase I. La télophase sépare complètement les chromosomes et produit les spermatocytes secondaires. Cette première division est dite réductionnelle car elle divise le stock chromosomique par deux en produisant des cellules haploïdes.

Les spermatocytes secondaires traversent une interphase très courte, sans répliquer leur ADN. La deuxième division, dite équationnelle car le stock génétique est conservé, se déroule comme une mitose conventionnelle, avec séparation des chromatides sœurs de chaque chromosome. Cette dernière division donne naissance aux spermatides.

La recombinaison entre les chromosomes sexuels est contrôlée afin de préserver l'intégrité des gènes impliqués dans le déterminisme du sexe. Chez la femelle, les deux chromosomes X se comportent comme des autosomes lors de l'ovogenèse. En effet, les gènes déterminant le sexe sont situés sur une région spécifique du chromosome Y. Chez le mâle, les régions homologues des chromosomes X et Y, appelées régions pseudo-autosomales, s'apparient localement, se

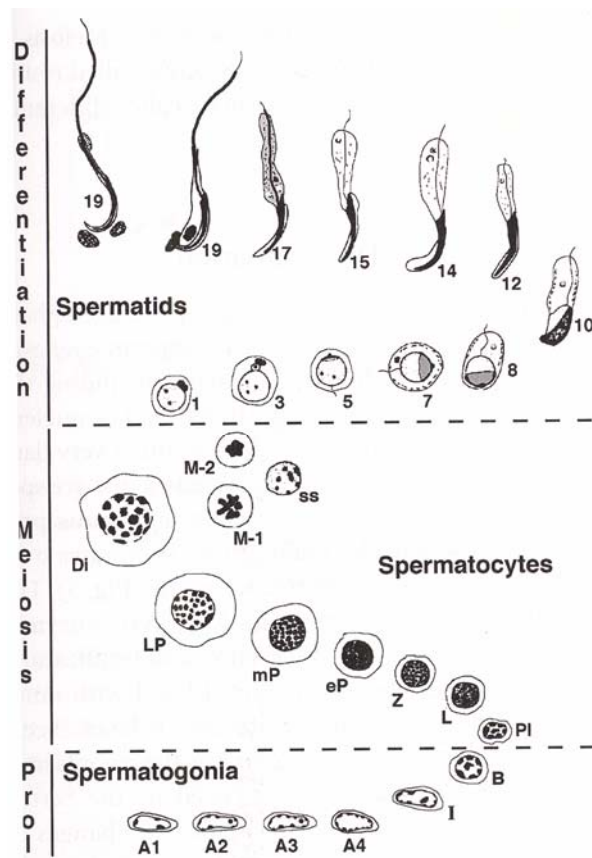


Figure III.1.2 Déroulement de la spermatogénèse

La spermatogénèse se déroule de bas en haut. Les spermatogonies (A1 à A4, et B) se divisent par mitose lors de la phase de prolifération (Prol). La méiose est la période la plus longue et est composée des stades préleptotène (PI), leptotène (L), zygotène (Z), pachythène (eP, mP et LP). La première division méiotique (M1) a lieu au stade diplotène, et donne naissance aux spermatocytes secondaires. La deuxième division méiotique (M2) produit les spermatides haploïdes. La différenciation des spermatides rondes passe par 7 stades, avant de se différencier en spermatides allongées (stade 8), condensées, et finalement en spermatozoïdes.

recombinent, et assurent la bonne ségrégation des chromosomes sexuels lors de l'anaphase I. Toutefois, les zones non homologues sont protégées de toute recombinaison par une structure particulière, très compacte, appelée vésicule sexuelle.

~ *La spermiogénèse*

Cette phase de différenciation terminale est caractérisée par trois transformations majeures :

(i) le noyau des spermatides s'allonge, et la chromatine se condense en une structure très compacte (voir Introduction, III.2).

(ii) l'appareil de Golgi se différencie en granules à fonction semblable à celle des lysosomes. Ces granules fusionnent à côté du noyau et donnent naissance à l'acrosome. Le système acrosomal contiendra notamment l'ensemble des enzymes hydrolytiques nécessaires à la fécondation.

(iii) un flagelle se développe. Sa région proximale, appelée manchette, contient un grand nombre de mitochondries qui produiront l'énergie nécessaire à la mobilisation du flagelle et au déplacement des spermatozoïdes. La maturation du flagelle est accompagnée d'une élimination de l'excès de cytoplasme, évacué sous forme de corps résiduels.

La différenciation des spermatides est séparée en trois phases, regroupant au total 16 étapes de différenciation chez la souris. La première phase regroupe les spermatides rondes de type 1 à 7, caractérisée par une chromatine homogène, un développement progressif de l'acrosome et une activité transcriptionnelle modérée. Dans un deuxième temps, le noyau des spermatides en allongement (type 8 à 11) s'allonge, et la transcription stoppe lorsque leur chromatine commence à se condenser. Enfin la différenciation des spermatides condensées (type 12 à 16) produit les spermatozoïdes. Leur noyau finit de s'allonger, l'acrosome connaît sa maturation terminale, le flagelle termine sa croissance et la chromatine est structurée sous sa forme la plus compacte.

~ *La maturation finale des spermatozoïdes au sein de l'épididyme*

Les expériences de fécondation *in vitro* ont démontré que le pouvoir fécondant des spermatozoïdes est supérieur après être passé dans l'épididyme. De nouvelles protéines sont enchâssées à la surface du spermatozoïde et potentialisent sa progression à travers la glaire cervicale, son interaction avec la zone pellucide de l'œuf. Enfin, la chromatine termine sa structuration. L'épididyme joue également un rôle de stockage des spermatozoïdes matures : l'éjaculat peut ainsi contenir un nombre de spermatozoïdes supérieur à la production journalière.

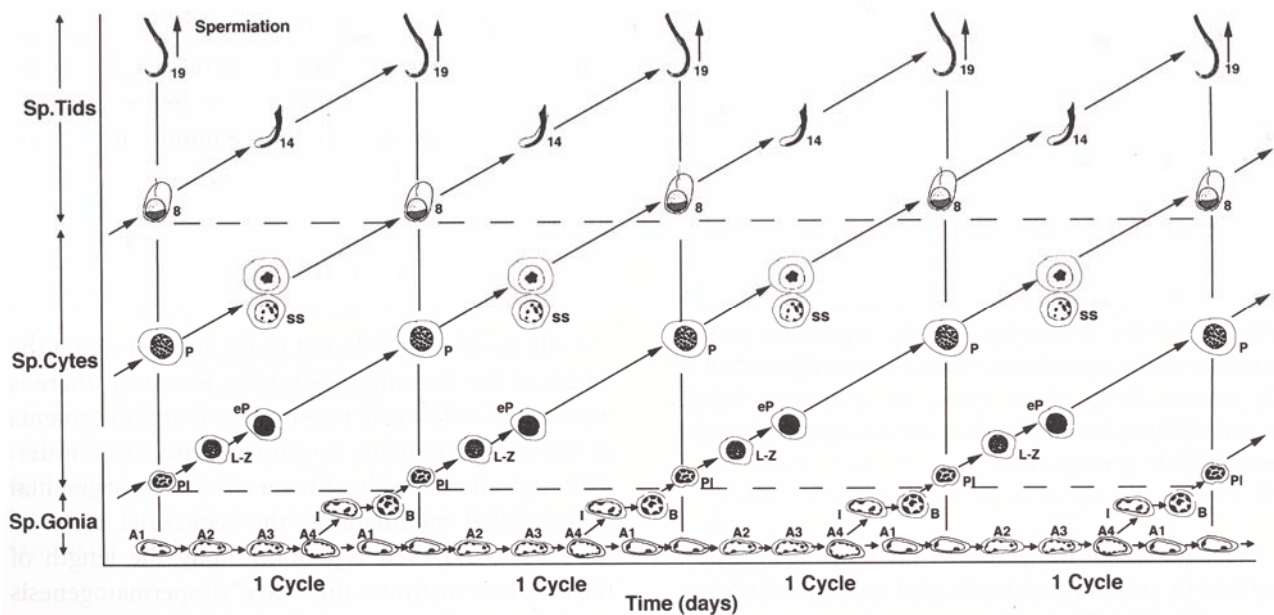


Figure III.1.3 Les cycles de la spermatogénèse

La répétition des cycles de la spermatogénèse est représentée de manière schématique. Chaque cycle est représenté en oblique vers le haut à droite. A un temps déterminé (axe des abscisses), plusieurs stades coexistent car l'intervalle entre chaque vague de spermatogénèse est inférieur à la durée totale de la spermatogénèse. Les phases du cycle sont détaillées figure III.1.2.

III.1.3. Les cycles de la spermatogenèse

La différenciation des cellules germinales est synchronisée (voir Figure III.1.3) : les spermatogonies entrent dans le processus de différenciation par groupes, qui se différencieront au même rythme. Chez la souris, une nouvelle vague de différenciation est lancée tous les 8,8 jours. La spermatogenèse dure en moyenne 35 jours, et 3 à 4 groupes de cellules sont observés sur une coupe transversale de tube séminifère. Chaque groupe de cellules est à la même étape de différenciation, et l'étude histologique de coupes transversales de tubes séminifères a permis découper la spermatogenèse en 16 stades chez la souris. Ainsi, un stade est défini par l'association de trois ou quatre groupes de cellules à différentes étapes du processus de différenciation. Par exemple, le stade V est caractérisé par la présence de spermatogonies de type B, de spermatocytes pachytène, de spermatides rondes de type 5 et de spermatides condensées de type 15. Pour des raisons de clarté, les types de spermatides sont annotés en chiffre arabe et le stade d'une zone d'un tube est noté en chiffre romain. Enfin, les stades ont été définis sur des bases histologiques et leur représentation au sein d'un tube séminifère est directement proportionnelle à leur durée (de 0,3 à 2,7 jours chez la souris).

La migration des cellules germinales en différenciation est limitée à une migration centripète. Aucune migration latérale n'est observée, mais la synchronisation précédemment décrite est à l'origine d'une organisation particulière. Chaque tube séminifère a la même organisation : le stade I est situé à côté d'un stade II, suivi d'un stade III, et ce jusqu'au stade XVI (chez la souris), lui-même suivi d'un stade I.

III.2. Remodelage de la chromatine lors de la spermatogenèse

III.2.1. Mise en place de la structure chromatinienne spermatique finale

Les cellules germinales subissent une réorganisation de l'intégralité de leur chromatine durant la spermiogénèse, aboutissant à un noyau dont le volume représente 5% du volume moyen d'un noyau somatique (Wyrobek *et coll.*, 1976). Plus de 95% des histones sont extraites chez la souris (85% chez l'homme) et remplacées par des protéines de transition, elles-mêmes remplacées par les protamines, qui constituent le composant majoritaire de la chromatine dans les spermatozoïdes (voir Figure III.2.1 et Caron *et coll.*, 2005).

~ *Les protéines de transition*

Les protéines de transition (TP) constituent 90% des protéines de la chromatine dans les spermatides de type 12-13, stade auquel les histones sont extraites et dégradées, alors que les protamines ne sont pas encore incorporées (Meistrich *et coll.*, 2003). Quatre protéines de transition sont décrites chez les mammifères, appelées TP1, TP2, TP3 et TP4. TP1 et TP2 représentent à elles seules respectivement 50% et 40% des protéines nucléaires des spermatides (Meistrich *et coll.*, 2003). TP1 est une petite protéine basique de 54 acides aminés, riche en arginines, en lysines et en sérines. Elle a été bien conservée au cours de l'évolution, notamment la région 29-42 contenant une tyrosine qui pourrait stabiliser la structure chromatinienne (Singh et Rao, 1987). Deux fois plus grande que TP1, TP2 contient deux domaines à doigts de zinc putatifs, et sa région carboxyterminale est enrichie en résidus basiques (Kimmins et Sassone-Corsi, 2005). TP2 a été moins bien conservée que TP1 au cours de l'évolution.

Les souris homozygotes invalidées pour TP1 ou TP2 sont fertiles, et n'ont pas révélé de phénotype radical lors de l'étude histologique de leur testicule (Yu *et coll.*, 2000 ; Adham *et coll.*, 2001 ; Zhao *et coll.*, 2001). Dans les deux cas d'invalidation, la chromatine des spermatozoïdes est moins condensée, bien que la déposition des protamines n'ait pas l'air affectée. Cependant, la fertilité des souris TP1^{-/-} est diminuée de moitié, et les portées des souris TP2^{-/-} sont plus petites. De plus, la maturation de la protamine 2 est affectée si TP1 ou TP2 ne sont pas présentes.

L'obtention de lignées de souris invalidées pour TP1 et TP2 a permis de compenser un effet redondant des deux protéines (Shirley *et coll.*, 2004 ; Zhao *et coll.*, 2004). Aucun mâle TP1^{-/-} TP2^{-/-} n'est fertile, et les spermatozoïdes ne sont pas féconds *in vitro*. Un tiers de spermatides condensées ont des malformations (tête, implantation et structuration du flagelle). Les spermatides matures sont retenues dans le testicule et peu de spermatozoïdes sont retrouvés au sein des épидидymes. En outre, plus de 80% des spermatozoïdes présents au sein de l'épididyme sont morts, et peu sont mobiles parmi les 20% restants. L'ensemble des analyses menées suggère un rôle de TP1 et/ou TP2 dans la condensation de la chromatine, la réparation des cassures de l'ADN et la maturation des protamines.

~ *Les protamines*

Les protamines sont de petites protéines basiques. La plupart des mammifères possède une seule protamine de 50 acides aminés, appelée Prm1. Prm1 est constituée de trois domaines structuraux

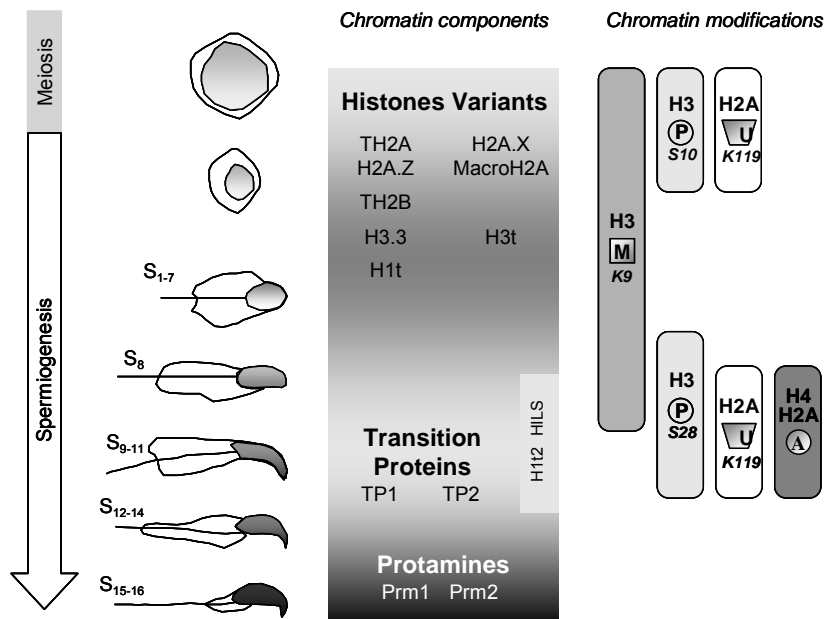


Figure III.2.1 Composants de la chromatine au cours de la spermatogénèse

Les composants majeurs de la chromatine et leurs modifications post traductionnelles sont présentés. Les variants d'histone sont incorporés à la chromatine au cours de la méiose, à l'exception d'HILS et H1t2. Les protéines de transition et les protamines remplacent les histones dans les stades finaux de différenciation. La distribution temporelle des modifications post traductionnelles majoritaires des histones est présentée (A, acétylation ; U, ubiquitination ; M, méthylation ; P, phosphorylation).

différents. La zone amino terminale (acides aminés 1 à 12) est caractérisée par un motif ARYRCC très conservé au sein de tous les mammifères. De plus, un résidu phosphorylable est conservé en position 8, ainsi que deux sérines en position 10 et 12. Une région centrale (13 à 27) est très enrichie en arginines, et lie probablement l'ADN (Fita *et coll.*, 1983). La région C terminale a été moins conservée au cours de l'évolution. Certains mammifères, dont la souris et l'homme, possèdent une deuxième protamine, Prm2. Prm2 est constituée de quelques acides aminés de plus que Prm1, et contient de nombreuses histidines. La protamine 2 est synthétisée sous forme de précurseur de 106 acides aminés, et six clivages successifs produisent la forme mature de Prm2 de 63 acides aminés (Yelick *et coll.*, 1987 ; Domenjoud *et coll.*, 1988 ; Debarle *et coll.*, 1995).

Des études phylogénétiques suggèrent que les protamines dérivent des histones de liaison (Oliva et Dixon, 1991 ; Lewis *et coll.*, 2004). Les histones de liaison sont enrichies en lysine alors que les protamines sont très riches en arginine. Les arginines des protamines pourrait faciliter leur liaison à l'ADN car les liaisons hydrogènes entre ADN et protéines basiques seraient plus favorable avec les deux groupements amines des arginines qu'avec celui des lysines (Pogany *et coll.*, 1981).

De manière très élégante, Lewis *et al* suggèrent que la délétion d'un seul nucléotide aurait permis de remplacer des lysines par des arginines (Lewis *et coll.*, 2004). Les spermatozoïdes de l'organisme protochordé *Ciona intestinalis* contiennent une seule protéine nucléaire basique majoritaire, proche des histones de liaison et riche en lysines. En revanche, deux protéines nucléaires basiques sont présentes dans les spermatozoïdes d'organismes chordés primitifs tels que *Styela montereyensis* et *Styela plicata* : l'une est une protamine riche en arginine, et l'autre est une histone de liaison dont la queue carboxy-terminale est riche en arginine. Les lysines des histones de liaison sont majoritairement codées par le codon AAG plutôt que le codon AAA, aussi bien chez *Ciona intestinalis*, chez l'oursin ou chez l'homme, dans une proportion de 5 pour 1. Ainsi, la délétion d'un nucléotide unique entraîne un décalage du cadre de lecture, et convertit un stretch de lysine codé par ...AAG AAG AAG AA... en un stretch d'arginine codé par AGA AGA AGA.

Enfin, Prm1 et Prm2 sont des protéines essentielles, car l'inactivation Prm1 ou Prm2 rend les souris hétérozygotes stériles, et empêche également la transmission de l'allèle sauvage (Cho *et coll.*, 2001). L'inactivation d'un allèle de Prm entrave la maturation des formes précurseurs de Prm2, dont une forme mature est essentielle à la compaction de la chromatine et au maintien de l'intégrité de la chromatine au sein du spermatozoïde (Cho *et coll.*, 2001).

Les acides aminés basiques des protamines neutraliseraient les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN, conduisant à une structure très compacte. La structure des noyaux spermatiques de poisson est si organisée qu'elle est quasi cristalline et diffracte aux rayons X (Risley, 1990). La chromatine des spermatozoïdes de mammifères est organisée de manière moins régulière (Balhorn, 1982), et différents modèles contradictoires tentent d'expliquer le rôle structural des protamines (Balhorn, 1982 ; Fita *et coll.*, 1983 ; Raukas et Mikelsaar, 1999).

III.2.2. Les variants d'histone

Tous les variants exprimés dans les cellules somatiques ont été détectés (ARN ou protéine) lors de la spermatogenèse. De plus, de nombreux variants d'histone sont exprimés spécifiquement lors de la spermatogenèse (voir Figure III.2.2. Pour revue Govin *et coll.*, 2004).

~ Les variants des histones de liaison

Le sous type H1.1 est prédominant dans les spermatogonies, mais son taux baisse lors des divisions mitotiques de la spermatocytogenèse et de la méiose (Meistrich *et coll.*, 1985 ; Franke *et coll.*, 1998). Les souris invalidées pour le gène H1.1 ne présentent pas de phénotype particulier, ni au niveau du déroulement de la spermatogenèse, ni au niveau de leur fertilité et de la morphologie des testicules (Rabini *et coll.*, 2000).

Le variant spécifique du testicule H1T présente une séquence primaire très divergente des isoformes H1.1 à H1.5, mais adopte la structure classique des histones de liaison en trois domaines dont un domaine globulaire central. Son profil d'expression a été caractérisé chez la souris (Drabent *et coll.*, 1996) et le rat (Grimes *et coll.*, 1990). L'ARN est détecté par hybridation *in situ* dans les spermatocytes pachytènes, et la protéine est détectée du stade spermatocyte pachytène aux spermatides allongées, stade auquel H1T représente 55% des histones de liaison totales (Drabent *et coll.*, 1996 ; Steger *et coll.*, 1998). La chromatine contenant H1T aurait une structure plus lâche qu'avec les autres histones de liaison (De Lucia *et coll.*, 1994 ; Khadake et Rao, 1995) : ceci pourrait faciliter les crossing overs lors de la méiose, et augmenter l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de remodelage. L'invalidation de ce gène n'a pas de conséquence phénotypique (Drabent *et coll.*, 2000 ; Lin *et coll.*, 2000 ; Fantz *et coll.*, 2001), mais son absence serait compensée par les autres histones de liaison, notamment H1.1 (Lin *et coll.*, 2004). Si H1.1 et H1T sont invalidées, le rapport entre histone de cœur et histones de liaison baisse de 25%, sans affecter le déroulement de la spermatogenèse (Lin *et coll.*, 2004). Ceci témoigne de la tolérance de la

```

H31 ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLPFORLVREIAQDFKT
H33 ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLPFORLVREIAQDFKT
H3t ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLPFORLVREIAQDFKT

H31 DLRFQSSAVMALQEAQEAAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA
H33 DLRFQSSAIGALQEAQEAAYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA
H3t DLRFQSSAVMALQEAQESYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA

H2A SGRGKQGGKARAKAKSRSFRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYAERVGAGAPVYLAAVLEYLTAEILELAGNAARDNKKTRIIP
TH2A SGRAKQGGKARAKAKSRSFRAGLQFPVGRVHRLLRQGNYAERIGAGAPVYLAAVLEYLTAEILELAGNAARDNKKTRIIP

H2A RHLQLAIRNDEELNKLGRVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTESHHKAKGK
TH2A RHLQLAIRNDEELNKLGRVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTESHHKSQTK

H2B PEF.AKSAPAPKKGSKKAVTKAOKKDCRKRKRKRKESYSVVYKVLKQVHPDTGISSKAMCIMNSFVNDIFERIASEASR
TH2B PEVAVKGAATISKKGFKKAVTKTQKKRKRKRKRKESYSIYIYKVLKQVHPDTGISSKAMSIMNSFVNDIFERIASEASR
htSH2B PEVSSKGAATISKKGFKKAVVKTQKKRKRKRKRKESYSIYIYKVLKQVHPDTGISSKAMSIMNSFVNDIFERIASEASR

H2B LAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGE LAKHAVSECTKAVTKYTSSK
TH2B LAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGE LAKHAVSECTKAVTKYTSSK
htSH2B LAHYSKRSTITSREIQTAVRLLLPGE LAKHAVSECTKAVTKYTSSK

```

Figure III.2 Alignements de principaux variants d'histone spécifiques du testicule

Les acides aminés identiques, similaires et différents sont représentés respectivement en blanc sur fond noir, noir (gras) sur fond gris et noir sur fond blanc.

réorganisation de la chromatine face à une baisse de la stœchiométrie histones de liaison/histones de cœur.

Le variant HILS1 (H1 like protein in spermatid 1) a été décrit chez la souris et chez l'homme ((Iguchi *et coll.*, 2003 ; Yan *et coll.*, 2003). Ce variant est détecté dans des stades plus tardifs que H1T, à savoir dans les spermatides allongées et condensées, suggérant un rôle dans les dernières étapes de la réorganisation de la chromatine.

Enfin, H1T2 est le variant d'histone de liaison spécifique du testicule découvert le plus récemment (Martianov *et coll.*, 2005 ; Tanaka *et coll.*, 2005). H1T2 contient un domaine globulaire potentiel, un motif liant l'ATP, et un domaine de phosphorylation putatif par la protéine kinase C, formé d'une répétition d'arginine et de sérine (Tanaka *et coll.*, 2005). De plus ce variant est capable d'interagir avec l'ADN et la protamine 1. Enfin, H1T2 a une distribution nucléaire très spécifique, juste sous l'acrosome. Les souris mâles, dont le gène *H1t2* a été invalidé, sont stériles, probablement à cause de problèmes de restructuration du noyau. Les spermatides présentent un retard de condensation de la chromatine, un allongement aberrant, un détachement de l'acrosome et une fragmentation de l'ADN (Martianov *et coll.*, 2005). De plus, le taux de protamines détectées est inférieur à celui présent dans les souris sauvages (Tanaka *et coll.*, 2005).

~ *Les variants d'H2A*

Un seul variant testiculaire d'H2A, TH2A, est connu. Huit acides aminés situés dans le fold histone et les zones N et C terminales différencient H2A et TH2A. TH2A est synthétisé activement et incorporé à la chromatine lors de la méiose, dans les spermatocytes au stade pachytène (Rao *et coll.*, 1983 ; Meistrich *et coll.*, 1985). Une étude quantitative indique que TH2A constituerait 60% des histones de la famille H2A à ce stade de différenciation (Rao *et coll.*, 1983).

Les variants d'histone somatiques d'H2A ont été étudiés plus en détail au cours de la spermatogenèse. H2A.X est essentiel au bon déroulement de la spermatogenèse car son invalidation conduit à une stérilité masculine (Celeste *et coll.*, 2002). L'alignement des chromosomes habituellement observé lors de leur synapse n'est pas observé, et des mésappariements graves entre chromosomes sexuels et autosomes ont lieu. Enfin, les foyers de sites de recombinaisons ne sont pas détectés, ce qui est à mettre en relation avec le rôle d'H2A.X dans la réparation des cassures double brins. L'ensemble de ces problèmes conduit les spermatocytes en apoptose au milieu du stade pachytène.

L'isoforme macroH2A1.2 est enrichie dans les testicules de souris (Pehrson *et coll.*, 1997 ; Rasmussen *et coll.*, 1999). MacroH2A est incorporé dans la vésicule sexuelle au début du stade pachytène (HoyerFender *et coll.*, 2000a ; Turner *et coll.*, 2001). En effet, la formation de la vésicule sexuelle XY a des similitudes avec le processus d'inactivation du chromosome X au sein des cellules somatiques femelles (Heard, 2004 ; Heard, 2005). Cependant, le rôle précis de macroH2A au cours de la méiose n'est pas clair. Son rôle fonctionnel pourrait impliquer HP1, qui est également enrichie sur les régions pseudo-autosomales de la vésicule sexuelle (Turner *et coll.*, 2001).

Enfin, H2A.Z est synthétisé au cours de la méiose, et est incorporé à la chromatine dans les spermatocytes pachytène et les spermatides rondes. Lors de la spermiogénèse, H2A.Z est enrichi dans les chromosomes sexuels, où il remplacerait macroH2A. H2A.Z maintiendrait notamment ces chromosomes dans un état d'hétérochromatine facultative (Greaves *et coll.*, 2006).

~ *Les variants d'H2B*

Un variant d'H2B, TH2B, est exprimé de manière spécifique du testicule. TH2B est très conservé entre la souris, le rat et l'homme (Hwang et Chae, 1989 ; Choi *et coll.*, 1996 ; Zalensky *et coll.*, 2002). La plupart des différences avec H2B sont localisées dans la queue N terminale et dans une moindre mesure au sein du fold histone. TH2B est exprimé activement dans les spermatocytes pachytène (Meistrich *et coll.*, 1985) et constitue la forme prédominante d'H2B dans les spermatides rondes et en allongement. Un anticorps cross-réagit avec TH2B et a permis sa localisation au cours de la spermatogénèse humaine. Il est exprimé dans les spermatogonies, et son taux augmente dans les spermatides rondes avant de disparaître lors de l'allongement des spermatides (van Roijen *et coll.*, 1998). Une partie de TH2B serait néanmoins conservée dans les spermatozoïdes humains (Zalensky *et coll.*, 2002).

Enfin une fonction non chromatinienne des variants d'H2B a été proposée. Des histones de cœur ont été localisées sur la thèque périnucléaire des spermatozoïdes, membrane entourant le noyau spermatique (Tovich et Oko, 2003). Un variant d'H2B, nommé SubH2Bv, serait associé à cette thèque chez les bovins, mais le rôle fonctionnel de cette association n'est pas connu (Aul et Oko, 2001).

~ *Les variants d'H3*

Un variant d'H3 spécifique du testicule, nommé H3t a été isolé en 1996 chez l'homme (Albig *et coll.*, 1996 ; Witt *et coll.*, 1996). H3t diffère seulement de H3.1 par 4 acides aminés (voir Figure

III.2.2). L'ARN de ce variant est détecté seulement dans les spermatocytes primaires. Une approche biochimique a permis l'identification d'un autre variant chez la rat, appelé TH3 (Trostle-Weige *et coll.*, 1984), mais aucun gène correspondant n'a été retrouvé au sein des génomes mammifères (Witt *et coll.*, 1996).

Les variants non spécifiques du testicule sont également impliqués dans la spermatogenèse. Aucune donnée n'atteste aujourd'hui avec certitude la présence de la protéine CENP-A au cours de la spermatogenèse, mais l'utilisation d'un anticorps autoimmun reconnaissant plusieurs protéines centromériques, dont CENP-A, a permis leur détection par microscopie électronique au cours de la spermatogenèse (Courtens *et coll.*, 1992). Ainsi, CENP-A structurerait les centromères lors de la spermatogenèse et serait impliqué dans la bonne ségrégation des chromosomes au cours de la méiose. De plus, CENP-A a été détectée dans les spermatozoïdes bovins (Palmer *et coll.*, 1990), suggérant que ce variant soit transmis lors de la fécondation (voir Introduction III.3).

Les deux gènes codant H3.3, *H3.3A* et *H3.3B*, sont exprimés lors de la spermatogenèse chez la souris (Albig *et coll.*, 1995 ; Bramlage *et coll.*, 1997). L'ARNm de *H3.3A* est détecté avant et après la méiose, tandis que celui d'*H3.3B* est exprimé spécifiquement lors de la prophase (Bramlage *et coll.*, 1997). *H3.3A* a été invalidé lors d'une approche de mutation par insertion : l'ARN est bien exprimé lors de la méiose, et l'invalidation chez des souris homozygotes cause une létalité néonatale, et chez les survivants, un retard de croissance, des déficiences neuromusculaires et une baisse de la fertilité des mâles (Couldrey *et coll.*, 1999). L'analyse des testicules, épидидymes et éjaculats n'a pas mis en évidence de différence significative, suggérant une altération de l'épigénome transmis par les spermatozoïdes.

Enfin Akhmanova et al (Akhmanova *et coll.*, 1997) ont montré que H3.3 est incorporé à la chromatine lors de la prophase I chez la drosophile ; il se concentre alors au sein de régions chromatiniennes spécifiques, et disparaît en même temps que les autres histones lors de l'allongement des spermatides. Comme il l'a été discuté en II.4.4, les régions transcriptionnellement actives sont enrichies en H3.3 (Ahmad et Henikoff, 2002 ; McKittrick *et coll.*, 2004 ; Chow *et coll.*, 2005). L'incorporation d'H3.3 lors de la méiose et sa présence au début de la spermatogenèse sont probablement liées à la transcription très active détectée à ces stades (Lewis *et coll.*, 2003).

III.2.3. Une abondance de modifications post traductionnelles

De nombreuses modifications post traductionnelles affectent les histones, mais également les protéines de transition et les protamines.

~ Acétylation des histones

L'acétylation des histones au cours de la spermatogenèse a été décrite dans de nombreuses espèces, dont la truite (Candido et Dixon, 1972), le rat (Grimes *et coll.*, 1975) et le hamster (Oliva et Mezquita, 1982). L'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement l'acétylation de certains résidus a permis une caractérisation précise du profil d'acétylation des histones lors de la spermatogenèse murine (Hazzouri *et coll.*, 2000 ; Khalil *et coll.*, 2004). H2A, H2B et H4 sont acétylées dans les spermatogonies et les spermatocytes au stade préleptotène, mais les histones sont globalement déacétylées lors de la méiose et dans les spermatides rondes (Meistrich *et coll.*, 1992 ; Hazzouri *et coll.*, 2000). Une acétylation d'H3 et H4 a lieu lors de leur incorporation à la chromatine dans un contexte réplicatif (Verreault, 2000), et peut expliquer le signal obtenu lors de la spermatocytogenèse et du début de la méiose. Cependant, ces études montrent également une hyperacétylation d'H4 dans un contexte totalement indépendant de la réplication (Hazzouri *et coll.*, 2000 ; Marcon et Boissonneault, 2004). La dégradation générale des HDAC de classe I serait responsable de cette vague d'acétylation, déséquilibrant la dynamique d'acétylation des histones et renforçant l'action des HAT (Caron *et coll.*, 2003). L'acétylation d'H4 est détectée dans l'intégralité du noyau des spermatides au début de leur allongement, et disparaît suivant un axe antéro-postérieur lors de la condensation des spermatides (Hazzouri *et coll.*, 2000).

L'acétylation des histones lors de la spermiogenèse est probablement liée à leur remplacement. En effet, les histones ne sont pas hyperacétylées dans les espèces où elles ne sont pas remplacées, telles que le flet et la carpe (Kennedy et Davies, 1980 ; Kennedy et Davies, 1981). Cependant, le rôle de l'acétylation des histones reste mal connu. Quelques expériences *in vitro* suggèrent que l'acétylation des histones faciliteraient leur remplacement par les protamines, mais aucune donnée *in vivo* ne supporte actuellement cette hypothèse. L'identification récente d'un facteur capable de condenser la chromatine acétylée suggère que l'acétylation des histones pourrait être l'un des premiers signaux à l'origine de la compaction de la chromatine (voir Introduction III.2.4 et Pivot-Pajot *et coll.*, 2003 ; Govin *et coll.*, 2006).

~ **Méthylation des histones**

Suv39h1 et Suv39h2 sont responsables de la méthylation spécifique de H3K9, marque forte de l'hétérochromatine. Suv39h2 est surexprimée dans le testicule (O'Carroll *et coll.*, 2000), et colocalise avec les régions hétérochromatiques, notamment la vésicule sexuelle, au cours de la méiose et au début de la spermiogenèse. De plus, une invalidation de *Suv39h1* et *Suv39h2* conduit à une instabilité chromosomique et un mésappariement des chromosomes lors de la diacinese, induisant les spermatocytes en apoptose (Peters *et coll.*, 2001). Une étude récente a analysé le profil de mono, di et triméthylation d'H3K9, H3K27 et H4K20 (Payne et Braun, 2006). Toutes ces modifications ont été détectées au cours de la méiose, mais seuls H3K9me3 et H4K20me3 persistent lors de la spermiogenèse, avant de disparaître lors de l'allongement des spermatides.

~ **Ubiquitination des histones**

L'ubiquitination des histones touche principalement H2A et H2B (Jason *et coll.*, 2002), et a été décrite au cours de la spermatogenèse dans de nombreuses espèces, incluant le rat, la souris, la truite et le hamster (Jason *et coll.*, 2002). Une forte proportion d'H2Aub est détectée au sein de la vésicule sexuelle des spermatocytes, ce qui rappelle fortement le mécanisme d'inactivation du chromosome X chez les mammifères femelles (de Napoles *et coll.*, 2004 ; Fang *et coll.*, 2004). H2Aub n'est plus détectée au sein des spermatides rondes, mais réapparaît lors de leur condensation (Baarends *et coll.*, 1999). De plus, H2A, H2A.Z, H2B, H3 et TH3 sont détectés sous une forme mono et polyubiquitinée dans les spermatides allongées de rat (Chen *et coll.*, 1998 ; Baarends *et coll.*, 1999).

HR6, enzyme catalysant l'ubiquitination d'H2B *in vivo*, est enrichie dans le testicule (Sung *et coll.*, 1988). L'invalidation du gène codant HR6 conduit un arrêt de la spermiogenèse au tout début de l'allongement des spermatides, soulignant le rôle essentiel de l'ubiquitination des histones lors de la spermatogenèse (Sung *et coll.*, 1988).

~ **Phosphorylation des histones**

Les sérines 10 et 28 d'H3, très conservées au sein de la famille H3, sont phosphorylées au cours de la condensation des chromosomes mitotiques. La phosphorylation d'H3S10 est retrouvée au cours de la méiose, et est probablement associée au même processus de condensation (Prigent et Dimitrov, 2003). Bien que des rôles fonctionnels dans la transcription et l'apoptose aient été attribués à la phosphorylation de certains sites d'H2A (Zhang *et coll.*, 2004) et d'H2B (Cheung *et*

coll., 2003), peu de données expliquent le rôle fonctionnel de phosphorylations de ces histones au cours de la spermatogénèse.

La phosphorylation d'H2A.X est associée à la réparation des cassures doubles brins de l'ADN. En effet, la sérine 139 d'H2A.X est une cible des PI3 kinases, comprenant DNA-PK (Park *et coll.*, 2003), ATM (ataxia telangiectasia mutated) (Burma *et coll.*, 2001) et ATR (Shroff *et coll.*, 2004) au sein des cellules somatiques. L'inactivation d'H2A.X (Celeste *et coll.*, 2002), tout comme l'inactivation d'ATM (Barlow *et coll.*, 1998), induit de sérieux problèmes méiotiques. ATM serait la kinase d'H2A.X au sein de la chromatine autosomale, alors qu'ATR phosphoryle spécifiquement H2A.X au niveau de la vésicule sexuelle (Bellani *et coll.*, 2005).

Enfin, des cassettes binaires, constituées de la juxtaposition d'une lysine avec un acide aminé phosphorylable (sérine ou thréonine), interviendraient dans la signalisation du code des histones (Fischle *et coll.*, 2003). Par exemple, la phosphorylation de la sérine 10 d'H3 ne permet plus à HP1 de lier la lysine 9 adjacente méthylée pendant la mitose (Fischle *et coll.*, 2005 ; Hirota *et coll.*, 2005). La comparaison des séquences d'H2B et TH2B montre que trois cassettes n'existent plus chez TH2B, car le remplacement d'un résidu ne permet plus sa phosphorylation, mais que trois nouvelles cassettes ont été créées (Govin *et coll.*, 2004). Les voies de signalisation potentielles liées à ces changements sont encore inconnues.

~ **Phosphorylation des TPs et des protamines**

La phosphorylation des TPs, notamment TP2 sur la sérine 109 et la thréonine 101 par la protéine kinase A, est associée à une décompaction de la chromatine et pourrait faciliter l'incorporation des protamines (Meetei *et coll.*, 2002). De plus, la phosphorylation de TP2 faciliterait son importation au sein du noyau (Ullas et Rao, 2003).

De la même manière que les TPs, la phosphorylation des protamines faciliterait leur incorporation à la chromatine (Oliva et Dixon, 1991). Prm2 est phosphorylée par la kinase IV dépendant du Ca²⁺/calmodulin (CamK4). Une inactivation de cette kinase bloque l'échange entre TP2 et Prm2, ce qui conduit à un arrêt de la spermatogénèse (Wu *et coll.*, 2000).

~ **Formation de ponts disulfures**

Une fois déposées, les protamines sont reliées entre elles par de nombreux ponts disulfures (Calvin et Bedford, 1971). Ces ponts disulfures aident au maintien d'une structure compacte au sein

des spermatozoïdes : un traitement avec un agent réducteur (DTT par exemple) est une étape courante des protocoles de FISH ou d'immunofluorescence, permettant de décompacter les spermatozoïdes et rendre leur ADN accessible.

Les ponts disulfures se forment lors de la maturation finale des spermatozoïdes au sein de l'épididyme. Très peu de données documentent les enzymes impliquées dans la formation et la régulation de cette modification post-traductionnelle, d'autant plus importante au vu du nombre de résidus concernés. Il est également intéressant de noter que H3.1, H3.2, H3.3 et H3t possèdent une cystéine en position 110, mais que, en position 96, H3.1 et H3t ont une cystéine alors que H3.2 et H3.3 ont une sérine. De même, TH2B possède une cystéine au sein de sa queue N terminale (acide aminé 33) alors qu'une sérine est présente chez H2B. Ainsi, des ponts disulfures impliquant les histones pourraient être utilisés dans les voies de signalisation des histones, et de manière plus spécifique lors de la spermatogénèse, puisque certains variants ont de nouvelles cystéines. Des ponts disulfures pourraient être établis parmi les histones d'un même nucléosome, notamment entre les deux exemplaires d'H3. Sa cystéine 110, conservée au sein de toutes les isoformes sauf CENP-A, est située au cœur de la zone d'interface entre les deux H3 du tétramère H3-H4 (Luger *et coll.*, 1997). La présence d'un pont disulfure, recréé lors de la reconstitution de nucléosomes dans des conditions oxydantes, modifierait les propriétés du nucléosome (Camerini-Otero et Felsenfeld, 1977). Enfin, la présence de cystéines au sein de variants spécifiques du testicule, et notamment sur la queue N terminale de TH2B suggère des ponts disulfures potentiels entre les histones résiduelles au sein des spermatozoïdes et les protamines (voir Introduction III.3).

La spermatogénèse affiche une diversité certaine de modifications post-traductionnelles. Combinées à la présence de nombreux variants d'histone, ubiquitaires ou spécifiques du testicule, une machinerie complexe dépose, lit et interprète ces marques. La partie suivante cherchera à décrire les données connues sur les acteurs du remodelage de la chromatine au cours de la spermatogénèse.

III.2.4. Les acteurs connus du remodelage chromatinien

Le remodelage de la chromatine au cours de la spermiogénèse implique le dépôt de nombreuses modifications post traductionnelles, l'incorporation et l'enlèvement de nombreux variants d'histone, et enfin l'action des protéines de transition avant l'incorporation finale des protamines.

Bien que de nombreuses histones soient manipulées, très peu de données expliquent comment elles sont incorporées et extraites de la chromatine, ou tout simplement chaperonnées de leur lieu de synthèse à leur lieu d'action. Le facteur HIRA est responsable de l'incorporation d'H3.3 lors de la prophase I de la méiose (Akhmanova *et coll.*, 1997). On peut supposer que les sous unités fondamentales des complexes incorporant H2A.Z et H2A.X dans les cellules somatiques soient conservées lors de la spermiogenèse, mais il serait surprenant que celles-ci ne contiennent pas certaines sous unités spécifiques du testicule modulant leur action dans ce tissu.

Le facteur NASP est un chaperon connu des histones de liaison, qui existe sous une isoforme testiculaire (tNASP) et une isoforme somatique (sNASP) (Lee et O'Rand, 1993). NASP interagit notamment avec le complexe CAF1 et serait impliqué dans la mobilisation des histones de liaison au cours de la réplication (Tagami *et coll.*, 2004). Le rôle de tNASP au cours de la spermatogénèse est mal connu. Il pourrait être impliqué dans le dépôt de variants d'histone de liaison, et/ou dans leur enlèvement lors de l'allongement des spermatozoïdes.

Enfin, l'identification d'une protéine spécifique du testicule contenant deux bromodomains, et appelée Brdt, est un premier pas vers la compréhension des mécanismes de compaction de la chromatine (Pivot-Pajot *et coll.*, 2003). Son ARNm est présent à partir de la méiose jusque dans les spermatozoïdes ronds, et la protéine est présente lors de l'allongement des spermatozoïdes (Govin *et coll.*, 2006). Brdt possède deux bromodomains fonctionnels, et est capable de compacter la chromatine hyperacétylée de cellules somatiques. Enfin, Brdt endogène est précisément localisé sur la chromatine acétylée des spermatozoïdes allongés, et permettrait la compaction de la chromatine des spermatozoïdes et l'extraction des histones de liaison (Govin *et coll.*, 2006).

III.3. L'épigénome du spermatozoïde

Surani et Solta (McGrath et Solter, 1984 ; Surani *et coll.*, 1984) montrèrent qu'un gamète paternel et un gamète maternel sont indispensables au développement de l'embryon, car deux pronoyaux de même origine parentale conduisent à un développement aberrant. Certaines informations indispensables au développement sont donc transmises par le gamète mâle et le gamète femelle.

Le brassage génétique lié à la méiose nous indique que ces informations ne sont pas codées par la séquence de l'ADN : l'information portée par l'épigénome des gamètes est donc indispensable au développement embryonnaire. Elle peut être transmise sous trois formes :

1. la modification directe du support de l'information génétique (méthylation de l'ADN)
2. le contenu protéique des gamètes. Toutes les protéines interagissant avec la chromatine peuvent jouer un tel rôle (histone, variants d'histone).
3. les ARN transportés et transmis par les spermatozoïdes.

III.3.1. Transmission de l'empreinte paternelle

La production de gamètes implique une uniformisation de l'empreinte parentale pour que l'ensemble des gamètes porte une empreinte unique, paternelle chez les mâles et maternelle chez les femelles (voir Figure III.3.1). La méthylation des gènes soumis à empreinte est effacée après la migration des cellules primordiales germinales au niveau des crêtes génitales (E11,5 à 12,5 chez la souris) (Lee *et coll.*, 2002 ; Yamazaki *et coll.*, 2003). La perte générale de méthylation de l'ADN en peu de cycles cellulaires suggère un mécanisme actif de déméthylation (Morgan *et coll.*, 2005). Cependant, la déméthylation épargne certains rétrotransposons et séquences répétées (Lines et IAP), ce qui préviendrait l'apparition de mutations dues à la propagation de transposons réactivées (Morgan *et coll.*, 2005).

L'action des Dnmt3a, 3b et 3L restitue un profil de méthylation biallélique au stade E14,5 (Okano *et coll.*, 1999 ; Bourc'his et Bestor, 2004 ; Rousseaux *et coll.*, 2005). Les allèles méthylés avant déméthylation sont reméthylés avant l'allèle homologue, suggérant que des marques épigénétiques encore inconnues soient maintenues pour diriger la méthylation *de novo* des deux allèles (Davis *et coll.*, 1999 ; Lucifero *et coll.*, 2004).

Enfin, le facteur CTCF est capable de lier la forme non méthylée de certains ICR, bloquant l'accès de ces séquences aux Dnmt dans les cellules somatiques (Delaval et Feil, 2004). Une protéine paralogue appelée BORIS est surexprimée dans le testicule. Son action pourrait contrer la liaison de CTCF et permettre la méthylation de sites spécifiques par Dnmt3a 3b et 3L (Klenova *et coll.*, 2002).

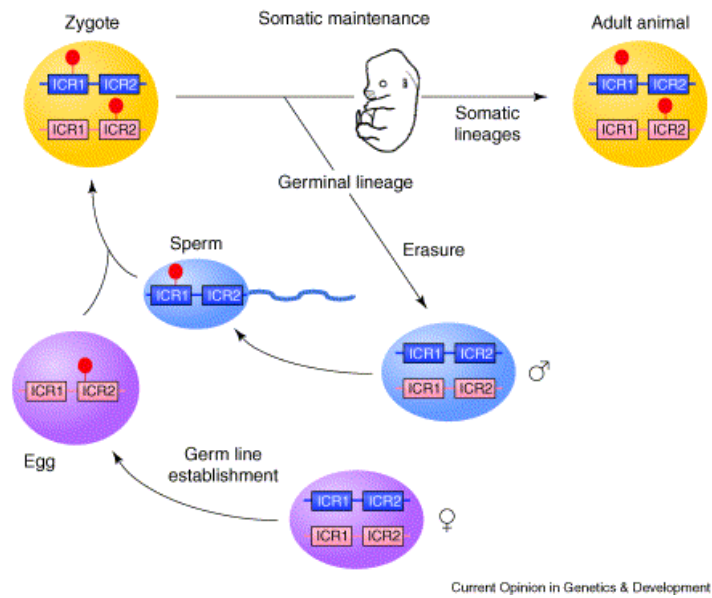


Figure III.3.1 Principes généraux de l’empreinte parentale

Les empreintes parentales sont établies durant la gamétogénèse, au niveau de régions de contrôle appelées ICR (Imprinting control region). Après fécondation, l’empreinte est maintenue durant l’ensemble du développement. A titre d’exemple, la méthylation (points rouges) de deux ICR a été représentée, les ICR1 et 2 étant soumis à une empreinte respectivement paternelle et maternelle. Adapté de (Delaval et Feil, 2004).

Ainsi, l'ensemble des spermatozoïdes présente une homogénéité des marques de l'empreinte parentale, afin de transmettre uniquement une information marquée du sceau paternel. Il en est de même pour les ovocytes concernant les sites soumis à empreinte maternelle.

III.3.2. L'organisation chromatinienne des spermatozoïdes

Bien que la majeure partie des histones soient extraites et remplacées par les protamines lors de la spermiogénèse, une fraction persiste au sein du spermatozoïde -15% chez l'homme, ainsi qu'une structure mixte entre protamines et d'autres protéines basiques (Tanphaichitr *et coll.*, 1978 ; Gusse *et coll.*, 1986). Une analyse par microscopie électronique de spermatozoïdes humains révèlent des structures globulaires de la taille de nucléosomes (Gusse et Chevaillier, 1980). De plus, les structures formées par les protamines et les nucléosomes peuvent être discriminées et seraient séquence spécifique (Gatewood *et coll.*, 1987). Une analyse des histones présentes au sein des spermatozoïdes par chromatographie liquide à haute performance a permis d'identifier H2A, ainsi qu'H2A.X et des traces d'H2A.Z, H4 et quatre formes acétylées d'H4, H3.1 et H3.3 présents sous différentes formes acétylées et H2B (Gatewood *et coll.*, 1990). CENP-A a été détecté dans les spermatozoïdes bovins (Palmer *et coll.*, 1990) et une partie de TH2B serait également conservée dans les spermatozoïdes humains (Zalensky *et coll.*, 2002).

L'analyse de certains loci spécifiques indique une structure nucléoprotéique fine au sein des spermatozoïdes (Figure III.3.2). Ainsi les gènes de la famille des globulines ont une structuration différente. Les gènes codants la globuline ϵ et γ , exprimés au début du développement embryonnaire, sont organisés sous forme nucléosomale au sein du spermatozoïde. En revanche, les gènes codants les formes β et δ de la globuline, non exprimés durant le développement, sont structurés avec des protamines au sein des spermatozoïdes (Gardiner-Garden *et coll.*, 1998). Les gènes codants Prm1 Prm2 et TP2, regroupés en un cluster, sont également enrichis en histones (Wykes et Krawetz, 2003). De plus, le gène IGF2, soumis à empreinte paternelle, et les séquences télomériques seraient structurés avec des histones, alors que le gène de l'acrosine et les régions centromériques contiennent un mélange d'histones et de protamines (Wykes et Krawetz, 2003).

La chromatine des spermatozoïdes serait capable de transmettre une information épigénétique, mais sa nature, son mode de transmission et son effet sur le développement embryonnaire reste encore inconnu. Il reste notamment à déterminer comment une partie de cette structuration est intégrée au programme de développement embryonnaire. L'organisation de certains loci peut aussi

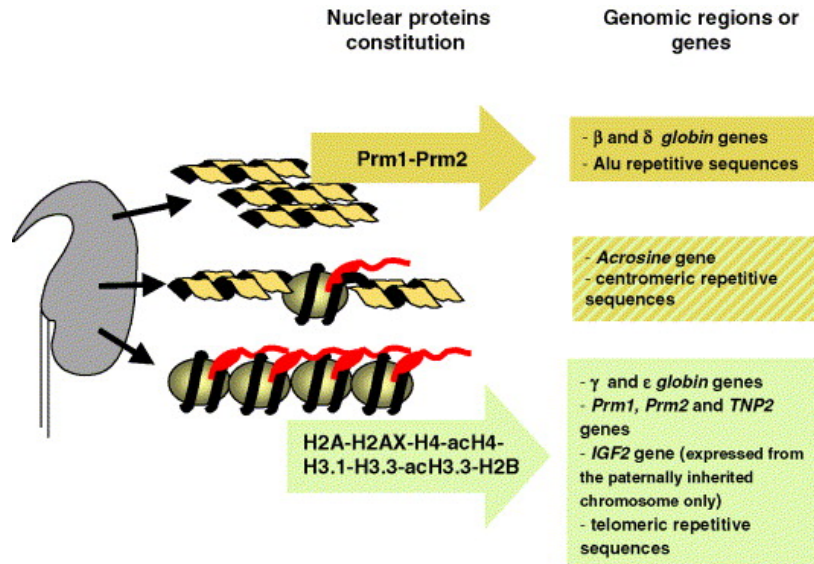


Figure III.3.2 Représentation schématique de l'organisation chromatinienne des spermatozoïdes

Les régions du génome structurées avec les protamines ou sous forme nucléosomale ont été indiquées. Le gène de l'acrosine et les séquences répétées centromériques contiendraient les deux types de structure. Tiré de (Rousseaux et coll., 2005)

rendre compte de l'histoire du remodelage qui a touché la chromatine lors de la spermiogénèse : on peut supposer par exemple que le cluster des gènes *TP Prm* reste sous forme nucléosomale car doit rester accessible dans les étapes finales de différenciation.

III.3.3. Les divers types d'ARN présents au sein des spermatozoïdes

L'idée que les spermatozoïdes puissent transmettre des ARN a été longtemps refusée, car ils n'ont presque plus de cytoplasme et sont transcriptionnellement inactif. Cependant, dès les années 1970, plusieurs études ont montré que des ARN sont présents dans les spermatozoïdes de taureau et de plantes (Krawetz, 2005). La présence d'ARN au sein de spermatozoïdes humains a été confirmée en 1993 grâce à plusieurs travaux réalisés dans des conditions excluant toute contamination par des mitochondries ou des ARN somatiques (Kumar *et coll.*, 1993 ; Dadoune *et coll.*, 2005).

Il a été confirmé que les ARN portés par le spermatozoïde sont transmis lors de la fécondation (Ostermeier *et coll.*, 2004). Néanmoins leur fonction reste incertaine. La présence d'ARN codant les protamines suggère que certains ARN seraient des reliquats de la transcription très active qui a lieu lors de la spermiogénèse (Ostermeier *et coll.*, 2004). Cependant, la présence d'ARN codant des facteurs impliqués dans le développement embryonnaire précoce, tel *FOXP1B* et *WNT5A*, soutient l'hypothèse d'une transmission d'information épigénétique portée par les ARN (Ostermeier *et coll.*, 2004).

Un travail récent du groupe de Mino Rassoulzadegan confirme de manière spectaculaire le potentiel épigénétique porté par les ARN transmis par les spermatozoïdes (Rassoulzadegan *et coll.*, 2006). Les souris homozygotes mutées sur le gène *Kit* décèdent après leur naissance de problèmes de développement, de différenciation des cellules germinales, d'hématopoïèse et de mélanogénèse. Par contre, les souris hétérozygotes survivent mais leurs pattes et l'extrémité de leur queue sont blanches, alors que leur pelage est noir. De manière surprenant, les souris homozygotes sauvages nées d'un accouplement entre deux souris hétérozygotes ont encore ce phénotype. Ceci reflète la transmission d'une information épigénétique non codée par le génome, dénommé paramutation. De plus les auteurs montrent que ce phénomène est lié d'une dérégulation de l'ARN *Kit*, partiellement dégradé dans les souris mutées. De plus la microinjection des ARN totaux d'une souris hétérozygote dans un embryon d'une cellule induit le phénotype chez une souris sauvage. Cette transmission impliquerait des petits ARN (miRNA), connus pour contrôler l'expression des gènes (Carthew, 2006 ; Valencia-Sanchez *et coll.*, 2006). Ces miRNA sont complémentaires de la partie

3' non traduite des ARNm, et recrutent des endonucléases. Ces dernières vont alors dégrader l'ARN ciblé. L'injection d'un miRNA ciblant l'ARNm Kit induit le phénotype mutant.

Les miRNA transmis par les spermatozoïdes codent d'une information épigénétique utilisée lors du développement embryonnaire. De plus, une étude générale des transcrits antisens présent au sein des spermatozoïdes a identifié 68 petits ARN transmis par la fécondation (Ostermeier *et coll.*, 2005).

Très récemment, une classe de petits ARN, appelé piRNA (*PIWI interaction RNA*) est spécifique des testicules (Aravin *et coll.*, 2006 ; Girard *et coll.*, 2006 ; Vagin *et coll.*, 2006 ; Watanabe *et coll.*, 2006). Les miRNA mesurent habituellement 21 à 23 nucléotides, et les piRNA mesurent 29 à 30 nucléotides. Ces piRNA sont présents de la prophase I mais disparaissent progressivement lors de l'allongement des spermatides. Ils pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression des gènes lors de la spermatogénèse, et il est séduisant de penser que certains piRNA persistent au sein des spermatozoïdes et transmettent une information épigénétique lors de la fécondation.

III.3.4. Quel est le devenir de l'épigénome transmis par le spermatozoïde ?

Au moment de la fécondation, génome paternel et maternel sont dans des états très différents : la majeure partie du génome paternel est organisé par les protamines, alors que la chromatine maternelle, bloquée en métaphase II, est organisée en nucléosomes. Après la fécondation, la méiose maternelle se termine, pendant que les protamines sont rapidement enlevées et remplacées par des histones. Ce remplacement est assuré par la nucléoplasmine N1/N2 chez le xénope, qui chaperonnent les histones de cœur et les assemblent sur le génome paternel. Chez la drosophile, le chaperon HIRA dépose le variant H3.3 au sein de la chromatine (Loppin *et coll.*, 2005).

Les histones incorporées au génome paternel sont plus acétylées que ceux présents dans le génome maternel, mais leur provenance cytoplasmique peut expliquer ce niveau d'acétylation (Adenot *et coll.*, 1997 ; Santos *et coll.*, 2002). La déposition des histones paternelles est suivie par une déméthylation rapide et massive du génome mâle, visible par immunofluorescence et confirmée à de nombreux loci (Mayer *et coll.*, 2000 ; Beaujean *et coll.*, 2004). Seuls l'hétérochromatine située autour et au niveau des centromères, les rétrotransposons IAP, et les gènes soumis à empreinte parentale sont protégés de cette déméthylation, garantissant la fonctionnalité de l'hétérochromatine, l'inactivation des transposons IAP et le maintien de l'empreinte parentale (Morgan *et coll.*, 2005).

Cette déméthylation est terminée avant le début de la réplication du pronoyau mâle, et implique nécessairement un processus actif (voir Introduction II.2.4). Cependant aucune donnée n'explique la spécificité de la déméthylation pour le génome mâle et comment certaines régions échappent à cette déméthylation. Les modifications post traductionnelles portées par les histones pourraient jouer un rôle protecteur car les histones présents au sein de l'hétérochromatine péricentrique et centromérique sont méthylées sur H3K9 avant le début de la déméthylation (Santos *et coll.*, 2005).

Enfin, il est intéressant de noter que la déméthylation du génome est d'autant plus marquée que l'activation transcriptionnelle du zygote est précoce (Memili et First, 2000 ; Beaujean *et coll.*, 2004). Cette déméthylation serait donc une étape nécessaire à la reprogrammation finale de l'information épigénétique, qui va réguler le programme d'expression des gènes et les premières étapes de développement. En effet certains gènes paternels sont méthylés dans le spermatozoïde, et leur déméthylation est nécessaire à leur activation lors du développement précoce de l'embryon (Morgan *et coll.*, 2005).

Enfin l'impact des histones résiduelles au sein du spermatozoïde lors du développement embryonnaire, tout comme celui des ARN transmis par le spermatozoïde sont encore très mal connus. Les limitations techniques sont encore importantes mais le développement de nouvelles approches adaptées à ce matériel biologique est très prometteur (O'Neill *et coll.*, 2006).

IV. Objectifs et plan de travail

Mon travail s'est orienté autour de trois axes majeurs :

IV.1.Études bibliographiques

Plusieurs études bibliographiques ont marqué le déroulement de ma thèse, et sont présentées en cinquième partie de ce chapitre d'introduction.

Dans un premier temps, une synthèse du rôle fonctionnel des variants d'histone lors de la spermatogénèse a donné naissance à une revue publiée en 2004.

Dans un deuxième temps, des études protéomiques publiées ont été étudiées dans le détail. Ce travail a mis en évidence l'expression ectopique de variants d'histone spécifique du testicule dans des cellules cancéreuses. Cette analyse a été publiée en 2005.

IV.2.Dynamique de l'épigénome au cours de la spermiogénèse

Mon travail a analysé quelques facettes de la dynamique de l'épigénome mâle lors de la spermiogénèse, à savoir l'évolution des modifications post traductionnelles des histones, des variants d'histone et l'état chromatinien associé aux régions de contrôle de l'empreinte parentale. La description de ces travaux constituera la première partie du chapitre « Résultats ».

IV.3.Caractérisation des facteurs impliqués dans la réorganisation de l'épigénome lors de la spermiogénèse

Très peu de données moléculaires détaillent les mécanismes de remodelage de la chromatine au cours de la spermatogénèse. Mon travail s'est efforcé de caractériser le rôle fonctionnel Brdt, un facteur capable de compacter la chromatine acétylée. De plus, une approche biochimique a été

développée afin d'identifier de nouveaux acteurs de cette restructuration de la chromatine. L'ensemble de ces données sera présenté dans la deuxième partie du Chapitre « Résultats ».

V. Études bibliographiques

V.1. Rôle des histones dans le remodelage de la chromatine au cours de la spermiogénèse

V.1.1. Résumé

Ce résumé sera volontairement court car l'ensemble des données discutées a déjà été détaillé dans l'introduction.

L'abondance de nombreux variants d'histone, dont certains spécifiques du testicule associées à la variété des modifications post traductionnelles portées par les histones multiplient les voies de métabolisme chromatinien associées à la spermatogénèse. Un code des histones spécifique du testicule pourrait ainsi exister, combinant variants d'histone et modifications post traductionnelles. Dans un dernier temps, cette revue discute la réorganisation générale de la chromatine associée au remplacement des histones lors de la spermiogénèse.

V.1.2. Revue publiée

Cette revue a été publiée en 2004 dans *European Journal of Biochemistry*.

Mon implication personnelle a portée sur l'analyse et l'alignement de variants d'histone, l'adaptation du code des histones aux variants testicule spécifique et à l'étude des machineries moléculaires associés aux variants d'histone. J'ai également participé à la conception et à la rédaction du manuscrit.

REVIEW ARTICLE

The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis

Jérôme Govin, Cécile Caron, Cécile Lestrat, Sophie Rousseaux and Saadi Khochbin

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation, INSERM U309, Équipe Chromatine et Expression des gènes, Institut Albert Bonniot, Faculté de médecine, La Tronche, France

One of the most dramatic chromatin remodelling processes takes place during mammalian spermatogenesis. Indeed, during the postmeiotic maturation of male haploid germ cells, or spermiogenesis, histones are replaced by small basic proteins, which in mammals are transition proteins and protamines. However, nothing is known of the mechanisms controlling the process of histone replacement. Two hints from the literature could help to shed light on the underlying molecular events: one is the massive synthesis of histone variants, including testis-specific members, and the second is

a stage specific post-translational modification of histones. A new testis-specific 'histone code' can therefore be generated combining both histone variants and histone post-translational modifications. This review will detail these two phenomena and discuss possible functional significance of the global chromatin alterations occurring prior to histone replacement during spermiogenesis.

Keywords: bromodomain; chromodomain; epigenetics; histone chaperone; histone structure.

Introduction

The basic unit of chromatin is the nucleosome, which consists of 146 base pairs of DNA wrapped around an octamer of core histones, including two molecules of H2A, H2B, H3 and H4 [1]. A fifth histone, H1, protects additional DNA fragments linking neighbouring nucleosomes [2]. The nucleosomes are also the building blocks of a complex organization of chromatin, which adopts different architectures in response to specific stimuli. These include organization states going from a 'beads-on-a-string' structure to the highly condensed mitotic chromosomes. Because of the specific nature of gene expression during development and in various adult tissues, the chromatin structure also has to undergo local structural alterations.

Three major strategies contributing to local and specific chromatin remodelling have so far been identified. ATP utilizing complexes act directly on nucleosomes to modify the accessibility of factors to limited DNA regions present in a nucleosome [3]. Histone modifying enzymes dictate combinations of post-translational modifications of histones to create specific signals defining the 'histone code', which in turn induces localized alterations of the chromatin structure and function. The histone code hypothesis postulates that specific factors can act on chromatin by recog-

nizing and binding particular histone modifications [4–6]. This hypothesis is so far supported by the discovery of chromatin interacting modules present in various factors, specifically recognizing methylated or acetylated lysines of histones [7].

Finally, variants of histones H2A, H2B, H3 and H1 have been identified. Some of these variants have already been shown to mediate specific functions such as DNA repair in response to genotoxic treatments [8].

In somatic cells, these three mechanisms act together to locally induce alterations of the chromatin structure and to maintain a region-dependent differentiation of chromatin over generations of cells, although many questions remain unanswered on the molecular basis of their action. An extreme case of chromatin remodelling occurs during spermatogenesis, where histones are massively removed and replaced [9]. Although nothing is known of the underlying mechanisms, one can expect a major participation of the three chromatin modifying mechanisms already known to act in somatic cells. Indeed, disparate data from the literature suggest that histone removal during spermiogenesis is preceded by a massive incorporation of histone variants associated with the induction of different types of histone modifications (Fig. 1).

In this review, data from the literature are analysed in order to finally discuss the functional significance of histone variants, as well as of histone post-translational modifications, during spermiogenesis.

The main histone variants

Histone variants are nonallelic forms of the conventional histones [8]. Conventional histones are mostly synthesized and assembled into nucleosomes during S phase

Correspondence to S. Khochbin, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation, INSERM U309, Équipe Chromatine et Expression des gènes, Institut Albert Bonniot, Faculté de médecine, Domaine de la Merci, 38 706 La Tronche, France.
Fax: +33 0474549595, Tel.: +33 0474549583,
E-mail: khochbin@ujf-grenoble.fr

(Received 14 May 2004, revised 16 June 2004, accepted 23 June 2004)

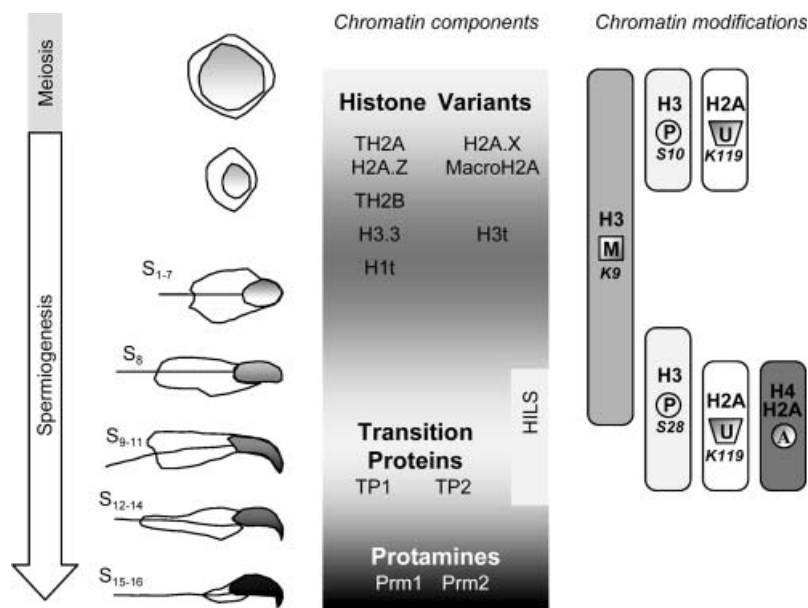


Fig. 1. Chromatin components during spermatogenesis. The major chromatin components and their post-translational modifications are presented. Histone variants are incorporated during meiosis, except linker variant HILS, which shows a delayed expression. Highly basic proteins, transition proteins and protamines, replace histones during late spermiogenesis. The temporal distribution of the main post-translational histone modifications is also presented (A, acetylation; U, ubiquitination; M, methylation; P, phosphorylation). Spermatogenesis, the differentiation of male germinal cells, is characterized by three major stages: premeiotic, meiotic and postmeiotic. Pre-meiotic spermatogonia divide by mitosis. They then enter meiosis by the formation of preleptotene primary spermatocytes, which replicate DNA and subsequently go through the leptotene, zygotene, pachytene and diplotene stages of the first meiotic division prophase. Meiotic I division yields secondary spermatocytes which then rapidly go through meiotic II division, generating haploid round spermatids. During its postmeiotic maturation, the spermatid undergoes a global remodelling of its nucleus, which elongates and compacts into the very unique nucleus structure of the spermatozoa.

progression, whereas replacement histones can be produced and incorporated throughout the cell cycle. Testis specific variants have been described [9], but many nontissue specific histone variants are also expressed and incorporated into chromatin during spermatogenesis (Fig. 1).

Linker histone variants

In mammals, at least six somatic subtypes (H1.1–H1.5 and H1^o), one oocyte-specific and two testis-specific linker histones (H1t and HILS1) are expressed [2,10,11].

H1t contains the usual tripartite structure of linker histones, but is highly divergent in its primary structure compared to the other five members H1.1–H1.5 (Fig. 2). Its expression has been characterized in the mouse [10] as well as in the rat [12]. *In situ* hybridization detects the RNA in mid-pachytene spermatocytes, and immunodetection indicates the presence of the protein from the stage of pachytene spermatocytes until round and elongating spermatids [10,13]. At this stage, the H1t amount constitutes up to 55% of the total linker histones. Mice bearing invalidated *H1t* gene display no phenotype [14–16], but the analysis of enriched populations of pachytene spermatocytes and round spermatids in these mice has shown that its absence is partially compensated by the other H1s, still permissive to end maturation and fertilization [14,15]. Interestingly, other groups have shown that the interaction of H1t with nucleosomes leads to a less compact structure than that of other H1 subtypes [17,18], suggesting that this variant may

help chromatin de-compaction, giving accessibility to other chromatin remodelling factors.

Among the somatic linker histones, H1.1 (H1a) is present at a high level in spermatogonia and then decreases upon further development during mitotic and meiotic cell divisions [19,20]. Nevertheless H1.1 disrupted mice display no significant phenotype, and show normal spermatogenesis, fertility and testicular morphology [21]. It has been shown recently that in the absence of H1t, H1.1 is over-expressed to maintain the normal ratio of H1 to core histone [22]. Interestingly, the elimination of both H1.1 and H1t led to a significant decrease of H1/core histone ratio (75% of the normal ratio) without any defect in spermatogenesis [22]. These findings suggest that male germ cell development can normally proceed in the presence of reduced ratio of H1 to core histones.

A last H1 variant, named HILS1 (H1-like protein in spermatids 1), has been found recently in human and mouse [11,23]. Whereas H1t is essentially present until the round/elongating spermatids stages, HILS is detected later in elongating and condensing spermatids nucleus, suggesting a sequential action of linker histones during chromatin remodelling.

H3 variants

At least five H3 variants have been described, of which one seems to be testis specific.

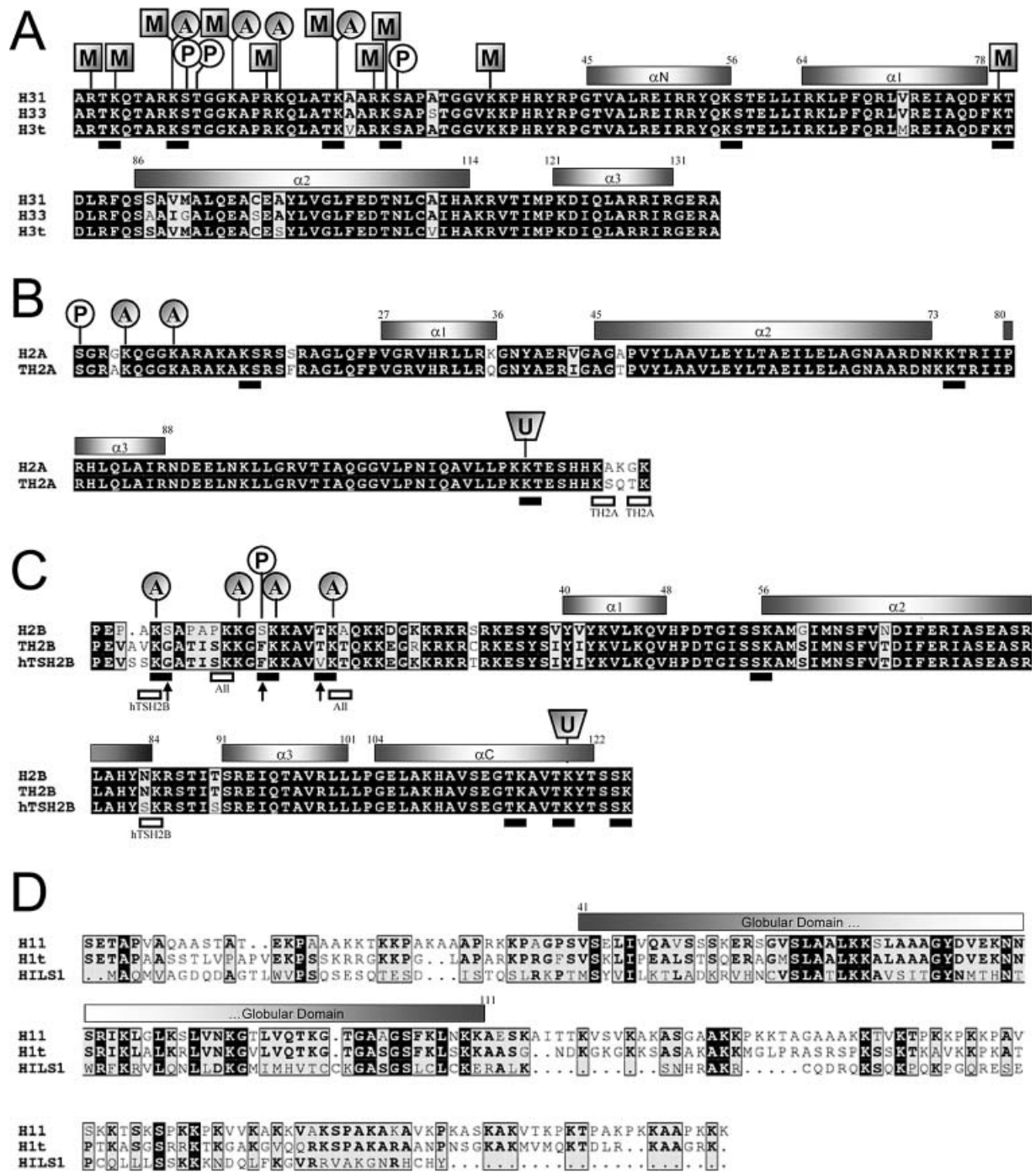


Fig. 2. Sequence analysis of known histone variants expressed during spermatogenesis. The sequences of conventional histones and their spermatogenic variants are aligned in (A), (B), (C) and (D). All sequences are murine, as most of the sequence data are available for this species, except for TH2A (rat), and hTH2B and H3t (human sequences). Conventional histone sequences were chosen on the basis of work by Marzluff and colleagues [94]. Alignments were performed with the algorithm CLUSTALW on the web interface of the PBIL at <http://npsa-pbil.ibcp.fr> [95] and coloured with ESPRIT at <http://prodes.toulouse.inra.fr/ESPrIPT/ESPrIPT/> [96]. Some of the histone modifications discussed are indicated [67,91]. Modification cassettes (amino acids Thr/Ser-Lys or Lys-Thr/Ser) [91] were searched in conventional histones and variants, and are represented by small rectangles, underneath the corresponding sequences. Black rectangles underline cassettes present in conventional histones. Some cassettes are not conserved in variants and arrows indicate changes leading to the cassette disappearance in the variants. Open rectangles underline new cassettes specific to a variant and absent in conventional histones. Original crystallographic data were used for the representation of the secondary structures [1,97]. Sequence accession numbers: H3.1 (P16106); H3.3 (P06351); H3t (Q16695); H2A (NP_783591); TH2A (Q00728); H2B (NP_835502); TH2B (Q00729); hTSH2B (NP_733759); H1.1 (P43275); H1t (Q07133); HILS1 (Q9QYL0).

A testis-specific H3 variant, only detected in the human, has been isolated in 1996 [24,25]. This variant, named H3t, differs from the canonical H3 by only four residues (Fig. 2A). The RNA of this variant was only detected in primary spermatocytes. The experimental sequencing helped to identify another testis specific variant, named TH3 in rat [26]. However, no gene or sequence information is available on this putative histone variant and no corresponding genes have been found in known mammalian genomes [25].

More data is available on nontestis specific H3 variants. CENP-A is a centromeric specific variant, and unique by its N-terminal amino-acid composition [27]. In somatic cells, CENP-A is deposited on newly duplicated centromeres, and is required for the recruitment of other proteins to centromeres and kinetochores. A similar function in germ cells would imply its involvement during mitotic and/or meiotic segregation.

The other H3 variant is H3.3, which differs by 4–5 amino acids from H3, depending on the allelic form considered (Fig. 2A). The two H3.3 genes, *H3.3A* and *H3.3B*, are expressed in mouse testis [28,29]. *H3.3A* mRNA was detected before and after meiosis while the expression of *H3.3B* gene was found to be restricted to cells of the meiotic prophase [29]. Interestingly, *H3.3A* was identified by a gene trap strategy as a gene expressed in spermatocytes, and of which homozygous disruption caused partial neonatal lethality and, in surviving mutants, reduced growth, neuromuscular deficits and male subfertility [30]. The number of copulations per male, as well as the number of pregnancies per copulatory plug, were significantly lower for *H3.3A*–/– mutants than for non mutants. No obvious differences in the testis, epididymis, vas deferens, or sperm numbers were reported in this study, suggesting that spermatogenesis was not quantitatively affected.

Akhmanova and colleagues [31] have shown that *Drosophila* H3.3 is incorporated during the first meiotic prophase, then concentrated in a limited number of chromatin regions and further disappears with the other core histones during the elongation of spermatids. In somatic cells, actively transcribing regions have been shown to be enriched in H3.3 [32], suggesting that the replacement of H3 by H3.3 in spermatocytes could also be linked to the very active transcription that takes place during meiosis [9].

H2B variants

Rat, mouse and human TH2B have been cloned, showing very high levels of conservation [33–35]. The main differences between H2B and TH2B are in the N-terminal, and to a lesser extent, the histone fold domain (Fig. 2C). Most of these differences are conserved between the three species, suggesting a conserved role for this variant during spermatogenesis (see below).

In rat, TH2B is actively expressed in early primary spermatocytes until mid–late pachytene [19] and then remains the major form of H2B in round and elongating spermatids. Using an antibody that, luckily, cross-reacts with TH2B, it has been shown in human testis that TH2B first appears in spermatogonia, is maximal in round spermatids, and then gradually disappears during the elongation of spermatids [36]. In contrast, the human

TH2B, hTSH2B, was retained in mature sperms and presented a specific nuclear localization only in 20% of sperm populations [35].

There is also apparently a nonchromatin function for histones during spermatogenesis. Indeed, recently, in bull somatic type core histones have been found associated with the perinuclear theca, which is a layer surrounding the nucleus of mammalian sperms [37]. A histone H2B variant, named SubH2Bv, has also been found associated with the theca in bull sperm [38]. The function of these non-nuclear histones has not been defined.

H2A variants

Only one testis specific H2A variant has been characterized and named TH2A, which differs from somatic H2A in several residues located in its histone fold domain as well as in its N- and C-terminal tails (Fig. 2B). TH2A is actively expressed and incorporated in the chromatin of pachytene spermatocytes [19,39].

The expression of nontestis specific H2A variants have been studied in more detail. Mainly, two H2A variants are expressed during spermatogenesis, H2A.X, and macroH2A. In somatic cells, H2A.X is involved in DNA double strand breaks (DSB) surveillance and repair [9,40]. H2A.X disruption leads to male sterility with abnormal spermatogenesis. Indeed, in the male mutants, no DNA alignment for synapsis is observed at zygotene and early pachytene stages. In the spermatocytes that progress into mid-pachytene Mlh1, a mismatch repair protein, do not display the foci characteristic of recombined DNA strands, and chromosomes X and Y are abnormally paired with autosomes, leading to apoptosis of mid pachytene spermatocytes [41].

MacroH2A is a long variant of H2A, containing a large C-terminal nonhistone region [42]. Two allelic forms, macroH2A1 and macroH2A2, are expressed. They are 80% identical [43,44]. The *macroH2A1* gene encodes two proteins generated by an alternative splicing mechanism, macroH2A1.1 and macroH2A1.2 [43]. In somatic cells of female mammals, the inactive X chromosome has been shown marked by a high concentration of histone macroH2A [43,45,46], forming a dense structure, referred to as the macrochromatin body. MacroH2A1.2 is found at high concentrations in mice testis [47,48]. During spermatogenesis, it has been observed in the nuclei of germ cells, with a localization that is largely to the developing XY-body in early pachytene spermatocytes [49,50]. Hence, the process of X-inactivation in XX somatic cells [51] and that in XY spermatocytes show some similarities, including a heterochromatinization of the region which is densely stained (forming, respectively, the Barr Body or the Sex Vesicle) and a coating of the X with the Xist RNA, a non coding RNA specifically associated with the inactive X chromosome [52]. Interestingly, a potential relationship has been discovered between macroH2A1.2 and the mammalian HP1-like heterochromatin protein M31 (HP1beta or MOD1) during meiosis. The HP1-like protein M31 was found initially to colocalize with heterochromatic regions in Sertoli cells, in mid-stage pachytene spermatocytes, as well as in round spermatids (where it localized with the

centromeric chromocenter) [53]. Both macroH2A1.2 and M31 were found to colocalize in a time-dependent manner at specific nuclear regions, including the pseudo-autosomal region (PAR) of the sex body [50], suggesting a role for this heterochromatic region in preventing precocious desynapsis of the terminally associated X and Y chromosomes prior to anaphase I. According to the data described above, the large histone H2A variant, macroH2A1.2, along with the HP1-like protein M31, could be involved in the partial pairing of X and Y chromosomes and the formation of the sex vesicle, which, although of unknown function, is an indispensable feature of a successful male meiotic division. Indeed, meiotic studies in men presenting an impaired spermatogenesis in the context of a constitutional chromosomal abnormality have suggested that the presence of a sex vesicle is crucial for the achievement of meiosis.

In one study, macroH2A1.2 has also been found in murine spermatozoa, suggesting that it may be important for other functions besides meiotic recombination [49]. However, according to another study, macroH2A was not found among sperm nuclear proteins, not even in species fully retaining the histones in mature sperm such as catfish and bullfrog [54].

Histones and post-translational modifications

The histone code hypothesis proposes that combinations of histone modifications could define specific signals, and serve as an interface language between histones and chromatin modifying activities, to assign particular structure and function to specific chromatin domains [5,6]. In fact each histone has several sites of potential modifications including acetylation, methylation, phosphorylation, etc... Assuming that the eight core histones of each nucleosome could have different associations of modifications, their combination in a multinucleosomal microenvironment would create a tremendously complex epigenetic code. This hypothesis stands only if experimental data support the existence of a machinery capable of specifically recognizing and reading the histone code. The existence of cellular factors recognizing and binding to specifically modified histones is in support of this hypothesis [7,55].

The histone code is probably in action in spermatogenic cells as stage-specific histone modifications have been reported to occur during the postmeiotic genome reorganization phase. However, despite detailed descriptions of some histone modifications [9], nothing is known about their potential function in chromatin reorganization and histone replacement in elongating spermatids (Fig. 1).

Histone acetylation

Acetylated forms of histones have been found during spermatogenesis in various species including, trout [56], rat [57] and rooster [58]. The use of antibodies, specifically recognizing individual acetylated residues, has allowed a more precise characterization of histone acetylation pattern during spermatogenesis [59]. Spermatogonia and preleptotene spermatocytes contain acetylated H2A H2B and H4, whereas histones are underacetylated during meiosis and in

round spermatids. The replication-dependent acetylation of H4 and H3 [60] can partially explain the acetylation signal detected in DNA replicating cells.

Interestingly, these data also showed that in elongating spermatids, histones become hyperacetylated in the total absence of DNA replication. In the case of histone H4, this acetylation was shown to follow a stage-specific distribution [59,61]. Indeed, the H4 hyperacetylation observed in the early elongating spermatids affects the nucleus in a global manner. This distribution then changes during the elongation and condensation stages and finally acetylated H4 disappears following an antero-caudal movement in condensing spermatids.

This replication and transcription-independent histone acetylation seems to be tightly linked to histone replacement. Indeed, histones remain under-acetylated in species where histones remain all through spermiogenesis such as winter flounder and carp [62,63]. However, the role of acetylation of core histones in their replacement remains largely unknown. Some *in vitro* experiments suggest that histone acetylation could facilitate their displacement by protamines [64,65], but there is no hint in the literature on how it could affect *in vivo* chromatin remodelling in spermatids. The recent identification of a new bromodomain-containing testis specific factor capable of condensing acetylated chromatin suggests that histone acetylation could primarily be a signal for chromatin condensation [66].

Histone methylation

Suv39h1 and Suv39h2 are two histone methyltransferases (HMTs) responsible for methylating Lys9 of H3 in heterochromatic regions, in somatic cells [67]. Suv39h2 is over-expressed in the testis [68], where it is enriched in heterochromatic regions from leptotene spermatocytes to round spermatids stages. The H3 Lys9 methylation pattern colocalizes with Suv39h2 [69]. A disruption of heterochromatic HMT activities (double knockout of *Suv39h1* and *h2*) leads to chromosomal instability, impaired homologous interactions and meiosis defects.

Histone phosphorylation

Ser10 and 28 of H3, both very conserved in the H3 family, are phosphorylated during mitotic chromosome formation. The mitotic-specific phosphorylation of histone H3 Ser10 has also been shown to occur during meiosis very probably associated with chromosome condensation [70]. However, no information is available about the phosphorylation of Ser28 during spermatogenesis.

Site-specific phosphorylations of H2A [71], H2AX [40] and H2B [72] have also been reported. While nothing is known about the phosphorylation of H2A and H2B during spermatogenesis, that of H2AX may play a crucial role as it is tightly linked to the function of H2AX in DNA double strand breaks repair [40]. Indeed, a transient phosphorylation of H2AX on Ser139 accompanies double strand break damage repair, as well as DNA cleavage events such as those associated with meiotic recombination [73].

Histone ubiquitination

Ubiquitination is a modification known to be a mark for protein degradation via the proteasome pathway. However, the function of protein ubiquitination is not restricted to degradation, and data from the literature suggest its involvement in DNA repair, cell cycle control, cellular response to stress, as well as in the histone code [74].

H1 and H3 have been found occasionally ubiquitinated *in vivo*, but H2A and H2B appear to be the predominant forms of ubiquitinated histones in eukaryotes, encompassing 5–15% of H2A and 1–2% of H2B [75].

Histone ubiquitination has been described during spermatogenesis in many species, including rat, mouse, trout and rooster [75]. In the mouse, a high proportion of ubiquitinated H2A (uH2A) is detected by immunohistochemistry in the specific chromatin domain formed by the sex body in pachytene spermatocytes. uH2A becomes depleted from round spermatids, but reappears in elongating spermatids [74]. In elongating spermatids H2A, H2A.Z, H2B, H3 and TH3 were found mono and poly ubiquitinated in the rat [74,76].

HR6, a ubiquitin-conjugating enzyme, homologous to the yeast RAD6 protein, ubiquitinates H2B *in vivo* and is strongly expressed in the testis [77]. A disruption of the HR6-encoding gene induces a spermatogenesis arrest at the round/elongating spermatids stage [78] pointing to the fundamental role of histone ubiquitination during spermiogenesis.

All these data suggest that histone ubiquitination can be considered as one of the important epigenetic mark involved in chromatin remodelling in postmeiotic male germ cells.

Histone variants

Functional significance of sequence divergence in chromatin remodelling. One of the most distinctive characteristics of chromatin remodelling during spermatogenesis is the expression of a large number of histone variants. Indeed, in addition to all the somatic-type histone variants, spermatogenic cells express testis-specific histones corresponding to three of the four core histones. Nevertheless, understanding how each variant specifically acts on chromatin structure and function is a real challenge. The fundamental structural basis of a nucleosome is very well conserved during evolution. The incorporation of histone variants could lead to the formation of nucleosomes with altered structure and modified properties.

Histone variants incorporated during spermatogenesis, although showing only small changes in their primary structures, could therefore bring major changes in the nucleosome function and stability.

A detailed analysis of testis-specific histone variants shows that the histone fold is usually well conserved between variants (Fig. 2A,B,C). The N-terminal region of H3 is very similar between the variants, including H3.3 and H3t, whereas the N-terminal regions of TH2A and TH2B present several differences with their somatic counterparts, which may potentially affect residues modified by known histone post-translational modifications (Fig. 2).

Interestingly, the comparison of H2A/TH2A sequence shows three amino acid changes in a region covering the end of $\alpha 1$, loop1 and the beginning of $\alpha 2$. As a structural analysis has already shown that H2A Loop1 is the only area of contact between the two (H2A–H2B) dimers within the nucleosome core particle [1], the minor sequence changes observed in TH2A could have important functional consequences, as already established in the case of H2A.Z by crystallographic data [79]. The structural analysis also showed that the incorporation of two heterodimers of H2A–H2B and H2A.Z–H2B within the same nucleosome is unlikely, suggesting that the incorporation of the first (H2A.Z–H2B) dimer could facilitate the recruitment of another H2A.Z-containing dimer [79,80]. Similarly, the incorporation of given testis-specific histone variants might facilitate the incorporation of other variants, creating highly specialized nucleosomes.

Moreover, the H2A.Z containing nucleosomes display an altered surface, with the possible incorporation of a metal divalent ion, which could lead to changes of higher order structures or modify the recruitment of specific factors [79]. It could be assumed that similar properties associated with testis specific histones would lead to an altered chromatin structure and facilitate the recruitment of testis-specific chromatin remodelling factors.

The centromere specific histone variant, CENP A, has been shown to be retained in mature spermatozoa, suggesting that it could have a role in organizing the centromeres during the final stages of spermiogenesis and/or the paternal genome during early embryogenesis [81].

A role for specific histone chaperones. Cellular machinery containing histone chaperone HIRA, has recently been discovered that is capable of uniquely assembling histone H3 variant, H3.3, in specialized nucleosomes [82,83] enriched in transcriptionally active regions [32]. The localization of H3.3-containing chromatin has not yet been determined in mammalian germ cells, but in *Drosophila*, H3.3 is incorporated in chromatin during first meiotic prophase [31]. It remains concentrated in specific regions (compared to H3, which is evenly distributed) in round and elongating spermatids, and disappears in condensed spermatids like other histones. H3.3 is therefore present in haploid male germ cells in the total absence of transcription. One possible function of this specific H3 variant could be linked to the massive histone replacement, taking place in elongating spermatids where HIRA, or maybe other spermatid-specific factors, could recognize H3.3 and dismantle the nucleosomes. Histone removal by HIRA may also occur in somatic cells but to a much lesser extent than in spermatids. Therefore the identification of HIRA partners in spermatids would be of great interest in understanding the molecular basis of histone replacement during spermiogenesis and furthermore in that of nucleosome disassembly in general.

Recently, a histone variant exchanger that specifically replaces conventional H2A by H2A.Z has been identified in yeast [84,85] showing that H3 and also H2A variants can be deposited by specific factors.

Recent work showed that in yeast, a protein identified as Hif1p is a histone H3 and H4 chaperone involved in chromatin assembly [86]. Interestingly, Hif1p is the

homologue of a H1 chaperone, known as NASP, which has a testis-specific variant expressed in different species of mammals and is present all through spermiogenesis [87]. It has been proposed that tNASP may bind and translocate testicular histone variants to nucleosomes [87]. Its presence during late spermiogenesis suggests that the protein may also function as a histone remover, as no chromatin assembly occurs during these stages.

It is therefore very possible that the enrichment of spermatid chromatin with different histone variants would first increase the accessibility of chromatin to various factors (such as those involved in recombination in pachytene cells or histone modifying enzymes in spermatids) and then facilitate histone replacement. Moreover, histone modifications, such as acetylation, may mediate the action of more specialized chaperones (see below). It would therefore be important to investigate the structural characteristics of testis-specific histone variants, and to explore whether the testis-specific and somatic histone chaperones expressed in spermatogenic cells are capable of exchanging TH2A, TH2B as well as H3t with transition proteins.

Histone acetylation – a signal for histone replacement?

As mentioned previously, postmeiotic histone hyperacetylation has not been observed in species where somatic histones are retained completely in spermatozoa. This specific histone modification therefore appears to be tightly associated with histone replacement. Moreover, the observation that in mice spermatids, acetylated H4 disappearance follows an antero-caudal pattern similar to that of chromatin condensation [59], reinforces the hypothesis of a direct link between histone acetylation, their replacement and nucleus condensation.

The mechanisms underlying this sudden histone hyperacetylation in early elongating spermatids are unknown. However, a recent work showed that it is associated with the degradation of the major cellular histone deacetylases [88], a phenomenon that is able to play an important role by disrupting the cellular acetylation equilibrium.

According to the histone code hypothesis, histone hyperacetylation in elongating spermatids would serve as a signal for the recruitment of specific machinery acting on acetylated histones. Such machinery probably contains factors such as bromodomain-bearing proteins, enabling them to bind acetylated chromatin (Fig. 3).

Bromodomains are acetyl-lysine binding modules present in ATP-dependent chromatin remodelling factors as well as in some HATs and other nuclear proteins of unknown function [89]. Bromodomain-containing proteins therefore appear to be excellent candidates to interpret the signal generated by the global histone acetylation taking place during spermiogenesis. Recently, a testis-specific double bromodomain-containing protein, named BRDT, was shown to be capable of inducing a dramatic condensation of chromatin strictly dependent on histone hyperacetylation [66]. These data present a new scenario regarding the significance of histone acetylation during spermiogenesis: it could primarily act as a signal for chromatin condensation. In support of this hypothesis, nuclear domains containing condensed chromatin in elongating spermatids also correspond to regions enriched in acetylated histone H4 (J. Govin,

C. Caron, C. Lestrat, S. Rousseaux and S. Khochbin, unpublished results).

Bromodomain-containing factors, such as BRDT, upon their interaction with acetylated histones, could also recruit testis-specific chaperones to mediate histone removal. In fact, a new bromodomain-interacting chaperone, CIA-II, highly expressed in the testis, also interacts with histone H3 *in vivo* and with histones H3/H4 *in vitro* [90]. Such factors may establish a link between an acetylation-dependent chromatin compaction mediated by bromodomain proteins and histone displacement. Moreover, it has recently been shown in yeast that Hat1p/Hat2p/Hif1p specifically binds acetylated histones H4 and H3 [86]. As mentioned above, the testis-specific homologue of Hif1p, tNASP, is present all through spermiogenesis, and may also provide a link between histone acetylation and histone removal (Fig. 3B).

Chromatin remodelling that occurs during spermiogenesis seems to depend simultaneously on histone variants and histone modifications (histone code). It is therefore very likely that the combination of histone variants and particular histone modifications generate a testis-specific 'chromatin code' (Fig. 3A).

It is noteworthy that all the sites in histones potentially involved in generating the histone code are conserved between histone variants expressed during spermiogenesis, with the exception of the H2B phospho-acceptor site S14, which is not conserved in TH2B. This sequence divergence signifies a modification of the TH2B related histone code in spermatogenic cells, as for H2B, Ser14 phosphorylation has been shown to play an essential role in somatic cell apoptosis [72]. In contrast, compared to H2B, hTSH2B has gained four potentially new phosphorylation sites (Fig. 2C).

The observation of a pair of neighbouring amino acids both targets of post-translational modifications has recently led to the proposal of the 'binary switches' hypothesis modulating the readout of specific marks such as lysine methylation [91]. In fact the phosphorylation of Thr/Ser in Thr/Ser-Lys or Lys-Thr/Ser pairs found in the four histones may negatively regulate the binding of chromodomains to methylated lysines. Indeed, chromodomain-containing proteins are involved in a variety of functions, but all seem to deal with chromatin. In some of these proteins, such as heterochromatin protein 1 (HP1), the chromodomain has been shown to specifically interact with histone tails bearing methylated lysines [7].

In order to assess the potential function of these binary switches during spermatogenesis, they were searched for on the primary sequences of the different histone variants. Among the three testis-specific core histones, TH2B seems to be the only variant which presents significantly divergent binary cassettes compared to its somatic counterpart. Indeed, in testis-specific H2Bs, in three cases the Thr/Ser residues occurring in somatic type H2B next to a Lys residue were replaced by nonphospho-acceptor residues, and three new binary cassettes were created (Fig. 2C).

These analyses show that, on top of a structural role, sequence divergence in testis-specific histone variants may participate in increasing the complexity of the histone code.

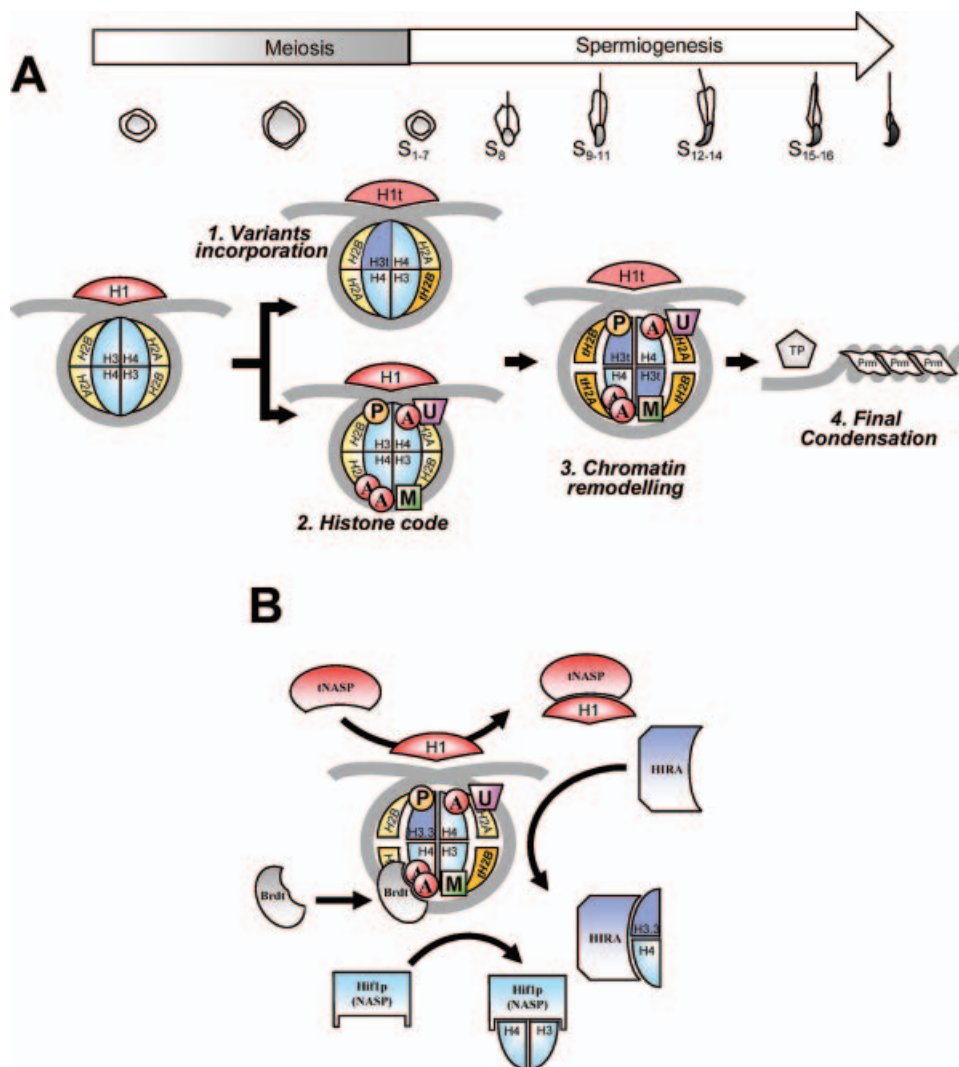


Fig. 3. Integrative model for chromatin remodelling during spermatogenesis. (A) Chromatin remodelling combines histone variants (1) and the histone code (2, 3). In the late stages of spermiogenesis, transition proteins and protamines participate in constituting the final sperm chromatin structure (4). (B) Putative factors involved in the spermatogenic remodelling process. Brdt is probably one of the histone code 'readers', binding acetylated histones, and condensing acetylated chromatin [66]. HIRA, Hif1p (also named NASP) and tNASP are suspected to behave as histone chaperones during this remodelling process, with some histone specificity (see text for more details).

Concluding remarks

After analysing all the available data it clearly appears that a massive chromatin alteration occurs before histone replacement due to an extensive incorporation of histone variants as well as to globally specific histone modifications. Recruitment of histone variants in nucleosomes may have two general effects on chromatin structure and function. First, subtle sequence divergences can have important consequences on the stability of the nucleosome. Second, these sequence divergences may change the potential of core histones to be modified. A testis-specific histone code can therefore be generated directing chromatin compaction, histone removal and degradation. Very little is known on the nature of this specific histone code and the way it directs chromatin remodelling in spermatids.

Recently, two factors expressed in spermatids and potentially capable of participating in chromatin

remodelling have been identified [66,88,92]. One of these factors containing two bromodomains, BRDT, has been shown to have the ability to induce *in vitro* and *in vivo* an histone acetylation-dependent chromatin compaction. Histone H4 acetylation occurring in elongating spermatids might primarily be a signal for chromatin condensation. However, more investigations are required to link this acetylation-dependent chromatin compaction to histone removal. With this regard, histone chaperones may play a crucial role. Indeed, it is very plausible that specific chaperones identified to mediate nucleosome assembly [93] may reverse their function and control the dismantlement of nucleosomes in spermatids.

Spermatogenic cells would therefore constitute an excellent source for the discovery of a nucleosome disassembly machinery. The identification of such factors would not only shed light on the molecular basis of chromatin reorganization during spermiogenesis but also give valuable

information on the yet unknown mechanism of nucleosome disassembly.

Acknowledgements

This work was supported by "Région Rhône-Alpes" emergence program. C.L. is supported by "Région Rhône-Alpes" PhD fellowship.

References

- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. & Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260.
- Khochbin, S. (2001) Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* **271**, 1–12.
- Lusser, A. & Kadonaga, J.T. (2003) Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* **25**, 1192–1200.
- Turner, B.M. (1993) Decoding the nucleosome. *Cell* **75**, 5–8.
- Strahl, B.D. & Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45.
- Turner, B.M. (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**, 285–291.
- Khorasanizadeh, S. (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* **116**, 259–272.
- Malik, H.S. & Henikoff, S. (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 882–891.
- Lewis, J.D., Abbott, D.W. & Ausio, J. (2003) A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem. Cell Biol.* **81**, 131–140.
- Drabent, B., Bode, C., Bramlage, B. & Doenecke, D. (1996) Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis. *Histochem. Cell Biol.* **106**, 247–251.
- Iguchi, N., Tanaka, H., Yomogida, K. & Nishimune, Y. (2003) Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *Int. J. Androl.* **26**, 354–365.
- Grimes, S.R., Wolfe, S.A., Anderson, J.V., Stein, G.S. & Stein, J.L. (1990) Structural and functional analysis of the rat testis-specific histone H1t gene. *J. Cell Biochem.* **44**, 1–17.
- Steger, K., Klonisch, T., Gavenis, K., Drabent, B., Doenecke, D. & Bergmann, M. (1998) Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* **4**, 939–945.
- Drabent, B., Saftig, P., Bode, C. & Doenecke, D. (2000) Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochem. Cell Biol.* **113**, 433–442.
- Lin, Q., Sirotkin, A. & Skoultchi, A.I. (2000) Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Mol. Cell Biol.* **20**, 2122–2128.
- Fantz, D.A., Hatfield, W.R., Horvath, G., Kistler, M.K. & Kistler, W.S. (2001) Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis. *Biol. Reprod.* **64**, 425–431.
- De Lucia, F., Faraone-Mennella, M.R., D'Erme, M., Quesada, P., Caiafa, P. & Farina, B. (1994) Histone-induced condensation of rat testis chromatin: testis-specific H1t versus somatic H1 variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 32–39.
- Khadake, J.R. & Rao, M.R. (1995) DNA- and chromatin-condensing properties of rat testes H1a and H1t compared to those of rat liver H1bdec; H1t is a poor condenser of chromatin. *Biochemistry* **34**, 15792–15801.
- Meistrich, M.L., Bucci, L.R., Trostle-Weige, P.K. & Brock, W.A. (1985) Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Dev. Biol.* **112**, 230–340.
- Franke, K., Drabent, B. & Doenecke, D. (1998) Testicular expression of the mouse histone H1.1 gene. *Histochem. Cell Biol.* **109**, 383–390.
- Rabini, S., Franke, K., Saftig, P., Bode, C., Doenecke, D. & Drabent, B. (2000) Spermatogenesis in mice is not affected by histone H1.1 deficiency. *Exp. Cell Res.* **255**, 114–124.
- Lin, Q., Inselman, A., Han, X., Xu, H., Zhang, W., Handel, M.A. & Skoultchi, A.I. (2004) Reductions in linker histone levels are tolerated in developing spermatocytes but cause changes in specific gene expression. *J. Biol. Chem.* **279**, 23525–23532.
- Yan, W., Ma, L., Burns, K.H. & Matzuk, M.M. (2003) HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 10546–10551.
- Albig, W., Ebentheuer, J., Klobeck, G., Kunz, J. & Doenecke, D. (1996) A solitary human H3 histone gene on chromosome 1. *Hum. Genet.* **97**, 486–491.
- Witt, O., Albig, W. & Doenecke, D. (1996) Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp. Cell Res.* **229**, 301–306.
- Trostle-Weige, P.K., Meistrich, M.L., Brock, W.A. & Nishioka, K. (1984) Isolation and characterization of TH3, a germ cell-specific variant of histone 3 in rat testis. *J. Biol. Chem.* **259**, 8769–8776.
- Smith, M.M. (2002) Centromeres and variant histones: what, where, when and why? *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 279–285.
- Albig, W., Bramlage, B., Gruber, K., Klobeck, H.G., Kunz, J. & Doenecke, D. (1995) The human replacement histone H3.3B gene (H3F3B). *Genomics* **30**, 264–272.
- Bramlage, B., Kosciessa, U. & Doenecke, D. (1997) Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation* **62**, 13–20.
- Couldrey, C., Carlton, M.B., Nolan, P.M., Colledge, W.H. & Evans, M.J. (1999) A retroviral gene trap insertion into the histone 3.3A gene causes partial neonatal lethality, stunted growth, neuromuscular deficits and male sub-fertility in transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 2489–2495.
- Akhmanova, A., Miedema, K., Wang, Y., van Bruggen, M., Berden, J.H., Moudrianakis, E.N. & Hennig, W. (1997) The localization of histone H3.3 in germ line chromatin of *Drosophila* males as established with a histone H3.3-specific antiserum. *Chromosoma* **106**, 335–347.
- McKittrick, E., Gafken, P.R., Ahmad, K. & Henikoff, S. (2004) Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 1525–1530.
- Hwang, I. & Chae, C.B. (1989) S-phase-specific transcription regulatory elements are present in a replication-independent testis-specific H2B histone gene. *Mol. Cell Biol.* **9**, 1005–1013.
- Choi, Y.C., Gu, W., Hecht, N.B., Feinberg, A.P. & Chae, C.B. (1996) Molecular cloning of mouse somatic and testis-specific H2B histone genes containing a methylated CpG island. *DNA Cell Biol.* **15**, 495–504.
- Zalensky, A.O., Siino, J.S., Gineitis, A.A., Zalenskaya, I.A., Tomilin, N.V., Yau, P. & Bradbury, E.M. (2002) Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* **277**, 43474–43480.
- van Rooijen, H.J., Ooms, M.P., Spaargaren, M.C., Baarends, W.M., Weber, R.F., Grootegoed, J.A. & Vreeburg, J.T. (1998) Immunoeexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Hum. Reprod.* **13**, 1559–1566.
- Tovich, P.R. & Oko, R.J. (2003) Somatic histones are components of the perinuclear theca in bovine spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **278**, 32431–32438.
- Aul, R.B. & Oko, R.J. (2001) The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with

- the forming acrosome during spermiogenesis. *Dev. Biol.* **239**, 376–387.
39. Rao, B.J., Brahmachari, S.K. & Rao, M.R. (1983) Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *J. Biol. Chem.* **258**, 13478–13485.
 40. Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. & Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* **273**, 5858–5868.
 41. Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, et al. (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* **296**, 922–927.
 42. Pehrson, J.R. & Fried, V.A. (1992) MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* **257**, 1398–1400.
 43. Costanzi, C. & Pehrson, J.R. (2001) MACROH2A2, a new member of the MACROH2A core histone family. *J. Biol. Chem.* **276**, 21776–21784.
 44. Chadwick, B.P., Valley, C.M. & Willard, H.F. (2001) Histone variant macroH2A contains two distinct macrochromatin domains capable of directing macroH2A to the inactive X chromosome. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2699–2705.
 45. Costanzi, C. & Pehrson, J.R. (1998) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**, 599–601.
 46. Perche, P., Voure'h, C., Konecny, L., Souchier, C., Robert-Nicoud, M., Dimitrov, S. & Khochbin, S. (2000) Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density. *Curr. Biol.* **10**, 1531–1534.
 47. Pehrson, J.R., Costanzi, C. & Dharia, C. (1997) Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes. *J. Cell Biochem.* **65**, 107–113.
 48. Rasmussen, T.P., Huang, T., Mastrangelo, M.A., Loring, J., Panning, B. & Jaenisch, R. (1999) Messenger RNAs encoding mouse histone macroH2A1 isoforms are expressed at similar levels in male and female cells and result from alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* **27**, 3685–3689.
 49. HoyerFender, S., Costanzi, C. & Pehrson, J.R. (2000) Histone MacroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Exp. Cell Res.* **258**, 254–260.
 50. Turner, J.M., Burgoyne, P.S. & Singh, P.B. (2001) M31 and macroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis. *J. Cell Sci.* **114**, 3367–3375.
 51. Avner, P. & Heard, E. (2001) X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 59–67.
 52. Ayoub, N., Richler, C. & Wahrman, J. (1997) Xist RNA is associated with the transcriptionally inactive XY body in mammalian male meiosis. *Chromosoma* **106**, 1–10.
 53. HoyerFender, S., Singh, P.B. & Motzkus, D. (2000) The murine heterochromatin protein M31 is associated with the chromocenter in round spermatids and is a component of mature spermatozoa. *Exp. Cell Res.* **254**, 72–79.
 54. Abbott, D.W., Laszczak, M., Lewis, J.D., Su, H., Moore, S.C., Hills, M., Dimitrov, S. & Ausio, J. (2004) Structural characterization of macroH2A containing chromatin. *Biochemistry* **43**, 1352–1359.
 55. Jenuwein, T. & Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science* **293**, 1074–1080.
 56. Candido, E.P. & Dixon, G.H. (1972) Amino-terminal sequences and sites of *in vivo* acetylation of trout-testis histones 3 and IIb 2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **69**, 2015–2019.
 57. Grimes, S.R. Jr, Platz, R.D., Meistrich, M.L. & Hnilica, L.S. (1975) Partial characterization of a new basic nuclear protein from rat testis elongated spermatids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 182–189.
 58. Oliva, R. & Mezquita, C. (1982) Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Res.* **10**, 8049–8059.
 59. Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A.K., Usson, Y., Pelletier, R., Sele, B., Khochbin, S. & Rousseaux, S. (2000) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 950–960.
 60. Verreault, A. (2000) *De novo* nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* **14**, 1430–1438.
 61. Marcon, L. & Boissonneault, G. (2004) Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol. Reprod.* **70**, 910–918.
 62. Kennedy, B.P. & Davies, P.L. (1980) Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins. *J. Biol. Chem.* **255**, 2533–2539.
 63. Kennedy, B.P. & Davies, P.L. (1981) Phosphorylation of a group of high molecular weight basic nuclear proteins during spermatogenesis in the winter flounder. *J. Biol. Chem.* **256**, 9254–9259.
 64. Oliva, R. & Mezquita, C. (1986) Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles *in vitro*. *Biochemistry* **25**, 6508–6511.
 65. Oliva, R., Bazett-Jones, D., Mezquita, C. & Dixon, G.H. (1987) Factors affecting nucleosome disassembly by protamines *in vitro*. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* **262**, 17016–17025.
 66. Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S. & Khochbin, S. (2003) Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol. Cell Biol.* **23**, 5354–5365.
 67. Sims, R.J., Nishioka, K. & Reinberg, D. (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.* **19**, 629–639.
 68. O'Carroll, D., Scherthan, H., Peters, A.H., Opravil, S., Haynes, A.R., Laible, G., Rea, S., Schmid, M., Lebersorger, A., Jerratsch, M., Sattler, L., Mattei, M.G., Denny, P., Brown, S.D., Schweizer, D. & Jenuwein, T. (2000) Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol. Cell Biol.* **20**, 9423–9433.
 69. Peters, A.H., 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**, 323–337.
 70. Prigent, C. & Dimitrov, S. (2003) Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J. Cell Sci.* **116**, 3677–3685.
 71. Zhang, Y., Griffin, K., Mondal, N. & Parvin, J.D. (2004) Phosphorylation of histone H2A inhibits transcription on chromatin templates. *J. Biol. Chem.* **279**, 21866–21872.
 72. Cheung, W.L., Ajiro, K., Samejima, K., Kloc, M., Cheung, P., Mizzen, C.A., Beeser, A., Etkin, L.D., Chernoff, J., Earnshaw, W.C. & Allis, C.D. (2003) Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell* **113**, 507–517.
 73. Mahadevaiah, S.K., Turner, J.M., Baudat, F., Rogakou, E.P., de Boer, P., Blanco-Rodriguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W.M. & Burgoyne, P.S. (2001) Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* **27**, 271–276.
 74. Baarends, W.M., Hoogerbrugge, T.W., Roest, H.P., Ooms, M., Vreeburg, J., Hoeijmakers, J.H.J. & Grootegoed, J.A. (1999)

- Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.* **207**, 322–333.
75. Jason, L.J., Moore, S.C., Lewis, J.D., Lindsey, G. & Ausio, J. (2002) Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays* **24**, 166–174.
 76. Chen, H.Y., Sun, J.M., Zhang, Y., Davie, J.R. & Meistrich, M.L. (1998) Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J. Biol. Chem.* **273**, 13165–13169.
 77. Sung, P., Prakash, S. & Prakash, L. (1988) The RAD6 protein of *Saccharomyces cerevisiae* polyubiquitinates histones, and its acidic domain mediates this activity. *Genes Dev.* **2**, 1476–1485.
 78. Roest, H.P., van Klaveren, J., de Wit, J., van Gorp, C.G., Koken, M.H., Vermey, M., van Rooijen, J.H., Hoogerbrugge, J.W., Vreeburg, J.T., Baarends, W.M., Bootsma, D., Grootegoed, J.A. & Hoeijmakers, J.H. (1996) Inactivation of the HR23B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell* **86**, 799–810.
 79. Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J. & Luger, K. (2000) Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1121–1124.
 80. Korber, P. & Horz, W. (2004) SWRred not shaken; mixing the histones. *Cell* **117**, 5–7.
 81. Palmer, D.K., O'Day, K. & Margolis, R.L. (1990) The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei. *Chromosoma* **100**, 32–36.
 82. Ray-Gallet, D., Quivy, J.P., Scamps, C., Martini, E.M., Lipinski, M. & Almouzni, G. (2002) HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol. Cell* **9**, 1091–1100.
 83. 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**, 51–61.
 84. Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S. & Wu, C. (2004) ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**, 343–348.
 85. Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D. & Rine, J. (2004) A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-Related ATPase swr1p deposits histone variant H2A.Z into Euchromatin. *PLoS Biol.* **2**, online publication E131.
 86. Ai, X. & Parthun, M.R. (2004) The nuclear Hat1p/Hat2p complex: a molecular link between type B histone acetyltransferases and chromatin assembly. *Mol. Cell* **14**, 195–205.
 87. Lee, Y.H. & O'Rand, M.G. (1993) Ultrastructural localization of a nuclear autoantigenic sperm protein in spermatogenic cells and spermatozoa. *Anat. Rec.* **236**, 442–448.
 88. Caron, C., Pivot-Pajot, C., Van Grunsven, L.A., Col, E., Lestrat, C., Rousseaux, S. & Khochbin, S. (2003) Cdy1: a new transcriptional co-repressor. *EMBO Report* **4**, 877–882.
 89. Zeng, L. & Zhou, M.M. (2002) Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.* **513**, 124–128.
 90. Umehara, T. & Horikoshi, M. (2003) Transcription initiation factor IID-interactive histone chaperone CIA-II implicated in mammalian spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 35660–35667.
 91. Fischle, W., Wang, Y. & Allis, C.D. (2003) Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* **425**, 475–479.
 92. Lahn, B.T., Tang, Z.L., Zhou, J., Barndt, R.J., Parvinen, M., Allis, C.D. & Page, D.C. (2002) Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 8707–8712.
 93. Akey, C.W. & Luger, K. (2003) Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 6–14.
 94. Marzluff, W.F., Gongidi, P., Woods, K.R., Jin, J. & Maltais, L.J. (2002) The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics* **80**, 487–498.
 95. Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. & Deleage, G. (2000) NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 147–150.
 96. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I. & Metz, F. (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305–308.
 97. Ramakrishnan, V., Finch, J.T., Graziano, V., Lee, P.L. & Sweet, R.M. (1993) Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature* **362**, 219–223.

V.2. Expression d'histones H3 spécifiques du testicule dans des cellules somatiques

V.2.1. Principaux résultats

L'échange d'une histone par un variant induit une différence fonctionnelle au sein de chaque nucléosome concerné. Les variants d'histone sont ainsi des régulateurs clés de l'organisation fonctionnelle de la chromatine. Des études protéomiques à grande échelle ont permis d'identifier de nombreux variants d'histone, et ont montré récemment que des cellules somatiques mammifères expriment une diversité de variants d'H3 que l'on pensait restreint au testicule.

Quatre histones H3 sont connues pour être exprimés dans les cellules somatiques. H3.1 et H3.2 sont synthétisés lors de la réplication. H3.3 est exprimé de manière constitutive et est enrichi dans les sites de transcription actifs, et CENP-A est associé spécifiquement aux centromères. Une étude protéomique a identifié H3t parmi les 692 protéines présentes dans les nucléoles de cellules HeLa. H3t est un variant spécifique du testicule (voir Introduction III.2.2) et aucune étude n'avait rapporté à ce jour une expression d'H3t en dehors du testicule.

Deux autres études protéomiques ont identifié deux autres variants inconnus de l'histone H3 dans un contexte d'apoptose induite par PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) et de carcinome hépatique.

Le séquençage de plusieurs génomes mammifères a mis en évidence plusieurs gènes codants potentiellement des variants d'histone. Cependant, aucune donnée EST (*Expressed Sequence Tag*) ne détecte leur expression, ce qui ne permet pas de savoir si ces gènes sont fonctionnels. Les approches protéomiques suggèrent actuellement que certains pourraient être néanmoins exprimés. Le variant H3.4 constitue un exemple caractéristique. Son gène a été identifié en 1981, mais aucune donnée n'attestait sa fonctionnalité. Récemment un variant d'H3, similaire à H3.4, a été identifié parmi les protéines présentes dans le corps intermédiaire (« midbody ») de cellules CHO.

Enfin, il est connu que les cellules cancéreuses expriment certaines histones spécifiques du testicule, reliant les profils d'expression des variants d'histone à l'état physiopathologique des cellules. L'expression ectopique de variants d'histone lors de la transformation cancéreuse pourrait

notamment engendrer des modifications chromatiniennes capable de faciliter processus de cancérisation.

V.2.2. Article publié

Cette étude a été publiée en 2005 dans *Trends in Biochemical Sciences*. J'ai participé à la synthèse des données et à la rédaction de ce commentaire.

Table 1. Summary of the snorkeling and anti-snorkeling behavior of different residues in the TM and interface regions

Region	Polar	Hydrophobic	Amphopathic
Transmembrane region	Snorkel	Anti-snorkel	Snorkel
Interface region	Snorkel	Anti-snorkel	Anti-snorkel

the N termini of helices, whereas hydrophobic residues (e.g. alanine, valine and isoleucine) and tyrosine are concentrated at the C termini. Because residue side chains tend to point towards the N termini in α helices, this makes N-terminal locations more favorable for polar residues to snorkel. Tyrosine has a special rotamer to enable its hydroxyl group to extend further from the core region, hence, tyrosine is more favored at the C termini. The biased locations of residues can be largely explained by the available side-chain rotamers and the propensity to snorkel.

Concluding remarks

The work of Granseth and colleagues opens up a new area for the study of membrane-protein biochemistry. Now, with the well-defined interface region and a clear picture of its constraints on structures of membrane proteins, we can start to ask new questions. For example, do interface helices form only in the constrained environment of the regions bordering the membrane? If the sequences of interface helices are introduced into soluble proteins, will they still form stable helical structures? Does the entropic effect of end-to-end distances for loops connecting two TM helices differ from that of soluble proteins? How can such thermodynamic considerations help to suggest mutants for enhanced stability or dynamics?

Undoubtedly, future studies of the interface region will facilitate understanding of the folding mechanisms of membrane proteins, and might lead to the development of engineering principles for designing novel and fully functional membrane proteins.

References

- 1 Popot, J.L. and Engelman, D.M. (2000) Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 881–922
- 2 von Heijne, G. (1986) The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the transmembrane topology. *EMBO J.* 5, 3021–3027
- 3 Arkin, I.T. and Brunger, A.T. (1998) Statistical analysis of predicted transmembrane α -helices. *Biochim. Biophys. Acta* 1429, 113–128
- 4 Senes, A. *et al.* (2000) Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with β -branched residues at neighboring positions. *J. Mol. Biol.* 296, 921–936
- 5 Weiss, M.S. *et al.* (1991) Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* 254, 1627–1630
- 6 Adamian, L. and Liang, J. (2002) Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: polar clamps and serine zippers. *Proteins* 47, 209–218
- 7 Eilers, M. *et al.* (2002) Comparison of helix interaction in membrane and soluble α -bundle proteins. *Biophys. J.* 82, 2720–2736
- 8 Senes, A. *et al.* (2001) The C_α-H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9056–9061
- 9 Choma, C. *et al.* (2000) Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nat. Struct. Biol.* 7, 161–166
- 10 Zhou, F.X. *et al.* (2000) Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nat. Struct. Biol.* 7, 154–160
- 11 Chamberlain, A.K. *et al.* (2004) Snorkeling preferences foster an amino acid composition bias in transmembrane helices. *J. Mol. Biol.* 339, 471–479
- 12 Chamberlain, A.K. and Bowie, J.U. (2004) Analysis of side-chain rotamers in transmembrane proteins. *Biophys. J.* 87, 3460–3469
- 13 Beuming, T. and Weinstein, H. (2004) A knowledge-based scale for the analysis and prediction of buried and exposed faces of transmembrane domain proteins. *Bioinformatics* 20, 1822–1835
- 14 Adamian, L. *et al.* (2005) Empirical lipid propensities of amino acid residues in multispans α helical membrane proteins. *Proteins* 59, 496–509
- 15 Hessa, T. *et al.* (2005) Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* 433, 377–381
- 16 Granseth, E. *et al.* (2005) A study of the membrane-water interface region of membrane proteins. *J. Mol. Biol.* 346, 377–385
- 17 White, S.H. and Wimley, W.C. (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 319–365

0968-0004/\$ - see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.tibs.2005.05.003

Testis-specific histone H3 expression in somatic cells

Jérôme Govin, Cécile Caron, Sophie Rousseaux and Saadi Khochbin

INSERM U309 – Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation Équipe Chromatine et expression des gènes
Institut Albert Bonniot Faculté de Médecine, Domaine de la Merci 38706 La Tronche Cedex, France

Histone variants functionally differentiate individual nucleosomes and, hence, act as key regulators of chromatin structure and function. Large-scale proteomic projects are now valuable sources of histone-variant

discovery, showing, in particular, that somatic mammalian cells express a larger panel of histone H3 variants than previously thought, including testis-specific variants and as yet uncharacterized species. These data also suggest a tight relationship between the complexity of histone-variant expression and physiopathological states of the cells.

Corresponding author: Khochbin, S. (khochbin@ujf-grenoble.fr).

Available online 26 May 2005

Actors of nucleosome differentiation

The basic repeating unit of the genome packaging structure in eukaryotes is the nucleosome, itself composed of an octamer of the four core histones H3, H4, H2A and H2B. A fifth histone, the linker histone or H1, directs the formation of a higher-order structure in the nucleosomal array. In addition to their structural role, histones might also serve as indicators, signalling the nature of the packaged DNA via their post-translational modifications [1]. Indeed, these modifications provide the complexity necessary to regionally and functionally specify the nucleosomes. The functional diversity of nucleosomes is increased by the incorporation of histone variants [2,3]. The genes encoding most of the histones are organized in clusters and have evolved to couple histone synthesis to DNA replication [4]. However, nucleosome assembly can also occur independently of DNA replication, involving histones with divergent sequences. These histone variants are mostly encoded by solitary genes that escape the regulatory constraints of replication-dependent genes but have acquired sensitivity to other signalling pathways such as those controlling embryonic development and cell differentiation [5]. Therefore, the regulatory circuits of histone gene expression, in addition to the primary sequence of the encoding genes, are both of highest importance to achieve a specific chromatin organization at the right time and place. Accordingly, some of the histone variants are essentially expressed in a tissue-specific manner. The testis best exemplifies this situation in which a massive synthesis of histone variants accompanies a dramatic genome reorganization, which takes place in the maturing germ cells and is characterized by the replacement of the majority of the histones by transition proteins and protamines [6]. Almost all known histone variants, including a panel of testis-specific histone members, are synthesized before and during the assembly of transition proteins and protamines (Figure 1). Although almost nothing is known about the structural and functional properties of the testis-specific histone variants, recent investigations indicate that at least some

members have a crucial role in nuclear condensation and genome reorganization [7].

Expression of new histone H3 variants in somatic cells

Somatic mammalian cells are known to express only four histone H3 variants: H3.1 and H3.2 are synthesized in a replication-dependent manner, whereas H3.3 is constitutively expressed and is enriched in transcriptionally active chromatin regions, and CENP-A (centromere protein A) is specifically associated with centromeres [2,3]. In addition to these variants, one human H3 variant, H3t – considered as testis-specific – has been reported [8] (Figure 2). The recent revolution in protein identification techniques now enables a comprehensive analysis of the proteome of distinct subcellular structures. Surprisingly, examination of the list of histones detected by these approaches shows that, at least in the case of H3, the number of variants expressed in somatic cells is larger than previously thought. Indeed, the identification of 692 proteins present in HeLa-cell nucleoli has shown that H3t is among the histones [9]. Histone H3t is normally expressed in human primary spermatocytes, and the analysis of multiple human cell lines, including HeLa cells and normal tissues, by RNase-protection assays shows no evidence for its expression outside the testis [8]. There is no information available on the expression of the H3t protein in spermatogenic cells or on its intra-nuclear localizations. Therefore, it would be interesting to know whether H3t specifically locates in the nucleoli chromatin of HeLa cells and, moreover, where it locates in the chromatin of meiotic and post-meiotic spermatogenic cells. It is possible that, like H3.3, H3t marks functionally defined chromatin regions.

Large-scale quantitative proteome studies undertaken to evaluate quantitative and qualitative changes in the proteome occurring during particular physiopathological processes also revealed the expression of as yet unknown histone H3 variants. One such study, aiming to identify proteins with concentrations that vary during the early stages of apoptosis after induction of PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis), has shown that an uncharacterized human histone variant is down-regulated in this process [10]. Although no expressed sequence tag (EST) corresponding to the reported protein could be found in the databanks, a single cDNA from human testis encoding a related and, as yet, uncharacterized histone H3 could be identified (GenBank accession number: BI460089), suggesting that it could also correspond to another testis-specific H3 variant. A second study that compared the proteome of human hepatocellular carcinoma with that of normal hepatocytes also revealed the up-regulation of another unknown histone H3 variant in cancerous cells [11].

With completion of the various genome-sequencing projects, one might expect an easy identification of all the genes encoding histone variants. In fact, the analysis of available mammalian genomic sequences databanks reveals the existence of several putative histone H3-encoding genes, dispersed in the genome of human, mouse and rat, harbouring sometimes very divergent sequences. However, in most cases, a search in the EST

Variants		
H1	H1.1-H1.5, H1°	H1t, H1t2, HILS1
H3	H3.1, H3.2, H3.3, CENP-A	H3t
H2A	H2A.X, H2A.Z, macroH2A, H2Abbd	TH2A
H2B		TH2B, TSH2B, H2BFWT
	Somatic cells	Spermatogenic cells

Figure 1. Spermatogenic cells express all the known histone variants. In addition to histone variants expressed in somatic cells (blue), spermatogenic cells express a panel of specific members (yellow) [6]. Known histone variants expressed in human somatic and spermatogenic cells are listed. H1.1–H1.5 signifies histone H1 variants number one to number five. Histone H2BFWT has been recently identified [15].



Figure 2. Sequence analysis of mammalian histone H3 variants. The sequence of the four known H3 variants expressed in human somatic cells is compared to that of testis-specific H3t variant. H3 peptides identified in HeLa cells nucleoli are outlined by black rectangles [13]. Amino acids are numbered based on the H3.1 sequence. GenBank accession numbers: H3.1, AAN10051; H3.2, AAN39283; H3.3, P84243; H3t, NP_003484; CENP-A, P49450.

databanks does not show any evidence for their expression. It is, therefore, difficult to determine if these are functional genes. Proteomic data now suggest that at least some of them are functional genes. The gene encoding H3.4 illustrates this situation well; indeed, a gene encoding a H3 variant was identified in 1981 and later named H3.4 with no evidence for its functionality [12]. Now a comprehensive proteomic analysis of the components of the mid-body isolated from synchronized CHO cells shows the presence of a H3.4-related histone H3 in this structure [13]. These data show for the first time that proteomic approaches might be much more powerful than the transcriptomic methods in the discovery of functional genes that encode new histone variants. Indeed, some of the genes, such as those encoding testis-specific histone variants, might be expressed at very low levels in somatic cells, or might encode unstable mRNAs, or be expressed only in response to specific physiopathological stimuli, resulting in an under-representation of their corresponding cDNAs in the EST databanks. By contrast, the putative encoded proteins, although expressed at low levels, could accumulate in specific cellular compartments and therefore be identified by proteomic analyses.

Concluding remarks

These new findings show that a complex set of histone H3 variants could permanently, or occasionally, be expressed in various cell types and emphasize their role in the functional differentiation of nucleosomes. It is also important to keep in mind that the increased complexity of the expression of histone H3 variants, mainly that of testis-specific members, might primarily concern oncogenically transformed cells. Indeed, although the expression of testis-specific histone variants in tumour cells has not been previously reported, it has been known for many years that cancer cells express a variety of testis-specific proteins [14]. Therefore, it would be worth considering the possibility that, at an early stage of malignant transformation of a cell, an initial alteration of DNA methylation and chromatin structure might induce an illegitimate expression of a variety of histone variants, mainly

testis-specific members, thereby triggering a more extensive modification of chromatin structure and function, which could, in turn, actively enhance cell transformation.

Acknowledgements

This work is supported by the 'Action Concertée Incitative' and 'Région Rhône Alpes' emergence programs.

References

- 1 Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45
- 2 Sarma, K. and Reinberg, D. (2005) Histone variants meet their match. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 139–149
- 3 Henikoff, S. *et al.* (2004) Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet.* 20, 320–326
- 4 Marzluff, W.F. *et al.* (2002) The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics* 80, 487–498
- 5 Khochbin, S. (2001) Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* 271, 1–12
- 6 Govin, J. *et al.* (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.* 271, 3459–3469
- 7 Martianov, I. *et al.* (2005) Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2808–2813
- 8 Witt, O. *et al.* (1996) Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp. Cell Res.* 229, 301–306
- 9 Andersen, J.S. *et al.* (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433, 77–83
- 10 Gu, S. *et al.* (2004) Large-scale quantitative proteomic study of PUMA-induced apoptosis using two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry coupled with amino acid-coded mass tagging. *J. Proteome Res.* 3, 1191–1200
- 11 Li, C. *et al.* (2004) Accurate qualitative and quantitative proteomic analysis of clinical hepatocellular carcinoma using laser capture microdissection coupled with isotope-coded affinity tag and two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 399–409
- 12 Sittman, D.B. *et al.* (1981) Isolation of two clusters of mouse histone genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4078–4082
- 13 Skop, A.R. *et al.* (2004) Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science* 305, 61–66
- 14 Scanlan, M.J. *et al.* (2004) The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* 4, 1
- 15 Churikov, D. *et al.* (2004) Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics* 84, 745–756

CHAPITRE II : RESULTATS

I. Dynamique de l'épigénome au cours de la spermiogénèse

Mon projet de thèse a démarré par une caractérisation précise du code des histones au cours de la spermatogénèse.

Le premier article présentera l'évolution des marques épigénétiques de l'hétérochromatine péricentrique au cours de la spermiogénèse. La reprogrammation de ce domaine d'hétérochromatine constitutive passe par une combinaison originale de modifications post traductionnelles, avant d'être envahi par des nouveaux variants d'histones. De plus, l'incorporation de ces variants d'histones est associée à une structuration originale de la chromatine, sous une forme non nucléosomale.

Le second article analyse la structure de la chromatine des régions de contrôle de l'empreinte parentale dans le cadre de la spermiogénèse. L'expression monoallélique de gènes soumis à empreinte parentale est dirigée par une région d'ADN appelée ICR (*Imprinting Control Region*). Lors de la spermiogénèse, nous montrons que les régions soumises à une empreinte maternelle et paternelle ne portent pas les mêmes combinaisons de modifications d'histones. Ces différences pourraient expliquer le maintien de l'empreinte paternelle face à la déméthylation massive du génome mâle lors de la fécondation.

Enfin le troisième article discutera le rôle fonctionnel d'une modification post transcriptionnelle particulière. En effet, la phosphorylation de la sérine 1 de l'histone H4 (H4S1P) est une marque récemment étudiée, impliquée dans la réparation des cassures doubles brins (Cheung *et coll.*, 2005). Nos travaux ont montré que cette marque serait associée au remodelage post méiotique de la

chromatine. De plus, son rôle a été conservé au cours de l'évolution puisque H4S1P est détectée dans la phase post méiotique de la sporulation chez la levure, au cours de la spermiogénèse chez la drosophile et chez la souris. Enfin, le rôle fonctionnel d'H4S1P sera discuté.

I.1. Reprogrammation de l'hétérochromatine péricentrique au cours de la spermiogénèse murine

I.1.1. Principaux résultats

~ Acétylation de l'hétérochromatine péricentrique durant la spermiogénèse

Une caractérisation fine de la cinétique d'acétylation des histones a été réalisée par immunofluorescence sur des tubules séminifères microdisséqués. Une hyperacétylation générale du noyau des spermatides est détectée au début de l'allongement des spermatides, plus particulièrement au niveau des lysines 5, 8 et 12 de l'histone H4. Dans les stades suivants, le signal d'acétylation se restreint à une région centrale. Cette région a été identifiée comme étant les satellites majeurs, une région d'hétérochromatine constitutive péricentromérique. Des immunoprécipitations de chromatine ont confirmé l'état acétylé des satellites majeurs.

~ L'hétérochromatine péricentrique présente une combinaison nouvelle de modifications d'histones

Les histones acétylées sont généralement exclues de l'hétérochromatine, ce qui nous a amené à vérifier le devenir des marques hétérochromatiques habituelles, telle que la présence d'HP1 et d'une triméthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9me3). HP1 est bien présente sur les satellites majeurs des spermatides rondes, mais n'est plus détectée dès que les histones sont hyperacétylées. Au contraire d'HP1, H3K9me3 persiste dans les spermatides allongées et colocalise avec la zone détectée par l'anticorps anti H4 acétylé. Cependant, une analyse détaillée de la distribution d'H3K9me3 et H4ac montre que ces deux marques ne colocalisent pas strictement, et que certains sous domaines sont enrichis en l'une des deux marques. Cet état reflète probablement la dynamique de réorganisation de l'hétérochromatine péricentrique à ce stade de différenciation.

~ ***L'hétérochromatine péricentromérique est organisée en nucléosomes et en structures non nucléosomales***

Nous nous sommes alors demandé si une structure chromatinienne particulière distingue les péricentromères dans les stades tardifs de différenciation. Une approche biochimique, basée sur l'utilisation de la nucléase micrococciale, a été développée sur des spermatides de stade 12-16. Deux types de structuration de la chromatine ont été détectés : une structure de type nucléosomale et une nouvelle structure, non nucléosomale et spécifique aux spermatides. Ces deux types de structures sont enrichies au sein des satellites majeurs, et suggèrent qu'un état épigénétique particulier est maintenu après la disparition des marques d'histones.

~ ***Identification de trois nouveaux variants d'histones***

Cette nouvelle structure non nucléosomale est présente uniquement dans les stades tardifs de la spermatogénèse, suggérant l'implication de protéines spécifiques. Une approche protéomique a permis d'identifier l'ensemble des histones présentes dans les spermatides condensées. Outre les histones canoniques et les variants d'histones attendus, trois nouveaux variants d'histone ont été identifiés, baptisés H2AL1, H2AL2 et H2BL1 en raison de leur similarité à H2A et H2B. Ces variants sont spécifiques du testicule, et enrichis dans les derniers stades de la spermatogénèse. H2AL1/L2 sont maintenus au sein des spermatozoïdes, et probablement transmis par le gamète mâle.

~ ***H2AL1/L2 sont présents au sein des structures non nucléosomales des péricentromères***

La distribution d'H2AL1/L2, analysée par immunofluorescence, indique que ces variants sont incorporés après la vague d'acétylation, mais avant l'apparition des protamines. De plus, H2AL1/L2 s'accumulent spécifiquement au sein de l'hétérochromatine péricentrique des spermatides allongées.

Cet enrichissement nous a amené à vérifier si l'association d'H2AL1/L2 est liée à la structure chromatinienne des satellites majeurs. Les structures nucléosomales et non nucléosomales ont été purifiées sur gradient de sucrose, et leur contenu protéique a été analysé. Les histones conventionnelles cofractionnent seulement avec les nucléosomes conventionnels et ne sont pas détectés au sein des structures non nucléosomales. A l'opposé, H2AL1/L2 cofractionnent

uniquement avec les structures non nucléosomales, suggérant un rôle fonctionnel au sein de ces structures.

~ ***H2AL1/L2 s'associent avec TH2B pour former des nucléosomes moins stables***

H2AL1/L2 ont été transfectés transitoirement dans des cellules somatiques, afin d'évaluer leur capacité à réorganiser la chromatine dans un contexte non spermatique. Nous montrons ainsi *ex vivo* que H2AL1/L2 sont bien incorporés au sein de nucléosomes. Cette incorporation serait facilitée en présence du variant TH2B, et les nucléosomes formés sont moins stables que des nucléosomes conventionnels.

L'ensemble de ce travail met en évidence une reprogrammation complexe de l'hétérochromatine péricentrique, caractérisée par un code des histones original, un nouveau mode de structuration de la chromatine et l'implication de nouveaux variants d'histone. Il est tentant de penser que cette réorganisation des satellites majeurs, au même titre que le maintien d'H2AL1/L2 au sein des spermatozoïdes, code une information épigénétique transmise par le pronoyau mâle lors de la fécondation.

1.1.2. Article en révision

L'ensemble de ce travail a été soumis à *Journal of Cell Biology* en 2006 et est actuellement en révision. Il sera présenté page suivante.

Mon implication personnelle a porté sur la caractérisation des modifications des histones et du profil épigénétique de l'hétérochromatine péricentromérique. J'ai participé au développement d'outils techniques utilisés dans l'étude de la structuration de la chromatine et des variants d'histones. J'ai également participé à la conception et à la rédaction du manuscrit.

Manuscript number: 200604141

Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis

Jérôme Govin^{1§}, Emmanuelle Escoffier^{1§}, Sophie Rousseaux¹, Laurianne Kuhn², Myriam Ferro², Julien Thévenon¹, Raffaella Catena³, Irwin Davidson³, Jérôme Garin², Saadi Khochbin^{1*} and Cécile Caron^{1*}

1- INSERM U309/Université Joseph-Fourier, F-38706 La Tronche, France

2- INSERM ERM 0201/CEA/ Université Joseph-Fourier, F-38054 Grenoble, France.

3- IGBMC/CNRS/INSERM/Université Louis Pasteur, F-67404 Illkirch, France.

[§] Contributed equally to this work

* To whom correspondence should be addressed

Cecile.Caron@ujf-grenoble.fr, Khochbin@ujf-grenoble.fr. Inserm U309, Institut Albert Bonniot – Domaine de la Merci - 38706 La Tronche Cedex, FRANCE. Tel: 33 476 54 95 83, Fax: 33 476 54 95 95.

Character count: 44601

Running title: Reprogramming of male pericentric heterochromatin

Keywords: spermatogenesis, epigenetic, chromocenter, histone methylation, HP1

Abstract

During male germ cells post-meiotic maturation, dramatic chromatin reorganization occurs, which is driven by completely unknown mechanisms. Here, for the first time, a specific reprogramming of mouse pericentric heterochromatin is described. Initiated when histones undergo global acetylation in early elongating spermatids, this process leads to the establishment of new DNA packaging structures organizing the pericentric regions in condensing spermatids. Five new histone variants were discovered, which are expressed in late spermiogenic cells. Two of them, which we named H2AL1 and H2AL2, specifically mark the pericentric regions in condensing spermatids and participate in the formation of new nucleoprotein structures. Moreover, our investigations also suggest that TH2B, an already identified testis-specific H2B variant of unknown function, could provide a platform for the structural transitions accompanying the incorporation of these new histone variants.

Introduction:

During the post-meiotic maturation of male haploid germ cells, or spermiogenesis, the DNA is re-packaged in a process involving a dramatic chromatin reorganization (Caron et al., 2005). At the onset of spermiogenesis, round spermatids inherit a nucleosome-based chromatin organization, which is progressively re-structured while the genome undergoes condensation. A wave of global histone acetylation marks the initial steps of this process in elongating spermatids and precedes their replacement in condensing spermatids, first by transition proteins, TP1 and TP2, and then by protamines. The latter ensure tight DNA packaging by the establishment of multiple intra-protein cross-links (Lewis et al., 2003b; Oliva and Dixon, 1990).

This textbook vision of mammalian spermiogenesis is now challenged by findings suggesting that the DNA is actually not homogeneously packed within the spermatozoa (Rousseaux et al., 2005). Approximately 10-15% of histones are retained in the human sperm nucleus, heterogeneously distributed within the genome, with an enrichment in specific loci such as imprinted genes or genes expressed during early embryogenesis (Gardiner-Garden et al., 1998; Wykes and Krawetz, 2003). Moreover, a large diversity of somatic-type or testis-specific histone variants become associated with the DNA in germ cells (Govin et al., 2004; Kimmins and Sassone-Corsi, 2005; Lewis et al., 2003a), some of them presenting a heterogeneous distribution within the spermatids or mature sperm nucleus (Martianov et al., 2005; Zalensky et al., 2002). In addition, heterochromatin regions seem to maintain a distinct organisation during spermiogenesis, since telomeres were shown to be enriched in somatic type core histones and H2B variants (Churikov et al., 2004; Gineitis et al., 2000; Wykes and Krawetz, 2003; Zalensky et al., 2002), and centromeres maintain some of their somatic specific marks such as an enrichment in the histone H3 variant CENP-A in spermatozoa (Palmer et al., 1990).

These observations suggest that the genome undergoes a regional differentiation during mammalian spermiogenesis. The exact nature of this differential reorganization of the genome and the molecular mechanisms driving it are unknown. One possibility is that this process could initially be built from differential marks inherited from early germ cells. In fact, pericentric heterochromatin is characterized by a specific histone code including a K9 trimethylation of histone H3 (H3K9me3), and its association with non-histone proteins including the HP1 family members (Maison and Almouzni, 2004). These large regions surrounding the centromeres are mainly composed of satellite repeats, named the major satellites in the mouse, generally assembled in clusters known as “chromocenters” (Guenatri et al., 2004). After the completion of meiosis, the pericentric heterochromatin still harbours somatic features (O'Carroll et al., 2000; Peters et al., 2001). However, in mouse round spermatids, it undergoes a very unique reorganization characterised by the assembly of all pericentric regions into a single large chromocenter. A very interesting and unanswered question is whether this distinct feature could be the first step of a specific reprogramming of pericentric heterochromatin in male haploid germ cells.

To investigate this issue, we undertook a step-by-step exploration of the chromocenter organization during mouse spermiogenesis. An increase in histone acetylation had previously been observed in early elongating spermatids (Hazzouri et al., 2000). A close inspection of histone modifications during spermatid elongation reveals that, pericentric heterochromatin exhibits very unusual characteristics combining active and repressive histone marks. Moreover, at later stages of spermiogenesis, nucleosomal structures containing acetylated histones are retained on the major satellites when most histones have been removed elsewhere. Finally, the investigation of nucleo-protein structures organizing the genome in condensing spermatids, has led to the identification of several new H2A and H2B histone variants. Two of them, named H2AL1 and H2AL2, were found in new DNA-packaging

structures, which specifically re-organize the major satellite DNA in condensed spermatids. Altogether, these data highlight specific processes activated after meiosis and establishing a differential organisation of pericentric heterochromatin during mouse spermiogenesis.

Results:

Pericentric heterochromatin acetylation during post-meiotic reorganization of the male genome.

During post-meiotic chromatin reorganization in male germ cells, a global hyperacetylation of histones occurs, which precedes their removal (Hazzouri et al., 2000). In order to better characterize these events, the kinetics of the core histones hyperacetylation and disappearance has been followed by immunofluorescence on micro-dissected squash preparations of seminiferous tubules, using an antibody recognizing the tetra-acetylated H4 N-terminal tail (H4ac). Round spermatids (steps 2-6) are weakly stained by the antibody (Fig. 1A). In early elongating spermatids (step 8), H4 acetylation clearly increases, and is homogeneously distributed throughout the whole nucleus. At later stages (steps 9-10), the signal for acetylated H4 globally decreases, except in a central domain, which is also intensely stained with DAPI (Fig. 1A, arrows). Finally, in step 11 condensed spermatids, acetylated H4 has completely disappeared.

In elongating step 9-10 spermatids, this restricted central area of the nucleus, where acetylated H4 remains, could correspond to a region where the genome is differentially reorganised. Because of its intense DAPI staining, we hypothesized this domain, could correspond to the A/T-rich pericentric constitutive heterochromatin, composed of the mouse major satellites repeats. In order to investigate this point, immuno-FISH assays were performed, where acetylated H4 was first detected by immunofluorescence (IF) and the major satellites were then localised by FISH, on the same germ cells. As expected, the major satellites were detected in the identifiable chromocenter of round spermatids (Fig. 1B, picture 2). The DAPI dense regions of step 9-10 elongating spermatids were also completely stained by the major satellites probes (Fig. 1B, pictures 6 and 10), confirming that they indeed

correspond to pericentric heterochromatin. A close analysis of pericentric heterochromatin shows that it undergoes important changes during spermatid maturation. In round spermatids, it is underacetylated and co-localizes with the round shaped chromocenter. In elongating spermatids, it becomes enriched in acetylated histone H4, while undergoing de-compaction and spreading within the nucleus (Fig.1B, compare picture 1 to pictures 5 and 9. Please note that the acquisition of the H4 acetylation signal in round spermatids was enhanced compared to that in Figure 1A, in order to give better evidence of the unacetylated state of pericentric heterochromatin in round spermatids compared to the hypoacetylated state of the rest of the genome).

We further aimed to identify the H4 lysines targeted by acetylation within pericentric heterochromatin. We had previously observed that the global acetylation increase in elongating spermatids mainly affects K5, K8 and K12 residues of histone H4, but not K16 (not shown). Here, IF with specific antibodies, shows that all three acetylated lysines acK5, acK8 and acK12 are associated with the major satellite region in elongating spermatids (Fig. 1C).

ChIP experiments were finally performed to ensure that the major satellite sequences were indeed associated with acetylated H4. Chromatin fibres were extracted from pooled spermatids purified from mouse testes, and immunoprecipitated using antibodies against H4ac or H3K9me3. The efficiency and specificity of the immunoprecipitation were controlled by western blots (Fig. 1D). A significant amount of major satellites was detected by PCR in the anti-H4ac immunoprecipitated material (Fig. 1E). As expected the major satellite sequences were also associated with H3K9me3, a histone modification also present with pericentric heterochromatin in round spermatids (see (Peters et al., 2001) and Fig. 2).

A new combination of histone marks in pericentric heterochromatin of elongating spermatids.

This unusual accumulation of acetylated histone in spermatids pericentric heterochromatin led us to investigate the fate of known heterochromatin marks, such as HP1 binding and H3K9 trimethylation in these cells.

HP1-beta was present in the chromocenter of round spermatids, but disappeared at later stages when H4 acetylation accumulated (Fig. 2A), showing a tight relationship between the presence of acetylated H4 in pericentric heterochromatin and the removal of HP1-beta at the beginning of the elongation process.

In contrast, trimethylation of H3K9, easily detectable in the round spermatids chromocenter, does not disappear in elongating spermatids when H4 acetylation takes place (Fig. 2B). Interestingly, during a short period of their developmental stage, corresponding to step 9 spermatids, both marks were localized in pericentric heterochromatin of all cells. A detailed analysis of both modifications in these cells was performed by confocal microscopy. The intensity of H4Ac and H3K9me3 signals, respectively revealed by Alexa 546 (red) and Alexa 488 (green) fluorochromes, were quantified: for each detection, a region containing values above 50% of maximal fluorescence was delimited (Fig. 2C, red and green borders, panels 4-8), and a quantification of fluorescence was shown along an axis and reported on a diagram (Fig. 2D). Similar experiments were performed by reversing the fluorochromes (H4Ac signal in green and H3K9me signal in red), so that artefacts due to differential bleaching or sensitivity could be ruled out (Suppl. Fig. 1). It shows that the signals for H4 acetylation and H3K9 tri-methylation actually do not strictly co-localize (see diagrams of Fig. 2D, and Suppl. Fig 1B). This observation suggests the existence, within the analyzed domain, of sub-regions where nucleosomes harbour either one or the other modification, and probably not both simultaneously. This partial colocalization of the two histone marks might reflect a

dynamic process reorganizing pericentric heterochromatin at this specific stage of maturation (step 9 spermatids), with a progressive invasion of the major satellite region by H4 acetylation.

Altogether, these data show that during early spermiogenesis, pericentric heterochromatin undergoes a transition from a somatic-like epigenetic state (which includes histone hypoacetylation, H3K9 trimethylation, and HP1 binding) into a completely new state, with persistent H3K9me3, but an absence of HP1 and an unusual accumulation of H4 acetylation. These observations clearly indicate a distinct behaviour of pericentric heterochromatin during post-meiotic chromatin reorganization in male germ cells.

Nucleosomes and new DNA packaging structures organize pericentric heterochromatin during late spermiogenesis.

We further aimed to determine whether pericentric regions would also harbour specific chromatin features at later stages of spermiogenesis, after disappearance of acetylated H4 and trimethylated H3K9 in condensing spermatids (see Fig. 2A and 2B, pictures 10). Indeed, at this stage, either the modifications could be removed, leaving the histones in place, or the modified histones themselves could be displaced and degraded. In order to investigate the possibility of a nucleosomal structure remaining in the pericentric heterochromatin of condensing spermatids, we chose a biochemical approach. Step 12-16 condensing spermatids were purified from mouse testes. Their extreme compaction renders their nuclei completely resistant to MNase digestion by the classical assays developed for somatic cells. Therefore, we first had to partially de-condense them in a detergent-containing buffer, in order to obtain a soluble nuclear extract, and a chromatin-containing pellet, which was then submitted to MNase fractionation (Suppl. Fig. 2A, Protocol 1). The MNase-solubilized fraction was then separated by centrifugation from an insoluble pellet.

The analysis of the DNA present in the MNase solubilized fraction, shows that a prolonged digestion by MNase, produces a single MNase-resistant DNA fragment of the expected nucleosomal size, about 150 bp, indicating that at least part of the nucleosomal chromatin of condensing spermatids was indeed obtained with this procedure (Fig. 3B). Accordingly, core histones were abundantly released by MNase digestion (Suppl. Fig. 2B, H2A, H2B and H4 panels).

Surprisingly, this procedure also generated an additional DNA band, that migrated faster than the nucleosomal DNA fragment, and that was more sensitive to MNase digestion (Fig. 3B). An electrophoretic analysis on a concentrated agarose gel with small size DNA markers confirmed that this band essentially corresponds to a discrete DNA fragment of about 60 bp (Fig. 3C). It is of note that this smaller DNA fragment was not produced from somatic cells (Fig. 3B, lower panel), or from germ cells at earlier stages of spermiogenesis (not shown), after MNase treatment in the same conditions. We concluded therefore that this fragment could correspond to a condensing spermatid-specific DNA packaging structure.

We then further investigated the nature of the DNA associated with the nucleosomal and the new spermatid-specific DNA-packaging structures. For this purpose, the two types of MNase-resistant DNA fragments were purified and used as probes in FISH assays, on mouse metaphase chromosomes, as well as on mouse spermatogenic cells. Interestingly, both fragments detected the pericentric regions and perfectly co-localized with the major satellites regions both on metaphase chromosomes and in spermatogenic cells (Fig. 3E, 3F, and Suppl. Fig. 4A). As controls, probes obtained either by sonication of spermatid total DNA, or after MNase digestion of chromatin of mouse somatic cells using the stringent conditions of protocol 1 or of a whole testis cell suspension, did not label any specific domain (Fig. 3E, 3F, and Suppl. Fig. 4A). The quantification of the fluorescence signals given by each probe show that about 72% of the nucleosomal fragment and 51% of the small fragment correspond to

major satellite sequences (Suppl. Fig. 4B). These results indicate that, in condensing spermatids, nucleosomes remain in pericentric heterochromatin regions, where they coexist with another MNase resistant structure of an unknown nature. We therefore hypothesized that these new DNA-packaging structures may contain condensing spermatids-specific proteins, which remained to be identified.

Identification of three new histone variants accumulating during late spermiogenesis.

In order to find new proteins involved in the organisation of the genome in late spermatids, a proteomic approach was undertaken. Basic proteins were extracted with acid from nuclei of purified step 12-16 spermatids, and compared with basic proteins of germ cells at earlier maturation stages on SDS-PAGE. Coomassie staining revealed global changes in the basic protein constitution of condensing spermatids compared to that of germ cells at earlier stages, with a decrease in histone content, and the appearance of two bands around 8 and 18 kDa, corresponding to TP1 and TP2 respectively (Fig. 4A). The proteins present in this particular cell fraction were identified by mass spectrometry. As expected, transition proteins TP1, TP2 and four canonical core histones were found, as well as known somatic and testis-specific histone variants. This proteomic analysis also revealed for the first time the presence of the mouse testis histone variant H3t (XP_356549). The mRNA encoding the human ortholog had previously been shown to be expressed in spermatocytes and spermatids (Govin et al., 2005).

More importantly, three new proteins containing significant sequence similarity with the H2A or H2B histone folds were also identified. These new histone variants were respectively named H2Alike1 (H2AL1, AAH87913), H2Alike2 (H2AL2, NP_080903), and H2Blike1 (H2BL1, XP_127485). H2AL1 and H2AL2 are related proteins and show a better

homology to each other than to H2A (Table 1). H2BL1 is very similar to the bovine testis specific H2B variant, known as SubH2Bv (Aul and Oko, 2001).

In addition to the mass spectrometry analysis, an “in silico” search in testis ESTs was carried out and led to the identification of two supplementary H2A and H2B variants, respectively named H2AL3 (NP_080372) and H2BL2 (BAB24353) (Table 1).

The expression pattern of the genes encoding the five new histone variants was analyzed by RT-PCR on RNAs from various mice tissues. Figure 4B shows that, like the H3t variant, all the new histone variants are mainly expressed in the testis. In order to test whether all these new variants could be post-meiotically expressed, RT-qPCR were performed on male germ cells fractionated according to their maturation stages on a BSA gradient. Figure 4C shows that H2AL1, -L2, -L3 and H2BL1 mRNA were strongly enriched in round and elongating spermatids (compare to pachytene spermatocytes, used as a reference), in contrast to TH2B used as a control, which mRNA was most abundant in meiotic cells. H2BL2 mRNA was detected at a very low level in meiotic, as well as post-meiotic, germ cells.

To study the accumulation of the encoded proteins during spermatogenesis, antibodies against each of the new histone variants were generated, and their specificity was checked on cells transfected with the corresponding expression vectors (not shown). All were highly specific in western blots, except H2AL1 and H2AL2, which could not be distinguished from one another by their respective antibodies. They will therefore be referred as H2AL1/L2 hereafter.

H2BL2, although present in whole testis extracts, was not detected in germ cells (Fig. 4D and not shown), and H2AL3 was not detected either in whole testis extracts or in germ cells (not shown). These data suggest that these “in silico” identified histones probably do not play a role in the post-meiotic chromatin reorganization of male germ cells. In contrast, H2AL1/L2 and H2BL1 are strongly enriched in step 12-16 spermatids compared to the whole

testis (Fig. 4D), and accumulate during late spermiogenesis, in condensing spermatids (Fig. 4E). Their expression pattern is therefore different from that of TH2B, detected in meiotic cells and afterwards, but similar to that of TP1, TP2, Protamine2 and H1t2, suggesting that H2AL1/L2 and H2BL1 could, like these proteins, be involved in chromatin organisation during spermatids condensation. Finally, and very interestingly, H2AL1/L2 and H2BL1 remain present in mature spermatozoa isolated from epididymis, while all of the other known spermatid proteins, such as TP1, TP2 and TH2B, disappear (Fig. 4F)

H2AL1/L2 and H2BL1 therefore behave differently from the other histones and histone variants present in germ cells, most of which are expressed earlier during spermatogenesis and removed in condensing spermatids, just as these new variants are produced. This pattern of expression pointed to H2AL1/L2 and H2BL1 as good candidates as specific genome re-organizers in condensing spermatids.

H2AL1/L2 are present in the new nucleo-protein structures specifically organizing pericentric heterochromatin.

The sub-nuclear distribution of H2AL1/L2 in germ cells was further analyzed by immunofluorescence on testis imprints (Fig. 5). These proteins first appear in step 9 elongating spermatids, and then strongly accumulate in early condensing spermatids (step 11) after the disappearance of the acetylation signal, and before and during protamine incorporation (Fig. 5A). These observations are in good agreement with the western blot data (Fig. 4E), and with immunohistochemistry data (IH) showing H2AL1/L2 accumulation in steps 9-11 spermatids (Fig. 5B).

Interestingly, H2AL1/L2, in contrast to TP1 and TP2, show a heterogeneous distribution in early condensing spermatids, with a preferential localization in the intensely DAPI-stained region, previously identified as pericentric heterochromatin (Fig. 5A and 5C).

These data highly suggest that, during late spermiogenesis, H2AL1/L2 could differentially organize pericentric heterochromatin after the disappearance of acetylated nucleosomes. However, although clearly detectable in western blots, H2AL1/L2 could not be observed by IF or IH in both step 12-16 spermatids and mature spermatozoa, probably because of the high genome compaction of these cells. Moreover, H2BL1 could not be detected in germ cells by these in situ approaches, probably also because of limited antibody accessibility.

Since H2AL1/L2 were localized to pericentric heterochromatin, we checked for their presence in the major satellite organizing nucleo-protein structures previously isolated from step 12-16 spermatids. In preliminary analyses, we observed that H2AL1/L2, as well as somatic-type core histones and TH2B, were released in the MNase-digested fractions of condensing spermatids prepared according to protocol 1 (Suppl. Fig. 2B), suggesting an association of these histones with at least one of the two MNase resistant nucleo-protein structures shown in Figure 3B. However, in contrast to the somatic core histones, a significant amount of H2AL1/L2, and to a lesser extent TH2B, were also present in the soluble nuclear extract, suggesting that the decompacting buffer (Protocol 1, Suppl. Fig. 2A) had partially disrupted the corresponding nucleoprotein structures (Supp Fig. 2B). We therefore set up another procedure using a less stringent decondensing buffer (Suppl. Fig 2A, protocol 2), which prevented the partial disruption of histone variants (Suppl. Fig 2C), but gave the same MNase digestion pattern (Suppl. Fig 3B and data not shown). To investigate the association of H2AL1/L2 within the nucleosomal or the smaller structure, the two structures (obtained using the less stringent protocol 2) were separated on a sucrose gradient, and the associated histones or histone variants analysed by western blot (Fig. 6). As expected, the somatic-type histones H2A, H2B and H4 co-fractionated with the larger fragment, confirming its nucleosomal nature. In contrast, the H2AL1/L2 variants specifically co-fractionated with the small MNase-resistant DNA fragment, indicating that they could be major constituents of the new DNA-

packaging structure identified in condensing spermatids. Interestingly, TH2B co-fractionated with both DNA fragments, suggesting that, unlike H2B, it associates not only with nucleosomes but also with the new structures. To confirm the association between the DNA fragments and histones, further purifications of the nucleoprotein structures were performed using hydroxyapatite (HTP). This ion-exchange medium presents a high affinity for DNA, which allows the capture and purification by phosphate elution, of nucleosomes or other nucleoprotein structures (Rickwood and MacGillivray, 1975). In these experiments, H2AL1/L2 not only were pulled-down on HTP, but also perfectly co-eluted with the small DNA fragment (Suppl. Fig. 3B and 3C), showing that the DNA small fragment and H2AL1/L2 are part of the same structure. Moreover, it was confirmed that TH2B, present within the nucleosomes, also associates with the new structure.

H2AL1/L2 specifically dimerize with TH2B and can form regular but unstable nucleosomes, when expressed in somatic cells.

The association of TH2B and the novel histone variants within an unknown DNA-packaging structure prompted us to investigate their ability to re-organize the genome when ectopically expressed in somatic cells.

We first monitored the ability of H2AL1 and H2AL2 to dimerize with either H2B or TH2B. HA-tagged H2B and TH2B were co-expressed with H2A, H2AL1 and H2AL2 fused to GFP (green fluorescent protein). H2B and TH2B were then immunoprecipitated using an anti-HA antibody, and the presence of H2A, H2AL1 and H2AL2 detected by western blot (Fig. 7). The data show that H2A is able to form dimers with TH2B, but less efficiently than with H2B. In contrast, H2AL2 displayed a strong preference for dimerisation with TH2B compared to H2B (Fig. 7A). H2AL1 also dimerized more efficiently with TH2B than with H2B, albeit with a lower affinity. These findings nicely correlate with the results obtained

after the analysis of the chromatin of condensing spermatids (Fig. 6), showing the presence of TH2B and the absence of H2B in the histone H2AL1/L2 containing structures.

An important question is whether the H2AL1/L2-TH2B dimers are capable of forming regular nucleosomes and/or could induce the formation of a different type of structure in somatic cells. In order to investigate this issue, the chromatin from cells expressing H2AL2/TH2B was digested by MNase, and the resulting oligo-nucleosomes were fractionated on a sucrose gradient. Figure 7B shows that all the H2AL2 and TH2B were efficiently incorporated into regular nucleosomes, and no smaller DNA-packaging structure was found. We then analyzed the stability of the H2AL2-TH2B containing nucleosomes compared to nucleosomes containing only somatic histones. Oligonucleosomes from cells expressing tagged H2A-H2B or tagged H2AL2-TH2B were immobilized on hydroxyapatite and eluted with increasing concentrations of salt. The results show that H2AL2-TH2B dimers are released at lower salt concentrations than H2A-H2B dimers, suggesting that H2AL2-TH2B containing nucleosomes are less stable than nucleosomes containing somatic histones (Fig. 7C).

Altogether, these data show that TH2B and H2AL2 preferentially associate with each other, are able to form nucleosomes when expressed in somatic cells, and are found in new nucleo-protein structures specifically organizing pericentric heterochromatin in condensing spermatids.

Discussion:

This study shows for the first time that pericentric heterochromatin exhibits very specific features at all stages of mouse spermiogenesis. Upon completion of meiosis, round spermatid chromatin retains somatic-type epigenetic marks, which then undergo reprogramming at the beginning of the elongation phase. A wave of histone acetylation affecting the whole genome marks the initiation of the chromocenter decompaction and spreading. In elongating spermatids, pericentric heterochromatin then acquires a novel and unique organization where it is both marked by H4ac and H3K9me3 and loss of HP1. The observed general histone hyperacetylation and the removal of HP1 from pericentric regions are reminiscent of the reported disappearance of HP1 from chromocenter after prolonged TSA treatment in somatic cells (Taddei et al., 2001). It is therefore very probable that, at the beginning of spermatid elongation, the global histone acetylation triggers the disruption of HP1 binding as well as the induction of pericentric heterochromatin reprogramming.

Interestingly, although HP1 is lost, the H3K9me3 mark remains when H4 acetylation invades the pericentric regions, and could be involved in delaying the completion of histone acetylation within the major satellite region. Indeed, although both marks co-localize in pericentric heterochromatin, a more detailed analysis suggests that they are not present on the same subregions, and consequently on the same nucleosomes. This implies the occurrence of an active removal of the H3K9me3 mark before or simultaneously with H4 acetylation. It could be either demethylated, or widely exchanged with unmethylated histone H3 or H3 variants. Interestingly, the proteomic identification of the surviving histones isolated from condensing spermatids (steps 12-16) presented here showed the presence of the H3 variants H3.3 and H3t. Hence, the exchange of trimethylated H3K9 with H3.3 and H3t in the pericentric regions could also account for the progressive removal of the H3K9me3 mark.

Later in spermiogenesis, the surviving nucleosomal organisation of the pericentric regions could provide a basis for the preferential recruitment of new H2A variants identified here in condensing spermatids. Interestingly, our data point to TH2B as a key player in the incorporation of H2AL1/L2 in regions . First, TH2B is expressed much earlier than H2AL1/L2 during spermatogenesis, but is still present at late spermiogenesis stages, when H2AL1/L2 accumulate. Second, using an ectopic expression approach, we show that H2AL1 and H2AL2 largely prefer TH2B to H2B, as a dimerization partner. Moreover, unlike H2B, TH2B was found with H2AL1/L2 associated to the small MNase-resistant DNA fragments, strongly suggesting that H2AL1 or H2AL2 also dimerize with TH2B in spermatogenic cells. Third, TH2B possesses the ability to induce nucleosome instability when incorporated in vitro into nucleosomes containing somatic type histones (Li et al., 2005), and H2AL2/TH2B containing nucleosomes were found here less stable than those containing H2A/H2B. Altogether, these observations support the hypothesis that TH2B-containing nucleosomes would be preferential sites for H2AL1-L2 incorporation through direct dimerisation. These unstable nucleosomes would then become targets for important structural reorganisation in condensing spermatids, leading to the formation of the new structures evidenced here by MNase digestion. Several testis-specific factors could potentially play a role in such a process. For example, the bromodomain-containing factor, TIF1- δ , is expressed in elongating spermatids (steps 9-11) concomitantly with the apparition of H2AL1/L2, and preferentially localizes on pericentric heterochromatin (Khetchoumian et al., 2004).

In contrast to H2AL1/L2, the presence of TH2B is strongly reduced in epididymal spermatozoa (Fig. 4F). However, longer western blot exposures and MS analyses reveal that a small amount of TH2B remains (not shown), and an immunofluorescence approach also suggested that hTSH2B (the human homolog of TH2B) could be detected in a subset of spermatozoa (Zalensky et al., 2002). The exact nature of the H2AL1/L2 containing structures

in sperm thus remains to be established. The possibility that H2BL1, which is synthesised later, partly replaces TH2B in the very late stages of spermiogenesis is an attractive hypothesis requiring further investigation.

In the human genome, no H2A and H2B variants were found with significant sequence similarity to the mouse H2AL1, H2AL2 and H2BL1. However, other testis-specific variants could act as functional homologues in human germ cells. For example, H2BFWT, a human testis specific H2B variant present in mature sperm, is found uniquely in primates and, like H2BL1, shows a relatively low similarity with H2B and TH2B (Churikov et al., 2004). Interestingly, several human sperm H2B variants preferentially accumulate on telomeres (Churikov et al., 2004; Gineitis et al., 2000; Zalensky et al., 2002). Thus, although not conserved, specific histone variants could organize particular regions of the genome, like telomeres, centromeres or pericentric heterochromatin, within the globally protamine-packaged genome.

This sperm-specific packaging of pericentric heterochromatin could be important for post-fertilization chromatin reorganization events. Indeed, after fertilization, a genome-wide epigenetic reprogramming occurs and establishes the totipotency of the zygote from the differentially organized paternal and maternal genomes, inherited from the highly specialised male and female gametes. Interestingly, recent data report important differences between the onset of paternal and maternal pericentric heterochromatin epigenetic marks in the first steps of preimplantation embryogenesis in the mouse (Martin et al., 2006; Santos et al., 2005). Therefore, it is tempting to speculate that the presence of H2AL1/L2 in a novel organisational unit of major satellites in sperm would, after fertilization, act as a guide for epigenetic reprogramming of paternal pericentric heterochromatin. It is also likely that histone variants play a role in the establishment of other epigenetically inherited structures in the male genome. Indeed, in addition to a clear enrichment in pericentric heterochromatin, H2AL1/L2-

containing structures are also dispersed elsewhere in the genome (Suppl. Fig. 4B). Characterization of these regions will constitute an additional, exciting challenge for the future, that should shed further light on both the nature and transmission of paternal epigenetic information.

Materials and Methods:

Antibodies

Antibodies against H2AL1, H2AL2, H3AL3, H2BL1 and H2BL2 were generated in rabbits by three injections of 200 μ g of purified His-tagged recombinant proteins. Sera were diluted at 1/1000 for western blot, and 1/250 for immunofluorescence. Anti H1t2 is described in (Martianov et al., 2005). Anti histones antibodies, including anti-TH2B (# 07-680), were provided from Upstate and used as advised by the supplier.

Purification of germ cells.

Three different protocols were used, depending on the required quantity, purity degree and maturation stage of male germ cells. Fractions enriched in spermatogenic cells at different stages of maturation were obtained by sedimentation on a bovine serum albumin (BSA) gradient as previously described (Pivot-Pajot et al., 2003). Pure fractions of nuclei from step 12-16 spermatids were obtained by sonication of mice testis as described in (Marushige and Marushige, 1983). Pure fractions of epididimal sperm heads were obtained as follows. Epididymes were opened with a razor blade to free spermatozoa in a DMEM drop. The spermatozoa were then pelleted by centrifugation (4°C, 1300g, 10 min), re-suspended in 1,5 ml of DMEM containing 1mg/ml salmon sperm DNA, sonicated at 250 J to break flagella, and centrifuged (1300 g, 10 min, 4°C) on a discontinuous Percoll gradient (100%/70%/40%). The pellet, containing pure sperm heads, was washed once in DMEM/1M NaCl and then in DMEM.

The quality of each fraction or preparation was controlled by observation under a phase-contrast microscope.

Fluorescent In Situ Hybridization (FISH), immunofluorescence and immunohistochemistry on germ cells

The FISH procedure was adapted from a standard protocol described elsewhere (Rousseaux and Chevret, 1995) and is detailed in the supplementary materials. Microdissected tubules were prepared as described in (Kotaja et al., 2004). Testis imprint preparations were performed by gently pressing the testis (previously cut in two and frozen in liquid nitrogen) onto glass slides, air-dried, incubated in 90% ethanol for 3 minutes, and air-dried again. The immunofluorescence protocol is described in details in the supplementary materials. The protocol of immunohistochemistry experiments is described in details in (Faure et al., 2003).

Chromatin Immunoprecipitation on spermatids

A pool of spermatids ranging from round to condensing were collected after sedimentation on a BSA gradient (about 10^7 cells), re-suspended in 200 μ l of RIPA buffer (Tris 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; NP-40 1%; DOC 0,5%; SDS 0,1% DTT 1mM; TSA 150 nM and protease inhibitors cocktail "Complete EDTA-free" (Roche)) and incubated for 20 min on ice so that even the highly condensed spermatids would be lysed. After ultracentrifugation (40 000 g, 10 min, 4°C) the pellet containing chromatin was re-suspended in 200 μ l of RIPA buffer and sonicated twice at 100 J. Fibres of less than 10 nucleosomes were usually obtained, as controlled on an agarose gel. 50 μ g of chromatin were used for chromatin IP, performed according to (Oberley et al., 2004), and described in the supplementary material section. PCR was performed as described in (Lehnertz et al., 2003).

MNase digestion of chromatin from steps 12-16 condensing spermatids.

Step 12-16 spermatids obtained from 10 testes, or 10^7 NIH 3T3 cells used as control, were lysed (15 min, in ice) in 150 μ l buffer 1 (Tris 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; NP-40 1%;

DOC 0,5%; SDS 0,1%) or buffer 2 (Tris 50 mM pH 7,4; NaCl 300 mM; NP-40 0,1%; DOC 0,1%; DTT 1mM; antiprotease cocktail Complete EDTA Free (Roche)). After centrifugation (20 000 g, 4°C, 10 min), the pellet was re-suspended in 150 μ l of the initial buffer. In the case of buffer 2, a short sonication (80 J) was performed to allow the suspension of chromatin fragments of about 5000 bp, and unlysed spermatids were eliminated by an additional centrifugation. MNase digestion was performed on the buffer 1 or buffer 2 lysates by addition of 150 μ l of MNase buffer (Tris 10 mM pH7,5; KCl 10mM, CaCl₂ 1mM) and 15U of micrococcal nuclease S7 (Roche), and incubation at 37°C for the indicated times. Reaction was stopped by 5mM EDTA (final concentration). MNase-digested fractions were separated by ultracentrifugation (80000g for 7 hours, 20°C) on a 10-30% linear sucrose gradient (in phosphate buffer pH7,4 1mM; NaCl 80mM; EDTA 0,2 mM, antiprotease cocktail). DNA analyses were performed on 10 μ l of MNase digested fractions by treatment with proteinase K followed by electrophoresis on a 2% agarose gel. Proteins of the collected fractions were analysed western blots.

Mass spectrometry and protein identification

After separation by SDS-PAGE, discrete bands were excised from the Coomassie blue-stained gel. The in-gel digestion was carried out as previously described (Ferro et al., 2000). Extraction of peptides from the gel pieces, and details of LC-MS/MS analysis are described in the supplementary material section.

RT, PCR and qPCR

Reverse transcription (RT) reactions were performed with the StrataScript First-Strand Synthesis System (Stratagene) using random hexamers primers. Quantitative PCR (qPCR) reactions were performed using Brilliant SYBR Green QPCR MasterMix on an Mx3005p

cycler (Stratagene). cDNA from total testis was used for the standard curve, and data were normalized using Brdt cDNA abundance, as Northern blot attests the constant level of this mRNA in meiotic and post-meiotic cells (Pivot-Pajot et al., 2003). The sequences of the primers used for PCR and qPCR are given in supplementary material.

Ex-vivo studies of histone variants

The coding sequences of H2AL1, H2AL2, H2A, H2B and TH2B were inserted into pCDNA3.1 (InVitrogen) modified by insertion of HA or Flag tags, or into peGFP-C (BD Biosciences Clontech). Plasmids were co-transfected in Cos7 cells by the Fugene transfection system (Roche), and cells were collected 24h post-transfection. Co-immunoprecipitations were performed as described in (Caron et al., 2003). Preparation of oligo-nucleosomes and capture on hydroxyapatite were performed as described in (Sun et al., 2003).

Acknowledgments:

We gratefully acknowledge Dr. C. David Allis for the gift of the anti-TH2B antibody, generated and provided ahead of publication in collaboration with Upstate-Serologicals. We are also grateful to Drs. Steve Kistler, Rod Balhorn and Minoru Yoshida for the generous gifts of anti-TP1, anti-TP2, anti-protamine and anti-acetylated lysines antibodies, respectively. We wish to thank Sandrine Curtet-Benitski, Christine De Robertis, Roberte Pelletier and Alexei Grichine for expert technical assistance. S.K. laboratory is supported by grants from the Regulome consortium (ANR-05-BLAN-0396-04), the “Action Concertée Incitative” (ACI) and the CLARA (EpiMed and EpiPro programs).

References:

- Aul, R.B., and R.J. Oko. 2001. The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis. *Dev Biol.* 239:376-87.
- Caron, C., J. Govin, S. Rousseaux, and S. Khochbin. 2005. How to pack the genome for a safe trip. *Prog Mol Subcell Biol.* 38:65-89.
- Caron, C., C. Pivot-Pajot, L.A. Van Grunsven, E. Col, C. Lestrat, S. Rousseaux, and S. Khochbin. 2003. Cdy1: a new transcriptional co-repressor. *EMBO Rep.* 4:877-882.
- Churikov, D., J. Siino, M. Svetlova, K. Zhang, A. Gineitis, E. Morton Bradbury, and A. Zalensky. 2004. Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics.* 84:745-56.
- Faure, A.K., C. Pivot-Pajot, A. Kerjean, M. Hazzouri, R. Pelletier, M. Peoc'h, B. Sele, S. Khochbin, and S. Rousseaux. 2003. Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Mol Hum Reprod.* 9:757-63.
- Ferro, M., D. Seigneurin-Berny, N. Rolland, A. Chapel, D. Salvi, J. Garin, and J. Joyard. 2000. Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. *Electrophoresis.* 21:3517-26.
- Gardiner-Garden, M., M. Ballesteros, M. Gordon, and P.P. Tam. 1998. Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol Cell Biol.* 18:3350-6.
- Gineitis, A.A., I.A. Zalenskaya, P.M. Yau, E.M. Bradbury, and A.O. Zalensky. 2000. Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J Cell Biol.* 151:1591-8.
- Govin, J., C. Caron, C. Lestrat, S. Rousseaux, and S. Khochbin. 2004. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem.* 271:3459-69.
- Govin, J., C. Caron, S. Rousseaux, and S. Khochbin. 2005. Testis-specific histone H3 expression in somatic cells. *Trends Biochem Sci.* 30:357-9.
- Guenatri, M., D. Bailly, C. Maison, and G. Almouzni. 2004. Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J Cell Biol.* 166:493-505.
- Hazzouri, M., C. Pivot-Pajot, A.K. Faure, Y. Usson, R. Pelletier, B. Sele, S. Khochbin, and S. Rousseaux. 2000. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol.* 79:950-960.
- Khetchoumian, K., M. Teletin, M. Mark, T. Lerouge, M. Cervino, M. Oulad-Abdelghani, P. Chambon, and R. Losson. 2004. TIF1delta, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *J Biol Chem.* 279:48329-41.
- Kimmins, S., and P. Sassone-Corsi. 2005. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature.* 434:583-9.
- Kotaja, N., S. Kimmins, S. Brancorsini, D. Hentsch, J.L. Vonesch, I. Davidson, M. Parvinen, and P. Sassone-Corsi. 2004. Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat Methods.* 1:249-54.
- Lehnertz, B., Y. Ueda, A.A. Derijck, U. Braunschweig, L. Perez-Burgos, S. Kubicek, T. Chen, E. Li, T. Jenuwein, and A.H. Peters. 2003. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol.* 13:1192-200.

- Lewis, J.D., D.W. Abbott, and J. Ausio. 2003a. A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol.* 81:131-40.
- Lewis, J.D., Y. Song, M.E. de Jong, S.M. Bagha, and J. Ausio. 2003b. A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma.* 111:473-82.
- Li, A., A.H. Maffey, W.D. Abbott, N. Conde e Silva, A. Prunell, J. Siino, D. Churikov, A.O. Zalensky, and J. Ausio. 2005. Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry.* 44:2529-35.
- Maison, C., and G. Almouzni. 2004. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:296-304.
- Martianov, I., S. Brancorsini, R. Catena, A. Gansmuller, N. Kotaja, M. Parvinen, P. Sassone-Corsi, and I. Davidson. 2005. Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:2808-13.
- Martin, C., N. Beaujean, V. Brochard, A. C., D. Zink, and P. Debey. 2006. Genome restructuring in mouse during reprogramming and early development. *Dev Biol.* In press.
- Marushige, Y., and K. Marushige. 1983. Proteolysis of somatic type histones in transforming rat spermatid chromatin. *Biochim Biophys Acta.* 761:48-57.
- O'Carroll, D., H. Scherthan, A.H. Peters, S. Opravil, A.R. Haynes, G. Laible, S. Rea, M. Schmid, A. Lebersorger, M. Jerratsch, L. Sattler, M.G. Mattei, P. Denny, S.D. Brown, D. Schweizer, and T. Jenuwein. 2000. Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol.* 20:9423-9433.
- Oberley, M.J., J. Tsao, P. Yau, and P.J. Farnham. 2004. High-throughput screening of chromatin immunoprecipitates using CpG-island microarrays. *Methods Enzymol.* 376:315-34.
- Oliva, R., and G.H. Dixon. 1990. Vertebrate protamine gene evolution I. Sequence alignments and gene structure. *J Mol Evol.* 30:333-46.
- Palmer, D.K., K. O'Day, and R.L. Margolis. 1990. The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei. *Chromosoma.* 100:32-6.
- Peters, A.H., D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schofer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Doyle, M. Sibilia, and T. Jenuwein. 2001. Loss of the suv39h histone methyltransferases impairs Mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell.* 107:323-337.
- Pivot-Pajot, C., C. Caron, J. Govin, A. Vion, S. Rousseaux, and S. Khochbin. 2003. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol.* 23:5354-5365.
- Rickwood, D., and A.J. MacGillivray. 1975. Improved techniques for the fractionation of non-histone proteins of chromatin on hydroxyapatite. *Eur J Biochem.* 51:593-601.
- Rousseaux, S., C. Caron, J. Govin, C. Lestrat, A.K. Faure, and S. Khochbin. 2005. Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene.* 345:139-53.
- Rousseaux, S., and E. Chevret. 1995. In-vitro decondensation of human spermatozoa for fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod.* 10:2209-2213.
- Russell, L., R. Ettlin, A. SinhaHikim, and E. Clegg. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press.
- Santos, F., A.H. Peters, A.P. Otte, W. Reik, and W. Dean. 2005. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev Biol.* 280:225-36.

- Sun, J.M., V.A. Spencer, H.Y. Chen, L. Li, and J.R. Davie. 2003. Measurement of histone acetyltransferase and histone deacetylase activities and kinetics of histone acetylation. *Methods*. 31:12-23.
- Taddei, A., C. Maison, D. Roche, and G. Almouzni. 2001. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol*. 3:114-20.
- Wykes, S.M., and S.A. Krawetz. 2003. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem*. 278:29471-29477.
- Zalensky, A.O., J.S. Siino, A.A. Gineitis, I.A. Zalenskaya, N.V. Tomilin, P. Yau, and E.M. Bradbury. 2002. Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem*. 277:43474-80.

Figure legends:

Figure 1: Pericentric chromatin becomes acetylated in elongating spermatids

A. H4 acetylation pattern in germ cells was analysed by immunofluorescence (IF) on spermatids at the indicated stages of maturation, using an anti-tetra-acetylated H4 antibody (H4ac). DNA was counterstained with DAPI. Arrows indicate the redistribution of the acetylated signal in a DAPI intensely stained region in elongating spermatids. Scale bars represent 5 μm .

B. Immuno-FISH assays, consisting in the sequential detection of H4 acetylation (H4ac) by IF and major satellites by FISH, were performed on round (pictures 1-4) and elongating (pictures 5-12) spermatids. Acquisition of the H4 acetylation staining has been enhanced to increase the signal intensity, compared to A, to show the hypoacetylation state of pericentric heterochromatin in round spermatids. Scale bars represent 5 μm .

C. The acetylation of lysines 5, 8 or 12 of histone H4 (respectively H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac) were analysed in elongating spermatids by IF as in A using the corresponding antibodies. Scale bars represent 5 μm .

D, E. Chromatin immunoprecipitations (ChIP) were performed on spermatids chromatin fibers using anti-tetra-acetylated H4 (H4ac) or anti-trimethylated H3K9 (H3K9me3) antibodies. D. DNA panel shows the mean size of chromatin fibers, around five nucleosomes, and western blots panels confirm the specificity of the enrichment in the corresponding histone modifications. E. Co-immunoprecipitation of major satellites with the indicated antibodies was detected by PCR amplification (ChIP panel). The amount of DNA matrix was decreased in a 4 to 4 fold scale to attest the linearity of the PCR conditions.

Figure 2: A restricted domain of pericentric chromatin harbours both euchromatic and heterochromatic marks in elongating spermatids.

A. HP1beta (red) and tetra-acetylated H4 (H4ac, green) were analysed by immunofluorescence in round (pictures 1-4), elongating (pictures 5-8) and condensing (pictures 9-12) spermatids. Merge corresponds to HP1beta and H4ac codetection. Scale bars represent 5 μ m.

B. Acetylation of histones (Ac, red) and trimethylation of H3K9 (H3K9me3, green) were analysed by immunofluorescence in round (pictures 1-4), elongating (pictures 5-8) and condensing (pictures 9-12) spermatids. Merge corresponds to H4ac and H3K9me3 co-detection. Scale bars represent 5 μ m.

C. D. Intensity of histone Ac (red, Alexa 546) and H3K9me3 (green, Alexa 488) fluorescence signals were quantified on step 9 spermatids using an analysis software (Metamorph). For each detection, a region containing values superior than 50% of maximal fluorescence was delimited (C, pictures 4-8, red and green borders for Ac and H3K9me3 signals respectively), and quantification performed along the grey axis (D, pictures 1-3) was reported along a diagram. A representative picture of the analysis of five different cells shows that the acetylated domain and the H3K9me3 do not perfectly overlap. Scale bar represents 2,5 μ m.

Figure 3: Two MNase-resistant structures are present in condensing spermatids and mainly correspond to pericentric heterochromatin.

A. Schematic representation of germ cells at different stages of spermatogenesis (Sc: spermatocytes; R: round spermatids; E: elongating spermatids; in the rectangle, C: condensing and condensed spermatids (steps 12-16) used in MNase digestion assays).

B. Chromatin of purified step 12-16 spermatids (upper) or somatic cells (lower) were submitted to MNase digestion during the indicated times. The DNA fragments present in

MNase-resistant nucleo-protein structures were purified, and analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel. The left line corresponds to the size markers.

C. MNase-resistant DNA fragments obtained as in B, after 15 minutes of MNase digestion, were analyzed on a 4% agarose gel, with small size markers.

D. The small DNA fragment (Sm) and the nucleosomal DNA fragment (Nuc) obtained respectively after 8' and 30' of MNase digestion of condensing spermatids chromatin were purified in order to be used as probes for FISH. The control probe (Ctl) corresponds to the genome of whole testis cells entirely digested into mononucleosomes by a prolonged action of MNase.

E, F. FISH using probes described in C (green) were performed on mouse metaphase chromosomes (E) and on male germ cells in co-detection with a major satellite probe (red) (F). DNA was counterstained with DAPI. Arrows on figure D indicate centric and pericentric chromatin domains. Scale bars represent 5 μ m.

Figure 4: identification of three new testis specific histone variants specifically expressed during late spermiogenesis.

A. Acidosolubles extracts were prepared from male germ cells purified according to their maturation stages (spermatocytes (Sc), or round (R), elongating and condensing (E) and condensing and condensed (C) spermatids), and separated on 15% SDS-PAGE stained with Coomassie blue. Proteins present in step 12-16 spermatid extracts (lane 4) have been excised from the gel, and identified by mass spectrometry (MS).

B. PCR using specific primers of the newly identified H2AL1, H2AL2, H2AL3, H2BL1 and H2BL2, as well as H3t and GAPDH as controls, were performed on reverse transcription products (“+”) obtained from total RNA of the indicated mouse tissues, in comparison to negative controls without (“-”) the reverse transcriptase (RT).

C. Reverse transcription was performed on total RNA extracted from either whole testis or fractions enriched in germ cells at different maturation stages. Enrichment of the indicated cDNA in each fraction compared to the spermatocytes was evaluated by quantitative PCR using the appropriate primers. The mean value of at least two independent assays is presented.

D. E. F. Western blots using the indicated antibodies were performed on various testis or germ cells extracts. Coomassie staining of the extracts are also shown (“Stain” panels). D: whole testis extract (WTE) and step 12-16 spermatids nuclei (Condensing/condensed spermatids, CS). Note that after a longer exposure, the anti-H2AL1/L2, -H2BL1, -Prm2, -TP1 and -TP2 blots all showed a weak signal in the whole testis extract (not shown). E: germ cells fractionated according to their maturation stages by sedimentation on BSA gradient. F: Step 12-16 spermatids nuclei (CS) and mature epididymal sperm heads (Spz).

Figure 5: H2AL1/L2 are localized on pericentric heterochromatin in early condensing spermatids.

A. H2AL1/L2 were analysed by immunofluorescence (IF) on round (pictures 1-3), elongating (pictures 4-6), early condensing (pictures 7-12) and condensing and condensed (pictures 13-18) spermatids in codetection with acetylated histones (Ac, pictures 1-9) or protamine (Prm, pictures 10-18). The DNA panels correspond to the DAPI counterstaining. Arrows indicate the distribution of H2AL1/L2 on DAPI densely stained regions. Scale bars represent 5 μm .

B. H2AL1/L2 were analysed by immunohistochemistry on testis sections. The tubule sections were staged according to the association of the corresponding germinal cells (Russell et al., 1990). The stage of each section is indicated with Roman numbers. The antibodies stained the spermatids found in stages IX, X and XI tubules respectively (corresponding to steps 9, 10 and 11 spermatids). Scale bars represent 20 μm .

C. TP1 or TP2 were detected by IF on early condensing spermatids. DNA panels correspond to the DAPI counterstaining. Scale bars represent 5 μ m.

Figure 6: In condensing spermatids, H2AL1/L2 are associated to the new nucleo-protein structure identified by MNase digestion.

Nucleo-protein structures released from step 12-16 spermatids after MNase digestion were fractionated by ultracentrifugation on a sucrose gradient. DNA fragments and proteins of each collected fraction were respectively analysed by electrophoresis on an agarose gel (DNA panel) and by western blot using the appropriate antibodies.

Figure 7: H2AL2-TH2B dimers can be assembled into nucleosomes when ectopically expressed in somatic cells.

A. Cos7 cells were co-transfected with vectors expressing Gfp-fused H2A, H2AL1, H2AL2, or Gfp alone as a control, and Ha-tagged H2B or TH2B, or an empty vector (-). After immunoprecipitation (IP) performed on whole cell extracts using an anti-Ha antibody, the immunoprecipitated proteins were denatured in Laemmli loading buffer and analyzed by western-blot. A western blot probed with an anti-Ha antibody showed the efficiency of the immunoprecipitations (upper panels). The co-immunoprecipitation of histones H2A, H2AL1 or H2AL2 was detected by western blots with an anti-Gfp antibody, and compared to the input.

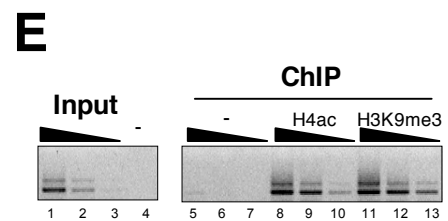
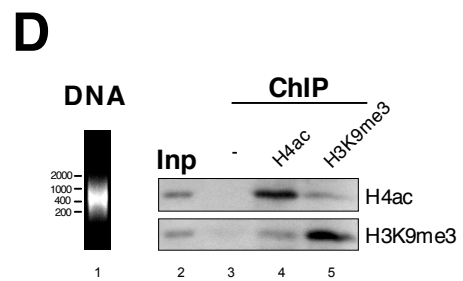
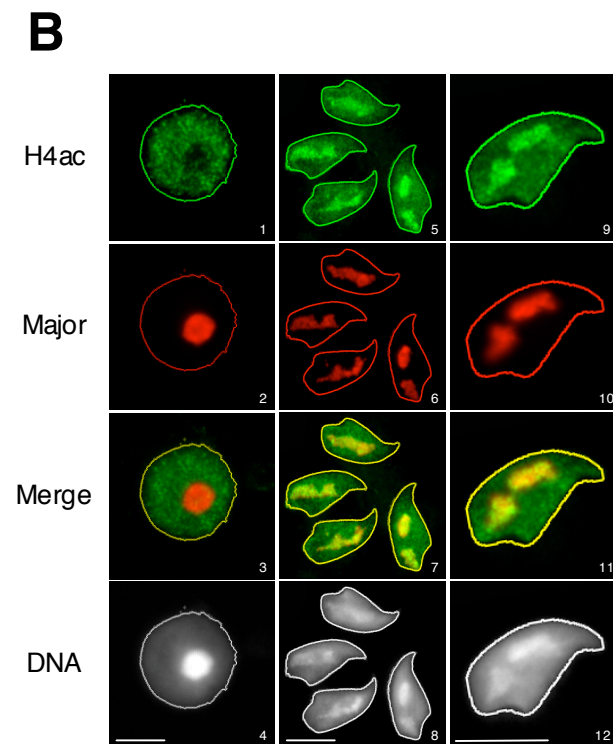
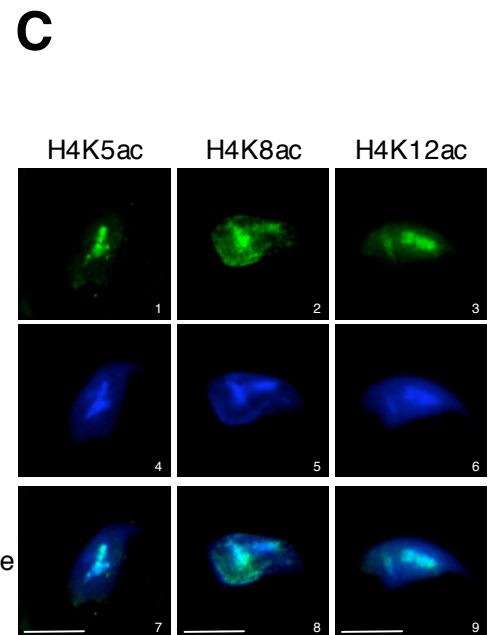
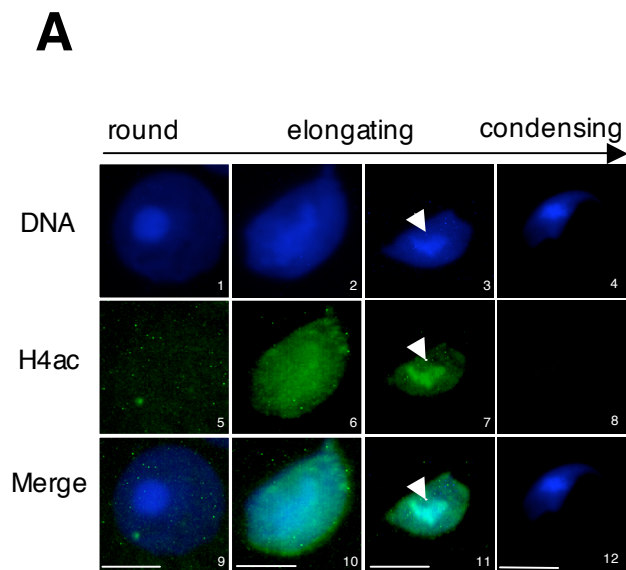
B. Oligonucleosomes were prepared by MNase digestion from Cos7 cells expressing Ha-H2AL2 and flag-TH2B, and fractionated by ultracentrifugation on a sucrose gradient. DNA fragments and proteins of each collected fraction were analysed respectively by electrophoresis on an agarose gel (DNA panel) and by western blots using the indicated antibodies.

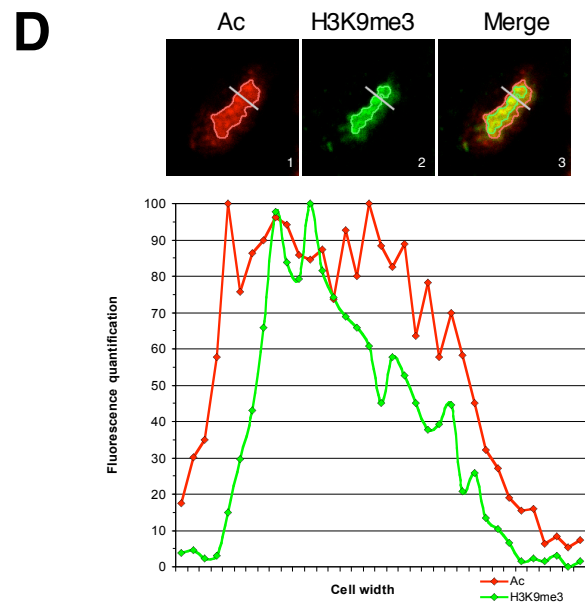
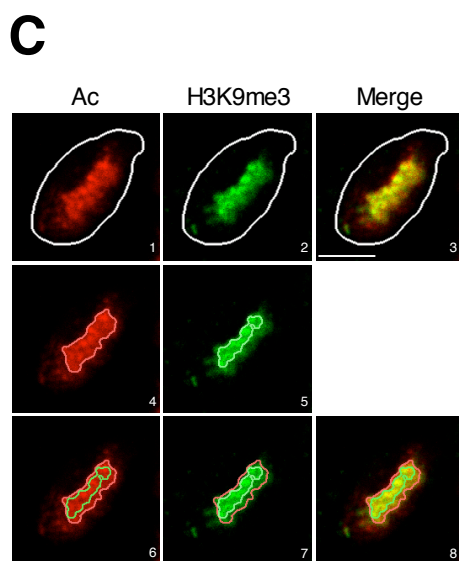
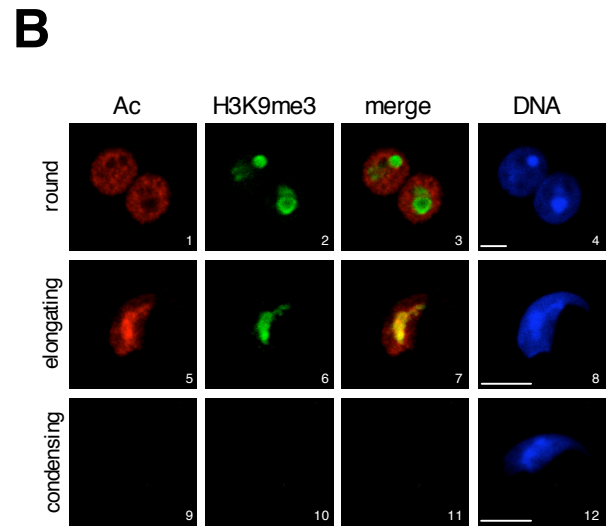
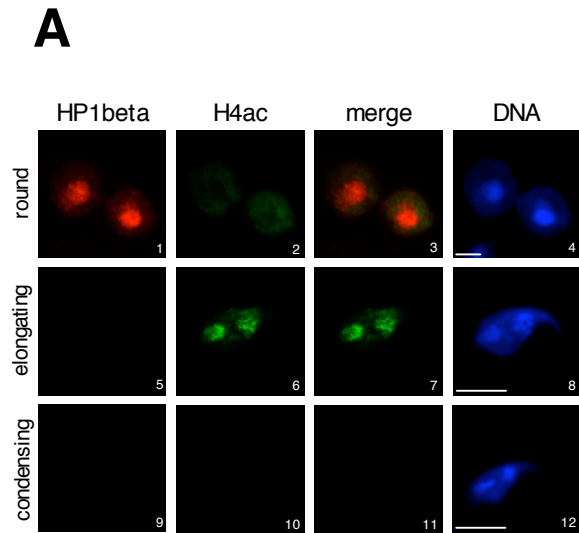
C. Oligonucleosomes prepared from Cos7 cells expressing Ha-H2A/flag-H2B or Ha-H2AL2-flag-TH2B were captured by hydroxyapatite. After elution by increasing salt concentrations, endogenous somatic histones were detected on SDS-PAGE by Coomassie staining (upper panel), and the ectopically expressed H2A/H2B or H2AL2/TH2B by western blots.

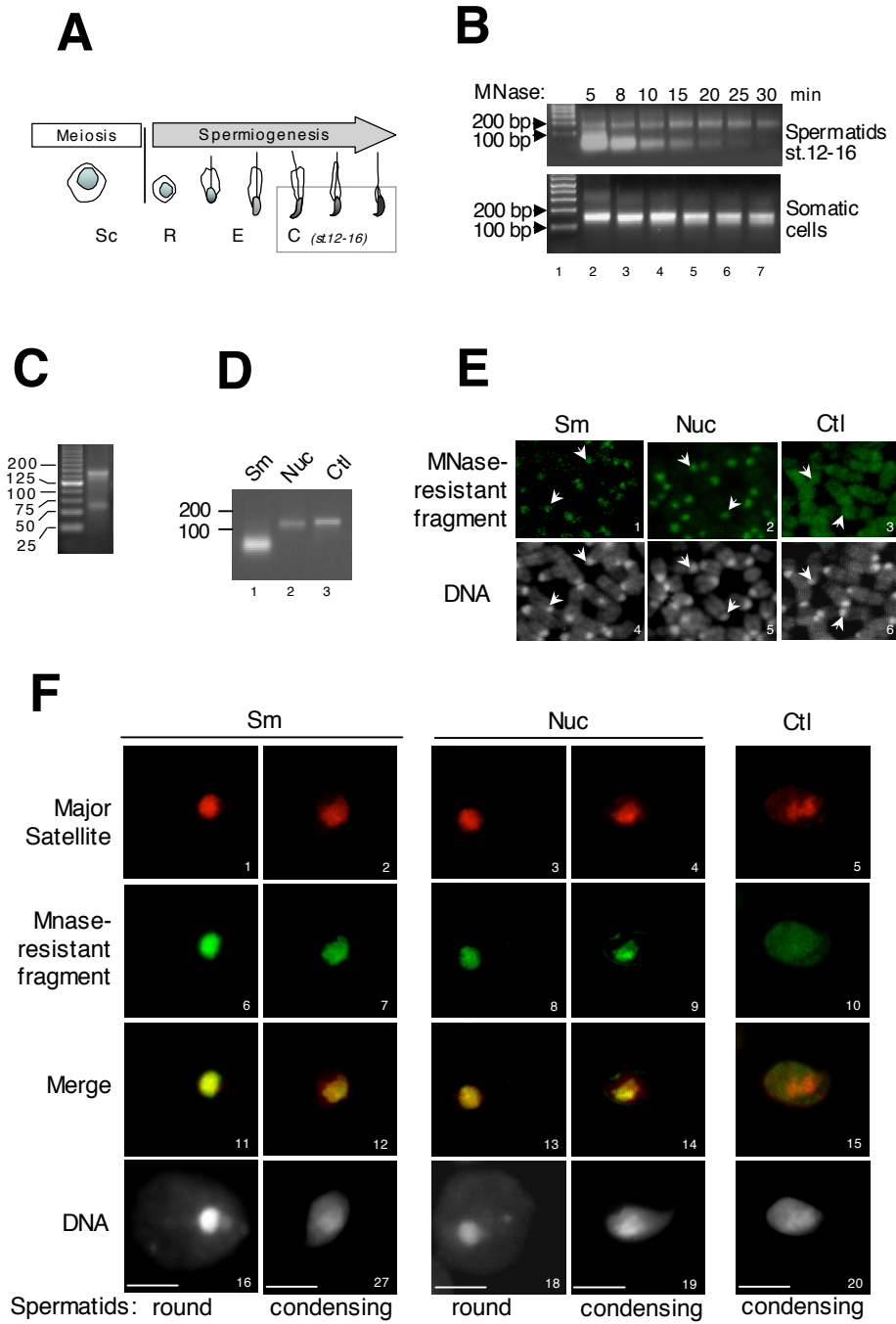
Table:

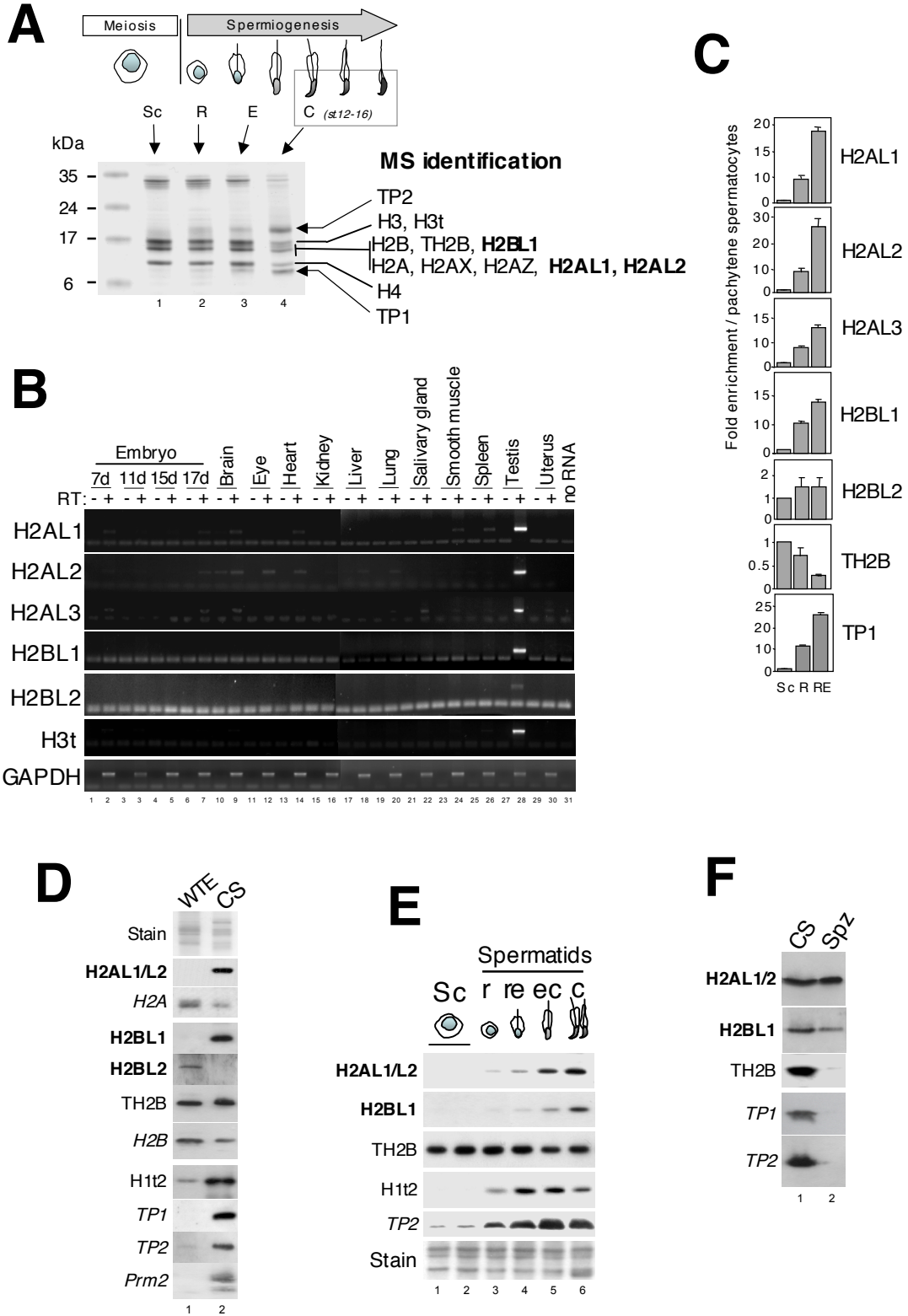
Table 1. The new identified histone variants.

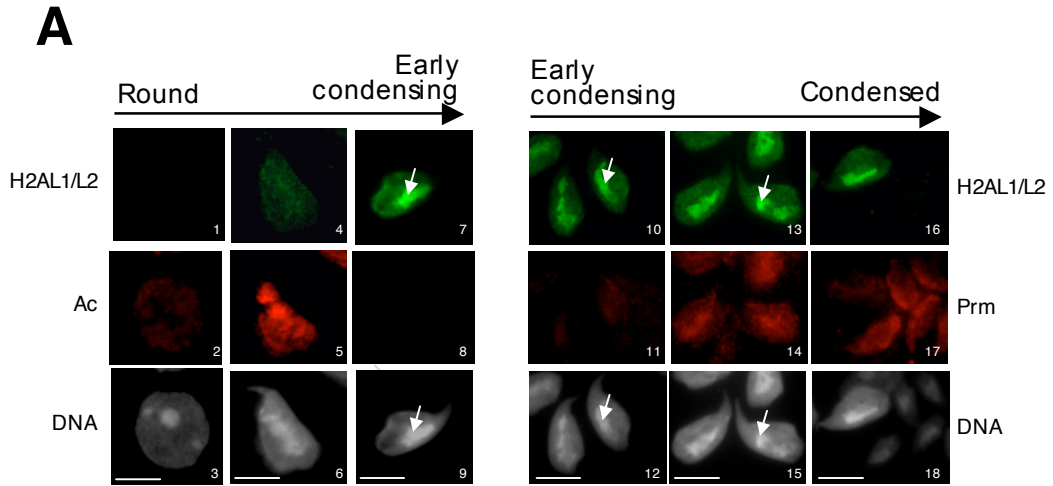
Name	Accession N°	Length (aa)	% Similarities (<i>%Identities</i>)	MS peptides
H2AL1	AAH87913	105	65 (30) with H2A 83 (75) with H2AL2	GELPFSLVDR, LVVQNNEQLR
H2AL2	NP_080903	111	75 (41) with H2A 83 (75) with H2AL1	AELQFPVSR
H2AL3	NP_080372	117	60 (24) with H2A	Not found
H2BL1	XP_127485	123	72 (38) with H2B 82 (58) with SubH2Bv	KLATLAVTFGSK
H2BL2	BAB24353	224	64 (31) with H2B	Not found



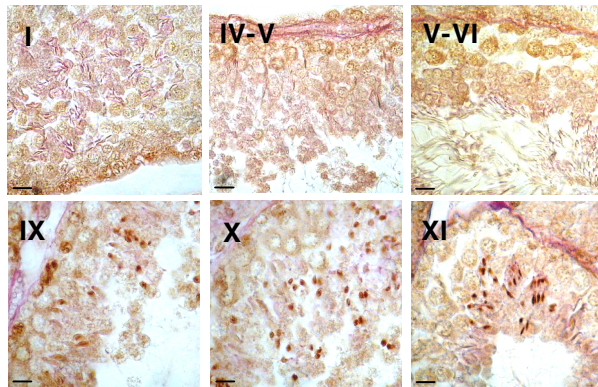




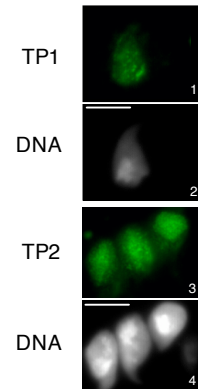


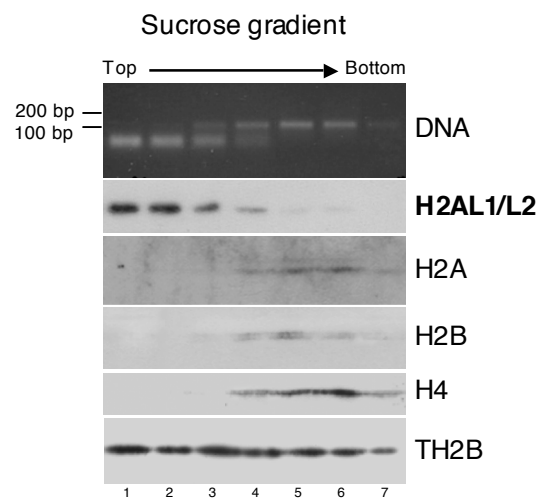


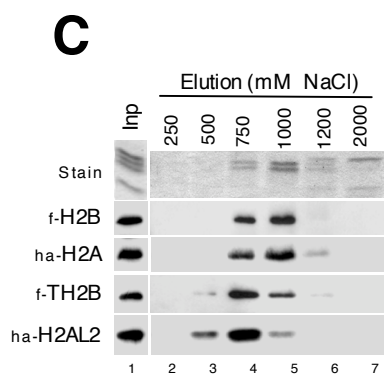
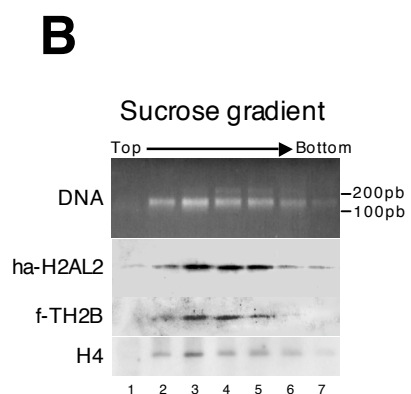
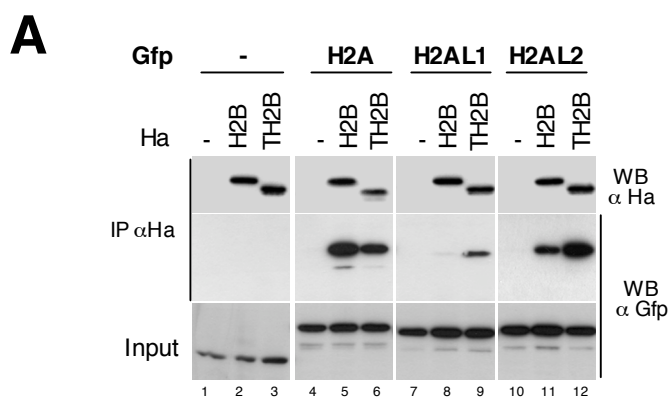
B



C







Supplemental material

Supplementary Figures:

Supplementary Figure 1: H4Ac and H3K9me3 do not perfectly overlap on pericentric heterochromatin in elongating spermatids.

Acetylation of histones and trimethylation of H3K9 were analysed by immunofluorescence in elongating spermatids as in Figure 2B-D of the manuscript, except that fluorochromes were inverted: acetylation was detected in green (Alexa 488), and H3K9me3 in red (Alexa 546). A region containing values superior than 50% of maximal fluorescence was delimited using the Metamorph analysis software (A, pictures 4-6, green and red borders for Ac and H3K9me3 signals respectively), and quantification performed along the white axis (B, pictures 1-3) was reported along a diagram. A representative picture of the analysis of three different cells shows that the acetylated domain and the H3K9me3 do not perfectly overlap. Scale bar represents 2,5 μm .

Supplementary Figure 2: Preparation of nucleosomal structures by MNase digestion from condensed spermatids.

A. Overview of the protocols used for MNase digestion of condensed spermatids. SN; supernatant. MNase; Micrococcal Nuclease

B. Three different fractions obtained by protocol 1, the soluble nuclear extract (SN-sol, lane 2), the MNase-digested fraction (SN-MNase, lane 3), and the MNase-resistant insoluble pellet (Pellet, lane 4), were analysed on a 15% SDS-PAGE by Coomassie staining (stain panel) and compared with a whole extract of condensed spermatids (lane 1).

The presence in each of these fractions of canonical and testis specific histones, transition proteins (TP1, TP2) and protamine 2 (Prm2) was checked by western blots with the corresponding antibodies. The DNA of each fraction was also analysed by electrophoresis on a 2% agarose gel after degradation of the associated proteins by proteinase K (DNA panel). (* Note that the DNA of the whole spermatid extract (lane 1) was sonicated in order to allow its visualization on the agarose gel.)

The insoluble pellet (lane 4) contains a large amount of MNase-resistant DNA, probably associated to protamins, all present in this fraction. However, as expected, canonical histones and a 150 bp DNA fragment are released by MNase digestion (lane 3), indicating that at least a part of the nucleosomes of condensed chromatin can indeed be obtained by this protocol. Moreover their absence from the soluble extract (lane 2) indicates that the nucleosomal structures are not disrupted by buffer 1. The testis specific histone variants H2AL1/L2 and TH2B are also released by MNase digestion, whereas a more important amount of H2BL1 remains in the insoluble pellet. The fact that some H2AL1/L2, H2BL1, TP1, TP2 and to a lesser extend TH2B are found in the soluble extracts suggests their partial dissociation from chromatin during the preparation of the soluble extract using buffer 1.

C: A western blot performed on extracts obtained by protocols 1 (lanes 1-3) and 2 (lanes 4-6) shows that H2AL1/L2 are not released from chromatin when using protocol 2 (lane 4), in contrast to the more stringent protocol 1 (compare lanes 1 and 4). M: DNA size markers

Supplementary Figure 3: H2AL1/L2 are associated to the small MNase-resistant DNA fragment.

A. Two different procedures were used to analyse the histones associated to the nucleosomal and the short DNA fragments respectively in condensed spermatids.

Nucleo-protein structures were prepared from condensed spermatids by MNase digestion according to protocol 2 of Supplementary Figure 2A. In the first procedure (“a” arrows), both structures were first separated by ultracentrifugation on sucrose gradient. The DNA fragments present in each fraction were then captured by hydroxylapatite (HTP), and the associated proteins released by denaturation in a SDS-PAGE loading buffer. In the second procedure (“b” arrows), structures were first captured together on HTP, and then eluted by increasing phosphate concentration. Histones and DNA present in each fraction were then analyzed respectively by western blot and by electrophoresis on a 2% agarose gel after degradation of proteins by proteinase K.

B. Results of the “a” procedure. “Input” and “DNA” panels show the correct separation of nucleo-protein structures on sucrose gradient, with a co-fractionation of H2AL1/L2 with the small fragment (lanes 1 and 2), H2A and H4 with the nucleosomal fragment (lanes 2 and 3), and TH2B with both fragments (lanes 1-3), as in Figure 6 of the manuscript. The HTP-pull-down panels show that H2AL1/L2 and TH2B are indeed co-captured with the small DNA fragment, and that TH2B is also present (like H4) in nucleosomal structures.

C. Results of the “b” procedure. The DNA panel shows the differential elution of the small and the nucleosomal fragment at two different phosphate concentrations (lanes 4 and 5). Anti-H2AL1/L2 and anti-TH2B western blot show the co-elution of H2AL1/L2 essentially with the small fragment (and not with DNA debris released at lower phosphate concentration) whereas TH2B co-elutes with both the small and the nucleosomal fragment.

Supplementary Figure 4: enrichment of the two MNase resistant structures in major satellite sequences.

A. FISH on mouse metaphase chromosomes was performed using labelled fractionated genomic DNA as probes (green), in co-detection with a major satellite probe (red). Total

DNA was counterstained with DAPI. The following DNA probes were used. **Sm** (pictures 1-4); small MNase-resistant DNA fragment, obtained from condensed spermatids according to Protocol 1 as described in Suppl. Fig. 2A. **Nuc**; nucleosomal MNase-resistant fragment obtained from condensed spermatids (pictures 5-8) or 3T3 cells (pictures 9-12) according to Protocol 1. **Total**; DNA obtained by sonication from condensed spermatids lysed according to Protocol 1 (visualized in Suppl. Fig 2B, lane 1)

B. Quantification of FISH experiments. On each slide shown in Suppl. Fig. 4B, the fluorescence intensity of each whole chromosome and of its corresponding pericentric region were quantified using the Metamorph software. The fluorescence intensity of pericentric hybridisation signals for each probe was expressed as a ratio of total chromosome hybridisation signal intensity (FI_p/FI_c) and then normalized to the FI_p/FI_c of the major satellite probe on the same chromosomes. Only well-individualized chromosomes were used for analysis (at least 5 chromosomes per slide). Mean values and standard deviation do not show significant variation between chromosomes.

Results show that about 70% of nucleosomal fragments and 50% of the small fragments of condensed spermatids indeed hybridize at pericentric regions. Thus, about 30% of the remaining nucleosomes are localized elsewhere, and the apparent absence of FISH signal in other regions is certainly due to a dispersed distribution giving a signal close to the background.

Supplemental material and methods:

Immunofluorescence on germ cells

Permeabilization of cells was allowed in saponine 0,5%, Triton 0,25%, PBS1x for 15 min at room temperature. Non-specific binding was blocked with dried milk 5%, Tween20 0,2%, PBS 1x for 30 min at room temperature. Primary antibodies were diluted in dried milk 1%, Tween20 0,2%, PBS1x (dilutions are indicated in Antibodies section). Incubations were performed overnight at 4°C in a humidified chamber. Slides were then washed 3 times 5 min in the antibodies dilution buffer. Secondary antibodies (anti-rabbit crosslinked to Alexa488 and/or anti-mouse crosslinked to Alexa546 provided by Invitrogen) were diluted at 1/500 in the same buffer as the primary antibodies, and incubated for 30 min at 37°C. Washes were performed as for primary antibodies. DNA was counterstained by DAPI and slides mounted in MOWIOL. An Axiophot (Zeiss) microscope coupled to a -40°C chilled CDD camera (Hamamatsu) was used for 2D image acquisitions. Images were acquired with a 63X objective (1.4 numerical aperture). Confocal images were taken using a CLSM microscope (Zeiss) and quantified using the Metamorph (Molecular Devices) software. The images presented in the figures were processed using Adobe Photoshop.

Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)

Slides preparation for FISH:

The germinal cells from one mouse testis were obtained by dilacerating the seminiferous tubules in approximately 500 μ l of DMEM:HamF12 medium (1:1), washed by centrifugation at 1000rpm for 10 min, then re-suspended and incubated for 10 min in Sodium Citrate 1% at room temperature and centrifuged again. The germinal cells of the pellet were carefully

dissociated and fixed twice in methanol : acetic acid (3:1) for 10 minutes at room temperature, then spread onto dry clean slides. The slides were air-dried and kept at room temperature for up to one week until FISH was done. For the immuno-FISH experiments, IF was performed as usual, the position of the acquired IF images were recorded, and the slides were washed in 2xSSC at 37°C for 30 min, dehydrated by immersing in a series of ethanol (70%/90%/100%) and finally air-dried.

FISH procedure:

The slides were denatured in Formamide 70%/2xSSC for 12 min at 82°C (germinal cells preparations) or 1 minute at 70°C (metaphases), dehydrated by passage through a cold ethanol series and air-dried (20xSSC: 175.3g/l NaCl and 88.2g/l sodium citrate in water, pH adjusted to 7 with NaOH). The DNA probes were labelled with either Biotin 11 dUTP or Digoxigenin dUTP, by Nick Translation (Roche kit). A 10 μ l sample of hybridization mix (50% formamide, 20% dextran sulfate, 1XSSC, 1XSSPE) (20xSSPE: 174g/l NaCl, 27.6g/l NaH₂PO₄H₂O, 7.2g/l EDTA, pH adjusted at 7.4) containing 50-100ng of each of the labelled probes, 10 μ g of sonicated salmon sperm DNA and, when needed, 5-10 μ g of mouse cot DNA, was heated at 72°C for 10 min, pre-incubated at 37°C for 30 min, and then applied onto each slide. The preparations were then placed in the dark, under sealed coverslips, for hybridization during 24 to 48 h in a moist chamber at 37°C. The coverslips were then carefully removed and the slides washed in 2xSSC for 2 min at 70°C, and pre-incubated for 15 min in phosphate buffer detergent (PBD, QBiogene) at room temperature. The digoxigenin-labelled and biotin-labelled probes were then respectively detected by a 15 min incubation at 37C with anti-digoxigenin-rhodamin (Boehringer, dilution 1/100) and/or streptavidin-Alexa 488 (Molecular probes, 1/200) diluted in PBD, and then washed three times 5 min in PBD at room temperature. The preparations were finally counterstained with 250ng/ml DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) in Vectashield (Vector, Burlingame, CA).

The quantification of the enrichment of each probe in major satellite sequences was performed on FISH slides as follows. The quantification was performed on mouse metaphases hybridised with either the small fragment, the nucleosomal fragment or control probes in codetection with major satellites. For each probe, the fluorescence signals on each whole chromosome and on its corresponding pericentric region (i.e. the area defined by major satellite hybridization) were respectively quantified using the Metamorph software. The “pericentric/whole chromosome” signal ratio for the major satellite probe was considered as 100% enrichment. For each of the other probes, this ratio (pericentric/whole chromosome) was also determined and normalized to the value obtained for major satellite probe.

ChIP

Chromatin was prepared from spermatids as described in the “material and methods” section of the text. Chromatin was then pre-cleared by incubation (15', 4°C, on a rotor shaker) in 50 µL of a mix 1:1 of Protein A Sepharose and Protein G Sepharose resins (Amersham), previously blocked by BSA and salmon sperm DNA. Immunoprecipitation was performed by incubation (overnight, 4°C) of 50 µg of chromatin with 5 µl of the appropriate antibody purchased from Upstate (H4Ac #06-866, H3K9m3 #07-523), followed by an additional incubation (15 min, 4°C on a rotor shaker) with 20 µL of the protein A-protein G sepharose mix. After three washes in RIPA buffer, half of the beads were incubated with Laemmli loading buffer and the eluted proteins analysed by Western Blots. The other half was kept for DNA analysis, performed as follows. Two successive 15 min elutions at room temperature in 100 µL of NaHCO₃ 50 mM SDS 1% allowed the recovery of DNA. DNA was then purified by a proteinase K digestion and phenol/chloroform extractions, precipitated and re-suspended in 100 µl TE 10:1.

Mass spectrometry analyses

After in-gel trypsin digestions, gel pieces were sequentially extracted with 5% [v/v] formic acid solution, acetonitrile 50%, formic acid 5% [v/v] and acetonitrile.

After drying, the tryptic peptides were resuspended in 0.5% aqueous trifluoroacetic acid. The samples were injected into a CapLC (Waters, Milford, MA) nanoLC system and first pre-concentrated on a 300µm X 5 mm PepMap C18 precolumn (Dionex, Sunnyvale, CA). The peptides were then eluted onto a C18 column (75 µm X 150mm) (Dionex, Sunnyvale, CA). The chromatographic separation used a gradient from solution A (2% acetonitrile: 98% water: 0.1% formic acid) to solution B (80% acetonitrile: 20% water: 0.08% formic acid) over 35 or 60 min at a flow rate of 200 nL/min. The LC system was directly coupled to a QTOF Ultima mass spectrometer (Waters, Milford, MA). MS and MS/MS data were acquired and processed automatically using MassLynx 4.0 software. Database searching was carried out using the MASCOT 2.1 program. Two databases were used: a home-made list of well-known contaminants (keratins and trypsin) and an updated compilation of SwissProt and TrEMBL databases (ftp://us.expasy.org/databases/sp_tr_nrdb/) with specifying *Mus* as the species. For searching the *Mus* database the variable modifications allowed were: acetyl-lysine, N-terminal acetylation, dimethyl-lysine, methyl-lysine, protein N-acetylation, methionine oxidation, serine and threonine phosphorylation, methionine sulphone and cysteic acid. Due to the potential high frequency of basic amino acid clusters (e.g. for histone proteins), four missed cleavages were also allowed. Proteins, which were identified with at least 2 peptides showing both a score higher than 40, were validated without any manual validation. For proteins identified by only 1 peptide having a score higher than 40, the peptide sequence was checked manually. Peptides, with scores higher than 20 and lower than 40, were systematically checked and/or interpreted manually to confirm or cancel the MASCOT suggestion.

Capture of nucleo-protein structures on hydroxyapatite

20 mg of hydroxyapatite powder (HTP, BioRad) was added to the MNase-digested soluble extract of condensed spermatids, or in each fraction of the sucrose gradient. After a 5' incubation on ice, and washes in 0,2 M NaCl containing 0,1 M potassium phosphate, pH 6,7), nucleoprotein structures were eluted by successive buffers respectively containing 0.15, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5M potassium phosphate. The DNA and proteins of each elution fraction were analysed on agarose gel and by western-blot respectively. In the case of nucleoprotein structures pulled-down from the sucrose gradient, proteins were released by denaturation in Laemmli buffer and analysed by western blot.

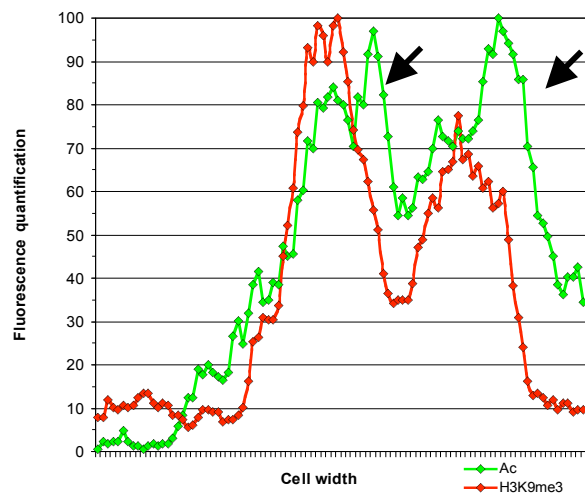
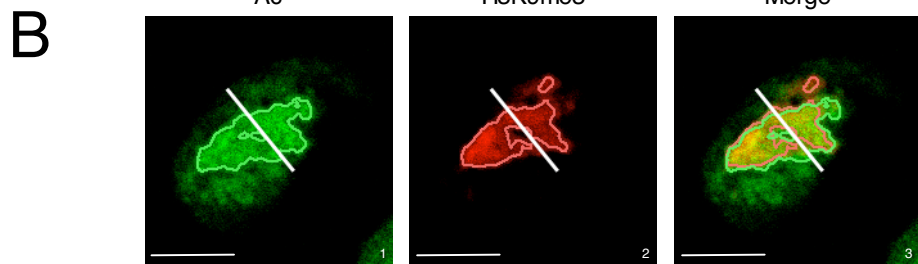
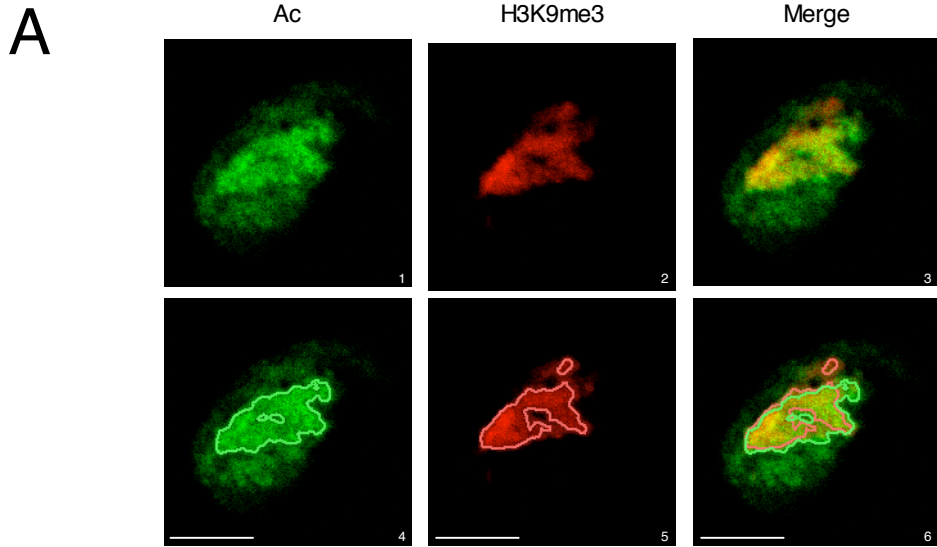
PCR primers

Name	Forward	Reverse
H2AL1	ATGGCCAAGAAAATGCAAAGGCG	TCAGTTGTCATCCTCATTCACTG
H2AL2	ATGGCCAGGAAAAGGCAAAGGC	TCAGTTGTCATCAGGTTCTGGTG
H2AL3	ATGTCGGAGAAGAAGAGCCAAGAA	TTAGCCATTCTTCTGGGTCCAG
H2BL1	ATGGCCAAGCCCACCTTCAAAG	TTAGGAATGAATGAATCTGTGGACG
H2BL2	ATGGCGTCTACCACGGCTATGG	CTTGTTGGAGATATAACCGGACC
H3T	ATGGCACGCACCAAGCAGACGG	AGCCCGTTCTCCGCGGATGCG

qPCR primers

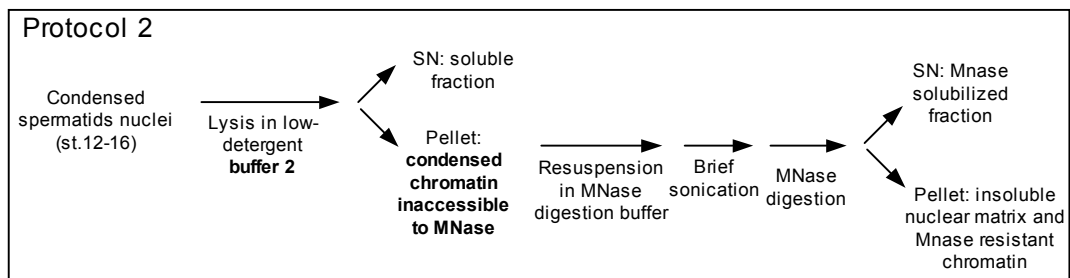
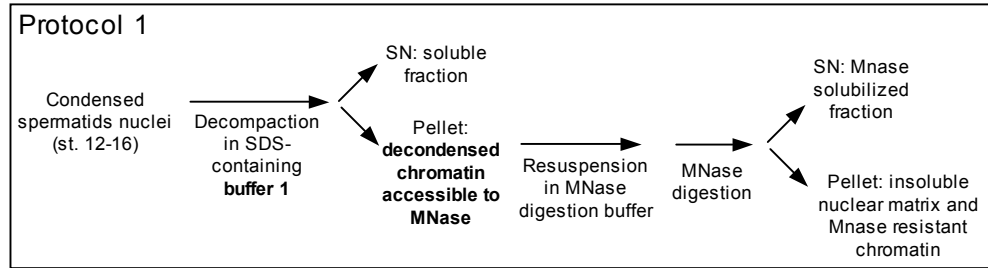
Name	Forward	Reverse
H2AL1	ATGGCCAAGAAAATGCAAAG	AGCACACTCGTGAGGAATGA
H2AL2	GCGAAGAAGACGGAAAGTGAC	GCGAGGAATACAGGAGCAGAA
H2AL3	CCTTGCAGCGACAACAACC	GGGGGTATATTGCTCCTCCTG
H2BL1	AGCCCACCTTCAAAGACAATG	GCAACGTGAGTGCTTTCTATACA
H2BL2	GCTATGGACGTTCTGGAGGA	GGCTTCTTCTTCGGCTTTTT
TH2B	GAGGTGGCGGTAAAGGGTG	GATGTCTGTCACAAAGGAGTTCA
TP1	ACCAGCCGCAAGCTAAAGAC	TTTCTACTTTTCAGGACGCTC
BRDT	ATGCATGCCACCTTACAACA	GGCTTTTTCCCTGGGTTTTTC

Govin et al. Supplementary Figure 1

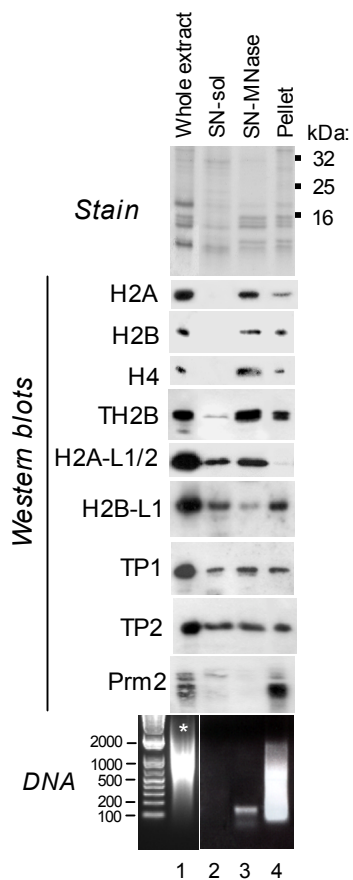


Govin et al. Supplementary Figure 2

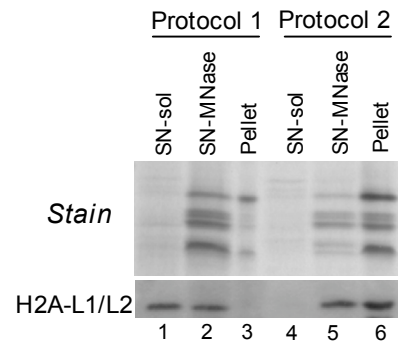
A



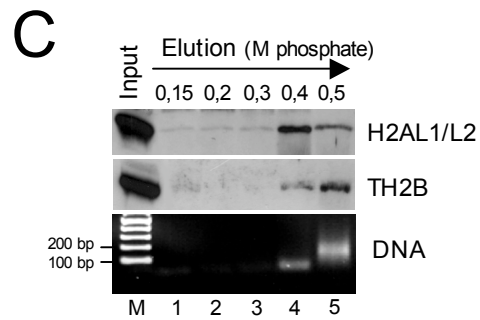
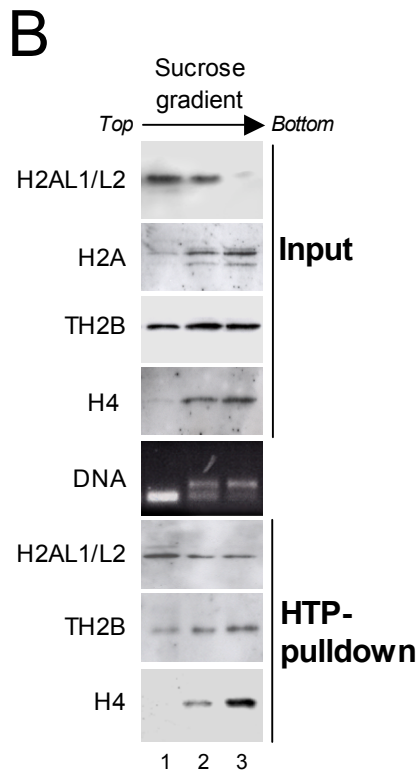
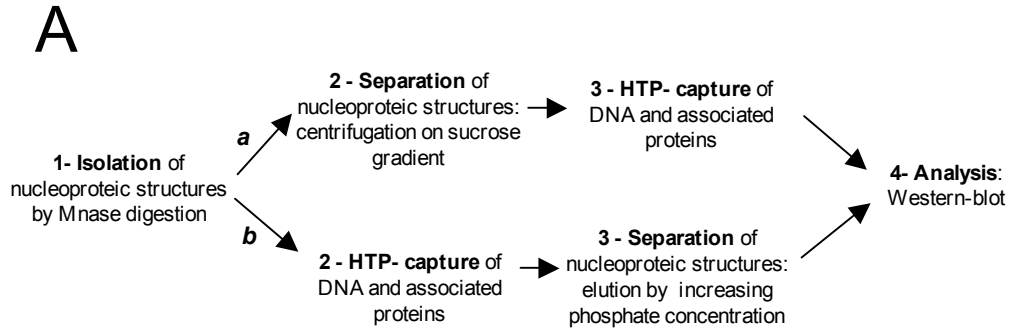
B



C

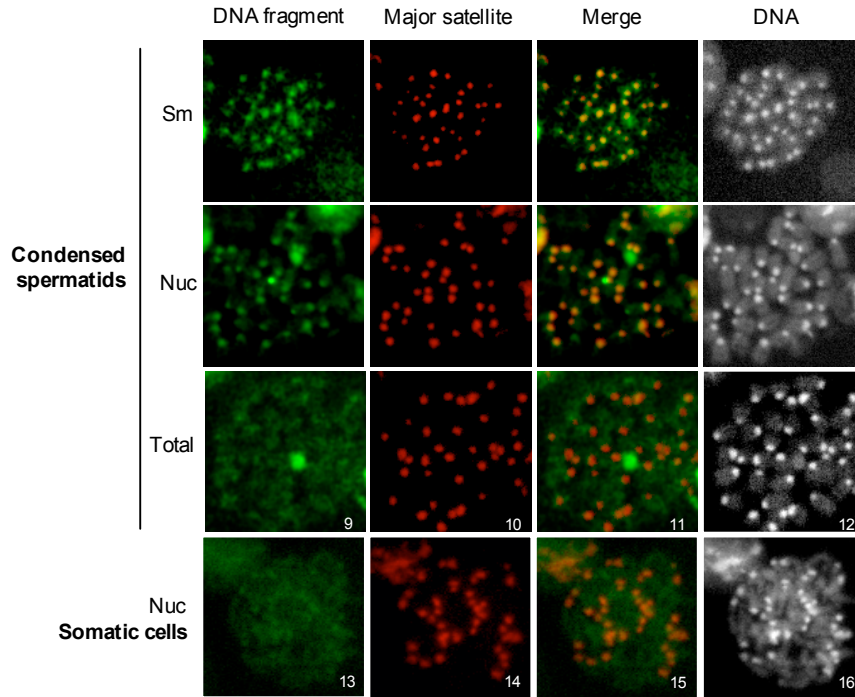


Govin et al. Supplementary Figure 3

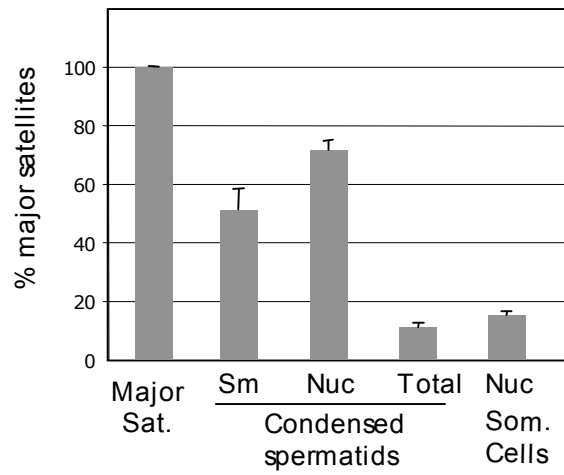


Govin et al. Supplementary Figure 4

A



B



I.2. Restructuration de la chromatine des régions de contrôle de l’empreinte parentale (ICR) lors de la spermiogénèse

I.2.1. Principaux résultats

L’expression des gènes soumis à empreinte parentale est régulée par les régions de contrôle appelées ICR. Les ICR sont notamment caractérisées par un profil de méthylation de l’ADN différent entre l’allèle maternel et paternel, qui conditionne l’expression monoallélique des gènes soumis à empreinte. Les ICR soumises à empreinte maternelle et paternelle sont méthylées respectivement sur leur allèle hérité de la mère et/ou de père.

La fabrication des gamètes impose une uniformisation du profil de méthylation transmis, car le gamète ne devra transmettre qu’une seule empreinte, maternelle pour les ovocytes, paternelle pour les spermatozoïdes. Ainsi, durant les étapes précoces de la spermatogénèse, les ICR soumises à empreinte paternelle sont méthylées sur les deux allèles, alors que la méthylation de l’ADN des ICR soumises à empreinte maternelle est effacée (voir Introduction III.3.1). Cet état de méthylation est maintenu lors de la différenciation des gamètes mâles, et transmis par les spermatozoïdes. Enfin, le profil de méthylation des ICR résiste à la déméthylation massive du pronoyau mâle lors de la fécondation.

Parmi la centaine de sites connus pour être soumis à empreinte (Morison *et coll.*, 2005), seuls trois ont une ICR méthylée sur l’allèle paternel (*Igf2-H19*, *Dlk1-Gtl2* et *Rasgrf1*). La structure de la chromatine associée à ces ICR a été caractérisée dans des cellules souches embryonnaires, des cellules adultes et au cours de la spermatogénèse. Des immunoprécipitations de chromatine (ChIP) réalisées dans des conditions natives permettent d’analyser les modifications des histones associées à l’allèle paternel et maternel de chaque ICR.

~ Modifications des histones associées aux régions soumises à empreinte parentale dans les cellules somatiques

Les modifications post traductionnelles des histones ont été étudiées dans un premier temps dans des cellules souches et dans un tissu adulte, le foie. Les allèles paternels des loci *Igf2-H19*, *Dlk1-Gtl2* et *Rasgrf1* sont enrichis en H4K20me3 et en H3K9me3, alors que les allèles maternels sont enrichis en H3K4me2 et en H3ac. Ces modifications sont également présentes au niveau des ICR

soumises à empreinte maternelle. Ainsi, l'allèle méthylé d'une ICR est enrichi en H4K20me3 et en H3K9me3 alors que l'allèle non méthylé est enrichi en H3K4me2 et en H3ac. Les modifications associées à chaque allèle de l'ICR sont les mêmes dans des cellules souches et dans un foie adulte. Ce profil de modification est en accord avec les données publiées au cours d'autres études (Umlauf *et coll.*, 2004).

~ ***Modifications des histones associées aux régions soumises à empreinte parentale lors de la spermatogénèse***

Nous avons cherché à savoir si les ICR paternelles sont caractérisées par des modifications d'histones spécifiques lors de la production des gamètes mâles. Celles-ci pourraient être associées à une réorganisation particulière de la chromatine dans les spermatozoïdes, capable de les protéger de la déméthylation après fécondation.

Dans un premier temps, le degré de méthylation des ICR a été quantifié. Comme attendu, les ICR soumises à empreinte paternelle ont un haut niveau de méthylation tout au long de la spermatogénèse alors que les ICR soumises à empreinte maternelle ne sont pas méthylées.

Dans un deuxième temps, les modifications d'histones décrites comme allèle spécifique dans les cellules souches et les tissus adultes ont été analysées. De manière surprenante, l'ensemble des loci présente un taux d'acétylation d'H4 élevé tout au long de la spermatogénèse. H3ac et H3K4me2 sont retrouvées au niveau des ICR soumises à empreinte maternelle. Ainsi, ces marques sont associées à l'ADN non méthylé aussi bien dans les cellules somatiques que lors de la spermatogénèse. En revanche, aucune marque spécifique n'a été découverte au niveau des ICR soumises à empreinte paternelle. H3K9me3 et H4K20me2 ont été détectés à un niveau basal sur l'ensemble des ICR étudiées.

Ainsi, ICR paternelles et maternelles portent des marques épigénétiques différentes, et les ICR paternelles se différencient par leur absence de marque spécifique.

~ ***Etat transcriptionnel des ICR maternelles***

Les trois ICR soumises à empreinte paternelle ne sont pas situées dans des promoteurs, et aucun EST (*Expressed Sequence Tag*) leur correspondant n'a été trouvé dans les banques de données. En revanche, les ICR soumises à empreinte maternelle sont situées à proximité de promoteurs de gènes, et portent des marques épigénétiques généralement associées à une chromatine ouverte et pouvant

être transcrite. Cependant, une quantification de leur ARN indique que ces gènes sont très peu exprimés au cours de la spermatogénèse.

En conclusion, dans des cellules souches et des tissus adultes, les deux allèles de régions soumises à empreinte parentale portent des modifications d'histones différentes. Les allèles méthylés des ICR soumises à empreinte maternelle et paternelle portent les mêmes modifications d'histones, tout comme les allèles non méthylés. Lors de la maturation post méiotique des gamètes mâles, les ICR soumise à empreinte maternelle et paternelle sont enrichies en H4ac, et les ICR soumises à empreinte maternelle sont enrichies en H3ac et H3K4me2. Ces différences pourraient moduler la réorganisation de la chromatine sous forme de structures particulières lors de la spermiogénèse et après la fécondation.

1.2.2. Article en révision

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration étroite avec Robert Feil et Katia Delaval (Institut de Génétique Moléculaire, UMR5535, Montpellier), et ont été soumis à *EMBO Journal*.

Mon implication personnelle porte sur la conception des expériences, la préparation de l'ensemble du matériel germinale qui a servi aux ChIP, et aux RT-PCR, et sur l'analyse du profil des modifications d'histones au cours de la spermatogénèse. J'ai été également impliqué dans l'ensemble des discussions qui ont rythmé l'avancée de ce projet.

Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during post-meiotic spermatogenesis.

Katia Delaval¹, Jérôme Govin², Frédérique Cerqueira^{1,3}, Sophie Rousseaux², Saadi Khochbin² and Robert Feil^{1*}

1, Institute of Molecular Genetics, CNRS, UMR5535; University of Montpellier II; Montpellier, France; 2, INSERM, U309; Université Joseph Fourier, Saint Martin d'Hères, Grenoble, France; 3, Current address: Institute of Evolutionary Sciences, UMR5554, University of Montpellier II, Montpellier, France.

*Corresponding author. Institute of Molecular Genetics, CNRS, UMR5535, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France. Tel.: ++33 467613663; Fax: ++33 467040231; E-mail: robert.feil@igmm.cnrs.fr

Only three of the known imprinting control regions (ICRs) in the mouse have DNA methylation that originates from the male germ line. These paternal methylation imprints are protected against the global wave of demethylation of the paternal genome following fertilisation, and are maintained throughout development as well. We find that in somatic cells, the allelic DNA methylation at these ICRs is associated with trimethylation on histone H4 lysine-20 and H3 lysine-9. Since these modifications are also detected at maternally-methylated ICRs, they could be linked to the somatic maintenance of imprints. To explore whether the post-fertilisation protection of ICRs relates to events occurring during spermatogenesis, we assayed chromatin at stages preceding the global histone-to-protamine exchange. Whereas at these critical stages, H3 lysine-4 methylation and H3 acetylation were strongly enriched at ICRs with maternal DNA methylation, these modifications were absent at the paternal ICRs. H4 acetylation, in contrast, was detected at all regions analysed. Thus, paternally and maternally methylated ICRs carry different combinations of histone modifications during the post-meiotic stages of spermatogenesis. These chromatin differences, together with differences in DNA methylation, could influence the assembly of ICRs into specific structures later in spermatogenesis, and after fertilisation.

Keywords: chromatin, genomic imprinting, histone methylation, DNA methylation, spermatogenesis.

Introduction

Genomic imprinting is an essential mechanism in mammalian development whereby certain genes are expressed from one of the two parental alleles only. In the mouse, most imprinted genes are clustered in chromosomal domains, which are broadly conserved also in humans. The allelic repression along these imprinted domains is mediated by imprinting control regions (ICRs) (Reik and Walter, 2001; Ferguson-Smith and Surani, 2001). These are essential sequence elements of up to several kilobases in size; most correspond to CpG islands. In somatic cells, the DNA at ICRs is methylated on one of the two parental alleles only. This differential DNA methylation is inherited from either the female or the male germ line. It provides parental allele-specific function to the ICR, and is thus essential for imprinted gene expression during development (Li *et al*, 1993). In the majority of murine ICRs, DNA is methylated on the maternally inherited allele, and this methylation originates from the female germ line. Only three of the known ICRs are methylated on the paternal allele, and their DNA methylation is established in the male germ line.

The ICRs with paternal DNA methylation are the one upstream of the *H19* gene at the *H19-Igf2* locus on distal chromosome 7 (the '*H19* ICR', Thorvaldsen *et al*, 1998), the ICR upstream of the *Gtl2* gene controlling the *Dlk1-Gtl2* domain on chromosome 12 (the IG-DMR, here called the *Gtl2* ICR; Lin *et al*, 2003), and the putative ICR at the *Rasgrf1* locus on chromosome 9 (the *Rasgrf1* ICR, Yoon *et al*, 2002). At the *H19* ICR, acquisition of DNA methylation in pro-spermatogonia starts before birth, (14.5-18.5 days post-coitum), and is fully accomplished in post-natal pachytene spermatocytes (Davis *et al*, 2000; Ueda *et al*, 2000). A similar timing of methylation establishment was observed at the *Gtl2* and *Rasgrf1* ICRs (Li *et al*, 2004). It is not well understood what determines that at the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrf1* ICRs, DNA methylation is established specifically in the male germ line. However, the establishment of DNA methylation at the *H19* and *Gtl2* ICRs during spermatogenesis involves the DNA methyltransferase Dnmt3a (Kaneda *et al*, 2004), like for the acquisition of imprinted DNA methylation in the female germ line (Bourc'his *et al*, 2001).

In contrast to the maternally-methylated ICRs, ICRs with paternal DNA methylation are not known to comprise promoter sequences, and are not located within genes either. They do, however, contain CpG-rich sequences, as do maternally-methylated ICRs. Here we explore whether, in somatic cells, the maintenance of the differential DNA methylation at the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrf1* ICRs is associated with differential chromatin organisation, as already shown for maternal ICRs. In particular, we address the question, whether specific histone modifications are associated with the DNA-

methylated allele at these ICRs, or with the unmethylated allele, and might thus be involved in the somatic maintenance of the allelic DNA methylation.

In the mouse, the parental genomes undergo dramatic reductions in DNA methylation after fertilisation, and during pre-implantation development. This is most striking for the sperm-derived genome, which loses most of its DNA methylation following fertilisation of the egg (Mayer *et al*, 2000; Oswald *et al*, 2000). Somehow, ICRs are protected against these global waves of active and passive demethylation. It is unknown which mechanisms are involved in this protection and whether these are the same for paternally and maternally-methylated ICRs. In somatic cells and tissues, on the other hand, ICRs with maternal DNA methylation present also allele-specific histone methylation and acetylation (Gregory *et al*, 2001; Fournier *et al*, 2002; Yang *et al*, 2003; Umlauf *et al*, 2004b). These differential histone modifications could potentially be involved in the maintenance of the parental allele-specific DNA methylation (Delaval and Feil, 2004).

Globally, the genomic DNA in mature sperm is not organised in nucleosomes, but is packaged by basic proteins called protamines. The exchange from histones to transition proteins first, and then, to protamines, occurs in condensing spermatids during late spermiogenesis (Meistrich *et al*, 2003; Govin *et al*, 2004; Kimmins and Sassone-Corsi, 2005). It is not known whether all DNA sequences undergo histone-to-protamine exchange, and whether this process has an impact on the global demethylation of DNA on the paternal genome, and on other chromatin changes occurring after fertilisation.

One explanation for the post-fertilisation protection of the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrfl* ICRs against the global demethylation of the paternal genome would be that it is linked to the establishment of specific structural marks during spermiogenesis, which persist in the male pronucleus when the massive DNA demethylation occurs. We explored this question by performing chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies at the stages preceding the global histone-to-protamine exchange. In this first locus-specific assay of histone modifications during spermatogenesis, we also included two ICRs with maternally-derived methylation: 'region 2' of the *Igf2r* imprinted gene on chromosome 17 (Wutz *et al*, 1997) and the KvDMR1 at the imprinted *Kcnq1* domain on distal chromosome 7 (Fitzpatrick *et al*, 2002). One key insight emerging from these ChIP studies is that paternally and maternally methylated ICRs are marked by different combinations of histone modifications at these critical stages preceding the histone-to-protamine exchange. We suggest that these marked differences in histone modifications between the two groups of ICRs, together with their different states of DNA

methylation, could have an impact on their subsequent re-organisation during late spermatogenesis, and after fertilisation.

Results

In embryonic cells, the *H19*, *Rasgrf1* and *Gtl2* ICRs have allelic H3 methylation and acetylation, and paternal H4 lysine-20 methylation

First, we determined whether ICRs with paternal DNA methylation are marked by allele-specific histone modifications in somatic cells, similarly as previously reported for ICRs that have maternal DNA methylation (Gregory *et al*, 2001; Fournier *et al*, 2002; Yang *et al*, 2003; Umlauf *et al*, 2004b). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed on unfixed chromatin from undifferentiated embryonic cells, and from adult tissue. Three ICRs with paternal methylation were analysed. These regions and the extent of their paternal DNA methylation are schematically presented in Figure 1. The ICR controlling the *H19* and *Igf2* genes on distal chromosome 7 is located at 2-4 kb upstream of the *H19* gene (*H19* ICR) (Thorvaldsen *et al*, 1998). At the *Dlk1-Gtl2* cluster on mouse chromosome 12, we analysed the differentially methylated region at 10-15 kb upstream of the *Gtl2* gene (*Gtl2* ICR) (Lin *et al*, 2003) which, like the *H19* ICR, corresponds to a CpG island (Takada *et al*, 2002). The differentially methylated region most likely controlling imprinting at the *Rasgrf1* locus on chromosome 9 corresponds to a CpG island of 300 bp in size, and is located 30 kb upstream of *Rasgrf1* (*Rasgrf1* ICR) (Yoon *et al*, 2002). Formal proof for this being an ICR remains, however, to be obtained. As a representative example of an ICR with maternal DNA methylation, we included the KvDMR1. This ICR mediates paternal gene silencing along the *Kcnq1* domain on distal chromosome 7, via the non-coding RNA *Kcnq1ot1* that it produces (Fitzpatrick *et al*, 2002; Mancini-Dinardo *et al*, 2006).

Unfixed chromatin fragments of 1-7 nucleosomes in length were obtained as described before (Umlauf 2004a). After incubation with antisera directed against specific histone modifications, DNA was extracted from the antibody-bound and unbound fractions. Then, using PCR amplification, followed by allelic discrimination applying newly-developed Single Strand Conformation Polymorphisms (SSCPs), we determined in each of these fractions the relative abundance of maternal and paternal alleles at the different loci of interest. Details about PCR amplification and the oligonucleotides used are provided in Supplementary Table I. The choice of histone H3 and H4 modifications included in the ChIP, was based on our previous findings on maternal ICRs (Fournier *et*

al, 2002; Umlauf *et al*, 2004b), as well as on studies on constitutive heterochromatin (Peters *et al*, 2003; Martens *et al*, 2005). On histone H3, lysine 9 and 14 acetylation (H3ac), lysine-9 tri-methylation (H3K9me3), and lysine-4 dimethylation (H3K4me2) were analysed. For histone H4, we used an antibody directed against tri-methylation on lysine-20 (H4K20me3), a modification which enriched at pericentric heterochromatin (Martens *et al*, 2005). An antiserum directed against H4 acetylation (at lysines 5, 8, 12 and 16) was also included. Embryonic stem (ES) cells were used as a model to explore early embryonic maintenance as ES cells are derived from the inner cell mass of the blastocyst. We analysed ES cells of the (C57BL/6 x *M. spretus*)F1 genotype, thus allowing for SSCP-based discrimination of the parental chromosomes. The ES line studied (SF1-G) was obtained from naturally-fertilised blastocysts and faithfully maintains imprinted expression of *H19*, *Igf2* and *Igf2r* (Dean *et al*, 1998). At the cell culture passages that were used for ChIP (passages 19 to 21), these cells had unaltered maternal DNA methylation at the KvDMR1 and unaltered paternal DNA methylation at the *H19*, *Rasgrf1* and *Gtl2* ICRs (data not shown). In agreement with our previous study on the KvDMR1 (Umlauf *et al*, 2004b), H3K4me2 and H3ac were precipitated from the paternal allele predominantly. In contrast, the DNA-methylated maternal allele was strongly enriched in the H4K20me3 and H3K9me3 precipitated fractions (Figure 2A).

Using an SSCP polymorphism at the 3'-end of the *H19* ICR, the maternal allele was preferentially brought down in the precipitations against H3K4me2 and H3ac. The DNA-methylated paternal allele, in contrast, was found to be strongly enriched in H4K20me3 and H3K9me3 (Figure 2B). Thus, as observed for the KvDMR1, at the *H19* ICR there is parental allele-specific H3K4me2, H3ac, H3K9me3 and H4K20me3.

The allele-specificity of the precipitations at the putative *Rasgrf1* ICR was comparable to that of the *H19* ICR. Also here, the unmethylated allele was enriched in precipitations directed against H3K4me2 and H3ac. The DNA-methylated allele, in contrast, was strongly enriched in H3K9me3 and H4K20me3 (Figure 2C).

For allelic discrimination at the *Gtl2* ICR, we used an SSCP polymorphism at the 5'-end of this differentially methylated region (Figure 1). Strong allelic enrichment of H3K4me2 and H3ac was observed on the maternal chromosome. However, in the ES cells we observed less pronounced allelic enrichment (1.5-fold) for H4K20me3 and H3K9me3 at this region (Figure 2D) in comparison to the other two paternally methylated ICRs.

Whereas at all four ICRs, there was pronounced allelic enrichment in the precipitations with the antiserum against H3 K9+K14 acetylation (H3ac) (and also with an antiserum directed only against H3 K9 acetylation, data not shown), there was no apparent allelic enrichment of H4 acetylation at the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrf1* ICRs, and only moderate allelic enrichment at the KvDMR1 (data not shown).

Thus, in ES cells the three ICRs with paternal DNA methylation have specific histone modifications (H3K9me3 and H4K20me3) associated preferentially with the methylated allele, and others (H3K4me2, H3ac) preferentially with the unmethylated allele.

The allele-specific histone modifications are maintained in adult somatic cells.

Next, we determined whether the allelic histone modifications at the *H19*, *Rasgrf1* and *Gtl2* ICRs are maintained in adult tissue cells as well. For this, we performed crosses between C57BL/6 females and males of a *M. musculus molosinus* inbred strain, in order to obtain offspring in which all the regions of interest were hybrid between the two subspecies. Adult liver was dissected and used for ChIP. As for the ES cells, maternal and paternal alleles could be distinguished by PCR followed by electrophoretic detection of SSCP polymorphisms. DNA sequence details and PCR primers are provided in Supplementary Table I.

As a control, we first analysed the KvDMR1, which, as in ES cells, had an enrichment of H3K4me2 and H3ac on the unmethylated paternal allele, and enrichment of H3K9me3 and H4K20me3 on the DNA-methylated maternal allele (Figure 3A). At the *H19* ICR, we detected H3K4me2 and H3ac on the maternal allele whereas the paternal, DNA-methylated, allele was enriched in H4K20me3 and H3K9me3 (Figure 3B). As in the ES cells, we observed no significant maternal enrichment in H4 acetylation (data not shown). Similarly, the *Gtl2* ICR had maternal H3K4me2 and H3ac, and pronounced paternal H4K20me3 and H3K9me3 in the chromatin derived from liver cells (Figure 3C). Parental allele-specific H3K4me2 and H3ac, and H4K20 trimethylation, were observed at the *Rasgrf1* ICR as well. Here also, the allele-specific chromatin organisation was as in the ES cells (data not shown). Together, these data indicate that histone modifications at the ICRs analysed are comparable in ES cells and adult tissue. Certain histone modifications are consistently associated with the DNA-methylated allele (H4K20me3 and H3K9me3), and others with the unmethylated allele (H3K4me2 and H3ac).

In germ cells, the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrf1* ICRs have different histone modifications than the *KvDMR1* and *Igf2r* ICRs during spermatogenesis

The *H19*, *Gtl2* and *Rasgrf1* ICRs are exceptional because their DNA methylation is established during spermatogenesis, at an early stage before the onset of meiosis. Following fertilisation, this paternal DNA methylation is maintained throughout development, in all the somatic lineages. In early embryonic cells and later in development, the somatic maintenance of DNA methylation could be linked to the presence of specific histone modifications, including the H4K20me3 and H3K9me3 that we detected in ES and adult cells. It is unclear however, what protects these regions against the global DNA-demethylation known to occur after fertilisation (Mayer *et al*, 2000; Oswald *et al*, 2000). This question is hard to address in mature sperm, given the technical difficulties to extract and study DNA-packaging structures in this densely-compacted context (Gatewood *et al*, 1987; Gardiner-Garden *et al*, 1998). Therefore, as a first step to address this problem, we chose to analyse the stages of spermatogenesis that precede the global histones-to-protamine exchange (Govin *et al*, 2004; Kimmins and Sassone-Corsi, 2004). Our specific aim was to determine whether paternal ICRs are marked by specific histone modifications at these critical stages, and could consequently be recognised differently during the subsequent chromatin remodelling (Figure 4A).

Germ cells were analysed at three spermatogenic stages: spermatocytes, round spermatids (steps 1-8) and elongating spermatids (steps 9-11). Pure fractions of primary spermatocytes and round spermatids were reproducibly obtained from testes from 8 weeks old mice. This was done by separating cells through BSA gradients according to their size and molecular density, as described before (Bellve *et al*, 1993; Pivot-Pijot *et al*, 2003). Using the same approach for purifying elongating spermatids, we routinely obtained a mixture of elongating spermatids (70%) and round spermatids (30%). Condensing spermatids (steps 12-16) were not included in this study, since these have largely undergone the histone-to-protamine exchange and the chromatin is no longer accessible to standard micrococcal nuclease (MNase) fractionation. By Western blotting, we first assessed the overall levels of the different histone modifications. This was done in multiple independent experiments. Figure 4B shows a representative example, in which five fractions were analysed: spermatocytes (Sc), two successive fractions of round spermatids (R1 and R2), and two fractions of elongating spermatids (E1 and E2, containing respectively about 40% and 25% of round spermatids). To monitor the developmental transitions between these stages, we included TP2, a transition protein which accumulates in elongating spermatids (Meistrich *et al*, 2003). To demonstrate a significant persistence of nucleosomes at these stages, we included an antiserum directed against core histone H2A. A global increase of H4 acetylation was observed in elongating spermatids compared to spermatocytes. H3

acetylation, assessed with an antiserum directed against K9 acetylation (H3K9ac), was lower in round and elongating spermatids than in spermatocytes, suggesting that there is a moderate reduction in H3 acetylation during spermiogenesis. Global levels of H3K4me2, and H4K20me3 did not vary between the three spermatogenic stages.

We next determined whether the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrfl* ICRs were DNA-methylated in the purified spermatocytes, round spermatids and elongating spermatids. We also studied the KvDMR1 (Fitzpatrick *et al*, 2002) and another maternally-methylated ICR, region-2 of the imprinted *Igf2r* gene (Wutz *et al*, 1997). As a control, we included, the promoter/CpG island of the *Hprt1* gene on the X chromosome, a CpG island not involved in imprinting. In order to also consider DNA-methylated repeat elements, and to determine whether these are comparable to methylated ICR elements, we included type-1 LINE repeats (LINE1). Genomic DNA was extracted from the germ cells corresponding to each of the three spermatogenic stages, and was digested with the methylation-sensitive restriction endonuclease *CfoI*, which cleaves its recognition sequence (5'-GCGC-3') only when it is unmethylated. Each of the regions analysed had one or several *CfoI* restriction sites (see Supplementary Table II). Following digestion, we determined by real-time PCR amplification (for primers, see Supplementary Table II) the percentage of DNA that had been cleaved by *CfoI* (Figure 4C). This showed that in spermatocytes and in round and elongating spermatids, the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrfl* ICRs and LINE1 sequences had high levels of DNA methylation, whereas only low levels of DNA methylation were detected at the KvDMR1, *Igf2r* region 2 and *Hprt1*.

To analyse in detail the histone modifications at the different ICRs, we devised a protocol to obtain unfixed chromatin fragments from spermatocytes, round spermatids, and elongating spermatids (Figure 4D, and Materials and Methods). One characteristic of these germ cells was that their genome was largely accessible to digestion by MNase. Upon short incubation of purified nuclei in a buffer containing MNase, most of the chromatin became digested into fragments of 1-7 nucleosomes in length. These oligonucleosomes were readily retrieved in the soluble chromatin fraction (Figure 4D). Importantly, we verified that none of the regions analysed was retained in the non-fractionated 'pellet' fraction (data not shown). After purification, the germ cell chromatin was precipitated exactly as for ChIP on chromatin of somatic cells. We focused on the histone modifications that we had found to be allele-specific in the ES and adult liver cells, reasoning that these could be differentially present in germ cells as well. Besides the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrfl* ICRs, we included the KvDMR1, the region 2 of *Igf2r*, the *Hprt1* CpG island/promoter and the LINE1 sequences.

In the antibody-bound fractions, we determined by real-time PCR (see Materials and Methods) the percentage of the input chromatin precipitated at the different loci (Figure 5). Histone H4 acetylation was readily precipitated at all the different loci analysed, with 10-40% of the input chromatin precipitated in spermatocytes, round and elongating spermatids. This indicated that considerable levels of H4 acetylation are present at all the loci analysed, including the ones at which the DNA is fully methylated (*i.e.*, *H19*, *Gtl2*, *Rasgrfl*, LINE1). At LINE1 repeats and *Hprt1*, levels of H4ac increased progressively from the spermatocyte to the elongated spermatid stage, following the global trend observed by Western blotting (Figure 4b). At the ICRs, levels of H4ac were comparable at the different spermatogenic stages analyzed.

For H3 acetylation, a rather different result was obtained. H3 acetylation was detected at the KvDMR1, *Igf2r* and *Hprt1* regions, but was absent or strongly reduced at the *H19*, *Gtl2*, and *Rasgrfl* ICRs and at LINE1 repeats (Fig. 5). Thus, whereas H4 acetylation was present at all the loci analysed, including those that had DNA methylation, H3 acetylation was preferentially present at the loci that had no DNA-methylation at the three spermatogenic stages analysed.

Relative levels of H3 K4 dimethylation were similar to those obtained for H3 acetylation. Particularly, in the spermatocytes, round and elongating spermatid fractions, high levels of H3K4me2 were detected at the KvDMR1 and *Igf2r* ICRs, and also at *Hprt1*. In contrast, there was little precipitation of H3-K4 dimethylation at the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrfl* ICRs, and at LINE1 sequences, in particular in round and elongating spermatids.

Combined, these data indicate that the *Igf2r* and KvDMR1 ICRs and the *Hprt1* CpG island have H3 lysine-4 methylation and H3 acetylation in spermatocytes and in round and elongating spermatids. The DNA-methylated *H19*, *Gtl2* and *Rasgrfl*, and LINE1 sequences are depleted for these modifications during these critical stages preceding the histone-to-protamine exchange

Analysis of H4K20me3, in contrast, did not reveal differences between the different ICRs analysed. Low levels of H4K20me3 precipitation were observed at all the ICRs analysed. Interestingly, however, there were high levels of H4K20me3 precipitation at the LINE1 repeats (Figure 5). We also tested the antiserum against H3-K9 trimethylation, but this did not give quantitative precipitation above background at any of the ICR elements analysed (data not shown)

Thus, in male germ cells, the combinations of histone modifications at *H19*, *Gtl2* and *Rasgrfl* are different from those at KvDMR1, *Igf2r* region 2, and *Hprt1*. Another distinction of these regions is that they have DNA methylation, whereas the maternal ICRs are unmethylated in spermatocytes and during the postmeiotic stages of spermatogenesis (Figure 4B). These methylated sequences are unlikely to be expressed since they do not correspond to promoters. Accordingly, we did not find the sequences of the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrfl* ICRs in databases of expressed sequence tags (ESTs) derived from testis and adult and embryonic tissues (see Materials and Methods). The KvDMR1 and the *Hprt1* CpG island, in contrast, correspond to promoters and could, thus, be transcriptionally active in the spermatogenic cells. To explore such a possible link with gene expression we made cDNA from spermatocytes and round and elongating spermatids, and determined the mRNA levels for *Hprt1* and the KvDMR1 (*i.e.*, the *Kcnq1ot1* non-coding transcript). Transcripts for both mRNAs were detected at all three stages, but expression levels were much lower (<1%) than that of *Tnp1*, a transition protein which becomes expressed specifically during spermiogenesis (Meistrich *et al*, 2003). Our finding confirms a recent study on *Hprt1* showing that this X-linked gene is lowly expressed in spermatocytes and does not become up-regulated during spermiogenesis (Namekawa *et al*, 2006). RNA levels of *Dlk1*, a gene reported to not be expressed in the testis, were even lower. Thus, although the KvDMR1, *Igf2r* region 2, and the *Hprt1* CpG island correspond all three to promoter regions, their chromatin's relative enrichment in H3-K4 methylation and H3 acetylation at the three spermatogenic stages does not correlate with their relative levels of expression.

Discussion

One conclusion from this study is that in somatic cells, ICRs with paternal DNA methylation are marked by allele-specific H3 and H4 modifications, similarly as ICRs with maternal DNA methylation. This suggests a putative role for these histone modifications in maintaining allelic DNA methylation at ICRs. The three known ICRs with paternal methylation are exceptional, however, in that their sperm-derived DNA methylation is protected against the global wave of demethylation that occurs after fertilisation. We explored whether this could be linked to events occurring during spermatogenesis, and found that the paternally and maternally methylated ICRs in germ cells are marked by different combinations of histone modifications during the spermiogenic stages preceding the genome-wide histone-to-protamine exchange. We hypothesize that these pronounced differences could impact on how chromatin at these regions is assembled into specific structures during the final

stages of spermiogenesis, and could thus determine in which configuration ICRs are transmitted to the fertilised egg.

Most germ line-marked regions that control imprinting have oocyte-derived DNA methylation and correspond to promoters. ICRs with sperm-derived DNA methylation are different. They are not promoters and are not located within genes. Nevertheless, these ICRs are also CpG-rich and their allelic DNA methylation needs to be maintained throughout development, as for the maternally methylated ICRs. By performing ChIP on ES and adult liver cells, we detected pronounced allelic differences at the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrf1* ICRs in these somatic cells. Chromatin on the DNA-methylated allele was consistently associated with H4-K20 and H3-K9 trimethylation. In contrast, chromatin on the allele without DNA methylation was marked by H3-K4 dimethylation and H3 acetylation, and this in spite of the fact that these paternal imprint regions do not correspond to promoters. This observation seems particularly significant for H3-K4 dimethylation, a modification which is generally found to be largely restricted to promoter regions in different mouse cell types (Bernstein *et al*, 2006). The allelic histone modifications at the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrf1* ICRs were similar to those observed at the KvDMR1 (Figs 2 and 3) and at several other ICRs with maternal DNA methylation (unpublished data; Gregory *et al*, 2001; Fournier *et al*, 2002; Umlauf *et al*, 2004b). In this study and in previous work we also achieved allelic enrichment of H3-K9 dimethylation, albeit less pronouncedly than that for H3-K9 trimethylation. However, little H3-K9 dimethylation was brought down at the different ICRs analysed, several-fold less than in the precipitations against H3-K9 trimethylation (data not shown). This could imply that H3-K9 trimethylation is more predominant at ICRs than H3-K9 dimethylation, or that, at least, it is precipitated more readily in ChIP.

It is not known how trimethylation at both H3-K9 and H4-K20 could be linked to the somatic maintenance of DNA methylation at ICRs. There are intriguing similarities, however, with the organisation of pericentric heterochromatin in mammals. Also the condensed chromatin associated with pericentric satellite repeats is characterised by H3-K9 and H4-K20 trimethylation, and by DNA methylation, and is maintained in all the somatic lineages (Lehnertz *et al*, 2003; Martens *et al*, 2005, Kourmoulli *et al*, 2004). The histone methyltransferase (HMT) Suv39h1/2 is essential for the H3-K9 trimethylation at this constitutive heterochromatin, whereas the Suv4-20h HMT is involved in regulating its H4-K20 trimethylation (Lehnertz *et al*, 2003; Schotta *et al*, 2004; Kourmoulli *et al*, 2004). Whether the same, or yet-other, HMTases control trimethylation on H3-K9 and H4-K20 at mammalian ICRs should now be functionally explored. Interestingly, Suv39h HMT was also found to be important for the recruitment of the DNA methyltransferase *Dnmt3b* to pericentric heterochromatin

(Lehnertz *et al*, 2003). This suggests a mechanistic link between the maintenance of histone and DNA methylation at constitutive heterochromatin (Fuks, 2005). Support for such a link has come from studies in *Neurospora crassa*, in which H3-K9 trimethylation is essential for the maintenance of CpG methylation (Tamaru *et al*, 2003). The parallels between ICRs and pericentric heterochromatin raise the question of whether they could have a similar nuclear localisation as well. Particularly, do the parental copies of ICRs, marked by both histone methylation (H3K9me3 and H4K20me3) and DNA methylation, localise close to pericentric heterochromatin in the nucleus, and could this be important for maintaining their repressed chromatin? Stable recruitment to centromeric heterochromatin has been observed in lymphoid development for silent genes associated with Ikaros complexes (Brown *et al*, 1997). Furthermore, in the mammalian nucleus virtually all the H3K9me3 and H4K20me3 are located at pericentric heterochromatin, and Western blot analysis indicates that these trimethylation marks are largely present on the same nucleosomes (Kourmouli *et al*, 2004; Sims *et al*, 2006).

What, then, protects the unmethylated copy of ICRs against acquisition of DNA methylation? At ICRs with maternal DNA methylation, this could be linked to gene activity. Such a mechanism seems unlikely for the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrfl* ICRs, however, since these regions are not known to correspond to promoters. Rather, a consistent feature of chromatin on the unmethylated allele of all the ICRs analysed was the presence of H3-K4 dimethylation, together with H3-K9 and K14 acetylation (but not H4 acetylation). *In vitro*, H3-K4 methylation prevents binding of the NURD histone deacetylase complex and could thus prevent loss of histone acetylation (Zhang *et al*, 1999; Zegerman *et al*, 2002). Since HDAC1/2 associate with Dnmt1, such a mechanism could also potentially prevent DNA methylation (Fuks, 2005). Non-histone protein binding to the active chromatin is likely to be involved in protecting against DNA methylation as well, as was shown for the binding of the CTCF protein to the *H19* ICR (Schoenherr *et al*, 2003).

Unlike in the somatic cells, in spermatocytes, round spermatids and elongating spermatids we did not detect enrichment of H4-K20 and H3-K9 trimethylation at the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrfl* ICRs, in spite of the fact that these regions had high levels of DNA methylation. At these spermatogenic stages, therefore, these histone methylation marks are not associated with the maintenance of DNA methylation, suggesting that other histone modifications could be involved in maintaining DNA methylation during spermatogenesis. High levels of H4-K20me3 were detected at LINE1 repeats, however. It should be important to explore the mechanistic significance of this histone H4 methylation and whether it represents a characteristic of other repeat elements as well.

An important insight from this first locus-specific analysis of histone modifications during spermatogenesis is that different ICRs are marked by different combinations of histone modifications. Whereas H3-K4 methylation and H3 acetylation are strongly enriched at ICRs with maternal DNA methylation (*Igf2r* region 2 and the KvDMR1), these modifications are absent on the chromatin at the three paternal ICRs. H4 acetylation, in contrast, is detected at all the regions analysed. A challenge for the future will be to explore the significance of these combinations of histone modifications. For instance, is the presence of H4 acetylation on its own sufficient to allow for subsequent histone-to-protamine exchange, possibly involving the testis-specific bromodomain protein BRDT (Hazzouri *et al*, 2000; Pivot-Pajot *et al*, 2003)? Or, rather, would certain combinations of modifications on H4 and other core histones provide the signal for this chromatin remodelling during spermiogenesis? Particularly, does the absence of H3-K4 methylation and H3 acetylation (but presence of H4 acetylation) at the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrf1* ICRs still allow for histone-to-protamine exchange during late spermiogenesis? If not, in which chromatin configuration are these regions transmitted by the sperm to the fertilised egg? Exceptionally, we detected high levels of H4-K20 methylation at LINE1 sequences, and chromatin at these repeats was also enriched in H4 acetylation. This combination of H4 modifications was not observed at other regions, suggesting that it could be specific to LINE1 (and possibly other) repeats and could signal the formation of specific structures later in spermatogenesis.

The combinations of histone modifications present at the different loci analysed raise also the question whether testis-specific histone variants are selectively recruited in order to form specific structures during late spermatogenesis. This has been suggested for the recently identified H1 variant H1T2, which accumulates at the acrosomal side of the nucleus during late spermatogenesis (Martinanov *et al*, 2005). Additionally, in certain chromatin contexts, non-histone proteins could bind to methylated DNA sequences and could thus affect their subsequent recognition and remodelling. Present chromatin technologies are not well adapted to address these novel questions in a locus-specific manner during and after the global histone-to-protamine exchange (*i.e.*, in condensed spermatids and mature sperm). However, based on immuno-staining against H4K20me3, it has been suggested that a small percentage of the genomic DNA remains packaged with histones in mature mouse sperm (Kourmouli *et al*, 2004). In human sperm, up to fifteen percent of genomic DNA could be associated with histones rather than protamines (Gatewood *et al*, 1987; Gardiner-Garden *et al*, 1998). One possibility, therefore, would be that paternal ICRs, and other regions that are protected against paternal DNA demethylation in the zygote, do not undergo the canonical histone-to-protamine exchange and remain nucleosomally organised in mature sperm. The present ChIP studies on

spermatocytes, round spermatids and elongating spermatids provided a first indication into this important possibility.

Material and methods

ES cells and adult tissues

Livers were dissected from mice obtained by crossing C57BL/6 females with *M. molosinus* males. Animal husbandry and breeding were licensed by the 'Direction Départementale des Services Vétérinaires'. For ChIP on ES cells (passages 19-21), line SF1-G was grown as described before (Dean *et al.*, 1998). For expression studies, brain and testis were dissected from 8-weeks old males.

ChIP on somatic cells and tissues, allelic discrimination by SSCP

ChIP was performed on adult liver, and on undifferentiated ES cells. All antibodies used were purchased from Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY. These were directed against dimethyl H3-K4 (#07-030), dimethyl H3-K9 (#07-212), trimethyl H3-K9 (#07-442), acetyl H3-K9 (#06-942), acetyl H3-K9+14 (#06-599), trimethyl H4-K20 (#07-463), acetyl H4(#06-866) and H2A(#07-146). Antiserum against TP2 was a kind gift from Dr WS Kistler. Unfixed chromatin fragments of 1-7 nucleosomes in length were prepared as described before (Umlauf *et al.*, 2004a). About 3µg of chromatin were used per ChIP, using ~2µg of affinity-purified antibody. Amplification by radio-active PCR was with primers described in Supplementary Table I. Parental alleles were distinguished by electrophoretic detection of SSCP polymorphisms in the PCR products by 24 hours-migration through a 1xTBE non-denaturing acrylamide gel. Maternal and paternal band intensities were determined using Aida-2 software.

ChIP on spermatogenic cells

Spermatogenic cells obtained from testes of 8-10 weeks old males were fractionated using the Bellvé method (Bellvé *et al.*, 1993), described in detail in Pivot Pajot *et al.* (2003). Briefly, mouse testes were dissected, and processed to obtain a homogenous cell suspension. Cells were then laid on top of a 2-4 % BSA gradient in an airtight sedimentation chamber at 4°C. This sedimented the cells according to their size and density. Fractions were collected after 70 minutes, were developmentally staged using a phase-contrast microscope, and were pooled to obtain cell populations enriched in each of the stages: spermatocytes, round spermatids, and a mix of elongating (70%) and round spermatids (30%). Cells were resuspended and lysed in 15 mM Tris-HCl pH 7.4, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 12 % sucrose, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.65 mM spermidine, 0.03% TritonX-100, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail (Roche, according to the manufacturer's instructions), 0.5 mM PMSF, and 330 nM TSA.

After 10 minutes centrifugation at 200.g, the nuclear pellet was washed in the same buffer omitting EDTA, EGTA and Triton, and was centrifuge for 10 min at 200.g. Nuclei were then re-suspended in 500 μ L MNase buffer (Umlauf *et al*, 2004b), and approximately 1 million nuclei were digested for 3 min with 3 units of MNase at 37°C. MNase was inactivated by adding EDTA to a concentration of 40 mM and chilling on ice. Centrifugation at 18000.g for 10 minutes allowed us to separate the S1 fraction (corresponding to small chromatin fragments) and a second fraction of larger oligonucleosomes obtained after overnight dialysis, as described (Gregory *et al*, 2001; Umlauf *et al*, 2004a). Centrifugation at 18000.g enabled us to separate these fragments (S2 fraction) from nuclei fragments ('pellet fraction'). S1 and S2 fractions were mixed and used for ChIP. The ChIP procedure, washing conditions, and DNA extraction from the precipitated chromatin fractions were as for chromatin from liver and ES cells. Precipitated chromatin DNA fractions obtained after ChIP were analysed by real-time PCR (Mx3000p, Stratagene), using the Quantitect SYBR Green PCR kit (Qiagen). Primers used for PCR amplification are described in Supplementary Table II. Each PCR was run in triplicate. Results were defined as the percentage of precipitation, i.e., the ratio between the average value of the bound fraction and the average value of input chromatin.

Western Blotting

After fractionation, cells were disrupted in 8mM urea, and crude extracts were quantified using Bradford (Biorad Protein Assay). Western blotting of total protein extracts was performed according to standard procedures. Antisera were used at the following dilutions: 1/1000 for H2A and TP2 and 1/2000 for the other antisera.

RNA expression and EST search

Currently available EST databases were searched by performing a BLAST search with sequences of about 2 kb in length selected such as to encompass the ICR element. Total RNA was extracted from cells and tissues using Trizol reagent (InVitrogen). cDNA was generated with the Stratascript kit (Stratagene), using random primers. cDNA samples were analysed by real-time PCR using primer pairs described in Supplementary Table I.

Acknowledgements

We are grateful to all members of the Imprinting and Development group, and Thierry Forné, for helpful discussion and comments on the manuscript, and to W. Kistler for the TP2 antiserum. RF acknowledges grant funding from the European Science Foundation (ESF) EUROCORES programme 'EuroSTELLS', the CNRS, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and its ARECA

programme, and the Cancéropôle Grand Sud-Ouest initiative on ‘Genetic Instability’, and the ACI programme of the French Ministry of Education and Science. SK acknowledges grant funding from CLARA Cancéropôle ‘EpiMed’ and ‘EpiPro’ programmes, from ARECA (ARC), and the ‘Regulome’ network (ANR).

References

Bellve AR (1993) Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol* **225**: 84-113

Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal ., Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Jaenisch, R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125, 315-326.

Bourc'his D, Xu GL, Lin CS et al, (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294**: 2536-2539

Brown KE, Guest SS, Smale ST, Hahm K, Merkenschlager M, Fisher AG (1997) Association of transcriptionally silent genes with karos complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* **91**: 845-854

Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS (2000) The *H19* methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet* **9**: 2885-2894

Dean W, Bowden L, Aitchison A, Klose J, Moore T, Meneses JJ, Reik W, Feil R (1998) Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. *Development* **125**: 2273-2282

Delaval K, Feil R (2004) Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 188-195

Ferguson-Smith AC, Surani MA (2001) Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* **293**: 1086-1089

Fitzpatrick GV, Soloway PD, Higgins M. (2002) Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of *KvDMRI*. *Nat Genet* **32**: 426–431

Fournier C, Goto Y, Ballestar E, Delaval K, Hever AM, Esteller M, Feil R (2002) Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *EMBO J* **21**: 6560-6570

Fuks F (2005) DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin. Genet Dev* **15**: 490-495

Gardiner-Garden M, Ballesteros M, Gordon M, Tam PPL (1998) Histone- and protamine-DNA association: Conservation of different patterns within the B-Globin domain in human sperm. *Mol Cell Biol* **18**, 3350-3356

Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW (1987) Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* **236**, 962-964.

Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* **271**: 3459-3469

Gregory RI, Randall TE, Johnson CA, Khosla S, Hatada I, O'Neill LP, Turner BM, Feil R (2001) DNA methylation is linked to deacetylation of histone H3, but not H4, on the imprinted genes *Snrpn* and *U2af1-rs1*. *Mol Cell Biol* **21**: 5426-5436

Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S (2000) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**: 950-960

Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H (2004) Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* **429**: 900-903

Kimmins S, Sassone-Corsi P (2005) Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* **434**: 583-589

Kourmouli N, Jeppesen P, Mahadevhaieh S, Burgoyne P, Wu R, Gilbert DM, Bongiorno S, Prantera G, Fanti L, Pimpinelli S, Shi W, Fundele R, Singh PB (2004) Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J Cell Sci* **117**: 2491-2501

Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Brainschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Cen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH (2003) Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* **13**: 1192-1200

Li E, Beard C, Jaenisch R (1993) Role of DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**: 362-365

Li JY, Lees-Murdock DJ, Xu GL, Walsh CP (2004) Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* **84**: 952-60

Lin SP, Youngson N, Takada S, Seitz H, Reik W, Paulsen M, Cavallé J, Ferguson-Smith AC (2003) Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the *Dlk1-Gtl2* imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nat Genet* **35**: 97-102

Mancini-Dinardo D, Steele SJ, Levorse JM, Ingram JM, Tilghman SM (2006) Elongation of the *Kcnq1ot1* transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. *Genes Dev* **20**, 1268-1282

Martens JH, O'Sullivan RJ, Braunschweig U, Opravil S, Radolf M, Steinlein P, Jenuwein T (2005) The profile of repeat-associated histone lysine methylation sites in the mouse epigenome. *EMBO J* **24**: 800-812

Martianov I, Brancorsini S, Catena R, Gansmuller A, Kotaja N, Parvienene M, Sassone-Corsi P, Davidson I (2005) Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 2808-2813

Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**: 501-502

- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* **111**: 483-488
- Namekawa S, Park PJ, Zhang L-F, Shima JE, McCarrey JR, Griswold MD, Lee JT (2006) Postmeiotic sex chromatin in the male germ line of mice. *Curr Biol* **16**: 660-667
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, dean W, Reik W (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* **10**: 475-478
- Peters AHFM, Kubicek S, Mechter K, O'Sullivan RJ, Derijck AAHA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y *et al*, (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* **12**: 1577-1589
- Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S (2003) Acetylation-dependent chromatin reorganisation by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* **23**: 5354-5365
- Reik W, Walter J. (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* **2**: 21-32
- Schoenherr CJ, Levorse JM, Tilghman SM (2003) CTCF maintains differential methylation at the *Igf2/H19* locus. *Nat Genet* **33**: 66-69
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, SenguptaR, reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**: 1251-1262
- Sleutels F, Zwart R, Barlow DP (2002) The non-coding *Air* RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* **415**: 810-813
- Sims JK, Houston SI, Magazinnik T, Rice JC (2006) A trans-tail histone code defined by monomethylated H4 Lys-20 and H3 Lys-9 demarcates distinct regions of silent chromatin. *J Biol Chem* **281**: 12760-12766

- Takada S, Paulsen M, Teverdale M, Tsai CE, Kelsey G, Cattanach BM, Ferguson-Smith AC (2002) Epigenetic analysis of the *Dlk1-Gtl2* imprinted domain on mouse chromosome 12: implications for imprinting control from comparison with *Igf2-H19*. *Hum Mol Genet* **11**: 77-86
- Tamaru H, Zhang X, Millen D, Singh PB, Nakayama J, Grewal SI, Allis CD, Cheng X, Selker EU (2003) Trimethylated lysine-9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat Genet* **34**, 75-79
- Thorvaldsen JL, Duran KL, Bartolomei MS (1998) Deletion of the *H19* differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of *H19* and *Igf2*. *Genes Dev* **12**: 3693-3702
- Ueda T, Abe K, Miura A, Yuzuriha M, Zubair M, Noguchi M, Niwa K, Kawase Y, Kono T, Matsuda Y, Fujimoto H, Shibata H, Hayashizaki Y, Sasaki H (2000) The paternal methylation imprint of the mouse *H19* gene locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes Cells* **5**: 649-659
- Umlauf D, Goto Y, Feil R (2004a) Site specific analysis of histone acetylation and methylation. *Methods Mol Biol* **287**: 99-120
- Umlauf D, Goto Y, Cao R, Cerqueira F, Wagschal A, Zhang Y, Feil R (2004b) Imprinting along the *Kcnq1* domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nat Genet* **36**: 1296-1300
- Wutz A, Smrzka OW, Schweifer N, Schellander K, Wagner EF, Barlow DP (1997) Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature* **389**: 745-749
- Yang Y, Li T, Vu TH, Ulaner GA, Hu JF, Hoffman AR (2003) The histone code regulating expression of the imprinted mouse *Igf2r* gene. *Endocrinology* **144**: 5658-5670
- Yoon BJ, Herman H, Sikora A, Smith LT, Plass C, Soloway PD (2002) Regulation of DNA methylation of *Rasgrf1*. *Nat Genet* **30**: 92-96

Zegerman P, Canas B, Pappin D, Kouzarides T (2002) Histone H3 lysine-4 methylation disrupts binding of nucleosome remodelling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J Biol Chem* **277**: 11621-11624

Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* **13**: 1924-1935

Figure 1 Schematic presentation of the ICRs that control imprinted expression at the *Igf2-H19*, *Dlk1-Gtl2* and *Rasgrfl* domains. Genes are presented as grey boxes; arrows indicate their allelic transcription status. ICRs are shown as filled black rectangles and correspond all to differentially methylated regions (DMRs); lollipops indicate their paternally derived CpG methylation. Thin lines indicate regions analysed by PCR and SSCP in precipitated chromatin fractions. The ICR controlling imprinted expression of the *Igf2* and *H19* genes on distal chromosome 7 is located 2-4 kb upstream of *H19* (Thorvaldsen *et al*, 1998), and has DNA methylation (indicated as a black bar) on the paternal chromosome (P). The ICR of the *Dlk1-Gtl2* domain on chromosome 12 is at 10-15 kb upstream of *Gtl2* (Lin *et al*, 2003). Only part of this >1 Mb domain is depicted. Potentially, imprinted expression of *Rasgrfl* on chromosome 9 is controlled by a DMR at 30 kb upstream of the gene. Establishment of DNA methylation at this putative ICR is controlled by a close-by repeat sequence (Yoon *et al*, 2002).

Figure 2 Allelic histone modifications at different ICRs in ES cells. ChIP was performed on undifferentiated ES cells against H3 lysine-4 dimethylation (H3K4me2), H3 lysine-9+14 acetylation (H3ac), H4 lysine-20 trimethylation (H4K20me3) or H3 lysine-9 trimethylation (H3K9me3). DNA was extracted from antibody-bound (B) and unbound (U) fractions. PCR amplification was followed by electrophoretic detection of SSCP polymorphisms. In each panel, the left lane shows the input chromatin used, followed by a control ChIP (C) without a histone-specific antiserum. For each of the bound fractions, we determined the ratio between the bands corresponding to the maternal (M) and paternal (P) alleles. Asterisks indicate ChIP samples where, after correction against the allelic ratio in the input chromatin, the allelic ratio was higher than 3 (more than 3-fold allelic enrichment). Typically, where only one parental allele is visible in the bound fraction, this corresponds to a >15 fold enrichment. (A) The KvDMR1 regulates imprinted expression along the *Kcnql* domain. The region analysed by PCR and SSCP is located at 100 bp from the *Kcnqlot1* transcription start site. (B) The *H19* ICR regulates imprinted expression at the *Igf2-H19* domain. PCR-SSCP was performed at a region located 2 kb upstream of *H19*. (C) The putative ICR of the *Rasgrfl* domain is located 30 kb upstream of *Rasgrfl*; a region at 200 bp from this DMR was analysed by PCR-SSCP. (D) The ICR of the *Gtl2-Gtl2* domain is located at 10-15 kb upstream of *Gtl2* (Lin *et al*, 2003).

Figure 3 Allele-specific histone methylation and acetylation in adult liver. ChIP and allelic discrimination by PCR-SSCP were as for the ES cells. Asterisks indicate the lanes where, after correction against the allelic ratio in the input chromatin, the allelic ratios were higher than 3. Typically, where only one parental allele is visible in the bound fraction, this corresponds to a >15 fold

enrichment. Shown are ChIP data for the ICR upstream of *H19* (A), the KvDMR1 (B), and the *Gtl2* ICR (C).

Figure 4 Levels of histone modifications and DNA methylation in male germ cells at different spermatogenic stages. (A) Schematic presentation of spermatogenesis and the different spermatogenic stages. The line with arrowhead on the right indicates when DNA methylation is detected at the *H19*, *Gtl2* and *Rasgrf1* ICRs and at LINE1 repeats. ChIP was performed on primary spermatocytes (Sc), and the post-meiotic round spermatid and elongating spermatid stages. (B) Total protein fractions corresponding to spermatocytes, and to round (samples R1 and R2), and elongating (E1 and E2) spermatids were used for Western blotting (for details, see Materials and Methods). Equal amounts of protein were loaded in the different lanes. Immunostaining was with antisera against different histone modifications, and antisera directed against histone H2A and transition protein TP2. Measured band intensities were normalized using H2A, and are presented in the graph to the right. Note that the elongating spermatid fraction 2 corresponds to a later stage than fraction 1, explaining the higher TP2 expression. (C) Analysis of DNA methylation at ICRs in spermatocytes and round and elongating spermatids. Total genomic DNA was digested with the methylation-sensitive enzyme *CfoI*, followed by real-time PCR amplification across the ICRs of *H19*, *Rasgrf1*, *Gtl2*, KvDMR1 and *Igf2r* region 2. Also included are the *Hprt1* CpG island and LINE1 sequences. Plotted for each locus is the percentage of digested by *CfoI*. (D) Purification of unfixed chromatin fragments from spermatocytes, round and elongating spermatids. Extracted nuclei were incubated for a short time in a buffer containing MNase. DNA was purified and electrophoresed through a 1 % agarose gel, followed by ethidium bromide staining of the gel. In all three preparations, chromatin fragments were 1-7 nucleosomes in length.

Figure 5 H3 modifications distinguish different ICRs in spermatocytes and at postmeiotic stages of spermatogenesis. The abundance of H3K4me2, H3K9ac, H4K20me3 and H4ac was assessed in spermatocytes (Sc), in round spermatids (R), and in elongating spermatids (RE) by ChIP followed by quantitative PCR amplification. Seven different regions were analysed in the bound fractions. For each graph, precipitation of specific histone modifications is represented as the percentage of the input chromatin that was brought down by the specific antiserum at the locus of interest. These values are the average of two independent ChIP experiments, and were corrected for background levels of precipitation at the different loci analysed (background precipitation was determined with a non-histone related antiserum and was <3% at all regions analysed).

Table I : mRNA expression in spermatogenic cells and tissues *

	Hprt1	Tnp1	Dlk1	Kcnq1ot1
spermatocytes	1	179	0.051	1.38
Round spermatids	1	983	0.113	0.88
Elongating spermatids	1	2918	0.086	1.48
testis	1	77.5	0.067	0.024
brain	1	0.001	0.935	0.051

*Expression levels were corrected against Hprt1 expression, which was defined as 1.

Figure 1

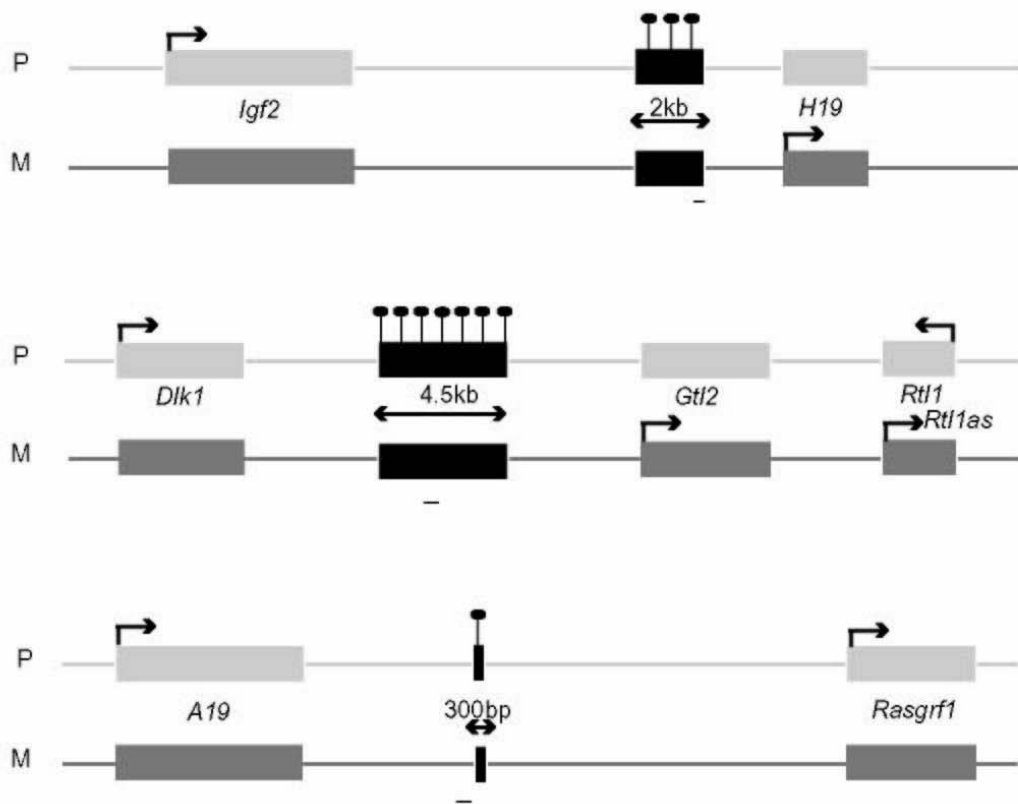


figure 2

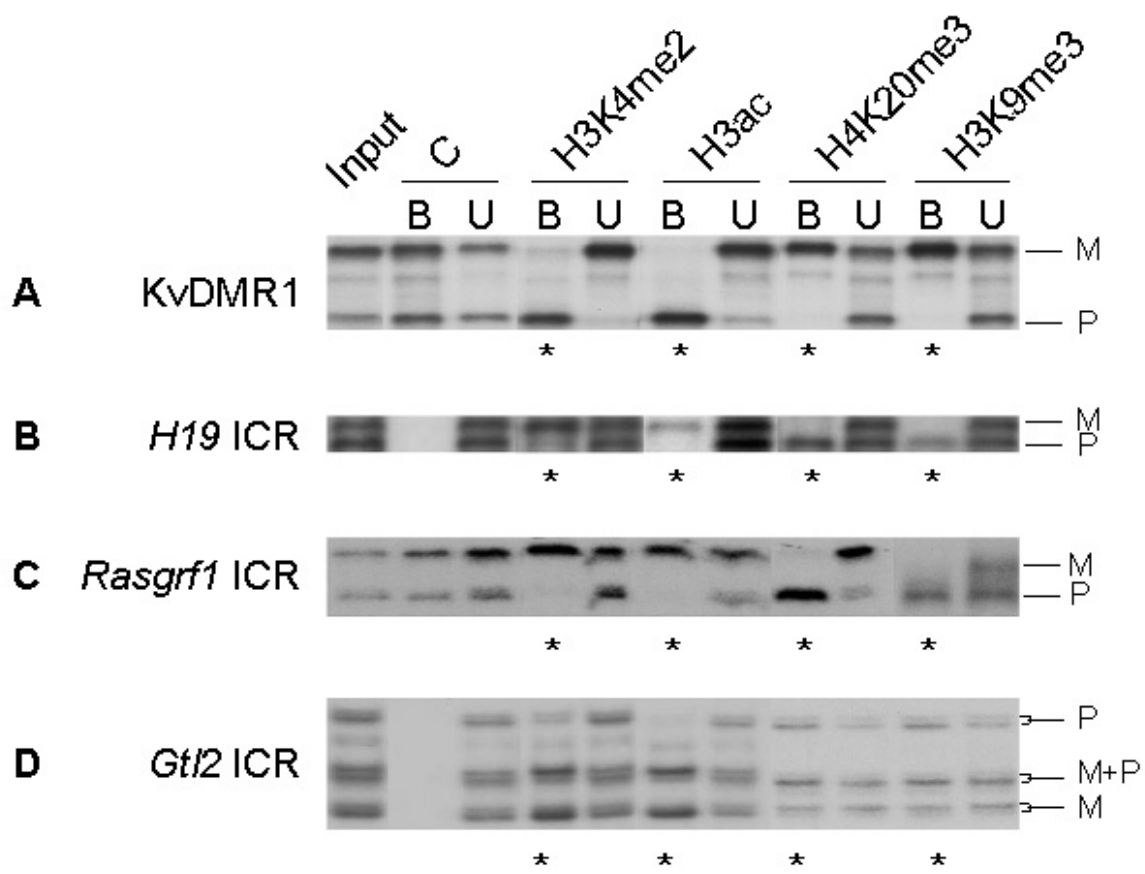


figure 3

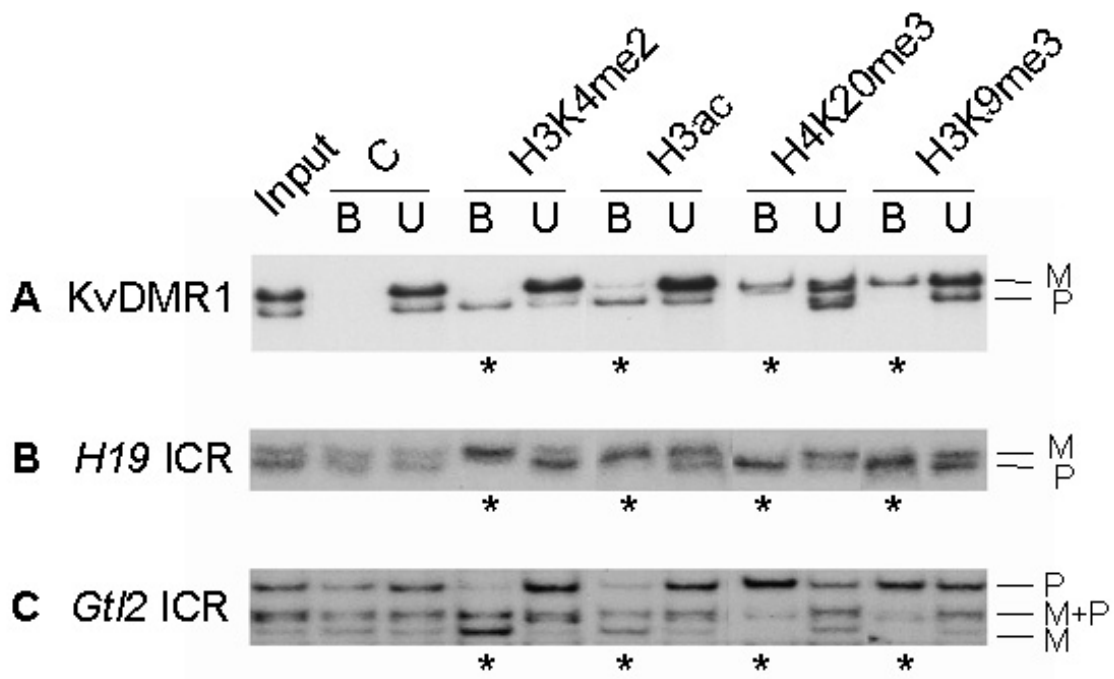


figure 4

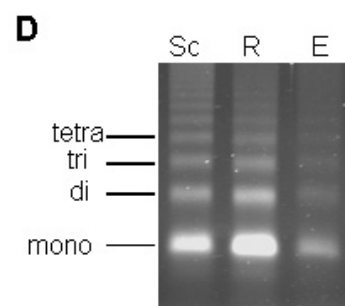
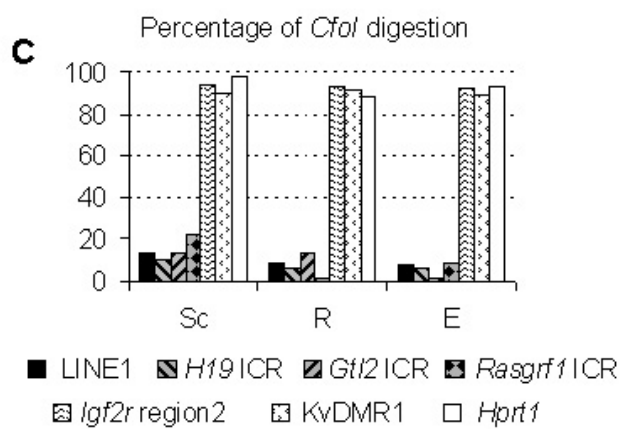
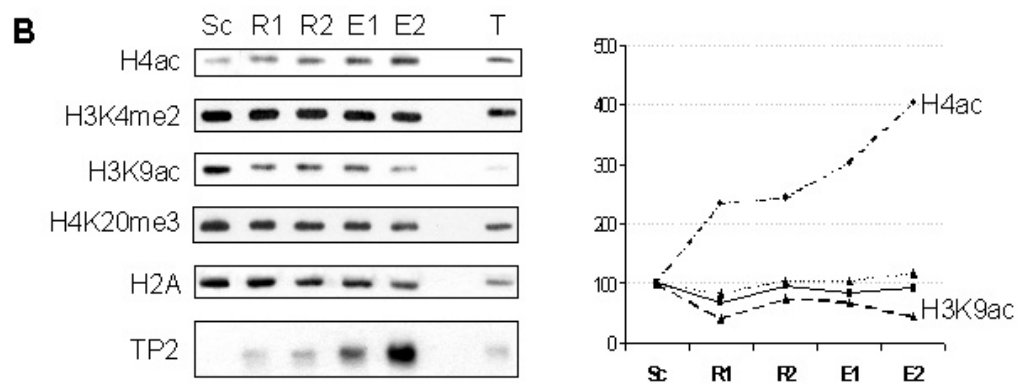
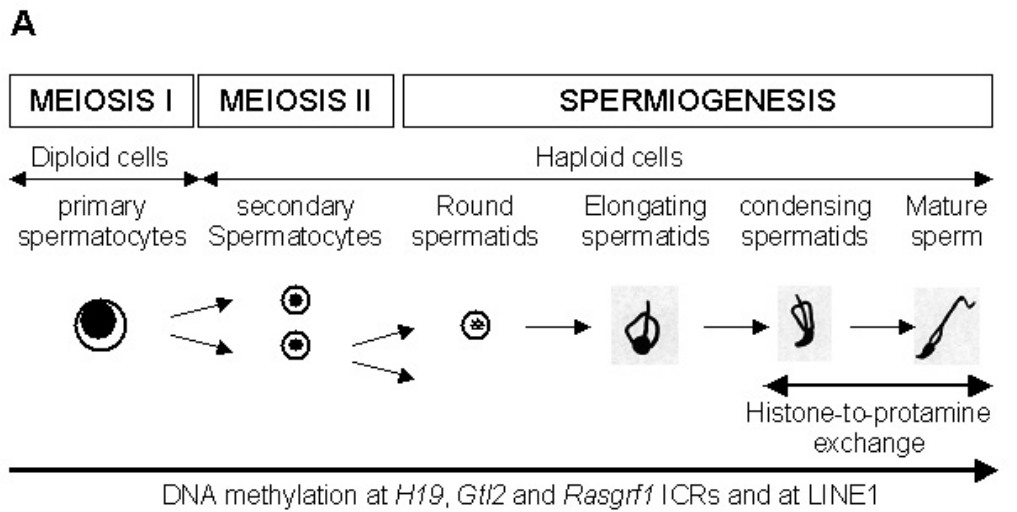
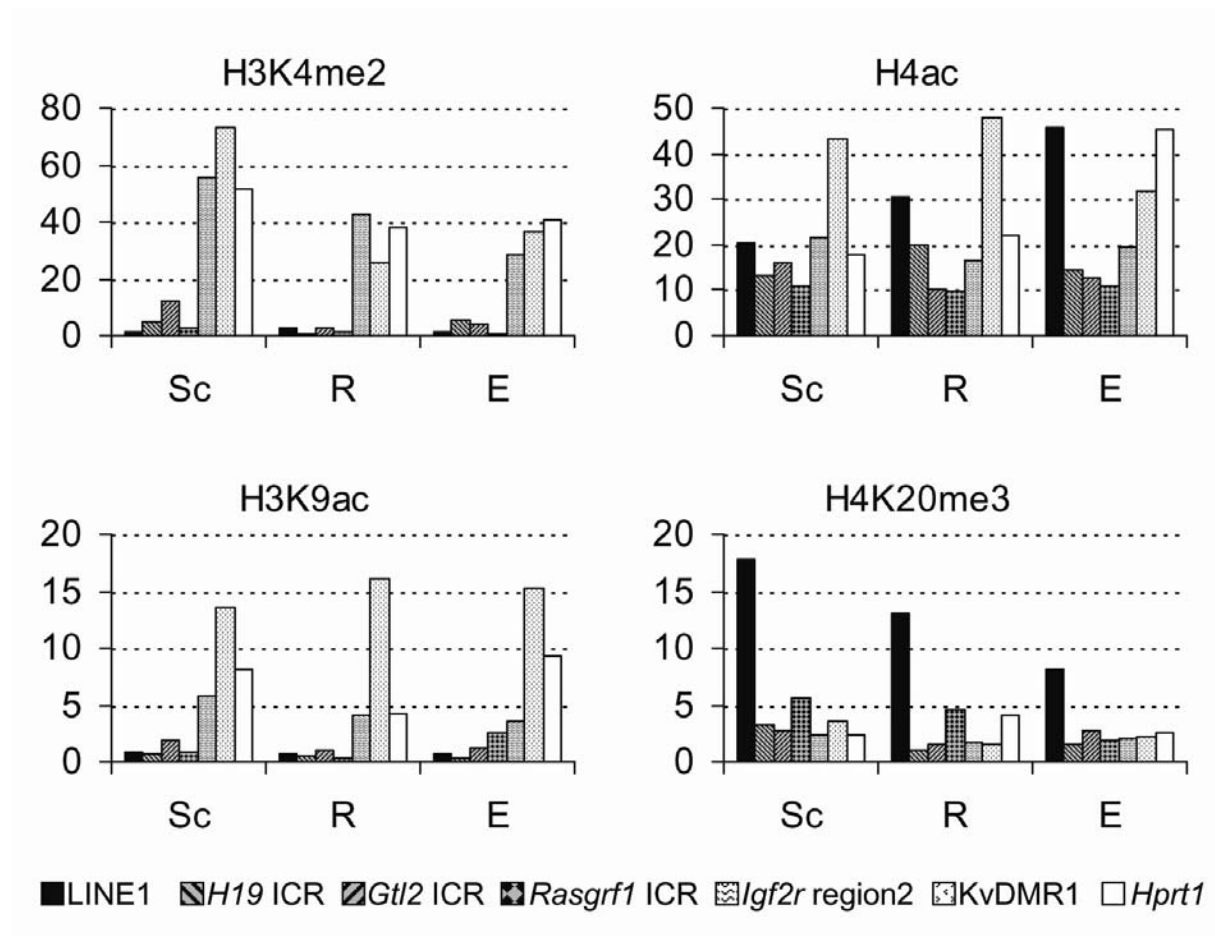


figure 5



I.3. Rôle fonctionnel de la phosphorylation de la sérine 1 de l'histone H4 au cours de la spermiogénèse

I.3.1. Principaux résultats

Pour la première fois, le remodelage de la chromatine associé à la différenciation des gamètes a été étudié conjointement dans plusieurs espèces. Le rôle fonctionnel d'une modification d'histone, la phosphorylation de la sérine 1 de l'histone H4 (H4S1P), a été caractérisé lors de la sporulation chez la levure, et la spermatogénèse chez la drosophile et chez la souris.

~ H4S1P est nécessaire à la sporulation

La sporulation des levures est induite par une détérioration des conditions de vie des levures, comme par exemple une privation des nutriments. Cette voie de différenciation passe par un brassage du génome des levures diploïdes au cours de la méiose, puis une différenciation des cellules haploïdes en spores. Les spores s'entourent d'une paroi très résistante, alors que leur noyau se compacte. Elles entrent alors dans un état inactif, attendant que les conditions environnementales changent.

La phosphorylation de la sérine 1 de l'histone H4 apparaît après la méiose, et est retrouvée au sein des spores. Son apparition serait contrôlée par la kinase SPS1, exprimée lors de la méiose. L'inactivation de *sps1*, au même titre que la mutation de la sérine 1 d'H4 en alanine, induit une réduction dramatique de l'efficacité de la sporulation.

~ H4S1P compacte la chromatine des spores

La mutation de la sérine 1 de l'histone H4 induit une augmentation du volume des spores, suggérant un rôle dans la compaction de la chromatine. Des expériences de ChIP ont quantifié l'accessibilité des histones lors de la sporulation, et confirment que H4S1P favorise la compaction du noyau des spores.

~ H4S1P est conservée chez la drosophile et la souris

H4S1P a été conservée à travers l'évolution car est détectée dans la phase post méiotique de la spermatogénèse de la drosophile et de la souris. Cependant, le marquage disparaît lors de

l'allongement des spermatozoïdes. Cette disparition est probablement liée à l'extraction et l'enlèvement des histones, car elle coïncide avec l'apparition des protéines de transition.

Le rôle fonctionnel d'H4S1P contraste avec les nombreuses modifications d'histones impliquées dans des événements moléculaires localisés (transcription, réparation de l'ADN, etc). De plus, cette modification intervient dans la production de gamètes de manière si fondamentale qu'elle a été conservée de la levure à la souris.

1.3.2. Article sous presse

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Shelley Berger et Thanuja Krishnamoorthy (The Wistar Institute, Philadelphia, Etats-Unis) et est sous presse dans *Genes and Development*.

J'ai travaillé personnellement sur l'ensemble des résultats portant sur la spermatogénèse murine.

L'article est présenté page suivante. Des résultats récents complètent l'étude fonctionnelle de cette modification, et seront présentés en I.3.3.

**Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast
and is conserved in fly and mouse spermatogenesis**

Thanuja Krishnamoorthy,¹ Xin Chen,² Jerome Govin,³ Wang L. Cheung,^{4,5}
Jean Dorsey,¹ Karen Schindler,⁶ Edward Winter,⁶ C. David Allis,^{4,7}
Vincent Guacci,⁸ Saadi Khochbin,³ Margaret T. Fuller,² and Shelley L. Berger^{1,9}

Running Title: Histone H4 Ser1 phosphorylation during gametogenesis

¹Gene Expression and Regulation Program, The Wistar Institute, Philadelphia, PA 19104

²Department of Development Biology, Stanford University School of Medicine, Stanford CA 94305

³INSERM U309 - Institut Albert Bonniot Faculté de Médecine, Domaine de la Merci 38706 La Tronche, France

⁴Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Virginia, Charlottesville, VA 22908

⁵current address: Department of Pathology, Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD 21287

⁶Department of Biochemistry and Molecular Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia PA 19107

⁷current address: Laboratory of Chromatin Biology, The Rockefeller University, NY 10021

⁸Howard Hughes Medical Institute/Carnegie Institution, Department of Embryology, Baltimore, MD 21218

⁹Corresponding Author: Gene Expression and Regulation Program, The Wistar Institute, 3601 Spruce Street, Rm 201, Philadelphia, PA 19104, Email: berger@wistar.org, FAX: 215-898-0663

Abstract

Sporulation in *S. cerevisiae* is a highly regulated process wherein a diploid cell gives rise to four haploid gametes. In this study we show that histone H4 Ser1 is phosphorylated (H4 S1ph) during sporulation, starting from mid-sporulation and persisting to germination, and is temporally distinct from earlier meiosis-linked H3 S10ph involved in chromosome condensation. A histone H4 S1A substitution mutant forms aberrant spores and has reduced sporulation efficiency. Deletion of sporulation-specific yeast Sps1, a member of the Ste20 family of kinases, nearly abolishes the sporulation-associated H4 S1ph modification. H4 S1ph may promote chromatin compaction, since deletion of *SPS1* increases accessibility to antibody immunoprecipitation; further, either deletion of Sps1 or an S1A substitution results in increased DNA volume in nuclei within spores. We find H4 S1ph present during *D. melanogaster* and mouse spermatogenesis, and similar to yeast, this modification extends late into sperm differentiation relative to H3 S10ph. Thus, H4 S1ph may be an evolutionarily ancient histone modification to mark the genome for gamete-associated packaging.

Introduction

Genetic and epigenetic information is transferred to a new cell generation through the gametogenesis process. Dramatic changes in chromatin structure occur during both metazoan spermatogenesis and yeast sporulation which involves DNA compaction. In addition, spermatogenesis requires removal of most canonical histones and substitution with histone variants and histone replacement proteins (Govin et al. 2004; Kimmins and Sassone-Corsi 2005).

The nucleosome is the fundamental repeating unit of chromatin and harbors an octamer of basic histone proteins (two copies of dimeric H3/H4 and H2A/H2B) wrapped by ~147 bp of DNA (Luger et al., 1997). Nucleosomes pack into higher order chromatin structures, whose precise architecture are not understood. Post-translational modifications (PTMs) of histones (including acetylation, phosphorylation, methylation, and ubiquitylation) regulate chromatin function and contribute to its folding. PTMs occur in distinct patterns and in diverse cellular pathways. For example H3 S10ph correlates with both mitotic/meiotic chromosome condensation and transcriptional activation (Nowak and Corces 2004). Chromosome condensation includes a large number of possibly redundant histone phosphorylation marks, including S10 (Hendzel et al. 1997), T3 (Polioudaki et al. 2004), T11 (Preuss et al. 2003), S28 (Goto et al. 1999; Goto et al. 2002) within H3, S1 within H4 (Barber et al. 2004), S1 within H2A (Barber et al. 2004), and S10 in H2B (Ahn et al. 2005b). Phosphorylation at H3 S10 has been causally linked to mitotic chromosome condensation in *Tetrahymena* (Wei et al. 1999).

Yeast sporulation is triggered by nutrient deprivation, including nitrogen starvation, growth in non-fermentable carbon sources, or the absence of glucose (Kupiec 1997). The diploid yeast cell then

initiates a transcriptional cascade characterized by expression of several temporally distinct classes of genes: early, middle, mid-late and late (Mitchell 1994; Chu et al. 1998; Primig et al. 2000). DNA is replicated and two meiotic divisions occur during the early and middle stages of the sporulation program. Mid-late and late gene products regulate spore morphogenesis/maturation (Chu et al. 1998; Chu and Herskowitz 1998). Haploid spores remain quiescent for an indefinite time until favorable conditions initiate germination. Spores have a specialized wall that imposes volume restrictions on the nuclei and serves as a physical barrier against environmental stress.

Covalent histone modifications have been characterized during early and middle stages of yeast sporulation, temporally coincident with gene regulation, with the occurrence of recombination of double-strand breaks, and with meiotic chromosome condensation. Dynamic H3 and H4 acetylation (H3ac and H4ac)/deacetylation activates transcription of early and middle genes (Chua and Roeder 1995; Rundlett et al. 1998; Burgess et al. 1999; Choy et al. 2001; Deckert and Struhl 2001). DNA synthesis occurs during S phase followed by meiosis I and II which are accompanied by histone phosphorylation (Hsu et al. 2000; Ahn et al. 2005b). S10ph on both H2B and H3 correlate with meiotic chromosome condensation and disappear during meiotic divisions. Histone ubiquitylation (ub) and methylation (me) are involved in meiotic DNA recombination and middle gene expression (Nislow et al. 1997; Robzyk et al. 2000; Hwang et al. 2003; Wood et al. 2003; Sollier et al. 2004; Yamashita et al. 2004). It is not known whether histone PTMs influence late gene transcription, or whether they regulate spore-associated genome compaction.

Higher eukaryotic spermatogenesis is conceptually similar to yeast sporulation in the requirement for remodeling and compaction of the genome. Spermiogenesis is marked by two post-meiotic events. In the first event spermatocytes differentiate into round, and then elongated spermatids. The second major event involves PTMs of histones, replacement of histones by histone variants, then by highly basic transition proteins (TPs) and, finally, by protamines (Sassone-Corsi 2002; Govin et al. 2004; Kimmins and Sassone-Corsi 2005). These changes in histone composition promote efficient genome compaction, sperm function, and increased fertility (Oliva and Dixon 1991; Yu et al. 2000; Cho et al. 2001; Zhao et al. 2001; Meistrich et al. 2003; Lewis et al. 2004). For example, the timing of H4ac correlates with compaction and may have a direct mechanistic role through binding of the testes-specific bromodomain protein BRDT (Pivot-Pajot et al. 2003). A large number of phosphorylations occur on the testes-specific histone relatives and replacement proteins, whose molecular mechanisms are not yet elucidated, but may be involved in genome compaction (Oliva and Dixon 1991; Wu et al. 2000; Meetei et al. 2002). Many components of the spermatogenesis program, including certain histone PTMs, show evolutionary conservation from yeast to mammals. However, it is not known whether histone replacement proteins have a role in flies and yeast, and if not, how lower eukaryotes achieve compaction with only canonical histones.

There is a paucity of information about the role of histone covalent modifications in the broad chromatin restructuring events in gametes. In the current study we describe the occurrence of H4 S1ph during yeast sporulation, as well as during fly and mouse spermatogenesis. H4 S1ph persists after the disappearance of H3 S10ph during gametogenesis in each organism and in yeast is stably present in mature spores. Our findings suggest an evolutionarily conserved role of H4 S1ph during chromatin compaction in the later stages of gametogenesis.

Results

H4 S1ph is observed in sporulating yeast cells and is dependent on Sps1, a middle sporulation specific kinase

Histone H3 phosphorylation occurs during both mitotic and meiotic chromosome condensation (Hsu et al. 2000). Because H4 S1ph is detected during mitotic chromosome condensation (Barber et al. 2004), we tested whether histone H4 S1 is phosphorylated during sporulation. We used an antibody that specifically recognizes H4 S1ph (Barber et al. 2004; Cheung et al. 2005). Diploid yeast cells were induced to proceed synchronously through sporulation and samples were taken at the indicated time points. A strong increase in H4 S1ph occurs at approximately 10 hours in sporulation media (Figure 1A). We found that the timing of this modification varies between 8 and 12 hours depending on the severity of starvation, amount of glucose, and aeration of the media (see below).

The timing of the histone H4 phosphorylation appears to coincide with the expression of middle genes. *SMK1* and *SPS1* are Ser/Thr kinases that are expressed in a middle sporulation-specific fashion and function in parallel pathways to regulate spore wall formation (Friesen et al. 1994; Krisak et al. 1994; Chu and Herskowitz 1998; Iwamoto et al. 2005). To determine whether these kinases are required for H4 S1ph, we tested diploid strains deleted for either *SPS1* or *SMK1* and carrying plasmid-borne FLAG-H4. S1ph in FLAG-H4 immunoprecipitates is induced in the *smk1Δ* strain (Figure 1B, upper panel), but the signal is abolished in the *sps1Δ* strain (Figure 1B, lower panel). This signal reduction was observed both for FLAG- H4 and endogenous H4 (suggesting that mixed octamers immunoprecipitated with FLAG antibody). Thus, sporulation-linked H4 S1ph requires Sps1, a middle sporulation specific kinase in the Ste20 family of kinases.

SPS1 encodes a kinase whose transcript levels peak at mid-sporulation and then decrease (Friesen et al. 1994). We compared the onset of H4 S1ph and induction of Sps1 protein during the sporulation program (Figure 1C). FLAG-Sps1 expression is induced ~12 hrs post-induction in sporulation medium containing 0.05% glucose (where the sporulation program is slightly delayed compared to medium lacking glucose or increased aeration). Induction of H4 S1ph exhibits similar timing as epitope-tagged

Sps1 (Fig. 1C), however, H4 S1ph persists even after Flag-Sps1 has declined (Fig. 1C). Sps1 is degraded rapidly during purification (data not shown), thus we have been unable to determine whether Sps1 is the direct kinase for H4 S1 during sporulation.

Phosphorylation of H3 S10 and H4 S1 are temporally distinct during yeast sporulation

As mentioned above, H3 S10ph occurs during meiotic chromosome condensation, increasing during late prophase and declining as the meiotic divisions occur (Hsu et al. 2000). Because both H3 S10ph and H4 S1ph occur during mitotic chromosome condensation (Barber et al. 2004), it was surprising that S1ph appeared to occur later in sporulation. In fact, H4 S1ph also occurs in response to DNA damage-induced double strand breaks in vegetative growth (Cheung et al. 2005; Utley et al. 2005), which are similar to meiosis-specific double strand breaks that occur in meiotic prophase. These observations led us to further examine the timing of H4 S1ph induction during sporulation, especially relative to H3 S10ph and meiotic divisions. Extracts were prepared for Western blotting and, in parallel; cells were DAPI stained to follow the meiotic divisions. The expression of the meiosis-specific Ime2 kinase increases shortly after meiotic induction and increases further as the meiotic divisions are occurring (Figure 2A, left panel) (Benjamin et al. 2003). As previously observed (Hsu et al. 2000), H3 S10ph peaks at ~4 hours coinciding with early sporulation (Figure 2A) and then declines by 6 hours. In contrast, H4 S1ph increases at ~8 hours, when 80% of cells have either completed MI or MII. (Figure 2A). Thus, while mitotic chromosome condensation is marked with redundant phosphorylation of H3 S10 and H4 S1, these phosphorylations are temporally distinct during sporulation suggesting separate functions.

We determined the duration of H4 S1ph during sporulation. Western blotting relative to unmodified H3 indicates that it persists to the longest post-meiotic time point tested (30 hours) (Figure 2B). Thus, unlike transient H3 S10ph, H4 S1ph appears to be stable. We examined S1ph during germination, when the haploid gamete begins to grow in nutrient-rich conditions. H4 S1ph declines between 2 and 4 hours following resuspension of the cells in rich YPD medium (Figure 2B). Thus, H4 S1ph is a stable modification in spores that is reversed when cells resume mitosis. Induction of H4 S1ph exhibits similar timing as epitope-tagged Sps1 (Figure 1C), however, H4 S1ph persists even after FLAG-Sps1 has declined (Figure 1C). Taken together, these data suggest that a H4 S1ph phosphatase is active during germination but not in spores.

Decreased sporulation in histone H4 S1A substitution mutant

Histone H3 S10ph correlates with mitosis/meiosis, however, substitution mutations in this site do not affect these processes in yeast (Hsu et al. 2000). We investigated the function of H4 S1ph by generating diploid yeast bearing substitution mutations at Ser1 within the sole copy of cellular H4. Cells were collected at the end of the sporulation program and tetrads were counted under light microscopy to obtain a terminal sporulation frequency. H4 S1A sporulates at approximately one-third of wild type frequency (Figure 2C). We found that H4 R3A sporulates with frequency similar to wild type (Figure 2C), indicating that the effect of S1A mutation is not likely to be caused by nonspecific alteration of the structure of the H4 tail.

Broad genomic distribution of H4 S1ph and Sps1

We investigated the localization of H4 S1ph and Sps1 using quantitative chromatin immunoprecipitation (ChIP). Fractions were collected from diploid wild type and *sps1*Δ strains after 0 and 10 hours in sporulation media. There was 20- to 30-fold enrichment of H4 S1ph at 10 hours on the promoters of mid-late/late *DIT1* and *SPS100* genes (Figure 3A) (Percival-Smith and Segall 1986; Law and Segall 1988; Briza et al. 1990; Chu et al. 1998). Consistent with the Western data (Figure 1B, lower panel), deletion of *SPS1* strongly decreased the H4 S1ph ChIP signal at *DIT1* and *SPS100* (Figure 3A, left panel). The H4S1ph ChIP signal that persists in the *sps1*Δ strain may either be due to background detection of unmodified histone H4 or may indicate another kinase pathway to place this modification.

We determined whether H4 S1ph is specifically enriched at genes expressed at this time, or if it is present more broadly in the genome. We found enrichment at many genomic locations, including the Chr VI-R telomere tip (Figure 3B, middle panel), the *ACT1* and *GALI* genes, as well as the ORF of *SPS100* (data not shown). We found by ChIP that endogenously tagged FLAG-Sps1 is present at *SPS100*, *DIT1* and other locations (Figure 3A, right panel). Thus, both H4 S1ph and Sps1 appear to be broadly distributed across the genome during middle-sporulation when H4 S1ph and Sps1 are induced.

We observed by Western analysis that Sps1 expression was transient whereas H4 S1ph was persistent through sporulation (Figures 1C and 2B). We next addressed the persistence of H4 S1ph and Sps1 genome association by ChIP. The levels peaked at 10 hours in sporulation media and declined thereafter (Figures 3B). This transience of the ChIP signal is the case both for association at *SPS100* (Figure 3B, left and right panels), and for association at other regions, such as the telomere (Figure 3B, middle panel). We were surprised that, in the wild type strain, when assayed by Western blotting, H4 S1ph persists well into germination (Figure 2B), but when assayed by ChIP, it peaks at 10 hours and declines by 24 hours (Figure 3B), which is addressed in more detail below.

The broad genomic distribution of H4 S1ph and Sps1 at 10 hours in sporulation media prompted us to test the specificity of the ChIP assay. We examined the localization of Sum1, a repressor of sporulation genes, at its cognate binding sites upstream of *SMK1* and *DIT1* as well as at the unrelated *SPS100* upstream sites. Epitope-tagged Sum1 is specifically recruited to *SMK1* and *DIT1* but not to *SPS100*, while H4 S1ph is again found associated at each of these genes (Figure 4A), suggesting specificity in the broad co-distribution of Sps1 and S1ph.

Sps1 affects histone ChIP accessibility

To try to reconcile the discrepancy between the Western data (Figure 2B) and ChIP results (Figure 3B) with respect to H4 S1ph, we hypothesized that during immunoprecipitation, the H4 S1ph antibody may not be able to access the target histone because of chromatin compaction occurring at later stages of sporulation. To test this, we carried out ChIP using antibodies recognizing unmodified histone H3 and H4, and postulated that the ChIP signals may increase in an *sps1Δ* strain compared to wild type because of potential decompaction in the absence of H4 S1ph. In addition, because H4 S1ph levels are constant in the *smk1Δ* strain (Figure 1B), which has a spore wall defective phenotype similar to *sps1Δ* mutant (Friesen et al. 1994; Krisak et al. 1994), we used this strain as a control for spore formation effects.

At 10 hours, both H3 and H4 ChIP signals are higher in the *sps1Δ* strain compared to the wild type strain (Figure 4B), and are slightly lower in the *smk1Δ* strain (Figure 4B, right panel). Beyond 20 hours both the H3 and H4 ChIP signals decrease, but to a greater extent in the wild type and *smk1Δ* strains relative to the *sps1Δ* strain (Figure 4B). Note that Western analyses show comparable amounts of histones in each strain across time courses similar to these (relative to total protein) (e.g. Figure 1). These data suggest that the loss of H4 S1ph ChIP signal at 24 hours in the wild type strain (Figure 3B), despite high Western signal (Figure 2B), may be due to inaccessibility of the histones as a result of chromatin compaction.

DNA volume and nuclear size are increased by mutation of H4 S1A

To more directly investigate chromatin compaction, and to determine whether compaction is due to H4 S1ph and not to other possible effects caused by deleting *SPS1*, we measured the area of DAPI stained nucleus in H4 wt (Figure 5A, a-c and g) compared to H4 S1A (Figure 5A, d-g) and in *smk1Δ* (Figure 5B, a-c and g) compared to *sps1Δ* (Figure 5B, d-g) strains. Sporulating yeast cells were collected, spheroplasted, and adhered to slides. Images of DAPI stained cells (a and d in Figures 5A and 5B) and the corresponding DIC images (b and e in Figures 5A and 5B) were digitally captured, merged (c and f in Figures 5A and 5B) and the areas of the spore nuclei were digitally measured (g in Figure 5A and 5B).

The data were clustered into $0.1 \mu\text{m}^2$ intervals. Larger DAPI stained nuclei were observed in spores of H4 S1A (mean = 0.96 ± 0.0498) compared to H4 wt (mean = 0.7838 ± 0.032), and in spores of *sps1* Δ (mean = 0.7682 ± 0.05) compared to *smk1* Δ (mean = 0.6458 ± 0.0259) (Figure 5). The histone substitution strains were treated with proteinase K and RNase A which likely accounts for larger nuclei. Thus, absence of H4 S1ph either in the *sps1* Δ strain or in the H4 S1A substitution mutant strain results in increased nuclear volume.

H4 S1ph persists during differentiation of fly spermatids

We investigated whether H4 S1ph and H3 S10ph also occur during male meiosis and spermatogenesis in *Drosophila* (Fuller 1993). In spermatocytes undergoing the first meiotic division, metaphase I chromosomes stained strongly against both H4 S1ph (Figure 6A) and H3 S10ph (Figure 6A') antibodies. The H4 S1ph signal was detected on meiotic chromosomes from prophase through telophase for both Meiosis I and Meiosis II cells (data not shown). In contrast, H3 S10ph staining was only prominent in metaphase and decreased substantially in anaphase and telophase. The H3 S10ph signal was also not detected in prophase spermatocytes (arrowhead in Figure 6I). The antibodies did not cross react between modified H4 and modified H3 in this assay, as staining of metaphase chromosomes with H4 S1ph antibody was blocked by competition with H4 S1ph peptide, but not by unmodified H4 peptide or H3 S10ph peptide (Figure 6D-F). Likewise, staining of metaphase chromosomes with H3 S10ph antibody was blocked by competition with the cognate peptide, but not by unmodified H3 peptide or H4 S1ph peptide (Figure 6G-I).

Immunofluorescence staining of *Drosophila* male germ cells undergoing spermatid differentiation revealed certain parallels between differentiation of yeast spores and male gametes in the behavior of H4 S1ph and H3 S10ph. During *Drosophila* spermatogenesis, as in yeast sporulation, H4 S1ph persisted until late in the terminal differentiation stages, while H3 S10ph levels were strongly reduced by the time meiosis was completed. Thus, in round and early elongating haploid spermatids, nuclei stained brightly for H4 S1ph (Figure 6B), while staining for H3 S10ph was nearly undetectable in the same cells (Figure 6B'). The H4 S1ph epitopes persisted in spermatid nuclei as cells grew flagella and elongated and were still detected in nuclei undergoing chromatin compaction and nuclear shaping (Figure 6C). Staining with H4 S1ph antibody gradually diminished at the later stages of nuclear elongation and shaping (compare * versus brackets in Figure 6C and C'') and was not detected in mature spermatids awaiting individualization. Staining for H3 S10ph was not detected in elongating spermatid nuclei at any stage (Figure 6C'). As mentioned above, incubation with competing peptides confirmed that the staining in round and elongating spermatid nuclei was due to H4 S1ph (Figure 6J-M').

H4 S1ph is present in post meiotic stages of mammalian spermatogenesis

We monitored histone H4 S1ph during mammalian spermatogenesis (Sassone-Corsi 2002). Dissociated mouse cells undergoing spermatogenesis were fractionated using a BSA gradient. Extracts from pooled fractions enriched in spermatocytes, round spermatids and round elongating spermatids were obtained to examine H4 S1ph and H3 S10ph by immunofluorescence and Western blotting. Consistent with our observations in flies, we detected H4 S1ph by immunofluorescence in spermatocytes and in further differentiated round spermatids, whereas H3 S10ph was observed only in spermatocytes (Figure 7A, a to l). Again, in agreement with the fly data, H4 S1ph disappears in elongating spermatids (Figure 7A, panel c).

Western blot analysis was carried out on extracts prepared from the different cell types and probed with H4 S1ph and H3 S10ph antibodies (Figure 7B). Again, H3 S10ph dramatically decreases after meiosis while H4 S1ph persists in post-meiotic stages. (Figure 7B). The quality of the fractionation procedure is shown by the pattern of H3 S10ph specifically in cells containing condensed meiotic chromosomes (compare Figure 7A, panels g-i to 7B). As an additional control the same blot was probed with an antibody that detects transition protein 2 (TP2), and as expected, TP2 accumulated in elongating cells (Figure 7B). Interestingly, the pattern of TP2 accumulation appeared to correlate with reduction of H4 S1ph (compare lanes 5 and 6 in Figure 7B).

Discussion

Histones and histone replacement proteins have long been known to be phosphorylated during vertebrate spermatogenesis (Sung and Dixon 1970). Indeed, H4 S1 phosphorylation was discovered in 1970 (Sung and Dixon 1970), however, the significance of this phosphorylation during gametogenesis has been unclear. In this study we examined S1ph in H4 during gametogenesis and find that the mark is conserved through evolution, appearing in diverse eukaryotes ranging from yeast to the metazoans *Drosophila* and mouse. In these three organisms H4 S1ph persists relatively late in the process of gametogenesis compared to meiosis-correlated H3 S10ph. We find that H4 S1ph is induced in yeast nearing completion of meiotic divisions, high levels are maintained to the end of sporulation, and the mark is strongly reduced following resumption of growth. We find that a single substitution mutation of H4 S1A lowers sporulation efficiency compared to wild type and increases the size of the nucleus. Thus, this histone mark appears to have a significant role during sporulation.

We do not yet know whether Sps1 is the direct kinase that phosphorylates H4 S1 because we cannot detect *in vitro* activity of recombinant Sps1 prepared in bacteria and we have been unable to prepare Sps1 from sporulating yeast (T.K., unpublished observations), which may be due to assembling spore walls (Lynn and Magee 1970) and abundant proteases (Klar and Halvorson 1975) present in

sporulating cells. However, Sps1 is required for H4 S1ph during sporulation (Figure 1B). Sps1 and H4 S1ph are induced coincidentally during mid-sporulation and become chromatin-associated, comparable in both timing and broad locations (Figure 1C and Figure 3). Deletion of SPS1 or substitution of Ser1 results in increased volume of DNA and increased nuclear size (Figure 5). Interestingly, Sps1 is a member of the Ste20/p21-activated kinase family, and yeast Ste20 and its mammalian counterpart, Mst1, have been identified as histone (H2B) kinases during apoptosis (Cheung et al. 2003; Ahn et al. 2005a).

H4 S1ph in yeast may be involved in chromatin compaction

H3 S10ph correlates with mitotic and meiotic chromosome condensation in all eukaryotes examined (Gurley et al. 1973; Paulson and Taylor 1982; Hendzel et al. 1997; Cobb et al. 1999; Hsu et al. 2000). However, it is unclear whether H3 S10ph contributes directly to condensation in yeast, because substitution mutation of the site does not alter either mitosis or meiosis (Hsu et al. 2000). Indeed, many histone phosphorylation sites in addition to H3 S10 are detected during mitosis (Goto et al. 1999; Goto et al. 2002; Preuss et al. 2003; Barber et al. 2004; Polioudaki et al. 2004), but none of these, or combinations of these, have yet been shown to alter growth in yeast (Hsu et al. 2000) (W.S. Lo and S.L.B., unpublished observations). In contrast, our results show reduction of overall sporulation efficiency by single substitution mutation of the H4 S1 site (Figure 2C).

Our data suggest that S1ph plays a role in genome compaction. H4 S1ph is persistent in spores, and is strongly reduced between two and four hours post-germination (Figure 2B). Consistent with a possible role in broad genome compaction, we detect the mark at many genomic locations throughout the genome (Figure 3 and 4A). Deletion of Sps1 was previously shown to alter transcription of mid-late and late sporulation genes (Friesen et al. 1994). However, because we find both the H4 S1ph mark and the putative kinase Sps1 at many genomic positions by ChIP, and not specifically at mid-late and late sporulation genes, it appears that the role of H4 S1ph is unlikely to be solely related to induction of these sets of genes. Most directly implicating a role for H4 S1ph in DNA compaction, we observe an increase in the size of the nucleus both in the absence of Sps1 as well as in the H4 S1A substitution mutant (Figure 5).

H4 S1ph may have a direct role in chromatin compaction within yeast spores. The amino terminal tails of histones are involved in chromatin fiber folding (Moore and Ausio 1997; Carruthers and Hansen 2000), and the X-ray crystal structure of the yeast mononucleosome reveals crystal packing contacts between the H4 tail and the DNA of a neighboring particle, suggesting a possible role in internucleosome contact *in vivo* (Suto et al. 2000; Zheng and Hayes 2003). *In vitro* biochemical analysis indicates that amino acids 14-19 of the H4 N terminal tail, and not tails of the other three core histones, are critical for

chromatin folding (Dorigo et al. 2003), and H4 K16ac inhibits the formation of higher order chromatin structures (Shogren-Knaak et al. 2006). H4 S1ph may oppose H4 K16 acetylation (Uteley et al., 2005).

In metazoans, H4 S1ph persists beyond the end of meiosis

Similarities in the processes of sporulation and spermatogenesis, particularly in the drastic reduction in nuclear volume in both processes, led us to examine whether H4 S1ph might also correlate with the timing of chromatin compaction during the latter process. We detect H4 S1ph extending well beyond the time that meiosis-associated H3 S10ph is reduced during *Drosophila* and mouse spermatogenesis (Figures 6 and 7). In these metazoans, H3 S10ph and H4 S1ph both occur during meiotic divisions and thus may play a role in chromosome condensation. However, following meiotic divisions, the H3 S10ph is dramatically lowered while H4 S1ph persists during the early stages of the developing spermatids when the genome begins to be compacted (Fuller 1993). This is true in mouse, as H4 S1ph continues to be present beyond the meiotic divisions and begins to be reduced contemporaneously with replacement of histones by the highly basic transition proteins (Figure 7B). Although we do not yet know whether H4 S1ph has a role in genome compaction in metazoans, our data indicate that H4 S1ph has an additional role beyond meiotic divisions, as is the case in yeast. One clear difference between H4 S1ph in lower eukaryotes compared to metazoans is the persistence of the mark in mature spores and elimination only after germination. Thus, while H4 S1ph may directly promote stable chromatin compaction in mature spores, its role in metazoans may help to compact the genome connected to histone replacement by basic transition proteins (Govin et al. 2004).

While many histone modifications have been correlated with broad genomic mechanisms such as transcription and DNA repair, the role of only few modifications has been elucidated in higher level biological processes. Here we report that a central biological process, gametogenesis, is critically controlled in yeast by a single histone modification. The similarities we observe between yeast and metazoans in the persistence of H4 S1ph after the decline of H3 S10ph emphasizes its importance.

Experimental Procedures

Plasmids and Yeast Strains

Site-directed mutagenesis was used to generate histone H4 mutations in plasmid pRM204 (*HHF2-HHT2 CEN-ARS1 TRP*). Plasmids pTK54 (*hhf2 S1A-HHT2 CEN-ARS1 TRP*) and pTK59 (*hhf2 R3A-HHT2 CEN-ARS1 TRP*) were plasmid shuffled into strain FY1716 [(*MATa his3Δ200 leu2Δ1 ura3-52 trp1Δ63 lys2-128* □ (*hht1-hhf1*)Δ::*LEU2* (*hht2-hhf2*)Δ::*HIS3* pDM9(*HHT1-HHF1 CEN-ARS1 URA3*))] to yield strains TY97, and TY98 respectively. Yeast strain ySL151, isogenic to FY1716 but carrying pRM204 instead of pDM9, was used as the wild-type control for histone H4. All the above strains were transformed with a

yCP50 plasmid containing *HO* to switch the mating type and promote mating to give rise to diploids. The *HO* plasmid was later evicted and the diploid strains thus generated were TY128 (wt H4), TY129 (H4 S1A) and TY130 (H4 R3A). These strains were used for assaying sporulation frequency and to observe the architecture of the spore wall.

To study H4 S1ph by Western analysis and CHIP, the following strains with SK1 background were used. Diploid wild type SK1 (LNY150: *MATa/α leu2::hisG/leu2::hisG trp1::hisG/trp1::hisG lys2-SK1/lys2-SK1 his4-N/his4-G ura3-SK1/ura3-SK1 ho::LYS2/ho::LYS2*); *sps1Δ* strain (MDPY6, genotype identical to LNY150 except having an additional disruption, Δ *sps1::TRP1/Δsps1::TRP1*); *smk1Δ* strain (MDPY10, genotype identical to LNY150 except having an additional disruption, Δ *smk1::LEU2/Δsmk1::LEU2*), Myc-Sum1 (DBY36, genotype identical to LNY150 except having NDT80-HA:URA3/NDT80-HA:URA3 SUM1-myc:TRP1/SUM1-myc:TRP1) and FLAG-SPS1/TY156 strain. Diploid TY156 strain carrying FLAG-*SPS1* was created by first 'C' terminal FLAG (2X) tagging the chromosomal *SPS1* in a haploid strain with SK1 background by using a TRP marker and following the method as described (Longtine et al. 1998) and the tagging was checked by standard procedures. The haploid FLAG-*SPS1* strain was thereafter transformed with a HO plasmid as described above to make diploids. Plasmid pF31 (*Fl-HHF2-HHT2 2μ URA3*) was used to transform *sps1Δ* or *smk1Δ* for FLAG immunoprecipitations of histone H4. For monitoring expression of Myc-Ime2, strain KSY187 (*MATa/α IME2-13XMYC::TRP1/IME2-13XMYC::TRP1 ura3/ura3 leu2::hisG/leu2::hisG trp1-ΔFA::hisG/ trp1-ΔFA::hisG lys2/lys2 ho::hisG/ho::hisG his3-11, 15/his3-11, 15*) (Benjamin et al. 2003) was used.

Culture conditions

A single colony from a fresh plate was used to inoculate 5 ml of YPD/selective SC media for an overnight growth at 30°C. The cells of the overnight culture was harvested, washed with water and used to inoculate 50 ml YPA at 0.02 OD_{600nm} and allowed to grow to 0.5 OD_{600nm} at 30°C. The YPA culture was scaled up to the experimental requirements, cells harvested, washed and finally used to inoculate SPM without glucose (SPM) or with 0.05% glucose (SPM*) at 2.0 OD_{600nm} at 30°C. Aliquots of sporulating cells were taken at various intervals either for preparing whole cell extracts or for CHIP.

DAPI staining

Cells equivalent to 1 OD_{600nm} were harvested and resuspended in 1 ml of 90 % ethanol and incubated with 1 μl of 10 mg/ml of 4', 6- diamidino-2-phenylindole (DAPI) stain (Sigma) in the dark for 10 min. The cells are washed three times with 1 ml of H₂O and resuspended in 50 to 100 μl of H₂O. 5 μl of the cell suspension was taken on a glass slide to observe the cells. This method was used for monitoring the

frequency of sporulation. In case of measuring the DAPI stained nuclei the following procedure was used. Yeast cells were processed as described (Guacci et al. 1994) with the following modifications. Sporulating yeast cells were diluted to 0.5 OD_{600nm} and fixed with formaldehyde. The extent of sphaeroplasting was determined by monitoring the cells under the microscope. The concentration of proteinase K was 10 µg/ml. The cells were stained with DAPI and the images were captured using a fluorescent upright microscope.

Yeast Whole Cell Extract (WCE) preparation

Yeast cells were harvested by spinning down cultures at ~3000 rpm for 3 min at 4°C. The cells were washed with ice-cold water once and broken in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.1 % NP-40; 5 mM MgCl₂; 10 mM NaF; 50 mM β-glycerophosphate; protease inhibitors that included pepstatin, leupeptin, aprotinin, protease inhibitor tablets from Roche and 1 mM PMSF; phosphatase inhibitor cocktail from Sigma) using glass beads and the bead beater (Bio-Spec). The lysate was spinned at 14,000 rpm at 4°C for 15 min and the supernatant/WCE was collected and stored at -80°C. Protein estimation was done using Bradford protein estimation kit.

FLAG Immunoprecipitation

50 µl of 50 % slurry of FLAG M2 agarose resin (Sigma) equilibrated in lysis buffer was used for immunoprecipitation from 1 mg of WCE. The binding reactions were incubated o/n at 4°C on a roller, washed four times with 1 ml lysis buffer and bound proteins were extracted with 30 µl of 2X sample buffer, heated and an aliquot was used for checking the expression of FLAG fusion proteins. Samples were resolved on 10-20 % SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane and probed with the antibody.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

50 ml aliquots of the sporulating cells were collected at various time points, cross-linked with formaldehyde and processed for ChIP as described (Henry et al. 2003). For FLAG-Sps1 ChIP, cells were first cross-linked with 1.5 mM EGS (100 mM stock prepared in DMSO) for 25 min before cross-linking with formaldehyde for 15 min. The antibodies used for ChIP were α-H4S1ph, α-FLAG (M2; Sigma) and H3 (ab1791, Abcam). Primer pairs spanning the TATA regions of *SPS100*, *DIT1*, *PHO5*; MSE regions of *SMK1* and *DIT1*; and the Telomeric Tip regions of the right arm of chromosome VI were used to amplify the inputs and eluates obtained by ChIP in a Thermal Cycler (ABI Prism 7000 from Applied Biosystems). Each amplification was done in duplicate and the average signal from the eluate was divided

by its average input signal for normalizations. The sequence of the primer pairs will be provided on request.

Immunofluorescence on fly testes

Drosophila testes from flies carrying a P[w^+ , *Ubi-Tubulin*] transgene (obtained from C. Gonzales) were stained for immunofluorescence as in (Hime et al. 1996; Yamashita et al. 2003). Testes were dissected in 1xPBS, transferred to a siliconized slide; the slide was then frozen in liquid nitrogen and the cover slip removed with a razorblade. Samples were then incubated at -20°C in 100% ethanol for 10 min, fixed in 4% formaldehyde (in 1X PBS buffer) for 7 min at RT, permeabilized by two rounds of incubation in 1X PBS, 0.3% Triton X-100, 0.3% sodium deoxycholate for 15 min each, rinsed with 1X PBST (PBS, 0.1% TritonX-100) for 10 min, then incubated in primary antibody in 1X PBS, 3% BSA overnight at 4°C. H4 S1ph antibody was used at 1: 2,000 dilution. H3 S10ph antibody (Upstate #RR002) was used at 1:100 dilution. Samples were rinsed three times in 1X PBST (1X PBS, 0.1%Triton X-100), then incubated for 2 hrs at RT in Alexa fluor-conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies diluted in 1X PBS, 3% BSA to concentrations recommended by the manufacturer (Molecular Probes, Inc.). Samples were rinsed three times in 1X PBST, then mounted in VECTORSHIELD medium with DAPI staining (Vector Lab Inc. #H-1200). For peptide competition assays, each primary antibody was incubated with the designated peptide at a final concentration of 10µg/ml peptide at RT for 4 hrs prior to application to the sample. Images were taken on a Leica TCS SP2 AOBS confocal light microscope and processed in Adobe Photoshop.

Mouse spermatogenic cell fractionation and western analysis

Spermatogenic cells were fractionated according to the Bellvé method (Bellve 1993). A detailed protocol has been published recently (Pivot-Pajot et al. 2003). Briefly, testes were dissected and processed to obtain a homogeneous cell suspension. The cell suspension was laid on the top of a 2-4% BSA gradient in an airtight sedimentation unit. Cells were allowed to sediment by gravity for 70 min at 4°C. Then the gradient was fractionated and cells in each fraction were staged using a phase contrast microscope. Chosen fractions were pooled to obtain cell populations enriched (>80%) in defined pooled stages (spermatocytes, round spermatids and a mix of round, elongated and condensed spermatids). Cell pellets obtained after fractionation were disrupted in 8M urea, quantified by Bradford (BioRad Protein Assay), and Western blots were performed according to standard procedures. Antibodies were used at following dilutions: H4 S1ph 1/5000, H3 S10ph (Upstate #06-570) 1/1000, TP2 (gift from W.S. Kistler) 1/1000.

Immunofluorescence on mouse testis

A fresh testis was frozen in liquid nitrogen and then applied on a Super frost slide. Fixation was performed in 70% ethanol for 5 min. Slides were dried and stored until use. After a PBS 1x washing, cells were permeabilized in saponine 0.5%, Triton 0.25% PBS1x for 15 min (2 x 7 min). Blocking was made in milk 5%, Tween 0.2%, PBS 1x for 30 min at room temperature. All the following steps (antibody dilution and washes) were performed using the same buffer (milk 1%, Tween 0.2%, PBS 1x). H4 S1 phos and H3 S10 phos antibodies were diluted respectively at 1/500 and 1/100, and the incubations were over-night at 4°C. Slides were then washed 3 times 5 min and an anti-rabbit antibody cross linked with Alexa 488 (Molecular Probes) diluted at 1/500 was applied to the slides for 30 min at 37°C. Slides were washed and mounted in Mowiol medium with DAPI 250 ng/mL. Image acquisitions were made on an Axiophot (Zeiss) microscope using a -40°C chilled CDD camera (Hamamatsu). Images were then processed using Adobe Photoshop.

Acknowledgements

We thank M Grunstein, MA Osley, R Strich and F Winston for plasmids and yeast strains. We appreciate the help of J Hayden and F Keeney at the Wistar Institute Microscope Facility in light microscopy; and D. Bungard for the strain DBY36. We thank J Rux at the Wistar Insitute Bio-informatics Facility for analysis of DAPI measurements, NG Avadhani and L Devi for use of the Olympus microscope. We appreciate Upstate/Serologicals for their help with the H4 S1ph antibody. We thank NCT Emre for critical reading of the manuscript; members of the Berger lab, NBV Sepuri and G Moore for valuable discussions. This research was supported by grants from NIH (GM55360) and NSF (MCB-9604208) to SLB; from NIH (GM61986) to MTF; from Lyon Rhône-Alpes Cancéropôle and the Regulome consortium (ANR-05-BLAN-0396-04) to SK laboratory and from NIH (GM40922) to CDA. XC is a Leukemia and Lymphoma Society Special Fellow (LLS-3598-06).

References

- Ahn, S. H., Cheung, W. L., Hsu, J. Y., Diaz, R. L., Smith, M. M., and Allis, C. D. (2005a). Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell* *120*, 25-36.
- Ahn, S. H., Henderson, K. A., Keeney, S., and Allis, C. D. (2005b). H2B (Ser10) phosphorylation is induced during apoptosis and meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell Cycle* *4*, 780-783.
- Barber, C. M., Turner, F. B., Wang, Y., Hagstrom, K., Taverna, S. D., Mollah, S., Ueberheide, B., Meyer, B. J., Hunt, D. F., Cheung, P., and Allis, C. D. (2004). The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved. *Chromosoma* *112*, 360-371.

- Bellve, A. R. (1993). Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol* 225, 84-113.
- Benjamin, K. R., Zhang, C., Shokat, K. M., and Herskowitz, I. (2003). Control of landmark events in meiosis by the CDK Cdc28 and the meiosis-specific kinase Ime2. *Genes Dev* 17, 1524-1539.
- Briza, P., Breitenbach, M., Ellinger, A., and Segall, J. (1990). Isolation of two developmentally regulated genes involved in spore wall maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 4, 1775-1789.
- Burgess, S. M., Ajimura, M., and Kleckner, N. (1999). GCN5-dependent histone H3 acetylation and RPD3-dependent histone H4 deacetylation have distinct, opposing effects on IME2 transcription, during meiosis and during vegetative growth, in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6835-6840.
- Carruthers, L. M., and Hansen, J. C. (2000). The core histone N termini function independently of linker histones during chromatin condensation. *J Biol Chem* 275, 37285-37290.
- Cheung, W. L., Ajiro, K., Samejima, K., Kloc, M., Cheung, P., Mizzen, C. A., Beeser, A., Etkin, L. D., Chernoff, J., Earnshaw, W. C., and Allis, C. D. (2003). Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell* 113, 507-517.
- Cheung, W. L., Turner, F. B., Krishnamoorthy, T., Wolner, B., Ahn, S. H., Foley, M., Dorsey, J. A., Peterson, C. L., Berger, S. L., and Allis, C. D. (2005). Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 15, 656-660.
- Cho, C., Willis, W. D., Goulding, E. H., Jung-Ha, H., Choi, Y. C., Hecht, N. B., and Eddy, E. M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 28, 82-86.
- Choy, J. S., Tobe, B. T., Huh, J. H., and Kron, S. J. (2001). Yng2p-dependent NuA4 histone H4 acetylation activity is required for mitotic and meiotic progression. *J Biol Chem* 276, 43653-43662.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O., and Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282, 699-705.
- Chu, S., and Herskowitz, I. (1998). Gametogenesis in yeast is regulated by a transcriptional cascade dependent on Ndt80. *Mol Cell* 1, 685-696.
- Chua, P., and Roeder, G. S. (1995). Bdf1, a yeast chromosomal protein required for sporulation. *Mol Cell Biol* 15, 3685-3696.
- Cobb, J., Cargile, B., and Handel, M. A. (1999). Acquisition of competence to condense metaphase I chromosomes during spermatogenesis. *Dev Biol* 205, 49-64.
- Deckert, J., and Struhl, K. (2001). Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol Cell Biol* 21, 2726-2735.
- Dorigo, B., Schalch, T., Bystricky, K., and Richmond, T. J. (2003). Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J Mol Biol* 327, 85-96.
- Friesen, H., Lunz, R., Doyle, S., and Segall, J. (1994). Mutation of the SPS1-encoded protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to defects in transcription and morphology during spore formation. *Genes Dev* 8, 2162-2175.

Fuller, M. T. (1993). Spermatogenesis. In *The Development of Drosophila melanogaster*, M. Bate and A. Martinez-Arias, eds. (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press), 71 pp. 14.

Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T., Takahashi, T., and Inagaki, M. (1999). Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem* 274, 25543-25549.

Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E. A., and Inagaki, M. (2002). Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* 7, 11-17.

Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 271, 3459-3469.

Guacci, V., Hogan, E., and Koshland, D. (1994). Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J Cell Biol* 125, 517-530.

Gurley, L. R., Walters, R. A., and Tobey, R. A. (1973). Histone phosphorylation in late interphase and mitosis. *Biochem Biophys Res Commun* 50, 744-750.

Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. P., and Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348-360.

Henry, K. W., Wyce, A., Lo, W. S., Duggan, L. J., Emre, N. C., Kao, C. F., Pillus, L., Shilatifard, A., Osley, M. A., and Berger, S. L. (2003). Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* 17, 2648-2663.

Hime, G. R., Brill, J. A., and Fuller, M. T. (1996). Assembly of ring canals in the male germ line from structural components of the contractile ring. *J Cell Sci* 109 (Pt 12), 2779-2788.

Hsu, J. Y., Sun, Z. W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D. K., Grushcow, J. M., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Hunt, D. F., et al. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102, 279-291.

Hwang, W. W., Venkatasubrahmanyam, S., Ianculescu, A. G., Tong, A., Boone, C., and Madhani, H. D. (2003). A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell* 11, 261-266.

Iwamoto, M. A., Fairclough, S. R., Rudge, S. A., and Engebrecht, J. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Sps1p regulates trafficking of enzymes required for spore wall synthesis. *Eukaryot Cell* 4, 536-544.

Kimmins, S., and Sassone-Corsi, P. (2005). Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 434, 583-589.

Klar, A. J., and Halvorson, H. O. (1975). Proteinase activities of *Saccharomyces cerevisiae* during sporulation. *J Bacteriol* 124, 863-869.

- Krisak, L., Strich, R., Winters, R. S., Hall, J. P., Mallory, M. J., Kreitzer, D., Tuan, R. S., and Winter, E. (1994). SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 8, 2151-2161.
- Kupiec, M., Byers, B., Esposito, R.E., and Mitchell, A.P. (1997). Meiosis and sporulation in *Saccharomyces Cerevisiae*. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, J. R. Pringle et al., eds. (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 889-1036.
- Law, D. T., and Segall, J. (1988). The SPS100 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is activated late in the sporulation process and contributes to spore wall maturation. *Mol Cell Biol* 8, 912-922.
- Lewis, J. D., Saperas, N., Song, Y., Zamora, M. J., Chiva, M., and Ausio, J. (2004). Histone H1 and the origin of protamines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4148-4152.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Lynn, R. R., and Magee, P. T. (1970). Development of the spore wall during ascospore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 44, 688-692.
- Meetei, A. R., Ullas, K. S., Vasupradha, V., and Rao, M. R. (2002). Involvement of protein kinase A in the phosphorylation of spermatidal protein TP2 and its effect on DNA condensation. *Biochemistry* 41, 185-195.
- Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R., and Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111, 483-488.
- Mitchell, A. P. (1994). Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 58, 56-70.
- Moore, S. C., and Ausio, J. (1997). Major role of the histones H3-H4 in the folding of the chromatin fiber. *Biochem Biophys Res Commun* 230, 136-139.
- Nislow, C., Ray, E., and Pillus, L. (1997). SET1, a yeast member of the trithorax family, functions in transcriptional silencing and diverse cellular processes. *Mol Biol Cell* 8, 2421-2436.
- Nowak, S. J., and Corces, V. G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 20, 214-220.
- Oliva, R., and Dixon, G. H. (1991). Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 40, 25-94.
- Paulson, J. R., and Taylor, S. S. (1982). Phosphorylation of histones 1 and 3 and nonhistone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa metaphase chromosomes. *J Biol Chem* 257, 6064-6072.
- Percival-Smith, A., and Segall, J. (1986). Characterization and mutational analysis of a cluster of three genes expressed preferentially during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 6, 2443-2451.

- Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2003). Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 23, 5354-5365.
- Polioudaki, H., Markaki, Y., Kourmouli, N., Dialynas, G., Theodoropoulos, P. A., Singh, P. B., and Georgatos, S. D. (2004). Mitotic phosphorylation of histone H3 at threonine 3. *FEBS Lett* 560, 39-44.
- Preuss, U., Landsberg, G., and Scheidtmann, K. H. (2003). Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res* 31, 878-885.
- Primig, M., Williams, R. M., Winzeler, E. A., Tevzadze, G. G., Conway, A. R., Hwang, S. Y., Davis, R. W., and Esposito, R. E. (2000). The core meiotic transcriptome in budding yeasts. *Nat Genet* 26, 415-423.
- Robzyk, K., Recht, J., and Osley, M. A. (2000). Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* 287, 501-504.
- Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Suka, N., Turner, B. M., and Grunstein, M. (1998). Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature* 392, 831-835.
- Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296, 2176-2178.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J. M., Pazin, M. J., Davie, J. R., and Peterson, C. L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844-847.
- Sollier, J., Lin, W., Soustelle, C., Suhre, K., Nicolas, A., Geli, V., and de La Roche Saint-Andre, C. (2004). Set1 is required for meiotic S-phase onset, double-strand break formation and middle gene expression. *Embo J* 23, 1957-1967.
- Sung, M. T., and Dixon, G. H. (1970). Modification of histones during spermiogenesis in trout: a molecular mechanism for altering histone binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67, 1616-1623.
- Suto, R. K., Clarkson, M. J., Tremethick, D. J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol* 7, 1121-1124.
- Utley, R. T., Lacoste, N., Jobin-Robitaille, O., Allard, S., and Cote, J. (2005). Regulation of NuA4 Histone Acetyltransferase Activity in Transcription and DNA Repair by Phosphorylation of Histone H4. *Mol Cell Biol* 25, 8179-8190.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M. A., and Allis, C. D. (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97, 99-109.
- Wood, A., Krogan, N. J., Dover, J., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M. A., Dean, K., Golshani, A., Zhang, Y., Greenblatt, J. F., *et al.* (2003). Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* 11, 267-274.
- Wu, J. Y., Ribar, T. J., Cummings, D. E., Burton, K. A., McKnight, G. S., and Means, A. R. (2000). Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat Genet* 25, 448-452.

Yamashita, K., Shinohara, M., and Shinohara, A. (2004). Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 11380-11385.

Yamashita, Y. M., Jones, D. L., and Fuller, M. T. (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* *301*, 1547-1550.

Yu, Y. E., Zhang, Y., Unni, E., Shirley, C. R., Deng, J. M., Russell, L. D., Weil, M. M., Behringer, R. R., and Meistrich, M. L. (2000). Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 4683-4688.

Zhao, M., Shirley, C. R., Yu, Y. E., Mohapatra, B., Zhang, Y., Unni, E., Deng, J. M., Arango, N. A., Terry, N. H., Weil, M. M., *et al.* (2001). Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol* *21*, 7243-7255.

Zheng, C., and Hayes, J. J. (2003). Structures and interactions of the core histone tail domains. *Biopolymers* *68*, 539-546.

Figure Legends**Figure 1. H4 S1ph occurs in sporulation and requires Sps1.**

(A) Detection of H4 S1ph during sporulation. Wild type SK1 strain was induced to sporulate and fractions collected at indicated time points. Whole cell extracts were prepared, resolved on a SDS-PAGE, blotted and probed either with unmodified H3 (ab1791, Abcam) antibody or with H4 S1ph antibody (Barber et al., 2004).

(B) Deletion of Sps1 kinase strongly lowers H4 S1ph whereas deletion of Smk1 kinase does not affect H4 S1ph. *smk1* Δ (upper panel) and *sps1* Δ (lower panel) SK1 strains carrying FLAG-H4 were induced to sporulate and fractions were collected at the indicated time points. FLAG-H4 was immunoprecipitated from whole cell extracts, resolved by SDS-PAGE, blotted and probed either with FLAG-HRP conjugated antibody (Sigma) or with H4 S1ph antibody. SPM* contains 0.05 % glucose.

(C) Expression of FLAG-Sps1 coincides with appearance of H4 S1ph. Whole cell extracts were prepared from sporulating FLAG-Sps1 strain, Western blotted, and probed with FLAG and H4 S1ph antibodies.

Figure 2. Comparison of H4 S1ph and H3 S10ph timing during sporulation.

(A) H3 S10ph and H4 S1ph are temporally distinct. Left panel. TCA precipitated extracts prepared from sporulating wild type SK1 strain carrying Myc-*IME2* were resolved on SDS-PAGE gels, blotted and probed with H3 S10ph (Lo et al., 2000), H4 S1ph, anti-Myc (9E10, Santa Cruz Biotechnologies) or with H3 (ab1791, Abcam) antibodies. Right panel. Cell fractions were also collected from the strain described above and were analyzed for meiotic divisions by counting the number of DAPI stained bodies by immunofluorescence. Cells containing two DAPI stained bodies were judged to have completed Meiosis I, while cells containing four DAPI stained bodies were judged to have completed Meiosis I and II, as depicted in the graph. At six hours, cells were mostly in Meiosis I while at 8 hours there was a mixture of Meiosis I and II.

(B) H4 S1ph mark is stable in mature spores. Whole cell extracts were prepared from wild type and *sps1* Δ SK1 strains. The strains were pre-grown in acetate media (YPA) prior to sporulation media containing 0.05% glucose (SPM*). After ~30 hours in SPM*, cells were allowed to germinate in rich media (YPD). Extracts were probed with H4 S1ph and H3 antibodies.

(C) H4 S1A mutation reduces sporulation frequency. S288c strains bearing wild type, S1A or R3A histone H4 were maintained in sporulation media (SPM*) for seven days to determine terminal sporulation frequency. Cells were observed under a Nikon E600 upright microscope. Tetrads were counted under DIC (100X oil). A total of 716 cells from three different wild type H4 colony isolates, 807

cells from two different H4 S1A and 465 cells from two different isolates of H4 R3A were counted. These results are representative of more than three independent experiments.

Figure 3. H4 S1ph and Sps1 are broadly distributed on the genome.

(A) Left Panel. Enrichment of H4 S1ph at mid-late and late sporulation genes. ChIP experiments in wild type SK1 and *sps1*Δ strains at 0 and 10 hours in sporulation medium using an H4 S1ph antibody. The values obtained at *SPS100* and *DIT1* promoters were normalized to input and are represented relative to the 0 time point set to 1.

(A) Right Panel. General recruitment of FLAG-Sps1. In addition to formaldehyde, EGS was also used as a cross-linker for the ChIP experiment. ChIP values obtained at 10 hours into SPM for TATA regions of *DIT1*, *PHO5* and the telomeric tip region of the right arm of Chr VI is presented as percentage of input.

(B) Left and Middle panels. H4S1ph levels decrease with time by ChIP. ChIP assays using H4 S1ph antibody in wild type SK1 and *sps1*Δ strains at various time points in sporulation medium as shown. The values obtained at the promoter region of *SPS100* and telomeric tip region of the right arm of Chr VI were calculated as in Figure 3A. Similar results were obtained using primer pairs that spanned the 5', middle and 3' ORF of *SPS100*.

(B) Right panel. Recruitment of FLAG-Sps1 in time course at *SPS100*. ChIP experiments were carried out in wild type SK1 and in FLAG-Sps1 strains at the indicated time points in SPM. ChIP experiment was done using formaldehyde alone as the cross-linker but reducing the time of Ip from o/n to 4 hrs. Values obtained at the *SPS100* promoter region were normalized to their respective inputs. The normalized values obtained in FLAG-Sps1 were converted to fold over the value obtained in SK1 strain at the identical time point that was set to 1.

Figure 4. Sps1 promotes genome compaction by phosphorylating Histone H4.

(A) Specific recruitment of Myc-Sum1. ChIP experiments were carried out in Myc-Sum1 strain at 10 hrs into SPM using an H4 S1ph antibody as well as antibody against the Myc epitope (Santa Cruz, 9E10). Values obtained at the promoter region of *SPS100*, MSE regions of *SMK1* and MSE regions of *DIT1* are presented as percentage of input.

(B) Accessibility of histone H3 and histone H4. ChIP assays used an antibody directed against unmodified histones H3 and H4 (Abcam, ab10156). Cell fractions were collected from wild type and *sps1*Δ SK1 strains at the indicated time points. Values obtained for *SPS100* were calculated as described for Figure 3A.

Figure 5. Absence of S1 phosphorylation results in increased nuclear volume.

(A) Larger nuclei in H4 S1A strain. Cells from H4 wt (a-c) and H4 S1A (d-f) strains at day 5 in SPM were spheroplasted, adhered to slides, treated with Proteinase K and RNase A, and stained with DAPI. Images were collected using an Olympus upright microscope and the area of the DAPI stained spore nuclei was measured using the Image Pro software (g). The DAPI images (a and d) and the corresponding DIC images (b and e) were captured under 100X with oil and merged (c and f). In case of H4 wt, 182 spore nuclei were measured while 121 spore nuclei were measured in H4 S1A strain. The measurements were certified as statistically significant with a mean of 0.7838394 ± 0.0323454 for H4 wt and 0.9604283 ± 0.0497988 for H4 S1A. Care was taken to limit the quenching of the fluorescence. The measurements were clustered into $0.1 \mu\text{m}^2$ intervals and is presented against percentage of cells (g). Scale bar—:5 μm

(B) Larger nuclei in the absence of SPS1. Cells from *smk1* Δ (a-c) and *sps1* Δ (d-f) strains at 12 hrs in SPM were collected, spheroplasted, adhered to the slides and stained with DAPI. Images were collected using a E600 Nikon upright microscope and the spore nuclei were measured as above. Panels (a) and (d) represent the DAPI images, (b) and (e) the corresponding DIC images while (c) and (f) are the merged images of DAPI and DIC. The number of spore nuclei measured for *smk1* Δ and *sps1* Δ were 117 and 151 respectively. The measurements were analyzed as in figure 5A and presented in (g). Scale bar—:5 μm . Nuclei in the H4 wt and H4 S1A strains appear relatively larger (Figure 5A) than in the *smk1* Δ and *sps1* Δ strains due to proteinase K treatment.

Figure 6. H4 S1ph in *Drosophila* spermatogenesis.

Immunofluorescence images of *Drosophila* male germ cells undergoing meiosis and spermatid differentiation stained with H4 S1ph (red) and/or H3 S10ph (purple) antibodies. For all images, flies carried an α -Tubulin-GFP transgene expressed under control of a *ubiquitin* promoter, allowing different stages of meiotic division and spermatid differentiation to be distinguished based on characteristic cytoskeletal structures: (green) α -Tubulin. A'', B'', C'', and M' show corresponding image stained with DAPI (blue) to highlight DNA. A-C'. Samples co-stained with H4 S1ph (A, B, C) and H3 S10ph (A', B', C') antibodies. Scale bar—:10 μm

A-A'': Metaphase of meiosis I.

B-B'': Early haploid spermatids initiating the first steps of cell elongation. (Arrow) Spermatid nucleus. (Arrowhead) Mitochondrial derivative initiating elongation.

C-C'': Late stage spermatids with elongated flagella. (*) A cluster of spermatid nuclei part way through nuclear shaping. Note array of microtubules (bright green) along one side of each nucleus characteristic of this stage. (Bracket) A cluster of nuclei from more mature spermatid cyst is shown, lacking the perinuclear microtubule array along one side of the nucleus.

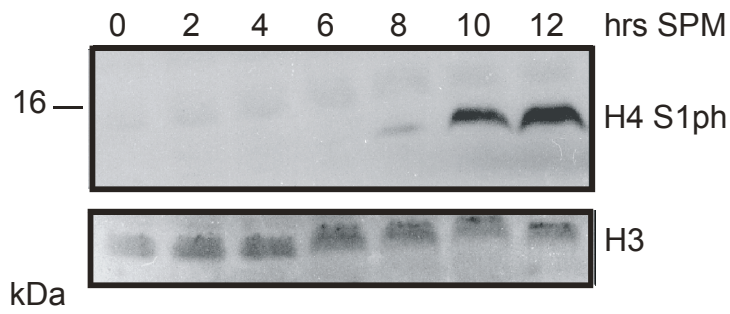
D-M: Peptide competition assays. D-F: Cells in meiotic metaphase II (D, E) or I (F) stained with H4 S1ph competed with: D) unmodified H4 peptide, E) H4 S1ph peptide, F) H3 S10ph peptide. G-I: Cells in metaphase I stained with H3 S10ph antibody competed with: G) unmodified H3 peptide, H) H3 S10ph peptide, I) H4 S1ph peptide. J-M': Differentiating spermatids stained with H4 S1ph antibody. J-K: round spermatids competed with: J) unmodified H4 peptide, K) H4 S1ph peptide. L-M': Late stage elongated spermatids competed with: L) unmodified H4 peptide. M, M') H4 S1ph peptide. M' shows α -Tubulin and DAPI signal corresponding to image in M. (Arrow) cluster of spermatid nuclei in mid elongation, which still retain the perinuclear microtubule array along one side.

Figure 7. H4 S1ph during mouse spermatogenesis.

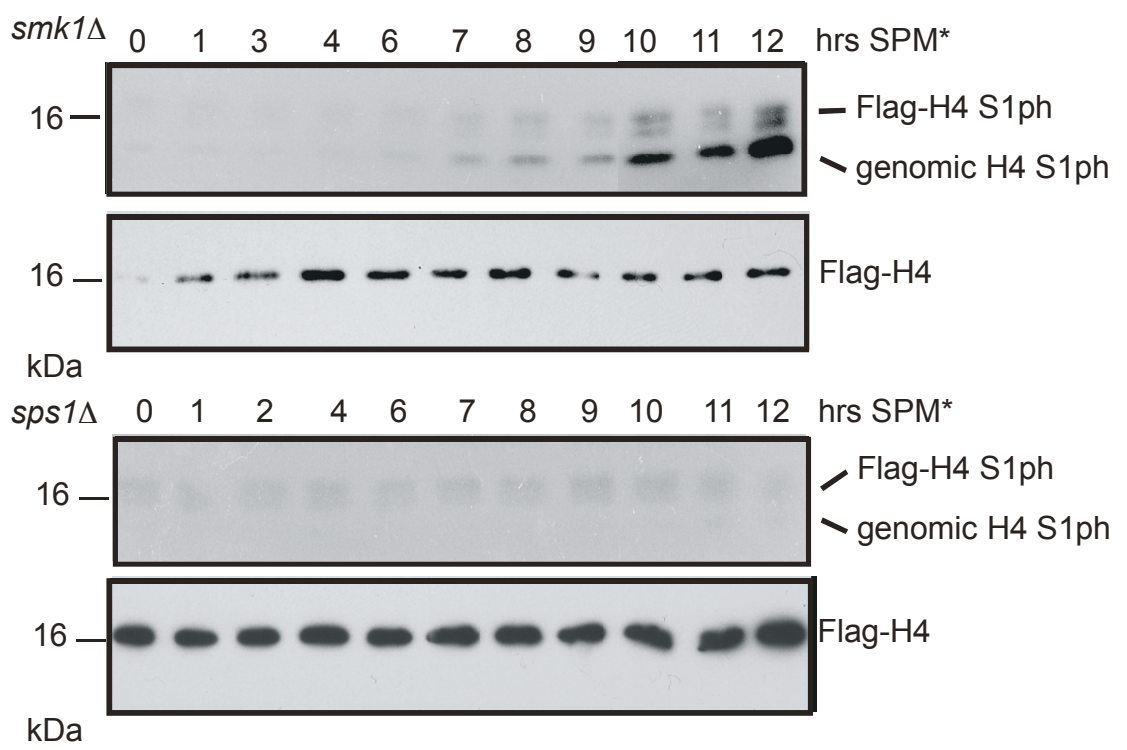
(A) Immunofluorescence of mouse germ cells undergoing spermatogenesis. Spermatocytes and round and elongated spermatids were either DAPI stained or stained with H4 S1ph or H3 S10ph antibodies. Scale bar--:5 μ m

(B) Western Analysis of differentiated mouse germ cell fractions. Protein extracts prepared from various cell fractions as shown in the figure were resolved on SDS-PAGE and western blotted. The blots were probed with anti H4 S1ph, H3 S10ph and TP2 antibodies. The histones were coomassie blue stained.

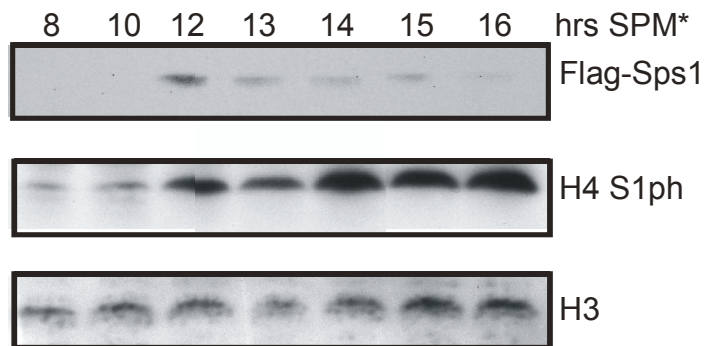
A WT

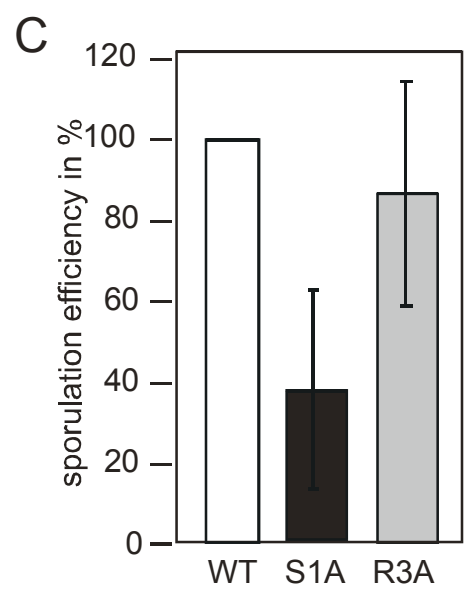
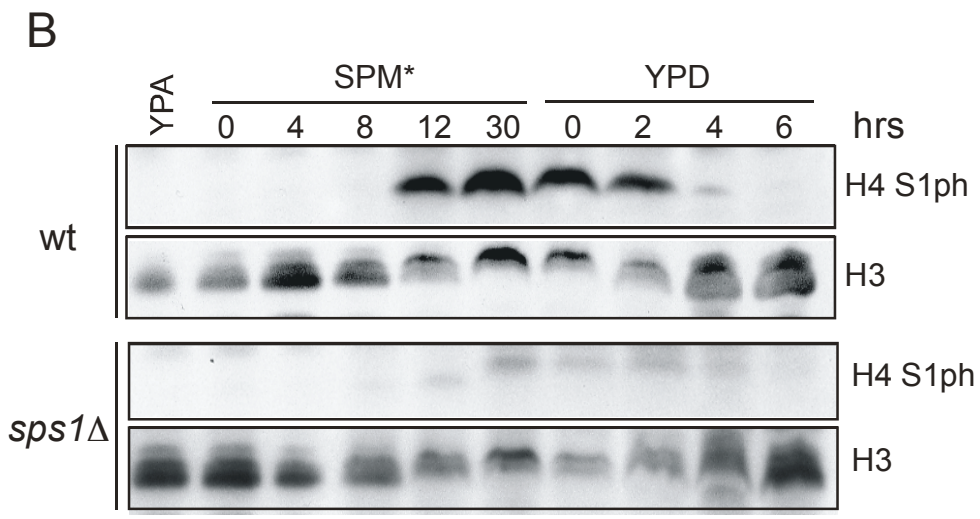
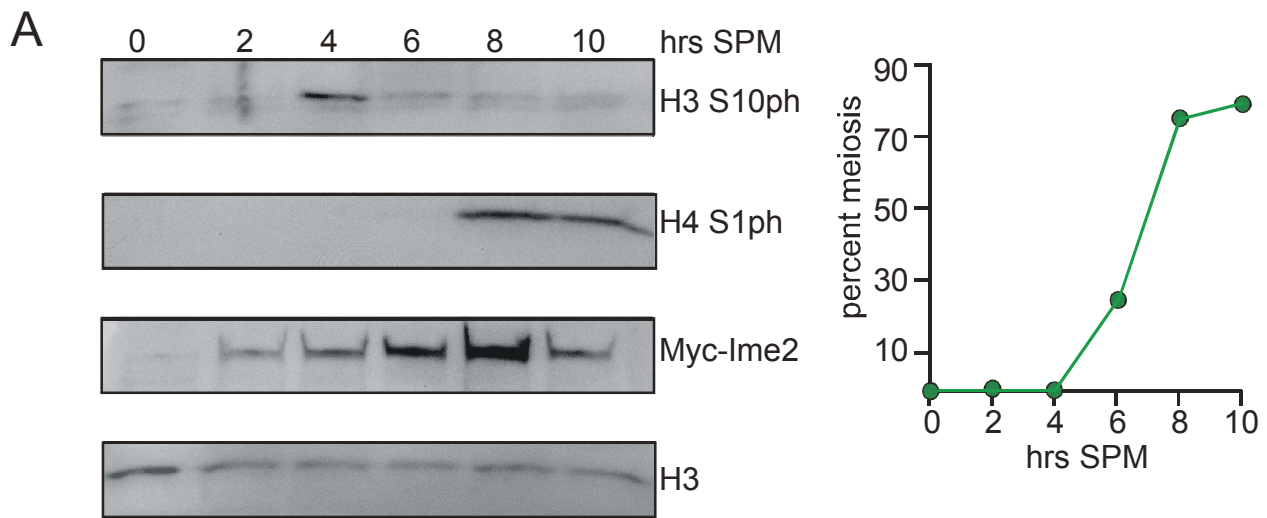


B



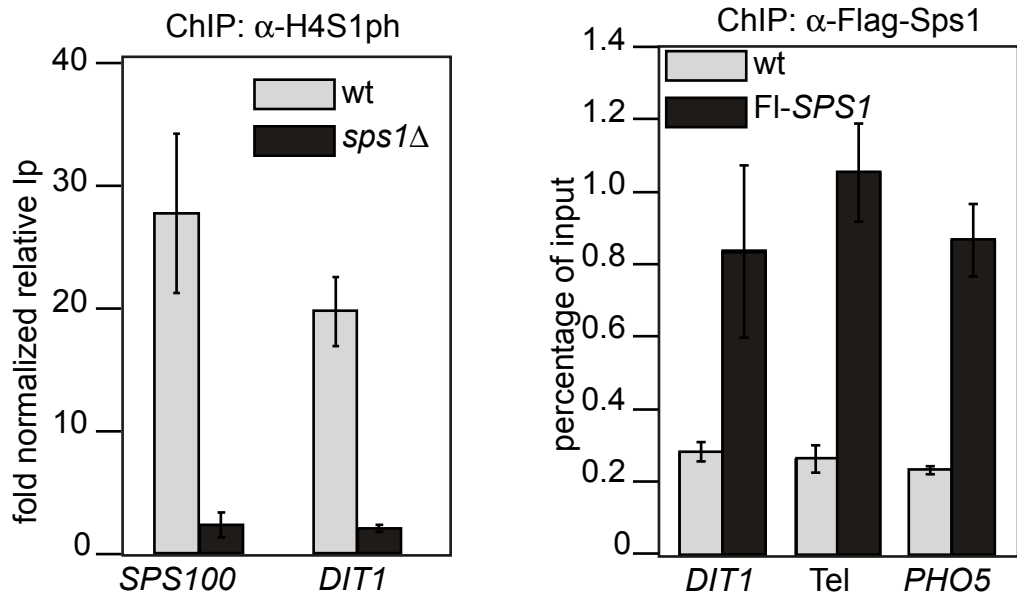
C



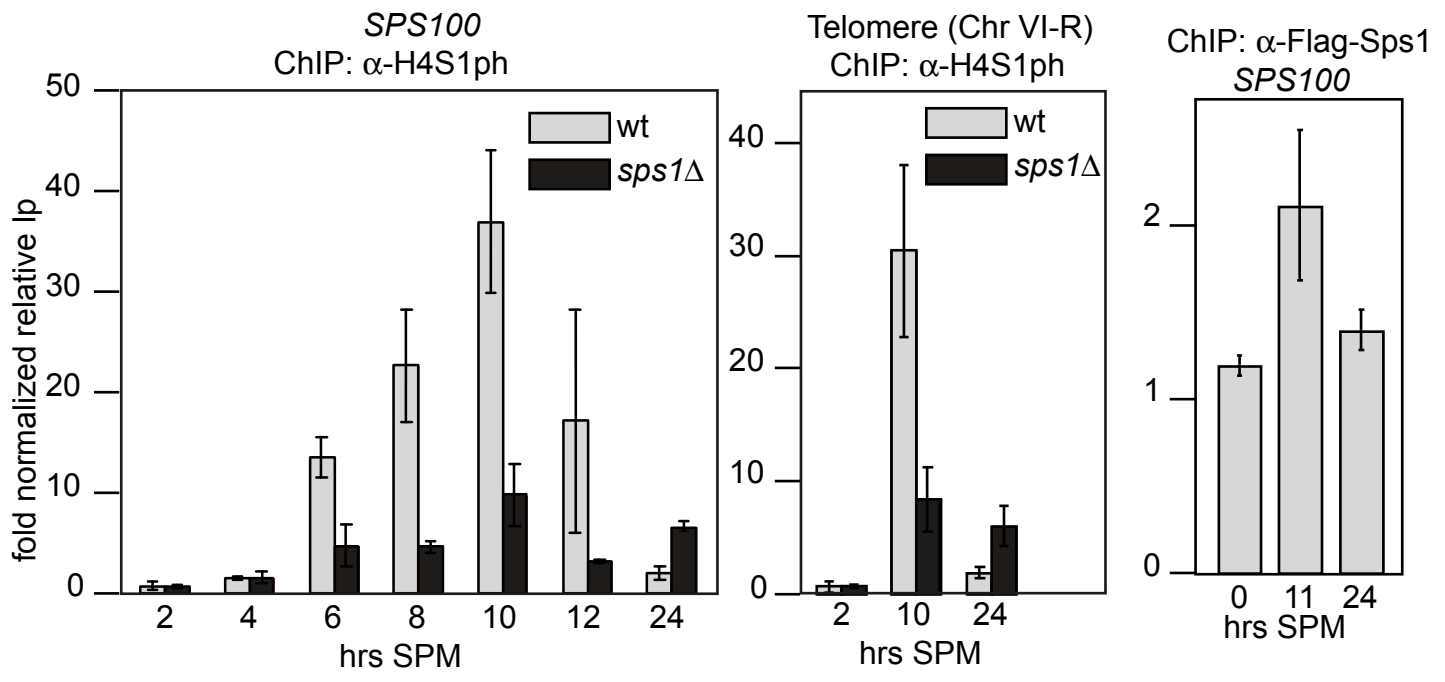


Krishnamoorthy; Figure 2

A

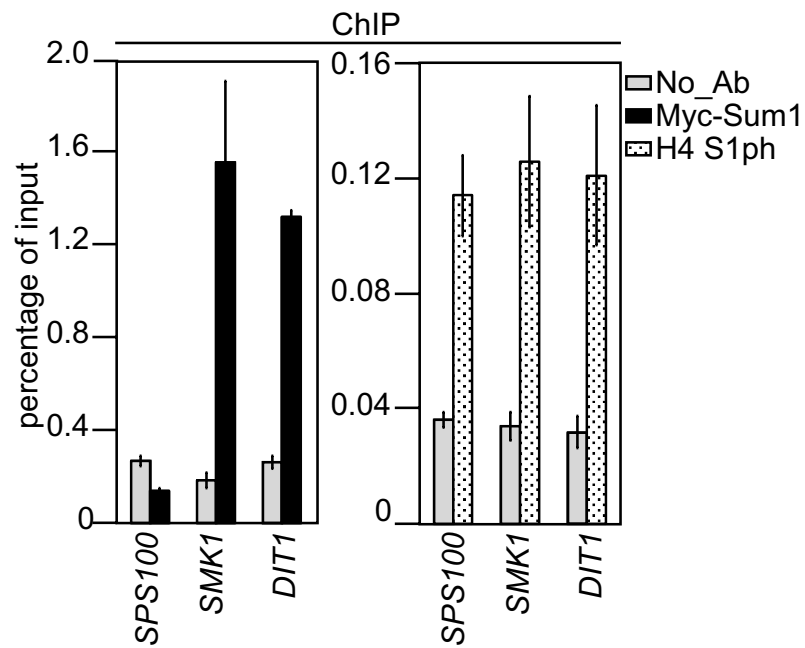


B

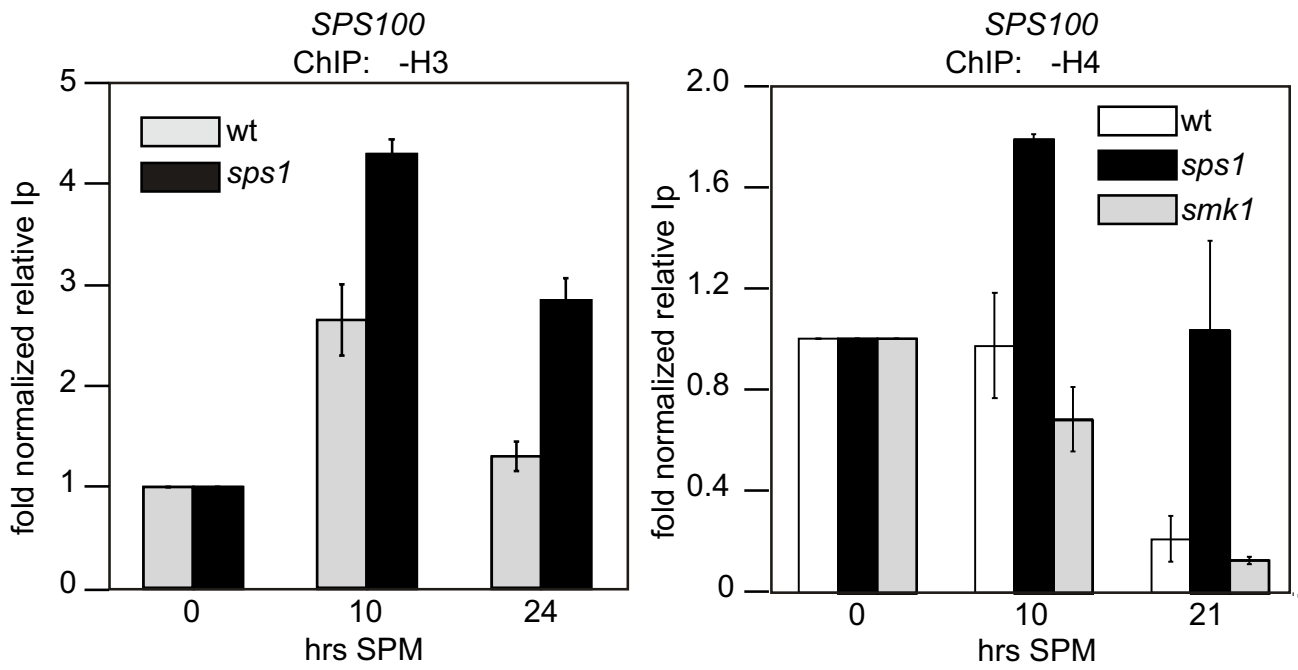


Krishnamoorthy; Figure 3

A

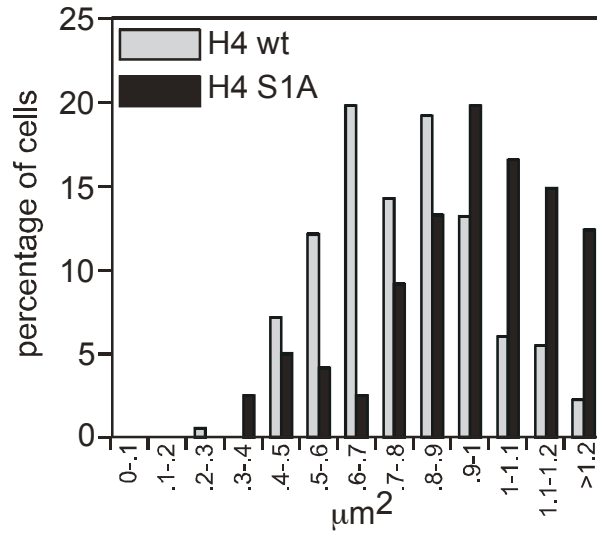
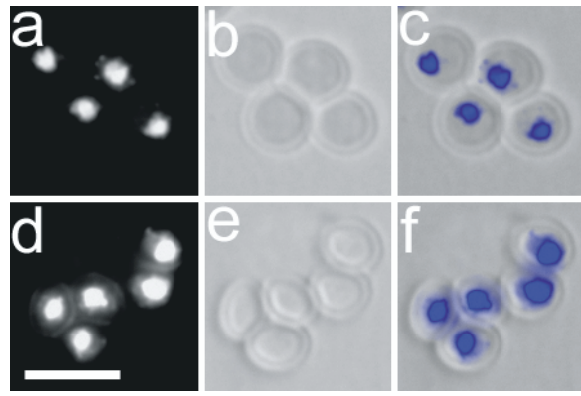


B

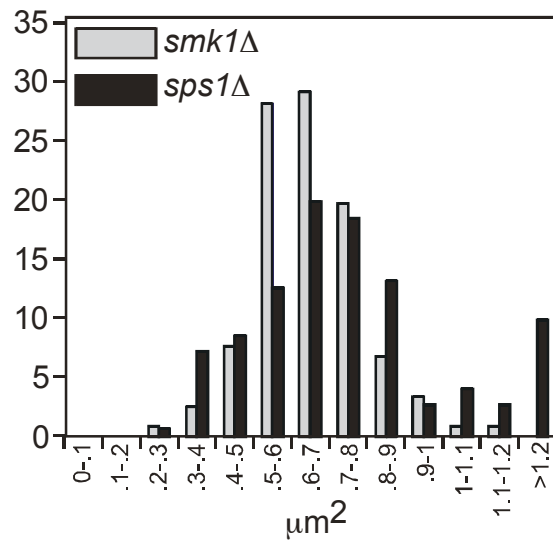
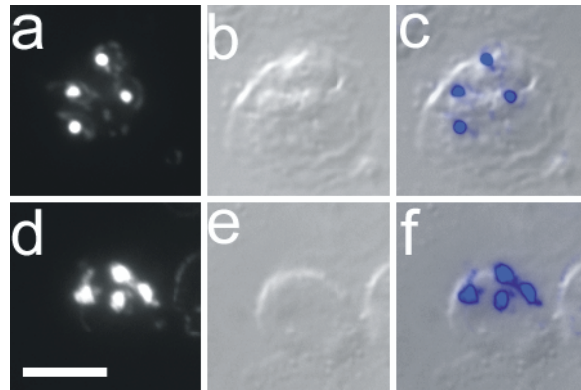


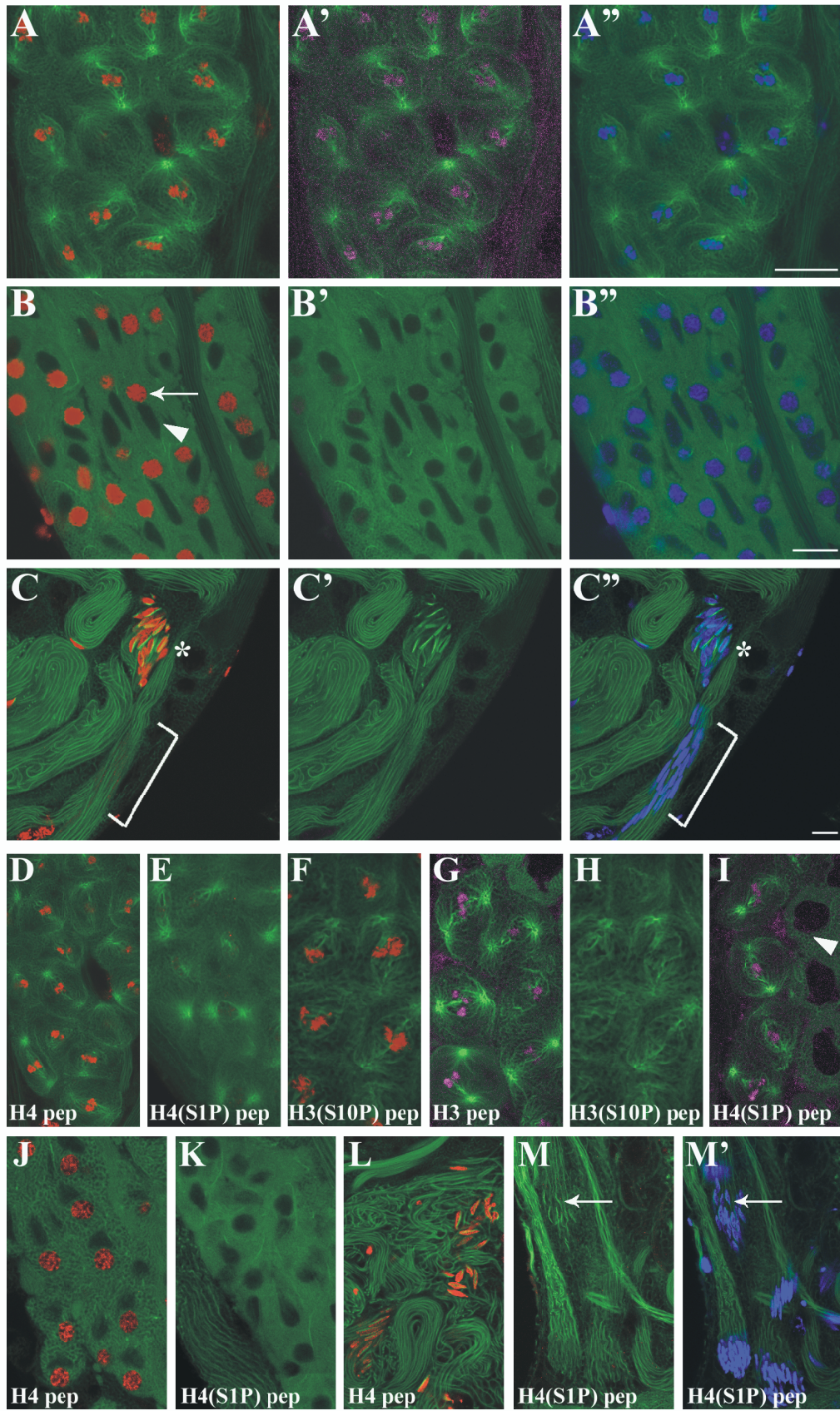
Krishnamoorthy; Figure 4

A

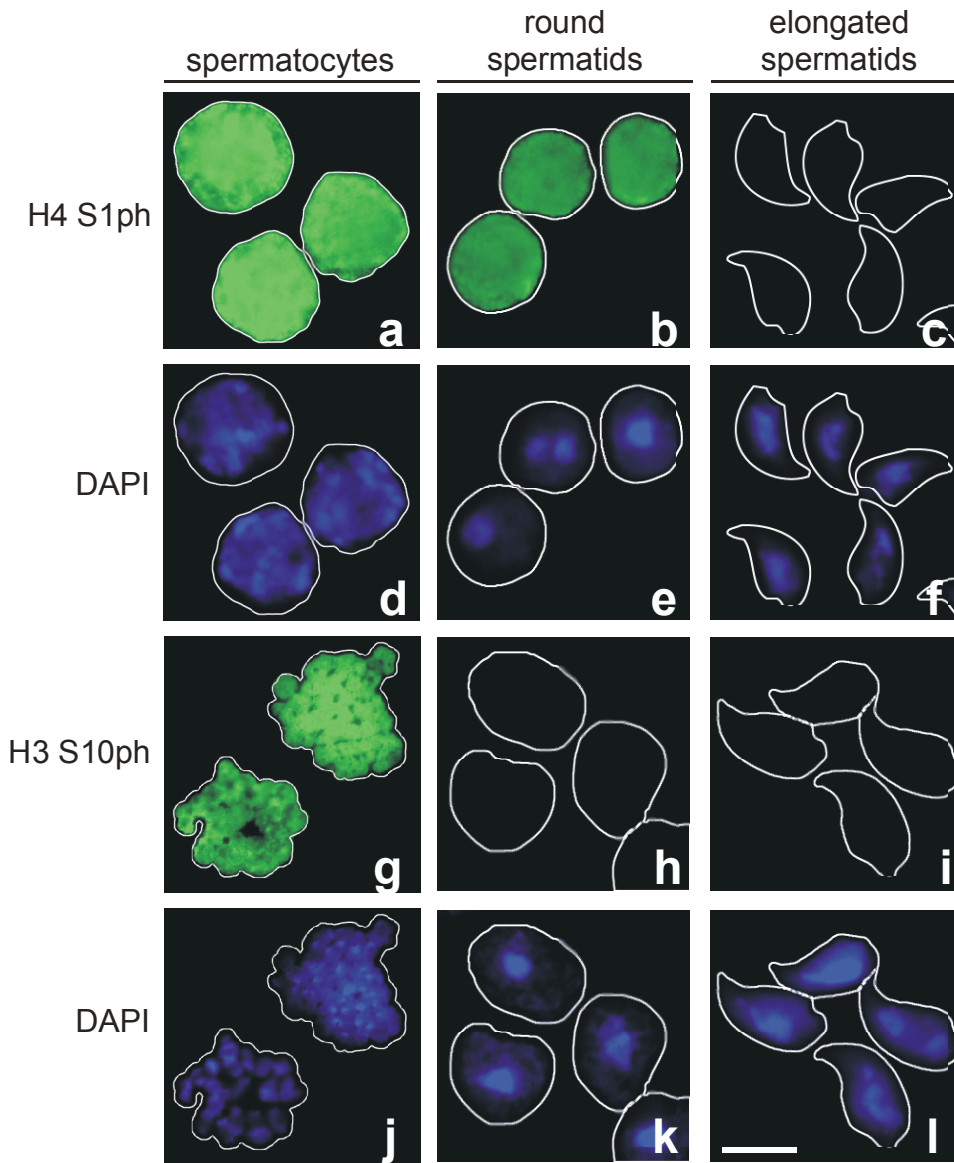
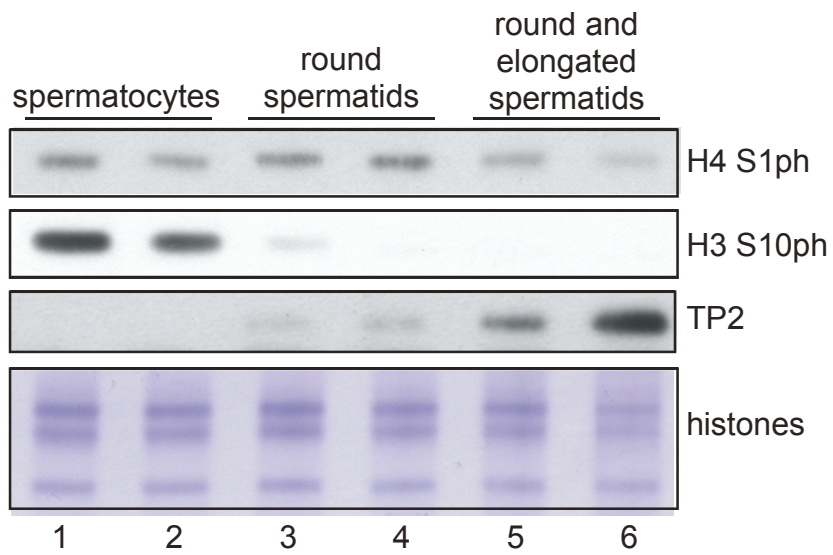


B





Krishnamoorthy; Figure 6

A**B**

1.3.3. Résultats complémentaires

~ Exclusion entre H4S1P et H4ac

Le rôle fonctionnel d'H4S1P lors de la spermiogénèse est en cours de caractérisation. Les études quantitative (par western blots) et qualitative (par immunofluorescence) indiquent que H4S1P disparaît au moment où les spermatides commencent à s'allonger, précisément lorsque les histones sont hyperacétylées (Hazzouri *et coll.*, 2000).

Dans un premier temps, la disparition d'H4S1P a été corrélée à la cinétique d'acétylation des histones. H4S1P et H4ac ont été détectées par western blot dans des extraits provenant de cellules de chaque stade de la spermatogénèse. Le signal H4S1P disparaît exactement au moment où les histones sont hyperacétylées (Figure I.3.3 A).

Ce résultat a été confirmé par immunofluorescence. Les anticorps anti H4S1P et anti H4ac ont été produits chez le lapin, empêchant toute codétection. Ainsi, j'ai développé une méthode permettant de détecter des épitopes différents sur des cellules à des stades quasi identiques. Un tube séminifère est microdisséqué sur une grande longueur, puis coupé tous les 0,5 mm. Chaque morceau de tube est si étroit que son stade de différenciation est très proche de ses voisins. Les morceaux de tubes sont répartis sur différentes lames. Un anticorps différent est utilisé sur chaque lame, permettant de suivre simultanément la distribution de plusieurs épitopes. Cette méthode a confirmé par immunofluorescence que H4S1P disparaît exactement lorsque les histones sont hyperacétylées (Figure I.3.3 B).

L'exclusion entre H4S1P et H4ac a ensuite été confirmée de manière biochimique. Pour ceci, des immunoprécipitations de chromatine (ChIP) ont été réalisées à partir de fibres de chromatine de 3 à 4 nucléosomes, préparées à partir de spermatides rondes et allongées. Ces ChIP indiquent que H4S1P et H4ac sont présents au sein de nucléosomes différents (Figure I.3.3 C).

Des tests d'activité histone acétyltransférase (HAT) réalisés *in vitro* indiquent que H4S1P inhibe l'action des complexes HAT Esa1 et NuA4 (Utley *et coll.*, 2005). Ainsi H4S1P pourrait réguler la cinétique d'acétylation des histones au cours de la spermiogénèse. L'hyperacétylation des histones (stade VIII) nécessiterait la déphosphorylation préalable de H4S1P. Un couplage entre un complexe HAT -encore inconnu- et une activité phosphatase régulerait la cinétique d'acétylation des histones lors de la spermiogénèse.

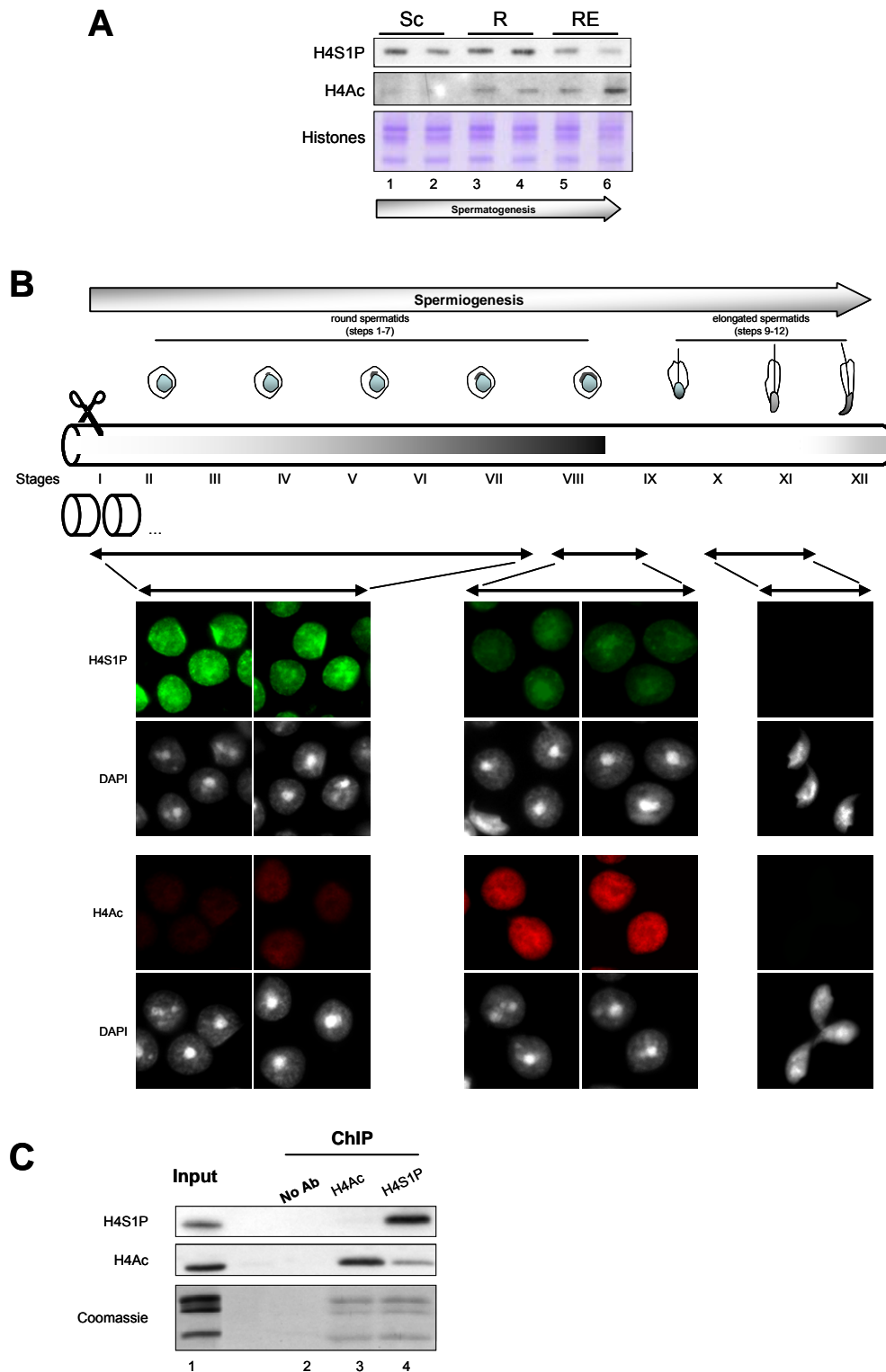


Figure I.3.3 Exclusion entre H4S1P et H4ac

(A) Les taux H4S1P et H4ac ont été évalués tout au long de la spermatogénèse. La présence de chaque marque est détectée par western blot sur des fractions enrichies en chaque stade majeur. Sc, spermatocytes, R, spermatides rondes, RE, mélange de spermatides rondes et allongées.

(B) Des immunofluorescences réalisées sur des coupes sériées de tubes séminifères ont permis de reconstruire la distribution de H4S1P et H4ac au fil de la spermiogénèse. Il apparaît clairement que H4S1P diminue au stade VIII, moment où les histones sont hyperacétylées (H4ac).

(C) Des immunoprécipitations de chromatine (ChIP) ont été réalisées à partir d'un pool de cellules post méiotiques. Les fibres de chromatine contiennent 3 à 4 nucléosomes. L'exclusion entre H4S1P et H4ac est très nette.

~ *H4S1P ou l'hypothèse de la « boucle des histones » (« loop hypothesis »)*

Certains domaines sont capables de reconnaître spécifiquement une modification post traductionnelle (voir Introduction). Par exemple, les bromodomains reconnaissent spécifiquement les lysines acétylées, et les chromodomains les lysines méthylées. Des facteurs présents dans le testicule et reconnaissant spécifiquement H4S1P ont été recherchés. Des pull downs ont été réalisés avec des peptides correspondant aux acides aminés 1-19 de la queue N terminale d'H4, portant ou non la modification H4S1P.

Aucun facteur liant le peptide H4S1P spécifiquement n'a été mis en évidence (Figure I.3.3 D). Cependant, la phosphorylation d'H4S1 semble diminuer fortement la liaison, spécifique ou non, de l'ensemble des protéines liant le peptide H4 (comparer puits 1 et 2 de la figure I.3.3). Cet effet est conservé si les quatre lysines 5, 8, 12 et 16 sont acétylées.

Ce résultat est surprenant : comment la phosphorylation d'un résidu situé à l'extrémité d'un peptide peut-il influencer la liaison de protéines sur l'ensemble de sa longueur ? Les queues N terminales des histones sont décrites comme flexibles et non structurées (Luger *et coll.*, 1997), bien que certains travaux démontrent une certaine structuration des queues des histones H3 et H4 (Baneres *et coll.*, 1997). Ainsi, H4S1P pourrait influencer la structure de la queue d'H4, et moduler son accessibilité aux facteurs environnants. La phosphorylation de la sérine 1 d'H4 accumule des charges négatives sur ce résidu à pH physiologique. En revanche, un stretch d'acides aminés basiques est présent dans la région 16-20 de l'histone H4, et crée une zone chargée positivement. Charges négatives d'H4S1P et charges positives du stretch 16-20 pourraient interagir via des interactions faibles, créant une boucle au sein de la queue d'H4. Cette boucle pourrait restreindre le recrutement d'autres facteurs et l'action des HAT (voir Figure I.3.3 E).

Des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont en cours de réalisation afin de valider l'hypothèse de cette boucle. De plus, des expériences fonctionnelles cherchent à vérifier si H4S1P est capable de bloquer la reconnaissance de modifications post traductionnelles portées par H4.

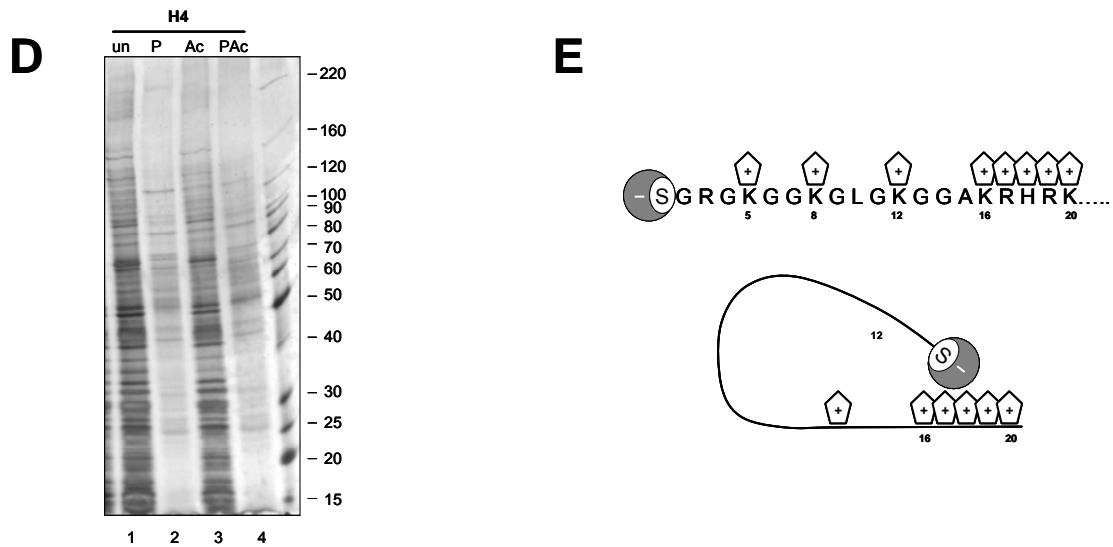


Figure I.3.3 (D) et (E) **H4S1P limite l'accessibilité de la queue N terminale d'H4**

(D) L'affinité différentielle de protéines pour certaines modifications d'H4 a été étudiée. Des pull downs ont été réalisés à l'aide de peptides représentant les acides aminés 1-19 d'H4, modifiées ou non (un, non modifié ; P, H4S1P ; Ac, H4K5acK8acK12acK16ac ; PAC, H4S1PK5acK8acK12acK16ac). Les protéines liées sont analysées sur des gels SDS-PAGE colorés à l'argent. La phosphorylation de la sérine 1 d'H4 bloque la liaison de nombreuses protéines, que le peptide soit acétylé ou non.

(E) **L'hypothèse de la boucle (« loop hypothesis »)**. Un stretch de charges positives est présent au niveau des résidus 16 à 20 d'H4 (pentagone marqué « + »). La phosphorylation de la sérine 1 d'H4 conduit à une accumulation de charges négatives, qui pourrait interagir directement avec le stretch de charges positives. Cette interaction conduirait à un repliement en boucle de la queue N terminale d'H4, et à une perte de l'accessibilité des résidus 1 à 16.

~ *Protocoles des expériences complémentaires*

Western blots : le fractionnement des cellules germinales, et la détection d'H4S1P ont été décrits dans le manuscrit présenté dans la partie précédente (Résultats I.3.2). L'anticorps anti H4ac (Upstate #06-866) a été utilisé au 1/1000.

Immunofluorescence : les lames ont été préparées et la détection a été réalisée ainsi qu'il l'a été décrit dans la partie Résultats I.1. Les morceaux de tubules ont été découpés de manière sériée afin de détecter H4S1P et H4ac dans des cellules de même stade. Les anticorps anti H4S1P et H4ac ont été utilisés au 1/100.

Immunoprécipitation de chromatine : le protocole utilisé est détaillé dans la partie Résultats I.1 et I.3.

Pull down : 400 µg d'extraits cytosolubles de testicule entier ont été incubés avec 3 nM de peptide biotinilé dans Hepes 50mM pH 7.9, Glycérol 20%, NaCl 150mM, MgCl₂ 3mM, DTT 1mM, TSA 300nM, cocktail d'antiprotéases Complete (Roche), pendant 45 min à 4°C sous rotation. 10 µL de billes d'agarose (Amersham) couplées à la streptavidine ont été ajoutées et incubées pendant 45 minutes dans les mêmes conditions que précédemment. A l'issue de l'incubation, les surnageants sont enlevés et les billes sont lavées trois fois dans le tampon d'incubation. Les protéines retenues sont éluées dans du tampon Laemli, analysées sur gel SDS PAGE, et colorées grâce au kit de coloration argent SilverQuest (Invitrogen).

II. Caractérisation des facteurs impliqués dans la réorganisation de l'épigénome lors de la spermiogénèse

L'extrême basicité des protéines chromatiniennes nécessite un recrutement de chaperons moléculaires afin de prévenir tout risque d'agrégat. L'incorporation de nombreux variants d'histone, l'extraction de plus de 90% des histones, la présence des protéines de transition et l'incorporation des protamines sont autant d'événements qui impliquent la présence de protéines chaperons. Très peu de données identifient et discutent le mode d'action des facteurs clés de cette réorganisation chromatinienne.

Deux grandes approches ont été développées au sein de l'équipe de Saadi Khochbin afin de combler ce manque d'informations. La première approche est basée sur une recherche *in silico* de protéines reliées au métabolisme chromatinien, et enrichies dans les testicules. Deux protéines ont été à ce jour caractérisées : CDYL contient un chromodomaine et une poche fixant le coenzyme A (Caron *et coll.*, 2003). Brdt est une protéine contenant deux bromodomains, et capable de compacter *in vitro* la chromatine acétylée (Pivot-Pajot *et coll.*, 2003). Mon travail de thèse a permis une caractérisation plus détaillée du mode d'action de Brdt en relation avec la distribution de la protéine endogène.

La deuxième approche est basée sur la purification de facteurs, identifiés par spectrométrie de masse. Plus 250 protéines ont été identifiées au cours de cette approche. Trois protéines ont été étudiées plus en détail. HSP70.2, un variant spécifique du testicule de la protéine de choc thermique HSP70, interagit avec les protéines de transition, participerait à l'enlèvement des histones et à l'établissement de structures chromatinienne particulières. NAP1L4 et Npm3 sont deux chaperons d'histones, exprimés uniquement dans le testicule, et dont les rôles sont en cours de caractérisation.

II.1. Brdt compacte la chromatine acétylée lors de la spermiogénèse

II.1.1. Principaux résultats

Brdt est un facteur contenant deux bromodomains surexprimé dans le testicule. Brdt se lie spécifiquement à la queue N terminale d'H4 lorsque celle-ci est acétylée, et induit une compaction dramatique de la chromatine *in vivo* et *in vitro* (Pivot-Pajot *et coll.*, 2003).

~ Brdt compacte la chromatine aussitôt qu'elle est hyperacétylée

L'action de Brdt a été suivie en détail en exprimant une protéine fusion Brdt-GFP dans des cellules somatiques. Une hyperacétylation des protéines est induite par la tricostatine A (TSA), et touche les histones après 20 min de traitement. Brdt agit dès que les histones sont hyperacétylées, car les premiers signes de compaction de la chromatine sont détectés après 20 min de traitement.

~ Les histones de liaison sont décrochées de la chromatine par Brdt

La compaction induite par Brdt a lieu malgré la présence des histones de liaison. Or, les histones de liaison limitent la formation de structures chromatinienne compactes, comme par exemple les

chromosomes mitotiques (Khochbin, 2001). La distribution d'une histone de liaison, H1°, a été analysée afin de mieux comprendre comment Brdt compacte la chromatine en sa présence.

H1° est dissociée de la chromatine compactée par Brdt et s'accumule dans les espaces sans ADN libérés par la compaction de la chromatine.

~ ***Localisation de Brdt endogène***

La distribution de la protéine Brdt endogène a pu être analysée grâce au développement d'un anticorps spécifique de Brdt. Brdt est détectée *in situ* dès que les histones des spermatides sont hyperacétylées, et colocalise parfaitement avec les histones hyperacétylées. La colocalisation est maintenue tant que des foyers acétylés sont détectés. Ceci confirme *in vivo* un rôle probable de Brdt dans la compaction des domaines dont les histones sont acétylées.

II.1.2. Article publié

L'ensemble de ce travail a été publié dans *Ernst Schering Res Found Workshop* en 2006. J'ai réalisé personnellement l'ensemble de l'étude de la protéine endogène. J'ai également participé à la conception et à la rédaction de l'article.

9 Histone Acetylation-Mediated Chromatin Compaction During Mouse Spermatogenesis

J. Govin, C. Lestrat, C. Caron, C. Pivot-Pajot, S. Rousseaux, S. Khochbin

9.1	Introduction	156
9.2	Results	158
9.2.1	Induced Histone Acetylation in Postmeiotic Spermatogenic Cells	158
9.2.2	Brdt, a Unique Factor Capable of Specifically Inducing the Compaction of Acetylated Chromatin	159
9.2.3	Brdt Accumulation During Mouse Spermatogenesis	162
9.3	Discussion	163
9.4	Material and Methods	167
9.4.1	Spermatogenic Cell Fractionation	167
9.4.2	Cell Lines, Transfection and Cell Treatment	167
9.4.3	Immunofluorescence	167
9.4.4	Microscopy	168
9.4.5	In Vivo Cell Imaging	169
9.4.6	Western Blots	169
	References	169

Abstract. One of the most dramatic chromatin remodelling events takes place during mammalian spermatogenesis involving massive incorporation of somatic and testis-specific histone variants, as well as generalized histone modifica-

tions before their replacement by new DNA packaging proteins. Our data suggest that the induced histone acetylation occurring after meiosis may direct the first steps of genome compaction. Indeed, a double bromodomain-containing protein expressed in postmeiotic cells, Brdt, shows the extraordinary capacity to specifically condense acetylated chromatin *in vivo* and *in vitro*. In elongating spermatids, Brdt widely co-localizes with acetylated histones before accumulating in condensed chromatin domains. These domains preferentially maintain their acetylation status until late spermatogenesis. Based on these data, we propose that Brdt mediates a general histone acetylation-induced chromatin compaction and also maintains differential acetylation of specific regions, and is therefore involved in organizing the spermatozoon's genome.

9.1 Introduction

Prokaryotes and eukaryotes are capable of activating specific programs, sporulation or gametogenesis, mediating an extreme compaction of their genome. In eukaryotes, the genome compaction mechanism is preceded by meiosis generating haploid cells, which then undergo a DNA condensation process. In the animal kingdom, spermatogenesis designates the generation of male reproductive haploid cells containing a tightly packed genome in many species (Lewis et al. 2003). The compaction of the genome is stabilized through the action of specialized proteins, which replace histones transiently or permanently. Despite the fundamental importance of this event, very little is known on the molecular basis of histone replacement and genome compaction. Two hints from the literature indicate that the transitions in DNA-packaging structures are preceded by a direct alteration of chromatin structure. First, in addition to several somatic-type histone variants, many testis-specific variants are massively incorporated into chromatin. Second, a widespread histone hyperacetylation is known to occur in many vertebrate species before their replacement (Govin et al. 2004). This acetylation, which occurs in a replication- and transcription-independent manner, seems to be closely linked to histone replacement. Indeed, histones remain underacetylated in species where they persist all through spermiogenesis such as winter flounder and carp (Kennedy and Davies 1980, 1981). How-

TS¹ Please provide a shorter running title.

ever, the role of the acetylation of core histones in their replacement or in other events has remained largely unknown. Some *in vitro* experiments suggest that histone acetylation could facilitate their displacement by protamines (Oliva et al. 1987; Oliva and Mezquita 1986), but there is no hint in the literature on how it could affect *in vivo* chromatin remodelling in spermatids.

The discovery of bromodomain as an acetyl-lysine binding module unveiled some of the molecular links between histone acetylation and downstream events (Yang 2004). Bromodomain defines a restricted conserved domain in a group of cellular proteins mostly involved in chromatin-related functions. Histone acetylation would therefore generate a signal recruiting a variety of functions, such as specific enzymatic activity, to chromatin (Yang 2004).

It is therefore reasonable to expect the participation of bromodomain-containing proteins also in triggering new functions after global histone acetylation in elongating spermatids. Following this reasoning, we searched databanks for testis-specific bromodomain-containing proteins susceptible of reorganizing the genome in maturing spermatids. A double bromodomain-containing protein of unknown function, Brdt, attracted our attention and was found to harbour all the properties designating it as a potentially important factor acting on acetylated chromatin in elongating spermatids (Pivot-Pajot et al. 2003). Our data indeed showed that Brdt specifically and efficiently binds acetylated histone H4 tail, and that this binding needed the integrity of both its bromodomains. The gene is specifically expressed in testis and the encoding mRNA is present in elongating spermatids where the protein could act on acetylated chromatin.

Here, we succeeded in generating antibodies specifically recognizing Brdt and monitored its expression and intracellular localization during mouse spermatogenesis. Considering its expression pattern, the unique biochemical properties of the protein, as well as its intranuclear localization in elongating spermatids, we propose that the induced histone hyperacetylation in spermatids is a preliminary signal for chromatin condensation further mediated by Brdt and analogous factors. Moreover, Brdt and related proteins may also maintain specific chromatin regions acetylated until late spermatogenesis, therefore organizing the spermatozoon's genome.

9.2 Results

9.2.1 Induced Histone Acetylation in Postmeiotic Spermatogenic Cells

Postmeiotic maturation of male germ cells has been shown in several vertebrate species to involve an enhanced acetylation of histones (Govin et al. 2004). We previously showed that this phenomenon also occurs during mouse and human spermatogenesis (Faure et al. 2003; Hazzouri et al. 2000). Here we more precisely characterized histone acetylation occurring during mouse spermatogenesis by taking advantage of a spermatogenic cell fractionation procedure. Dissociated spermatogenic cells were fractionated on a BSA gradient and fractions enriched in pachytene spermatocytes (three fractions), round (three fractions), round-elongating (one fraction) and elongating-condensing (one fraction) spermatids were obtained and histone acetylation analysed by Western blot. This analysis shows that among the core histones, mainly histone H4 and H2A are affected by the postmeiotic wave of histone hyperacetylation (Fig. 1A and data not shown).

In order to evaluate how this specific histone acetylation is associated with genome organization in maturing spermatids, we conducted a series of *in situ* analyses of histone H4 acetylation. Round spermatids contained essentially hypoacetylated histones (Fig. 1B). A sudden and widespread histone H4 acetylation occurred at the beginning of the elongation process, globally affecting the entire genome. As elongation proceeded the acetylation signal disappeared in a region-specific manner: a region containing compact heterochromatin-type structures, as can be judged by DAPI staining, seems to resist deacetylation/histone replacement events in elongating spermatids.

These data convey potentially important information. The induction of acetylation occurs on a very large scale without any regional specificity, therefore suggesting a sudden disequilibrium between cellular histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) activities, and corresponding to the initiation of a chromatin compaction phase. In the subsequent phases of chromatin compaction, acetylated histone H4 becomes preferentially associated with specific regions of the spermatid genome. It is therefore extremely important to identify

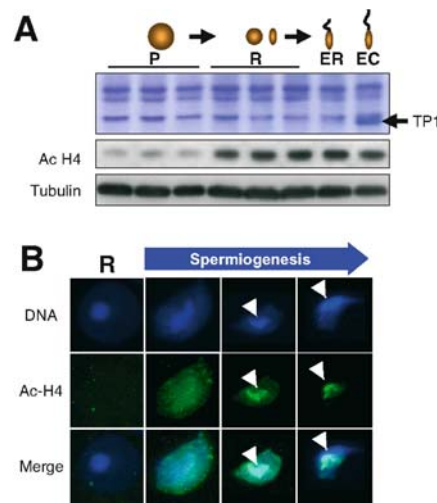


Fig. 1A,B. Induced histone H4 acetylation during spermiogenesis. **A** Mouse spermatogenic cells were fractionated on a BSA gradient and proteins in different collected fractions were analysed either by SDS-PAGE (*upper panel*, Coomassie-stained gel) or by Western blots. The fractions are enriched in meiotic spermatocytes (*P*, three fractions collected), round spermatids (*R*, three fractions collected), round and elongating spermatids (*ER*) and elongating and condensing spermatids (*EC*). The blot containing the indicated fractions was successively probed with antibodies detecting the indicated proteins. **B** Organization of acetylated H4-containing genomic regions during spermiogenesis was visualized after immunodetection of acetylated H4 on a suspension of spermatogenic cells. The *arrows* indicate compact chromatin regions containing acetylated histone H4

factors capable of interpreting the signals generated by these specific acetylations.

9.2.2 Brdt, a Unique Factor Capable of Specifically Inducing the Compaction of Acetylated Chromatin

In search of factors capable of mediating the acetylation-mediated chromatin reorganization in elongating spermatids, we previously screened

available sequences in the databanks for bromodomain-containing factors specifically expressed in testis. This analysis attracted our attention to Brdt, a double bromodomain-containing protein of unknown function found expressed in the human testis (Jones et al. 1997). Our analysis showed that Brdt-encoding mRNA is also over-expressed in the mouse testis and is present in spermatocytes, as well as in spermatids where histone hyperacetylation takes place. We showed that the protein was capable of interacting with acetylated histone H4 tails and that the two bromodomains were necessary for an efficient interaction. Moreover, the protein showed the extraordinary capacity of inducing a condensation of acetylated chromatin *in vivo* and *in vitro* (Pivot-Pajot et al. 2003).

In order to further test the relationship between the Brdt-induced chromatin compaction and the accumulation of acetylated histone H4 after a trichostatin A TSA treatment, we performed an *in vivo* follow-up

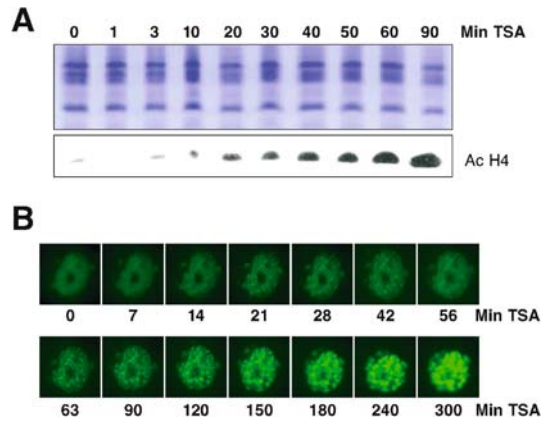


Fig. 2A,B. Time course of Brdt-dependent chromatin compaction after TSA treatment. **A** Cos cells were treated for the indicated times (min) with 100 ng/ml of TSA and the accumulation of acetylated histone H4 was monitored as in Fig. 1. The *upper panel* shows a Coomassie-stained gel of the proteins analysed in the *lower panel*. **B** Cos cells were transfected with GFP-Brdt and at the time 0 an image of a transfected cell was taken. Then 100 ng/ml of TSA was added to the culture medium. At the indicated time points after TSA addition, the GFP fluorescence of the same cell was recorded

of Brdt-induced compaction. Figure 2B shows GFP-Brdt in a single cell analysed at different times after the addition of TSA to the culture medium. After 20–30 min of TSA treatment, the first signs of chromatin compaction were clearly detectable. These time lapses also correspond to the first visible accumulation of acetylated H4 (Fig. 2A). These data confirm our previous observations and establish a strict correlation between histone acetylation and Brdt-mediated chromatin compaction.

More experiments further unravelled new aspects of Brdt- and acetylation-dependent chromatin condensation.

Histone H1 participates in the formation and stabilization of the 30-nm chromatin fibre but at the same time prevented the formation of tightly packed chromatin structures such as mitotic chromosomes (Khochbin 2001). In this regard, mitotic H1 phosphorylation is thought to loosen H1-DNA interaction, thereby allowing chromatin condensation during mitosis (Roth and Allis 1992). We wanted to know how Brdt manages to induce the formation of highly compact chromatin domains despite the presence of H1. Cos cells were transfected with GFP-Brdt, treated with TSA to induce histone hyperacetylation and endogenous histone H1^o was detected using an appropriate antibody. Figure 3 shows that chromatin compaction was observed only in Brdt-expressing cells (DNA panel, compare Brdt expressing cells with nontransfected cells), as expected. Interestingly, H1^o labelling was fainter in Brdt-expressing cells compared to non-transfected cells. Moreover, careful examination of the nuclei from Brdt expressing cells shows that H1^o is released from chromatin as the protein fills all the intranuclear spaces devoid of DNA generated by chromatin compaction (Fig. 3, lower panel, *arrowheads*). This phenomenon was Brdt-dependent since in non-transfected cells, H1^o perfectly co-localizes with chromatin (Fig. 3 and data not shown). These data show that Brdt is also capable of inducing a release of linker histones from chromatin. The removal of H1 could be facilitated by histone acetylation (Misteli et al. 2000; Perry and Annunziato 1989) as well as by Brdt-induced constraints on the chromatin fibre.

This property of Brdt may have an important implication in chromatin remodelling during spermatid maturation, namely in the exchange of linker histones. Indeed, testis specific linker histones replace somatic type H1s. H1t accumulates in meiotic spermatocytes and a specific testis-specific linker histone, Hils, becomes associated with chromatin

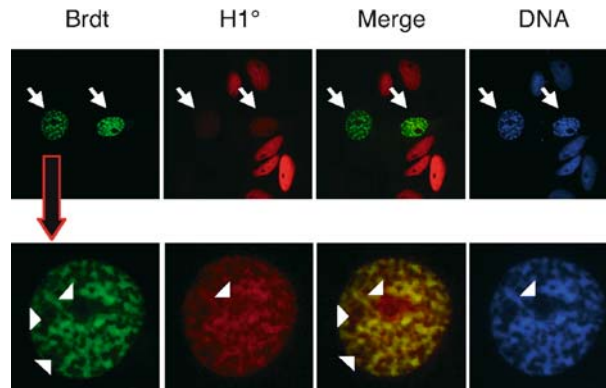


Fig. 3. Release of histone H1° from chromatin after Brdt-induced chromatin compaction. Cos cells were transfected with GFP-Brdt and then treated with 100 ng/ml of TSA for 12 h. Endogenous histone H1° was visualized in non-transfected and Brdt-expressing cells (*arrows*) after cells fixation and immunostaining. GFP fluorescence (*green*) and immunofluorescence (*red*) were recorded. The nucleus of a Brdt-expressing cell is shown in higher magnification to visualize Brdt-H1° co-localizations. *Arrowheads* show intranuclear spaces devoid of chromatin

precisely during the chromatin compaction phase in spermatids (Govin et al. 2004). Brdt, in addition to chromatin compaction, may also facilitate linker histone removal and replacement.

9.2.3 Brdt Accumulation During Mouse Spermatogenesis

Our data show that Brdt binds acetylated histones and has the capacity of inducing the compaction of acetylated chromatin. We have shown here that acetylation widely affects histone H4 at the beginning of spermatid elongation, as the whole genome seems to contain acetylated histones. However, during later stages, histone acetylation was mostly observed on dense and compact chromatin regions. We produced an antibody specifically recognizing Brdt and used it to localize the protein in spermatogenic cells. The antibody did not significantly detect Brdt in round spermatids. However, interestingly, at the

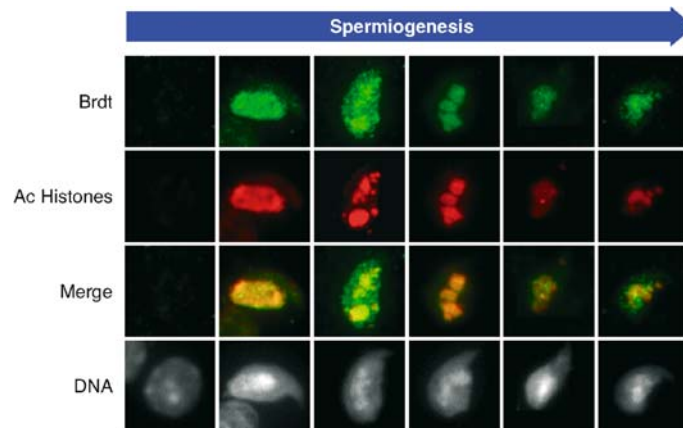


Fig. 4. Endogenous Brdt co-localizes with acetylated histones in elongating spermatids. Spermatogenic cells were recovered on a slide directly from a frozen piece of mouse testis, fixed and stained for Brdt and acetylated histones. For the purpose of co-detection, a mouse monoclonal antibody raised against acetylated lysines (Komatsu et al. 2003) was used to detect acetylated histones. Brdt was detected using an immunopurified polyclonal antibody raised in our laboratory

beginning of elongation, an intense Brdt signal appears, which perfectly co-localizes with acetylated histones (Fig. 4). During later stages, acetylated histones become preferentially visible on condensed DNA regions and Brdt continues to perfectly co-localize with these regions of compact chromatin. These observations are in agreement with a model attributing to Brdt a role in the condensation of acetylated chromatin domains.

9.3 Discussion

Basic testis-specific proteins have been thought for a long time to be responsible for the genome compaction during the maturation of spermatids or spermiogenesis. In mammals these basic proteins are transition proteins (TPs; Meistrich et al. 2003) and protamines (Lewis et al. 2003). TPs arrive first and are then replaced by protamines. Interestingly, the

generation of mice bearing invalidated TP1/2 genes showed that the first steps of chromatin condensation can take place in the total absence of TPs (Shirley et al. 2004; Zhao et al. 2004) indicating that another yet unidentified mechanism initiates chromatin compaction. Our data suggest for the first time that the massive histone acetylation may unexpectedly mediate this chromatin compaction. Indeed, the timing of induced histone acetylation during mouse spermiogenesis corresponds to the initiation spermatid elongation and genome condensation (Hazzouri et al. 2000). Moreover, our analysis showed that Brdt is also expressed in elongating spermatids. Brdt has the unique property of inducing the condensation of acetylated chromatin. In fact, we were able to mimic, in somatic cells, the situation observed in spermatids, i.e. Brdt expression in the presence of hyperacetylated histones. Histone acetylation was induced after the inhibition of histone deacetylases (HDACs) in Brdt-expressing cells in culture. Remarkably, Brdt mediated a dramatic chromatin compaction strictly dependent on histone acetylation. This experiment showed that when both Brdt and acetylated histones are present at the same time in a cell, the protein is capable of inducing a chromatin compaction. These conditions are precisely found in elongating spermatids, suggesting therefore that histone acetylation and Brdt would mediate the first chromatin condensation observed during spermiogenesis before the synthesis of TPs. This hypothesis is also supported by the fact that *in situ* analysis showed that Brdt perfectly co-localizes with acetylated chromatin in the spermatids at various stages of genome compaction. Based on these data, we could reasonably propose that chromatin acetylation is a preliminary signal for genome compaction and that Brdt is one of the actors interpreting the signal.

Our investigations also revealed a new property of Brdt. Indeed, Brdt-mediated compaction of chromatin was associated with the release of linker histones. It is therefore possible that Brdt also mediates the exchange of linker histones taking place in spermatids as somatic type H1s are replaced by H1t and Hils.

During spermatogenesis, Brdt probably ensures multiple functions. Its accumulation at the time of histone hyperacetylation would mediate the first steps of chromatin compaction. The protein could, at the same time, favour the exchange of linker histones. Finally, Brdt could

also protect specific chromatin region containing acetylated histones against their replacement by TPs. Along this line, it has been shown that the yeast homologue of Brdt, Bdf1, is capable of protecting acetylated H4 against deacetylation and actively maintains acetylated chromatin regions (Ladurner et al. 2003). Likewise, Brdt could also actively maintain specific chromatin region in acetylated state. In agreement with this hypothesis, our *in situ* analysis showed that Brdt and acetylated histones co-localized in specific domains during late spermatogenesis when most of the histones are replaced in other regions of the genome. This observation suggests that Brdt may be involved in establishing the functional organization of the spermatozoon's genome. In mammals, spermatozoa contain variable amounts of histones. The human sperm nucleus retains about 15% of the usual haploid histone complement and also contains a heterogeneous mixture of protamines (Balhorn et al. 1987) and other basic proteins (Ammer et al. 1986; Balhorn et al. 1987; Gusse et al. 1986; Tanphaichitr et al. 1978). Electron microscopy of spread human sperm chromatin has resolved globular structures, which correspond in size to nucleosomes (Gusse and Chevaillier 1980; Sobhon et al. 1982a, 1982b; Wagner and Yun 1981). Gatewood et al. (Gatewood et al. 1987) have demonstrated that the nucleohistone and nucleoprotamine portions of human sperm chromatin form discrete structures, which are, at least partly, sequence-specific (Wykes and Krawetz 2003). Based on these observations, it is tempting to propose that the acetylation-dependent recruitment of Brdt may also prevent the assembly of TPs and protamines on specific regions and therefore participate in organizing the spermatozoon's genome. It would also be very interesting to investigate the function of these particular regions during early embryogenesis. One prediction would be that these regions would transmit some male-specific information to the embryo.

Brdt is a member of BET double bromodomain-containing proteins also sharing a remarkably well-conserved domain of unknown function named ET (extra terminal). The family encompasses three somatic members known as Brd2, Brd3 and Brd4 in addition to the testis-specific member Brdt (Florence and Faller 2001; Shang et al. 2004). Several studies have established that different members may present different acetylated histone-binding activities. Brd2 specifically interacts with histone H4 acetylated on K12 and also shows a weak binding to H2B

acetylated on K5 and K12 (Kanno et al. 2004). Brd4 interacts with acetylated H4 and H3 tails while, under the same conditions, Brd2 does not interact with acetylated histone H3 (Dey et al. 2003). Both Brd4 and Brd2 have the unique properties of remaining bound to chromatin of condensed mitotic chromosomes when other bromodomain-containing proteins were released (Dey et al. 2003). One important function of these proteins could therefore be the transmission of the acetylation mark to daughter cells. Indeed, a massive histone deacetylation takes place during mitosis, which corresponds to the erasure of the histone acetylation-dependent epigenetic information (Kruhlak et al. 2001). The binding of Brd2 and Brd4 to acetylated nucleosomes would therefore first protect specific chromatin regions against deacetylation during mitosis and then ensure the transmission of this acetylation mark to the daughter cells. The ability of Brd4 to bind mitotic chromosomes has also been used by the bovine papillomavirus to tether its genome to the host cell mitotic chromosomes and to therefore ensure the transmission of the viral episomes to the daughter cells (You et al. 2004).

There is now strong evidence on the participation of these double Brd proteins in tumorigenesis, mainly in the development of B-cell lymphoma and leukaemia. Human leukaemic cell lines or primary leukaemic blasts have high levels of Brd2, and the transgenic mice model expressing Brd2 in lymphoid cells develops aggressive B-cell lymphoma showing all the characteristics of human non-Hodgkin lymphoma (Greenwald et al. 2004).

In a highly lethal form of epithelial tumour, the poorly differentiated carcinoma, a chromosome translocation $t(15;19)(q13, p13.1)$ causes the fusion of Brd4 to the novel testis-specific protein NUT (nuclear protein in testis), resulting in a fusion oncogene and deregulation of the activities of both proteins (French et al. 2003).

Finally, the aberrant expression of Brdt has been reported in 12 of 47 cases of non-small cell lung cancers (Scanlan et al. 2000). Considering the unique properties of Brdt, it is expected that its illegitimate expression in somatic cells would have deleterious effects. Brdt would locally induce the compaction of acetylated chromatin and this phenomenon may have a dramatic effect on gene expression and its illegitimate expression may represent an important risk factor for cancer development.

9.4 Material and Methods

9.4.1 Spermatogenic Cell Fractionation

A cell fractionation procedure was performed as previously described (Pivot-Pajot et al. 2003). Briefly, after euthanasia, the testes of two adult mice were dissected and the albuginea removed. The seminiferous tubules were released by incubation in a collagenase solution. The germinal and Sertoli cells were then released from the tubules by pipetting. The cells were finally resuspended in a volume of 18 ml of the sedimentation solution and laid on a 360-ml 2%–4% BSA gradient in an airtight sedimentation chamber at 4 °C. The cells were allowed to sediment at 4 °C for 70 min. Ten-millilitre fractions were then collected on ice and centrifuged. The cells present in each collected fraction were identified by observation under a phase contrast microscope, and the fractions were pooled in order to obtain cell suspensions enriched in pachytene spermatocytes (P), round and elongating spermatids (RES) or condensing spermatids (CS). Each cell suspension was then washed again in phosphate buffered saline at 4 °C and processed for further analysis.

9.4.2 Cell Lines, Transfection and Cell Treatment

Cos7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco, Invitrogen, San Diego, CA, USA) supplemented with penicillin, streptomycin and 10% FCS (Gibco). Cells at 50% confluence in one-well coverslips were transfected with 2 µg of δ C-sBrdt (Pivot-Pajot et al. 2003) using the FuGENE 6 reagent (Roche, Meylan, France). Twelve hours after transfection, cells were treated with Trichostatin A (100 ng/ml) and used for further analysis.

9.4.3 Immunofluorescence

Somatic Cell Preparations

Transfected cells (Cos7) grown on coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 min at room temperature, and then permeabilized in 4% paraformaldehyde, 0.1% Triton-X100 for 1 min at room temperature.

Testis Imprint Preparations

Mouse testes were cut into three and frozen in liquid nitrogen. Testis imprint were prepared by gently pressing the frozen testis tissue onto glass slides, air drying them, incubating them in 90% ethanol for 3 min, and air drying them again. They were then permeabilized in Saponine 0.5%/Triton 0.25%/phosphate buffered saline for 15 min at room temperature.

Immunofluorescent Staining

Following incubation with the blocking buffer (10% skimmed milk and 0.2% Tween in phosphate buffered saline) for 30 min, primary antibody diluted in 1% skimmed milk and 0.2% Tween in phosphate buffered saline was added on the slides for 1 h at 37 °C. Primary antibodies were a monoclonal antibody against H1^o (Gorka et al. 1998), a rabbit polyclonal antibody against acetylated H4 diluted at 1:100 (Upstate #06-598), a monoclonal antibody against acetylated lysine diluted at 1:250 (Komatsu et al. 2003), and an immunopurified rabbit anti-BRDT polyclonal antibody. The slides were then washed three times in 1% skimmed milk and 0.2% Tween in phosphate buffered saline and further incubated for 30 min at 37 °C with anti-mouse IgG and/or anti-rabbit IgG (Molecular Probe, Invitrogen, San Diego, CA, USA) conjugated with Alexa 488 or 456, respectively. After three washes in 1% skimmed milk and 0.2% Tween in phosphate buffered saline, the cells were counterstained with Hoechst (250 ng/ml) and examined under a fluorescence microscope.

9.4.4 Microscopy

Cell preparations were first analysed with an epifluorescence microscope (Axiophot, Zeiss) using a 63× oil immersion objective. For 3D analysis, a confocal laser scanning microscope (LSM 510-NLO, Zeiss), equipped with a 40× oil immersion objective (NA = 1.3), was used. Following excitation at the appropriate wavelengths (at 488 nm using an argon ion laser, at 543 nm with a HeNe laser, and at 750 nm with a Ti:Sa laser (SpectraPhysics, Mountain View, CA, USA) of the Alexa 488, 546 and Hoechst signals, stacks of equidistant 0.1 μm of 128 × 128 pixel size

images (with a zoom of 3.9 \times , one pixel = 0.1 μ m) were recorded. Images were averaged eight times.

9.4.5 In Vivo Cell Imaging

Cos7 cells growing on coverslips were transfected with δ C-sBrdt-GFP 24 h before imaging. Cells were then transferred into an incubation chamber (37 °C, 5% CO₂) of a videomicroscopy station. TSA was added to the cell culture medium at the final concentration of 100 ng/ml, and images were acquired every 7 min using a Zeiss Axiovert 100 M microscope with an air 40 \times objective controlled by Metamorph software.

9.4.6 Western Blots

Samples were submitted to electrophoresis on a 15% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond C+, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) according to standard procedures. Following a 30 min incubation in phosphate-buffered saline containing 10% skimmed milk and 0.3% Tween (blocking solution), the blots were incubated for 1 h at room temperature with primary antibody diluted in phosphate-buffered saline, containing 10% FCS and 0.2% Tween. After three washes of 5 min each at room temperature, the blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody in phosphate-buffered saline containing 1% dry milk. The final detection was performed using the ECL+ kit (Amersham).

Acknowledgements. We are also grateful to Sandrine Curtet-Benitski for technical assistance. This work was supported by the Ligue National Contre le Cancer, Comité de l'Isère and the Région Rhône-Alpes Emergence program. CL is recipient of a Region Rhône-Alpes PhD fellowship. SR is recipient of an INSERM interface program.

References

- Ammer H, Henschen A, Lee CH (1986) Isolation and amino-acid sequence analysis of human sperm protamines P1 and P2. Occurrence of two forms of protamine P2. *Biol Chem Hoppe Seyler* 367:515–522

- Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J, Stanker LH, Wyrobek A (1987) High-performance liquid chromatographic separation and partial characterization of human protamines 1, 2, and 3. *Biotechnol Appl Biochem* 9:82–88
- Dey A, Chitsaz F, Abbasi A, Misteli T, Ozato K (2003) The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8758–8763
- Faure AK, Pivot-Pajot C, Kerjean A, Hazzouri M, Pelletier R, Peoc'h M, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S (2003) Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Mol Hum Reprod* 9:757–763
- Florence B, Faller DV (2001) You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Front Biosci* 6:D1008–D1018
- French CA, Miyoshi I, Kubonishi I, Grier HE, Perez-Atayde AR, Fletcher JA (2003) BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma. *Cancer Res* 63:304–307
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW (1987) Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 236:962–964
- Gorka C, Brocard MP, Curtet S, Khochbin S (1998) Differential recognition of histone H10 by monoclonal antibodies during cell differentiation and the arrest of cell proliferation. *J Biol Chem* 273:1208–1215
- Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 271:3459–3469
- Greenwald RJ, Tumang JR, Sinha A, Currier N, Cardiff RD, Rothstein TL, Faller DV, Denis GV (2004) E mu-BRD2 transgenic mice develop B-cell lymphoma and leukemia. *Blood* 103:1475–1484
- Gusse M, Chevaillier P (1980) Electron microscope evidence for the presence of globular structures in different sperm chromatins. *J Cell Biol* 87:280–284
- Gusse M, Sautiere P, Belaiche D, Martinage A, Roux C, Dadoune JP, Chevaillier P (1986) Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim Biophys Acta* 884:124–134
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S (2000) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* 79:950–960
- Jones MH, Numata M, Shimane M (1997) Identification and characterization of BRDT: a testis-specific gene related to the bromodomain genes RING3 and *Drosophila* fsh. *Genomics* 45:529–534

- Kanno T, Kanno Y, Siegel RM, Jang MK, Lenardo MJ, Ozato K (2004) Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Mol Cell* 13:33–43
- Kennedy BP, Davies PL (1980) Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins. *J Biol Chem* 255:2533–2539
- Kennedy BP, Davies PL (1981) Phosphorylation of a group of high molecular weight basic nuclear proteins during spermatogenesis in the winter flounder. *J Biol Chem* 256:9254–9259
- Khochbin S (2001) Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* 271:1–12
- Komatsu Y, Yukutake Y, Yoshida M (2003) Four different clones of mouse anti-acetyllysine monoclonal antibodies having different recognition properties share a common immunoglobulin framework structure. *J Immunol Methods* 272:161–175
- Kruhlak MJ, Hendzel MJ, Fischle W, Bertos NR, Hameed S, Yang XJ, Verdin E, Bazett-Jones DP (2001) Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin. *J Biol Chem* 276:38307–38319
- Ladurner AG, Inouye C, Jain R, Tjian R (2003) Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell* 11:365–376
- Lewis JD, Abbott DW, Ausio J (2003) A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol* 81:131–140
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111:483–488
- Misteli T, Gunjan A, Hock R, Bustin M, Brown DT (2000) Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* 408:877–881
- Oliva R, Bazett-Jones D, Mezquita C, Dixon GH (1987) Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *J Biol Chem* 262:17016–17025
- Oliva R, Mezquita C (1986) Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles in vitro. *Biochemistry* 25:6508–6511
- Perry CA, Annunziato AT (1989) Influence of histone acetylation on the solubility, H1 content and DNase I sensitivity of newly assembled chromatin. *Nucleic Acids Res* 17:4275–4291
- Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S (2003) Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 23:5354–5365

- Roth SY, Allis CD (1992) Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *Trends Biochem Sci* 17:93–98
- Scanlan MJ, Altorki NK, Gure AO, Williamson B, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ (2000) Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9. *Cancer Lett* 150:155–164
- Shang E, Salazar G, Crowley TE, Wang X, Lopez RA, Wolgemuth DJ (2004) Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, Brdt in the mouse testis. *Gene Expr Patterns* 4:513–519
- Shirley CR, Hayashi S, Mounsey S, Yanagimachi R, Meistrich ML (2004) Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol Reprod* 71:1220–1229
- Sobhon P, Chutatape C, Chalermisarachai P, Vongpayabal P, Tanphaichitr N (1982a) Transmission and scanning electron microscopic studies of the human sperm chromatin decondensed by micrococcal nuclease and salt. *J Exp Zool* 221:61–79
- Sobhon P, Tanphaichitr N, Chutatape C, Vongpayabal P, Panuwatsuk W (1982b) Electron microscopic and biochemical analyses of the organization of human sperm chromatin decondensed with sarkosyl and dithiothreitol. *J Exp Zool* 223:277–290
- Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P (1978) Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* 117:347–356
- Wagner TE, Yun JS (1981) Human sperm chromatin has a nucleosomal structure. *Arch Androl* 7:251–257
- Wykes SM, Krawetz SA (2003) The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 278:29471–29477
- Yang XJ (2004) Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* 26:1076–1087
- You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM (2004) Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 117:349–360
- Zhao M, Shirley CR, Mounsey S, Meistrich ML (2004) Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biol Reprod* 71:1016–1025

II.2. HSP70.2 participe au remodelage post méiotique de la chromatine

II.2.1. Principaux résultats

Protéines de transition et protamines sont les protéines majoritaires présentes au sein des spermatides allongées et condensées. Elles sont encore plus basiques que les histones (point isoélectrique supérieur à 12), et sont probablement chaperonnées afin d'éviter tout problème d'agrégation. Ainsi, les molécules qui les chaperonnent peuvent être considérées comme des acteurs-clé de la réorganisation post méiotique de la chromatine.

~ Analyse par spectrométrie de masse des protéines nucléaires des spermatides allongées solubles dans l'acide

Une grande partie des protéines structurant la chromatine est très basique, et peut être purifiée en utilisant leur capacité à se solubiliser dans l'acide. Ainsi, notre approche s'est basée sur l'hypothèse que l'identification des protéines solubles dans l'acide, extraites de noyaux de spermatides allongées, aiderait à comprendre l'organisation chromatinienne de ce type cellulaire.

Les protéines acido-solubles des spermatides allongées de type 12-16 ont été identifiées par spectrométrie de masse. Comme attendu, de nombreuses protéines structurant la chromatine ont été identifiées. Toutes les isoformes somatiques connues des histones de liaison ont été identifiées (H1.1 à H1.5, ainsi que le variant H1^o), ainsi que les variants spécifiques du testicule H1t et H1t2. Toutes les histones de cœur, leurs principaux variants somatiques et spécifiques du testicules ont été identifiés, ce qui comprend H2A, H2A.X, H2A.Z, TH2A, H2B, TH2B, H3.1, H3t et H4. Enfin, certaines protéines inattendues ont également été identifiées.

L'étude des points isoélectriques (pI) de chaque protéine acido-solubles permet de séparer les protéines en deux groupes. Le premier contient l'ensemble des histones et protéines connues pour interagir avec la chromatine. Le deuxième est composé de protéines acides, dont le pI est compris entre 4.5 et 6. Certaines de ces protéines sont des chaperons moléculaires connus : une association forte avec des protéines basiques pourrait expliquer leur solubilisation dans l'acide.

~ ***HSP70.2 est solubilisé dans l'acide uniquement dans les spermatides allongées/condensées***

HSP70.2 a été identifiée parmi les chaperons moléculaires à pI acide. HSP70.2 est un variant spécifique du testicule d'HSP70, dont le rôle au cours de la méiose a été bien caractérisé (Allen *et coll.*, 1996 ; Dix *et coll.*, 1996 ; Dix *et coll.*, 1997 ; Zhu *et coll.*, 1997 ; Eddy, 1999). HSP70.2 est notamment impliqué dans un point de contrôle de la méiose, et son invalidation conduit à une apoptose massive des spermatocytes (Dix *et coll.*, 1996). Malgré son maintien dans les stades post méiotiques, aucune donnée n'explique son rôle fonctionnel à ce moment de la spermatogénèse.

Des extraits acides ont été réalisés sur des cellules à différents stades de la spermatogénèse (spermatocytes, spermatides rondes, spermatides allongées, spermatides condensées). La détection d'HSP70.2 dans ces extraits confirme que HSP70.2 est solubilisée dans l'acide, mais uniquement dans les spermatides allongées et condensées. Ainsi, HSP70.2 interagirait avec une ou des protéines basiques présentes dans les spermatides allongées/condensées, responsables de sa solubilisation dans l'acide. HSP70 est présente à ce stade, mais n'a jamais été détecté dans les extraits acides. HSP70 et HSP70.2 sont identiques à 80% et similaires à plus de 95%, ce qui exclue la possibilité que l'interaction entre HSP70.2 et protéines basiques soit induite par l'extraction acide elle-même.

~ ***La fonction d'HSP70.2 change dans les spermatides allongées***

HSP70.2 est soluble dans l'acide au moment même où la chromatine des spermatides allongées est réorganisée, suggérant un rôle chromatinien nouveau pour HSP70.2. Les protéines interagissant avec la chromatine ont été purifiées en utilisant la nucléase micrococcalle S7 (MNase), qui coupe l'ADN entre les nucléosomes. Ainsi, les protéines solubilisées par l'action de la MNase ont été étudiées à différents stades de la spermatogénèse. L'action de la MNase solubilise certaines protéines dans les spermatides allongées uniquement. HSP70.2 fait partie des protéines solubilisées par la MNase. Ainsi, elle est présente au sein de la chromatine au moment où elle est soluble dans l'acide.

La distribution d'HSP70.2 a été analysée par immunofluorescence au sein des noyaux des spermatides. HSP70.2 est distribuée de manière homogène dans le noyau des spermatides rondes, mais se relocalise au stade VIII, précisément lorsque les histones sont hyperacétylées. HSP70.2 se concentre notamment dans un domaine nucléaire situé sous l'acrosome. Ce domaine est vraisemblablement un site de réorganisation intense de la chromatine. En effet, les histones

hyperacétylées ne sont plus détectées à ce niveau et il est intéressant de noter que le variant d'histone de liaison H1t2 est localisé dans cette zone, témoignant la réorganisation chromatinienne en cours.

~ ***HSP70.2 est solubilisée dans l'acide par TP1 et TP2***

Les partenaires d'HSP70.2, responsables de sa solubilisation dans l'acide ont été recherchés. Des immunoprécipitations anti HSP70.2 ont été réalisées avec des extraits acides provenant de différents stades de la spermatogénèse, et contenant ou non HSP70.2. Les protéines précipitées spécifiquement par l'anticorps anti HSP70.2 ne sont pas des histones, mais des protéines présentes spécifiquement dans les spermatides allongées, dont le profil de migration correspond parfaitement aux protéines de transition TP1 et TP2. La détection de ces deux TP par western blot a confirmé l'association d'HSP70.2 avec TP1 et TP2 dans les spermatides allongées.

L'ensemble des données accumulées suggère un changement de la fonction d'HSP70.2 dans la phase post méiotique de la spermatogénèse. HSP70.2 formerait un complexe avec les protéines de transition TP1 et TP2, et serait recrutée au sein de la chromatine. Ceci suggère un rôle fonctionnel d'HSP70.2 dans le remplacement des histones somatiques et l'assemblage de structures chromatinienne spécifiques des spermatides.

II.2.2. Article soumis

L'ensemble de ces données a été soumis récemment à *EMBO reports*. J'ai réalisé personnellement l'intégralité des travaux présentés, à l'exception des identifications par spectrométrie de masse. J'ai également participé à la conception et à la rédaction du manuscrit.

Post-meiotic shifts in HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis

Jérôme Govin¹, Cécile Caron¹, Emmanuelle Escoffier¹, Myriam Ferro², Lauriane Kuhn², Sophie Rousseaux¹, Edward M. Eddy³, Jérôme Garin² and Saadi Khochbin^{1*}

1. Inserm U309, Institut Albert Bonniot, F-38700 France ; Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38700 France.

2. Inserm ERM 0201/CEA/ Université Joseph-Fourier, F-38054 Grenoble, France

3. Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, Gamete Biology Group, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, North Carolina, USA

* Corresponding author : Postal address : InsermU309, Institut Albert Bonniot, Domaine de la Merci, F-38706 La Tronche France.

Tel: (33) 4 76 54 95 83

Fax: (33) 4 76 54 95 95

e-mail : khochbin@ujf-grenoble.fr

Characters count: 24860

Running title: HSP70.2: a spermatid-specific chromatin chaperone

Abstract

HSP70.2 is a testis-specific member of the HSP70 family, known to play a critical role in the completion of meiosis during male germ cells differentiation. Although abundantly present in post-meiotic cells, its function during spermiogenesis remained obscure. Here, using a global proteomic approach to identify genome-organizing proteins in condensing spermatids, we discovered an unexpected role for HSP70.2, which acquires new functions and becomes tightly associated with major spermatid DNA-packaging proteins, Transition Proteins (TP) 1 and 2. Hence, HSP70.2 is identified here as the first TP chaperone and these data shed a new light on the yet totally unknown process of genome condensing structures assembly in spermatids.

Keywords: acetylation, acid extracts, histone, HSP70t, basic proteins.

Introduction

Although several waves of genome-wide reorganization have long been known to occur during male germ cells post-meiotic maturation, the underlying mechanisms still remain obscure. The most spectacular of these reorganizations are those associated with the replacement of histones by transition proteins (TPs) and of TPs by protamines (Caron *et al.*, 2005; Govin *et al.*, 2004; Kimmins and Sassone-Corsi, 2005; Lewis *et al.*, 2003). In somatic cells, specific sets of chaperones control the assembly of nucleosomes containing canonical and variant histones and hence are considered as major regulators of the establishment of differential genome organization (Polo and Almouzni, 2006). In differentiating spermatids, despite the fundamental role of TPs and protamines in genome organization, nothing is known on the chaperone system escorting these proteins and mediating their assembly into new DNA packaging structures. In general, very little is known on chaperones specific for histone and non-histone genome organizers, which are in action during spermiogenesis. The only characterized testis-specific histone chaperone is tNASP which binds the male germ cell linker histone, H1t (Alekseev *et al.*, 2005). Here, by analyzing the nature of proteins soluble in acids present in condensing spermatids, we have discovered an unexpected property of the testis-specific chaperone HSP70.2, which sheds lights on potential mechanisms controlling the post-meiotic genome reorganization. HSP70.2 had already been shown to possess an essential and specific role in male germ cell meiosis (Allen *et al.*, 1996; Dix *et al.*, 1996; Dix *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1997). However, because of a meiotic blockade and massive apoptosis of spermatocytes in HSP70.2 knockout mice, the post-meiotic function of this protein has remained obscure. Here, HSP70.2 is identified as the first chaperone of transition proteins, TP1 and TP2. Our data therefore strongly suggest that, after meiosis, HSP70.2 acquires new functions and contributes to the dramatic spermatid-specific genome wide reorganization.

Results

Mass spectrometry analysis of acid soluble proteins

Many genome-organizing proteins including histones and testis-specific DNA-packaging proteins, such as TPs and protamines, are highly basic and can be purified thanks to their solubility in acid. We reasoned that a global identification of acid soluble proteins extracted from condensing spermatids would allow us to gain an insight into the nature of genome-organizing proteins in these cells. Accordingly, nuclei from a population of sonication resistant mouse spermatids, composed mostly of condensing spermatids at step 12 to 16, were used to extract proteins soluble in 0.2 N sulfuric acid. A proteomic approach for the global identification of these proteins was undertaken. The identified proteins are listed in supplementary table 1. As expected, many DNA packaging proteins are on the list. Among the linker histones, the newly identified H1t2 (Martianov *et al.*, 2005) was present and, within the high mobility group proteins, testis-specific as well as yet uncharacterized members could be identified. In addition to canonical core histones, many variants were found including new H2A and H2B variants, which we called H2AL1, H2AL2 and H2BL1, and characterized elsewhere (Govin *et al.*, submitted). Other proteins non-related to histones were also found.

We then examined the isoelectric points (IP) of all the proteins found soluble in H₂SO₄ and plotted the IP values for each of these proteins along an IP scale (Fig. 1). This representation revealed the presence of two distinct groups of proteins. The first group contained, as expected, basic and mostly DNA-packaging structural proteins (Fig. 1, black arrows). Surprisingly the other group was mostly composed of acidic proteins with an IP between 4.5 and 6 (Fig. 1 grey arrows). An analysis of the nature of these acidic proteins revealed that known chaperones are among them. Based on these data, we hypothesised that a tight association between these acidic proteins, mainly the chaperones, and their basic partners may have induced their solubility in H₂SO₄. Accordingly, we had here an interesting

opportunity to uncover new functions for some of these chaperones in spermatids by identifying their partners.

Stage-specific HSP70.2 acid solubilization

Among the identified chaperones, HSP70.2, a testis-specific member of the HSP70 family (Eddy, 1999), appeared to us as an interesting candidate chaperone. Indeed, the data presented above provided an excellent opportunity to investigate its functions in post-meiotic cells where its role had remained obscure.

Spermatogenic cells were fractionated and pools of cells enriched in spermatocytes (Spc), round spermatids (R), a mix of round and elongated spermatids (RE), and a mix of elongating and condensing spermatids (EC) were obtained and used to confirm that HSP70.2 is expressed in meiotic as well as in post-meiotic cells (Fig. 2A). Our proteomic data suggested that HSP70.2 becomes acid soluble owing to its tight association with DNA-packaging basic proteins. To test this hypothesis, fractionated spermatogenic cells obtained as above were submitted to acid extraction. Figure 2B shows the results of two independent experiments. Very interestingly, a fraction of HSP70.2 becomes acid soluble only at late stages of spermiogenesis, after the accumulation of transition protein 2 (TP2). In the same extracts we did not find any evidence for the selective solubility of HSP70 (Fig. 2B, Exp 2 and not shown). Because of high sequence identity between HSP70.2 and HSP70, this experiment ruled out the possibility that the stage-specific acid solubility of HSP70.2 could be due to non-specific binding of basic proteins to HSP70.2 during the extraction procedure.

HSP70.2 function switch during spermiogenesis

Our data suggested that HSP70.2's function changes during spermatogenesis, and that it becomes specifically associated with spermatid-specific DNA-packaging proteins during the

late stages of spermiogenesis. According to this hypothesis, we predicted a recruitment of HSP70.2 to DNA-organizing structures as spermiogenesis proceeds. Proteins preferentially released by micrococcal nuclease (MNase) from post-meiotic cell nuclei (EC) compared to a spermatocyte pool (Spc), were identified by a proteomic approach. A silver stain analysis of these proteins showed that at least two major proteins are preferentially released from the nuclei of spermatids compared to spermatocytes (Fig. 3A, arrows). Interestingly, in band N°1, in addition to HSP70.2, mass spectrometry identified HSC70t, another testis-specific member of the HSP/HSC70 family. Band N°2 contained disulfide isomerase A3 (PDA3).

We also tried to visualize the stage-specific HSP70.2 redistribution *in situ*. A wave of histone acetylation is known to occur prior to histone replacement during spermatid elongation (Caron *et al.*, 2005; Govin *et al.*, 2004). In order to have an insight into the relationship between HSP70.2 localization and histone replacement, both histone acetylation and HSP70.2 were detected in spermatogenic cells, using respectively a monoclonal mouse anti-acetyl-lysine antibody (Komatsu *et al.*, 2003) and a rabbit polyclonal antibody specific for HSP70.2. Figure 3B shows examples of three critical periods during spermiogenesis as a function of changes occurring in global histone acetylation. In round spermatids (R), HSP70.2 is almost homogeneously distributed in the nucleus and, as previously shown, histones are found underacetylated in these cells (Hazzouri *et al.*, 2000). Interestingly, the wave of histone acetylation observed at stage VIII spermatids (Hazzouri *et al.*, 2000), is associated with a dramatic re-distribution of HSP70.2, which becomes concentrated in a cap-like structure penetrating into the inner side of the nucleus. Co-localization with DAPI DNA staining clearly shows that these regions are DNA-containing sub-acrosomal domains and interestingly also correspond to the domain previously shown to accumulate the spermatid-specific linker H1t2 at stage VIII (Martianov *et al.*, 2005). Moreover, the absence of hyperacetylated histones and accumulation of H1t2 in this region indicate that this particular

zone is probably one of the first concerned by the replacement of somatic-type histones in the nucleus of condensing spermatids. Figure 3B also shows an example of a more advanced spermatid (C), where most of the histone replacements have already occurred. It is interesting to note that the global disappearance of histone acetylation nicely matches the extension of HSP70.2 localization into various regions and its concentration in the nucleus.

Acid-resistant association between TP1/TP2 and HSP70.2

In order to visualize the binding of proteins to HSP70.2 in condensing spermatids, which supposedly mediates the latter's acid solubility, acid extracts from round and elongating/condensing pools of fractionated spermatogenic cells were used to immunoprecipitate HSP70.2. As shown in Figure 4 (input panel), acid extracts from EC spermatids shows a profile different from that of histones which compose most of the round spermatid chromatin proteins (compare lane 2 with lane 1). Mass spectrometry identified the two major bands migrating above histone H3 and below histone H4 as TP2 and TP1 respectively (not shown and Govin et al. submitted). The HSP70.2 antibody did not immunoprecipitate any histone, showing that if there is any HSP70.2-histone interaction, it does not resist acid extraction (lane 3). The silver stained profile of the immunoprecipitated proteins, as well as other data shown here (mainly the timing of TP accumulation and HSP70.2 acid-solubility) strongly suggest that HSP70.2 can form an acid-resistant complex with TP1 and TP2. In order to confirm this hypothesis, acid extracts from condensing spermatids were immunoprecipitated either with an irrelevant antibody (Ir) or the anti-HSP70.2. Western blots confirmed the existence of a specific acid resistant complex between TP1/TP2 and HSP70.2 in elongating and condensing spermatids.

Discussion

HSP70.2, although sharing important sequence identity with other members of the HSP70 family, shows unique functions in spermatogenic cells. Indeed, the knockout approach revealed the occurrence of specific meiotic defects in male germ cells despite of the presence of another testis-specific member, HSP70t, and the somatic type HSP70 in these cells (Dix *et al.*, 1996). Male germ cells lacking HSP70.2 arrest in prophase of meiosis I and pachytene spermatocytes undergo massive apoptosis (Dix *et al.*, 1996). In these cells, HSP70.2 was shown to be associated with the synaptonemal complex and to play a role in desynapsis (Allen *et al.*, 1996; Dix *et al.*, 1996; Dix *et al.*, 1997). The protein also appears to play a role in the assembly of the Cdc2-cyclin B1 complex during meiosis (Zhu *et al.*, 1997). Although the amount of HSP70.2 in post-meiotic cells is equivalent to that in meiotic cells, no function has been attributed to this chaperone in spermatids. Here we show that a fraction of HSP70.2 becomes soluble in acid only in elongating spermatids. Specific association of HSP70.2 with spermatid basic proteins, including TP1 and TP2, accounts for this selective solubility of HSP70.2 when extracted from elongating and condensing spermatids.

There is a considerable lack of information on the chaperone systems involved in the assembly of spermatid-specific DNA packaging structures. This report provides the first evidence for such an activity and moreover reveals a unique physiological situation where the activity of a chaperone evolves in a differentiation-dependent manner. The detailed analysis of the nuclear distribution of HSP70.2 in spermatids, with respect to histone acetylation, confirms the existence of a specific nuclear sub-acrosomal compartment in elongating spermatids, where transitions in genome reorganizing structures seem to start. Interestingly, Davidson and colleagues had already noticed that H1t2, a new spermatid-specific linker histone, accumulates in a highly polar manner at the apical pole of stage V-VIII spermatids under the acrosome compartment, before its spreading within the nucleus in stage X

spermatids (Martianov *et al.*, 2005). We observe a specific accumulation of HSP70.2 in the same region at approximately the same stage (VIII). Moreover, this particular mobilization of HSP70.2 perfectly correlates with the disappearance of histone acetylation. Like H1t2 (Martianov *et al.*, 2005), HSP70.2 accumulation spreads to various nuclear regions at later stages. Since histone acetylation is thought to be linked to their removal (Caron *et al.*, 2005; Govin *et al.*, 2004), our data on the intranuclear distribution of HSP70.2 strongly suggest that its spreading within the nucleus follows histone removal and the assembly of new spermatid-specific structures. This hypothesis is further supported by the fact that, at these stages, specific acid resistant complexes are formed, containing HSP70.2 and TP1 and TP2.

Based on all these data we propose here that, after the completion of meiosis, HSP70.2 acquires a new function as a chaperone of spermatid-specific DNA packaging proteins, and hence could be considered as the first identified factor controlling the histone to TP transition.

Methods

Detailed methods are available in Supplementary information (*EMBO reports* online).

Germinal cells fractionation

The fraction composed of condensing spermatids (steps 12-16) used for mass spectrometry analysis was obtained as described in (Marushige and Marushige, 1983).

Other spermatogenic cell fractions were obtained using the Bellvé sedimentation method (Bellve, 1993; Pivot-Pajot *et al.*, 2003). Cell fractions were enriched at 80% in each major stages (Spc, spermatocytes; R, round spermatids; RE, mix of round and elongating spermatids; EC, mix of elongating and condensing spermatids).

Acid extraction

Proteins were extracted by direct sonication of spermatogenic cell nuclei in sulphuric acid (0,2 N). The quality of extraction was controlled by SDS-PAGE gel stained by Coomassie.

Immunoprecipitation

25-40 μg of acid soluble proteins were incubated with 1-2 μg of anti HSP70.2 or anti HA (Santa Cruz) antibodies in the appropriate buffer (see Supp. Information). Protein G coupled to dynabeads (Invitrogen) were used following the manufacturer's instructions. Bound proteins were washed, eluted in loading buffer and analysed by SDS-PAGE and silver staining (SilverQuest, Invitrogen), or western blots using standard procedures.

Chromatin fibres extraction

Nuclei of pooled fractions obtained after fractionation were submitted to MNase digestion in the appropriate conditions (see Supp Methods). Nuclei were broken by osmotic shock by re-suspension in H₂O, TSA 300nM and antiprotease cocktail Complete (Roche). MNase released proteins were analysed by SDS-PAGE, using core histones amounts as internal loading control.

Immunofluorescence on germ cells

Nuclei were prepared as described in “Chromatin fibres” section, and fixed on Superfrost slides. Detection details are available in Supp Methods. Confocal images were taken using a CLSM microscope (Zeiss) with slices of 0.7-1 μ m.

Acknowledgements

We are grateful to Drs. Steve Kistler and Minoru Yoshida for the generous gifts of anti-TP1, anti-TP2 and anti-acetylated lysines antibodies, respectively. We wish to thank Sandrine Curtet-Benitski and Isabelle Galvez, for expert technical assistance. S.K. laboratory is supported by grants from the Regulome consortium (ANR-05-BLAN-0396-04) and the CLARA (EpiMed and EpiPro programs).

Supplementary information is available at *EMBO reports* online.

References

Alekseev OM, Widgren EE, Richardson RT, O'Rand MG (2005) Association of NASP with HSP90 in mouse spermatogenic cells: stimulation of ATPase activity and transport of linker histones into nuclei. *J Biol Chem* **280**: 2904-2911

Allen JW, Dix DJ, Collins BW, Merrick BA, He C, Selkirk JK, Poorman-Allen P, Dresser ME, Eddy EM (1996) HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma* **104**: 414-421

Bellve AR (1993) Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol* **225**: 84-113

Caron C, Govin J, Rousseaux S, Khochbin S (2005) How to pack the genome for a safe trip. *Prog Mol Subcell Biol* **38**: 65-89

Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM (1996) Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3264-3268

Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Poorman-Allen P, Mori C, Blizard DR, Brown PR, Goulding EH, Strong BD, Eddy EM (1997) HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* **124**: 4595-4603

Eddy EM (1999) Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod* **4**: 23-30

Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* **271**: 3459-3469

Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S (2000) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**: 950-960

Kimmins S, Sassone-Corsi P (2005) Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* **434**: 583-589

Komatsu Y, Yukutake Y, Yoshida M (2003) Four different clones of mouse anti-acetyllysine monoclonal antibodies having different recognition properties share a common immunoglobulin framework structure. *J Immunol Methods* **272**: 161-175

Lewis JD, Song Y, de Jong ME, Bagha SM, Ausio J (2003) A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* **111**: 473-482

Martianov I, Brancorsini S, Catena R, Gansmuller A, Kotaja N, Parvinen M, Sassone-Corsi P, Davidson I (2005) Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 2808-2813

Marushige Y, Marushige K (1983) Proteolysis of somatic type histones in transforming rat spermatid chromatin. *Biochim Biophys Acta* **761**: 48-57

Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S (2003) Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* **23**: 5354-5365

Polo SE, Almouzni G (2006) Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours. *Curr Opin Genet Dev* **16**: 104-111

Rosario MO, Perkins SL, O'Brien DA, Allen RL, Eddy EM (1992) Identification of the gene for the developmentally expressed 70 kDa heat-shock protein (P70) of mouse spermatogenic cells. *Dev Biol* **150**: 1-11

Zhao M, Shirley CR, Yu YE, Mohapatra B, Zhang Y, Unni E, Deng JM, Arango NA, Terry NH, Weil MM, Russell LD, Behringer RR, Meistrich ML (2001) Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol* **21**: 7243-7255.

Zhu D, Dix DJ, Eddy EM (1997) HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development* **124**: 3007-3014

Legend to Figures

Fig. 1: Presence of acidic proteins in nuclear acid extracts from condensing mouse spermatids

A global identification of proteins present in acid extracts from condensing spermatid nuclei was carried out, and the values of their isoelectric points (IP, supplementary table 1) were plotted along an IP scale. Black arrows indicate IP of chromatin proteins, grey arrows for chaperones; and grey arrowheads for miscellaneous proteins.

Fig. 2: Selective acid solubility of HSP70.2 in elongating/condensing spermatids.

A) Equivalent amounts of total cell extracts from fractionated spermatogenic cells were used to visualize the presence of HSP70.2, TP2 and tubulin (Tub) in cells at different stages. Fractions are as follows: Spc, spermatocytes; R, round spermatids; RE, round and elongating spermatids; EC, elongating and condensing spermatids. Bars indicate non-pooled fractions obtained during the fractionation procedure.

B) Nuclei from the indicated pooled fractions were purified and used for an acid extraction. The presence of HSP70.2 before acid extraction is shown in the input HSP70.2 panel. After acid extraction proteins were recovered and solubilized in an appropriate buffer (material and methods). The presence of HSP70.2, TP2 and acetylated histone H4 was monitored by the indicated antibodies. The coomassie stained gel (acid extracts) shows the histone part of the extracted proteins (Exp.1).

In another independent experiment (Exp. 2), acid extraction was performed in a pooled spermatocyte fraction (Spc) and a pooled elongating/condensing spermatids fraction (EC). The selective solubility of HSP70.2 in pooled spermatids was monitored as above. An immunodetection of HSP70 was also performed in these fractions. As a control, the blot also contained the total nuclear extracts from the EC cells before acid extraction (lane 3).

Fig. 3: Stage-specific redistribution of HSP70.2

A) Stage-specific MNase-dependent release of HSP70.2 from spermatogenic cell nuclei.

Nuclei were prepared from pooled fractions of spermatocytes (Spc) and elongating and condensing spermatids (EC) and submitted to extensive MNase digestion. Material released through the action of the enzyme was visualized after silver staining of a gel. The two indicated bands were cut on another gel and identified by mass spectrometry. Band N°1 contained HSP70.2 and HSP70t and band N°2 contained disulfide isomerase A3 (PDA3).

B) Stage-specific intranuclear redistribution of HSP70.2 during spermiogenesis.

Suspension of spermatogenic cells were used to prepare nuclei which were then subjected to co-immunolocalization of HSP70.2 and acetylated lysines (monoclonal antibody detecting essentially histones in the nucleus). Images were acquired using a confocal microscope. Four representative situations are shown, R, round spermatids; E, elongating spermatids and C, condensing spermatids.

These experiments were performed on purified nuclear suspensions, because the cytoplasmic HSP70.2 signal interfered with a clear detection of nuclear HSP70.2, which was the object of this study. Some of the remaining cytoplasmic HSP70.2 can be observed in the C panel (arrow head). Scale bar represents 2 μ m.

Fig. 4: Stage-specific acid resistant HSP70.2-TP1/TP2 complex formation

A) Acid extracts from pooled fractions containing round spermatids (R) or pooled fractions containing elongating and condensing spermatids (EC), were immunoprecipitated using the anti-HSP70.2 antibody. A fraction of input and immunoprecipitated materials was visualized after silver staining of a gel.

B) Acid extracts from elongating and condensing spermatids (EC), as shown in A, were immunoprecipitated with equivalent amounts of an irrelevant antibody (Ir, anti-HA) or an

anti-HSP70.2. The presence of HSP70.2, TP1 and TP2 was monitored by a western blot on the immunoprecipitated materials.

Supplementary information

Supplementary Table 1. Acid soluble proteins identified from elongating/condensing spermatids.

Acid soluble proteins from elongating/condensing proteins were extracted in sulfuric acid at 0.2N, and identified by mass spectrometry. A complete list of the identified proteins, including accession numbers, isoelectric points (see Figure 1), molecular weights and identified peptides is presented.

Supplementary methods

Antibodies

The HSP70.2 antibody has been previously described (Rosario *et al.*, 1992) and used at 1/2000 in western blot and 1/100 in immunofluorescence. The TP1 and TP2 antibodies have been used as described in (Zhao *et al.*, 2001). Mouse monoclonal anti acetylated lysine antibody was used at 1/250 in immunofluorescence (Komatsu *et al.*, 2003). Anti tubulin (Sigma #T5168) was used at 1/1000 in western blots.

Acid extraction

Proteins were extracted by direct sonication of spermatogenic cells in sulphuric acid (0,2 N). After 30 min on ice, acid soluble proteins were recovered by centrifugation at 20,000 g for 15 min at 4°C followed by trichloroacetic acid precipitation (at 20% final). Precipitated proteins were washed in acetone HCl 0.05% and then in acetone, and resolubilized in H₂O, TSA 300nM and antiprotease cocktail Complete (Roche). The quality of extraction was controlled by SDS-PAGE gel stained with Coomassie.

Immunoprecipitation

Immunoprecipitations were performed in Tris 25 mM pH 7.4, NP-40 0.5%, Sodium Deoxycholate 0.12%, KCl 150 mM, DTT 1mM, TSA 300 nM, antiprotease cocktail

Complete (Roche). 25-40 μg of acid soluble proteins were incubated with 1-2 μg of anti HSP70.2 or anti HA (Santa Cruz) antibodies for 2 h at 4°C under rotation. Protein G coupled to dynabeads (Invitrogen) were added following manufacturer's instructions, for 45 min at 4°C under rotation. Beads were washed 3 times in incubation buffer, and bound proteins were eluted in loading buffer. The SDS-PAGE analysis was followed by silver staining (SilverQuest, Invitrogen), or western blots using standard procedures.

Chromatin fibres extraction

Pooled fractions obtained after germinal cells fractionation were resuspended in a lysis buffer (Tris-HCl pH 7.4 15 mM, TritonX-100 0.03%, NaCl 15 mM, KCl 60 mM, sucrose 12%, EDTA 2 mM, EGTA 0.5 mM, spermidine 0.65 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, antiprotease cocktail Complete (Roche)) to obtain nuclei. Nuclei were pelleted at 200g for 10 min at 4°C and resuspended in a nuclei buffer (lysis buffer without Triton, EGTA and EDTA). The quality of nuclei was controlled under a phase-contrast microscope. The nuclei were preincubated for 5 min at 37°C, and 1-5 U of micrococcal nuclease S7 (Roche) was added for 1 million of nuclei. Digestion was allowed for 20 min at 37°C, and blocked by EDTA 0.1mM final. The nuclei were immediately put on ice for 5 min, and then pelleted. They were then broken by osmotic shock in H₂O, TSA 300nM and antiprotease cocktail Complete (Roche), and incubated in this buffer for 30 min on ice. The MNase released proteins were analysed by SDS-PAGE, using core histones as an internal loading control.

Immunofluorescence on germ cells

Nuclei were prepared as described in the "Chromatin fibres" section, except that nuclei were resuspended in the nuclei buffer supplemented with sucrose 66mM. They were laid on Superfrost slides previously soaked in a fixative solution (PFA 5% pH 8, Triton 0.05%). Fixation was allowed for 1 hour at room temperature in the dark, and then during 30 min

under half light. Slides were washed in PBS and immediately used for immunofluorescent detection.

Permeabilization of cells was allowed in saponine 0.5%, Triton 0.25%, PBS1x for 15 min at room temperature. Non-specific binding was blocked with dry milk 5%, Tween20 0.2%, PBS 1x for 30 min at room temperature. Primary antibodies were diluted in dry milk 1%, Tween20 0.2%, PBS1x (dilutions are indicated in the Antibodies section). Incubations were performed overnight at 4°C in a humidified chamber. Slides were then washed 3 times 5 min in the antibodies dilution buffer. Secondary antibodies (anti-rabbit crosslinked to Alexa488 and/or anti-mouse crosslinked to Alexa546 provided by Invitrogen) were diluted at 1/500 in the same buffer as the primary antibodies, and incubated for 30 min at 37°C. Washes were performed as for primary antibodies. The DNA was counterstained with DAPI and slides mounted in DakoMount media (Dako). Confocal images were acquired using a CLSM microscope (Zeiss) with slices of 0.7-1 μ m.

Protein identification by mass spectrometry

After separation by SDS-PAGE, discrete bands were excised from the Coomassie blue-stained gel. The in-gel digestion was carried out and gel pieces were then sequentially extracted with 5% [v/v] formic acid solution, acetonitrile 50%, formic acid 5% [v/v] and acetonitrile.

For MALDI-TOF-MS analyses, a 0.5 μ L aliquot of peptide mixture was mixed with 0.5 μ L matrix solution (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid at half saturation in 60% acetonitrile / 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (v/v)). The resulting solution was automatically spotted on the target plate. After drying, the sample was rinsed with 2 μ L of 0.1% TFA.

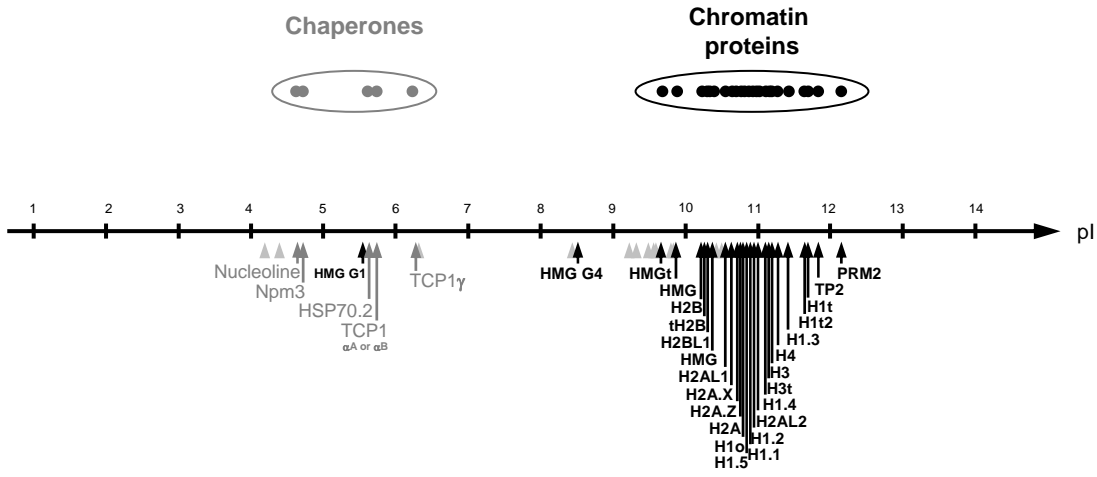
Peptides mixtures were then analysed with a MALDI-ToF mass spectrometer (Autoflex, Bruker Daltonik, Germany) in reflector/delayed extraction mode over a mass range of 0 - 4200 Da. For each sample, the spectrum acquisition was performed after an external

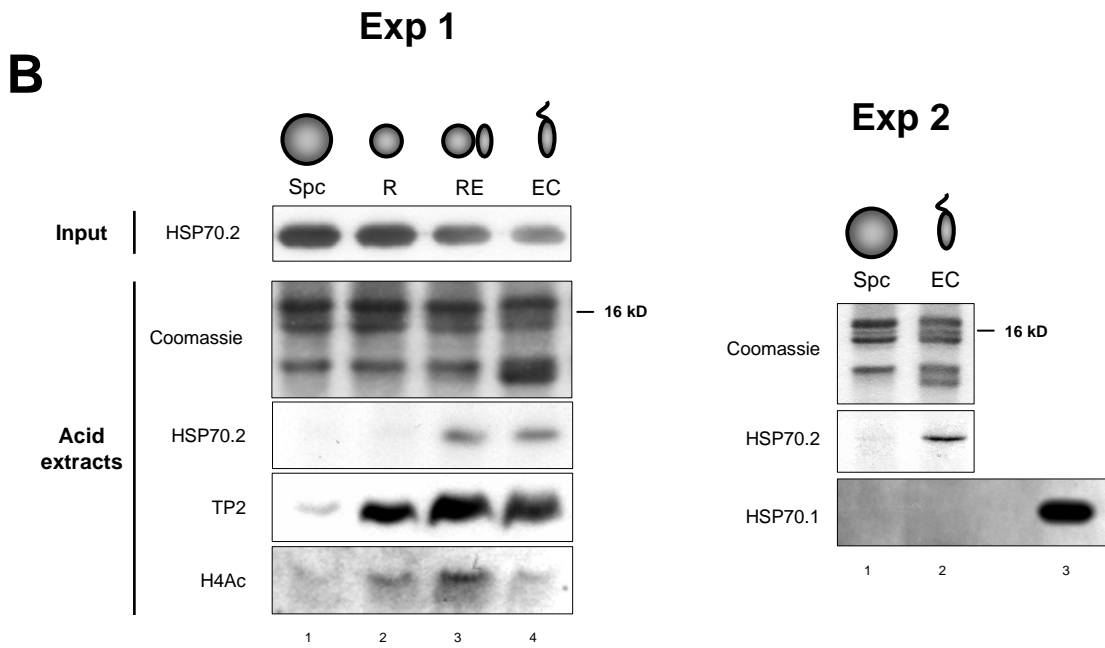
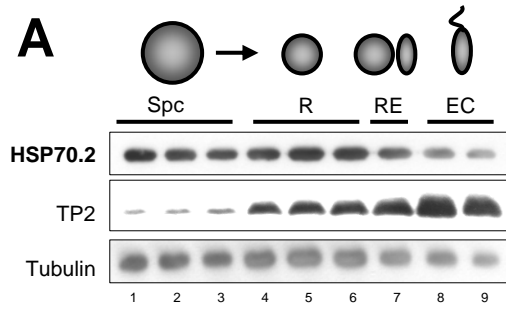
calibration using a mixture of four synthetic peptides (Angiotensin II, m/z 1046.54 Da; Substance P, m/z 1347.74 Da; Bombesin, m/z 1619.82 Da and ACTH clip18-39, m/z 2465.20 Da). Spectra displaying the best peak intensities and resolutions were automatically saved and subsequently annotated (XMass software, Bruker Daltonik). All peptide masses were assumed to be monoisotopic and $[M+H]^+$ (protonated molecular ions). For Mascot database searching the maximum number of missed cleavages was set to 1 and the mass tolerance was limited to ± 100 ppm. In most cases, proteins showing a score higher than 70 and an average coverage of 20% were automatically validated. When proteins exhibited scores lower than 70 and coverage lower than 20%, a manual inspection of the data was needed: if no or unclear identification is obtained after a MALDI-ToF analysis, the sample was submitted to a nano-LC-MS/MS analysis.

For LC-MS/MS analyses, after drying, tryptic peptides were resuspended in 0.5% aqueous trifluoroacetic acid. The samples were injected into a CapLC (Waters) nanoLC system and first pre-concentrated on a 300 μ m X 5 mm PepMap C18 precolumn. The peptides were then eluted onto a C18 column (75 μ m X 150mm). The chromatographic separation used a gradient from solution A (2% acetonitrile: 98% water: 0.1% formic acid) to solution B (80% acetonitrile: 20% water: 0.08% formic acid) over 35 or 60 min at a flow rate of 200 nL/min. The LC system was directly coupled to a QTOF Ultima mass spectrometer (Waters). MS and MS/MS data were acquired and processed automatically using MassLynx 4.0 software. Mascot was used for database searching and proteins, which were identified with at least 2 peptides showing both a score higher than 40, were validated without any manual validation. For proteins identified by only 1 peptide having a score higher than 40, the peptide sequence was checked manually. Peptides, with scores higher than 20 and lower than 40, were systematically checked and/or interpreted manually to confirm or cancel the MASCOT suggestion.

For both MALDI and LC-MS/MS data, database searching was carried out using the MASCOT 2.0 program available intranet. Two databases were used: a home-made list of well-known contaminants (keratins and trypsin) and an updated compilation of SwissProt and Trembl databases (ftp://us.expasy.org/databases/sp_tr_nrdb/) specifying Mus as the species. For searching the Mus database the variable modifications allowed were: acetyl lysine, N-ter acetylation, dimethyl lysine, methyl lysine, protein N-acetylation, methionine oxidation, serine and threonine phosphorylation, methionine sulphone and cysteic acid.

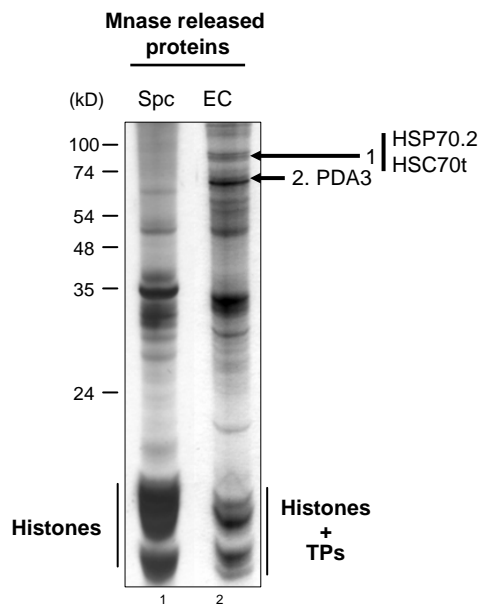
Govin et al., Fig.1



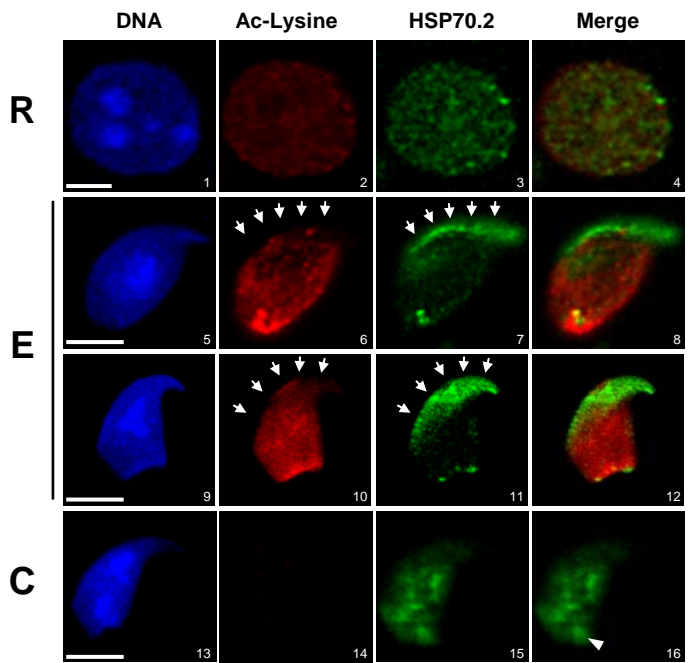


Govin et al., Fig.3

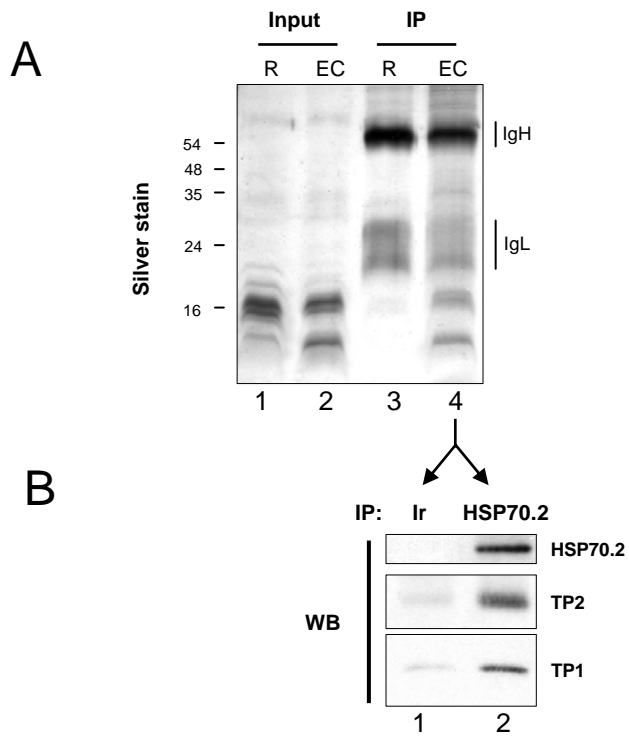
A



B



Govin et al., Fig.4



Supp Table 1. Acid soluble proteins identified from elongating/condensing spermatids

Family	Description	ID	MW (kDa)	pI	Identified Peptides	
Chromatin	Core histone					
	H2A.1	P22752	14	10.9	AGLOFPVGR, HLQLAIR, VTIAGGGVLPNIOAVLLPK	
	H2A.X	P22661	15	10.7	LLGGVTIAGGGVLPNIOAVLLPK	
	H2A.Z	P17317	14	10.6	GBEELDSLK, ATIAGGGVPHHK	
	H2A.L1	NF_003864	12	10.5	GELPFLVDR, LVVONNEQLR	
	H2A.L2	Q9CO70	13	11.0	AELQFPVSR	
	H2B	P10853	14	10.3	AMGIMNSFVNDIFER, DAVTYTEHAK, LLLPGLAK, KESYSVYYVK, KESYSVYYVYKQVHPDGTSSKAMGIMNSFVNDIFER	
	H2B.1	P70696	14	10.3	LLPGLAK, ESYVYYVK, KESYSVYYVK, AMGIMNSFVNDIFER	
	H2B.L1	Q9D9Z7	14	10.3	KLATLVTFGSK	
	H3	AAAT0051	15	11.1	YRPGYVALR, EIAQDFKIDLR	
	H3.1	NF_003464	15	11.1	KQLATKVAR	
	H4	Q9D0C9	11	11.2	ISGLYEETR, DAVTYTEHAK, DNIQGITKPAIR	
	Linker histone	H1.1	P43275	22	10.9	KYPAGPSVSELVQAVSSK, SLAAGGYDVEK, SGVSLAALKSLAAGGYDVEKNNSR, SLVNGKTLVQTK, SETAPVAGAASTATEKPAAPAK
		H1.2	P11864	21	11.0	SEAPAPAAPAPPAEK, JSGPPVSELTIK, KASGPPVSELTIK, ALAAGGYDVEK
		H1.3	P43277	22	11.3	SETAPAPAAPAPPAEK, KASGPPVSELTIK
		H1.4	P43274	52	11.1	TSGPPVSELTIK, SETAPAPAAPAPPAEK
		H1.5	P43276	22	10.9	SETAPAPAAPAPPAEK
		H1*	P10922	21	10.9	YSDMIVAIDQEK
		H1.1	Q07133	22	11.7	LPEALSTSOER, LIPEALSTSOERAGIMSLAALK, GTGASGFRLSK, SETAPAAASSTLYPAPYERPKSK, ALAAGGYDVEK, LIPEALSTSOERAGIMSLAALKALAAAGGYDVEK
		H1.2	Q8CJH4	44	11.7	ELGNAQTEYR
Testis specific non histone protein		TP2	P11378	13	11.8	HPKPSVSR
		Pm2	P07978	14	12.1	SPSEGHQPGQDHEREEQGGQLSPER
		High mobility group protein	P63158	25	5.6	TVYIPKGETK
			F30651	24 or 21 or 21	7 or 9.9 or 6.9	KIPDSSVNFAPFEFSK, LGEIMWSEDSAK, KLGEIMWSEDSAK, YEKIDIAAYR, KKLGEIMWSEDSAK, SKFEDLAK, IEHPQLSIGDTAK, LGEIMWSEDSAK
	High mobility group protein 2	Q54879	23	8.5	STNPGISGDVAK	
		Q324L8	12	10.4	KQPPVSPGTALVGSQK	
	High mobility group protein 4	P40630	28	9.7	KPMSSYLIR, SANVYSESFQEAQKDSAQGK, EULLGKPK, KOAYIQAK, SWEEQMAEYGR	
		Q8DAR4	22	9.9	KPPSSFELFSR	
	Chaperones	Nucleolin	P09405	77	4.7	VEGSEPTPRNLFIGNLNPVK, SEADAENLEEK
		Nucleoplasm 3	Q9C9P0	19	4.7	AAGAAALAFNQESR
HSP70.2 (testis specific HSP70)		P17156	70	5.6	TTPSYVAFDTER, DAGTITGLNVLININEPTAAAYGLDK	
		P11984	60	5.76 or 5.82	MEGPLSVFGDR	
T-complex protein 1, alpha subunit A or B		P80318	61	6.3	TAVETAVALLR	
T-complex protein 1, gamma subunit		P35700	0			
Peroxisexin 1 ou 4		P00342	22 or 31	8.26 or 6.67	QITINDLPVGR	
L-lactate dehydrogenase C chain, testis subunit			36	8.4	GLADELALVDAQTNK	
Elongation factor 1-beta		O70251	25	4.5	TPAGQLVNDYLAQK	
		Q9D8N0	50	6.3	AAGLTYTPENWIR, STFVLDKFR	
	P10126	50	9.1	STTGHLYIK, YYVTIDAPGHR, EHALLATYLGVK, LPLODYVK		
Miscellaneous	ELAV-like protein 1 (RNA binding protein)	P70372	36	9.2	AMGIMNSFVNDIFER	
	Peptidyl-prolyl isomerase B	P24369	23	9.5	TVDNRYALATGEK, DTNGSOFHTTYK	
	Proline rich protein 6	Q9CXS4	27	9.9	LLDTEYVGLVK	
	Proteasome subunit alpha type 7 or type 7-like	Q9CWR6	28	8.81 or 8.59	ALLEWQSGGK	
	Hypothetical lysine-rich protein	Q9CIR9	9	10.4	THYLTDQVFPSTSAKPK	
	Hypothetical lysine-rich protein	Q9DA62	13	10.5	GKELFGHYHR, THNLTDQVFPSTSAKPK	
	Fau1 protein (ubiquitin domain)	Q920W8	15	9.9	FVNVVPTFGK	
	Calmodulin	Q9D6G4	17	4.1	MADQLTEQAEKFAFLDKDGDGTTTK	
	Cytochrome c	P62897	11	9.6	TGPNLHGLFSR, TQAAAGFYTDANK	
	p15 (RNA polymerase II transcriptional coactivator)	P11031	14	9.6	EQSIDDDAVR	

II.3. Caractérisation de deux chaperons d'histones spécifiques du testicule

II.3.1. Identification de nouveaux chaperons d'histones

Le chaperon d'histone Npm3 a été identifié au cours du travail détaillé dans la partie Résultats II.2. Une dernière stratégie a été développée, afin d'identifier d'autres protéines impliquées dans l'enlèvement des histones et leur remplacement par les protéines de transition et les protamines. Ainsi, la protéine de transition TP1 recombinante a été couplée à une résine. Une colonne d'affinité pour la BSA a servi de contrôle de spécificité. Des extraits ont été préparés à partir d'un mélange de spermatides rondes et allongées. L'ensemble des protéines liant spécifiquement la colonne d'affinité pour TP1 a été identifié par spectrométrie de masse (voir Table II.3).

Comme attendu, cette approche a identifié plusieurs protéines chaperons présentes dans les stades terminaux de la spermatogénèse. HSP70.2 et la protéine disulfide isomérase 3 (PDA3), décrites comme associées à la chromatine dans les spermatides allongées (voir Résultats II.2), ont été à nouveau identifiées lors de ce crible. De plus, deux protéines chaperons classiques d'histones, tNASP et NAP1L4 ont été identifiées.

NAP1L4 fait partie de la famille NAP (*Nucleosome Assembly Protein*) (voir Introduction II.5.1). Les NAP chaperonnent principalement les dimères H2A-H2B, et permettent leur incorporation à la chromatine. De plus, la protéine NAP1 de levure (yNAP1) peut chaperonner des variants d'histone (Mizuguchi *et coll.*, 2004), et échanger des dimères H2A-H2B par des dimères H2A.Z-H2B (Park *et coll.*, 2005). Enfin, yNAP1 est capable de favoriser le déplacement des histones le long de la fibre de chromatine (Park *et coll.*, 2005). L'ensemble des propriétés de yNAP1 nous a amené à considérer NAP1L4 comme une protéine clé du remodelage post méiotique de la chromatine.

tNASP est un chaperon d'histone de liaison, qui importe les histones de liaison au sein du noyau et les dépose dans la chromatine dans le cadre de la spermatogénèse (Richardson *et coll.*, 2000 ; Alekseev *et coll.*, 2005). tNASP interviendrait notamment dans l'incorporation d'H1t (Alekseev *et coll.*, 2005).

Figure II.3 Protéines éluées de la colonne d'affinité TP1

Family	Description	ID	MW (kDa)	pI
Chromatin	Histone H2A	Q8BFU2	14	10,87
	Histone H2B	P10853	14	10,32
	Histone H4	Q9D0C9	11	11,18
Chaperones	Chromatin			
	Nucleosome assembly protein 1-like 4	O88701	43	4,56
	INASP	Q99MD9	84	4,35
	Generalist			
	HSP70	Q61696	70	5,53
HSP70.2 (testis specific HSP70)	P17156	70	5,58	
T-complex protein 1, alpha subunit A or B	P11984 or P11983	60	5,76 or 5,82	
RNA	Topology			
	ATP-dependent RNA helicase A DHX9	O70133	149	6,39
	ATP-dependent RNA helicase DDX5/p68	Q61656	69	9,06
	Binding (RRM motif)			
	hnRNP L	Q8R081	60	6,65
	hnRNP U	Q8C290	88	5,92
	Paraspeckle protein 1	Q8R326	59	6,26
	Pigpen	P56959	52	9,40
	Cold-inducible RNA-binding protein	P60824	19	9,61
	Gene expression	Transcription level		
Myelin gene expression factor		Q8QZZ1	63	8,96
TAF15 RNA polymerase II		Q8BQ46	59	8,51
Translation repression				
MSY4		Q80WG4	39	9,68
Y-box protein MSY2		Q9Z2C8	38	11,00
Matrin 3 (RNA retention and nuclear matrix associated)	Q8K310	95	5,87	
Metabolism	Energy production			
	Dihydroipoamide S-acetyl transferase (AcCoA synthesis)	Q91ZB1	59	5,71
	ATP synthase alpha chain	Q03265	60	9,22
	Redox			
	Protein disulfide isomerase A3 / ERp60	P27773	57	5,99
	Lipid			
	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	Q91XR9	29	10,16
	Phospholipide hydroperoxide glutathione	O70325	22	8,74
	Miscellaneous			
	D-dopachrome decarboxylase	O35215	13	6,15
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta2-like 1	P68040	35	7,57	
Miscellaneous	Cytoskeleton			
	Tubulin alpha-3/alpha-7 chain	P05214	50	4,97
	Tubulin alpha-8 chain	Q9JJZ2	50	4,97
	Tubulin beta 2	Q9DCR1	34	4,78
	Cofilin 1 (actin binding)	P18760	19	8,26
	Ribosomal protein			
	40S ribosomal protein S18	P62270	18	11,00
	60S ribosomal protein L12	P35979	18	9,48
	Ribosomal protein, large P2	Q7TNQ6	12	4,49
	Miscellaneous			
	Nardilysin (protease)	Q8BHG1	133	4,77
	Fau protein (ubiquitin domain)	Q920W8	15	9,94
	Hemoglobin beta-1	P02088	16	7,26
	Keratin 2 (mouse)	Q9D2K8	66	8,20

Les histones H2A, H2B et H3 ont également été identifiées lors de cette approche. Leur présence suggère l'existence de voies de restructuration impliquant un dialogue entre TP1, les chaperons d'histones et les histones elles-mêmes.

Ainsi, l'ensemble de nos approches protéomiques a identifié trois chaperons d'histones (Npm3, NAP1L4 et tNASP). Une étude fonctionnelle plus approfondie a été réalisée sur les chaperons Npm3 et NAP1L4.

II.3.2. Caractérisation fonctionnelle de Npm3

Trois isoformes de nucléoplasmines existent et sont appelées Npm1, Npm2 et Npm3. Npm2 est responsable du stockage des dimères H2A-H2B dans le cytoplasme des ovocytes, avant leur incorporation au pronoyau mâle (voir Introduction II.5.1). Npm1 est enrichie au sein des nucléoles, et serait impliquée dans la maturation des ribosomes, mais elle serait également impliquée dans la duplication des centromères et pourrait chaperonner des histones. Le rôle de Npm3 est encore mal connu.

Pour la première fois, l'abondance des ARNm des trois isoformes a été quantifiée conjointement par RT-qPCR sur une sélection de quinze tissus murins (embryon de 7, 11, 15 et 17 jours, cerveau, œil, cœur, rein, foie, poumon, glandes submaxillaires, muscle lisse, rate, testicule et utérus). Les trois isoformes Npm1, Npm2 et Npm3 ont un taux d'ARNm globalement élevé au cours du développement embryonnaire, malgré une valeur plus faible de Npm1 et 2 au quinzième jour de développement. Par contre, les taux d'ARNm des trois isoformes sont différents suivant le tissu adulte considéré. L'ARNm de Npm1 est très représenté, aussi bien dans les muscles lisses que dans la rate. Les ARNm de Npm2 sont surexprimés dans le testicule, et Npm3 est surexprimée dans le testicule, l'utérus et le cœur dans une moindre mesure. On peut noter dans plusieurs tissus une certaine corrélation entre les taux de Npm1 et Npm3 (embryon 11 et 17 jours, muscle lisse, etc). Npm1 et Npm3 sont en effet les deux isoformes de Npm les plus proches et pourraient partager certaines fonctions (Eirin-Lopez *et coll.*, 2006).

Un anticorps a été développé afin de confirmer ces résultats à un niveau protéique, et entreprendre l'étude fonctionnelle de la protéine endogène au cours de la spermatogénèse. Une immunisation contre de la protéine fusion GST-Npm3 a été réalisée. Le sérum a ensuite été déplété des anticorps reconnaissant la GST et les anticorps spécifiques de Npm3 ont été purifiés et

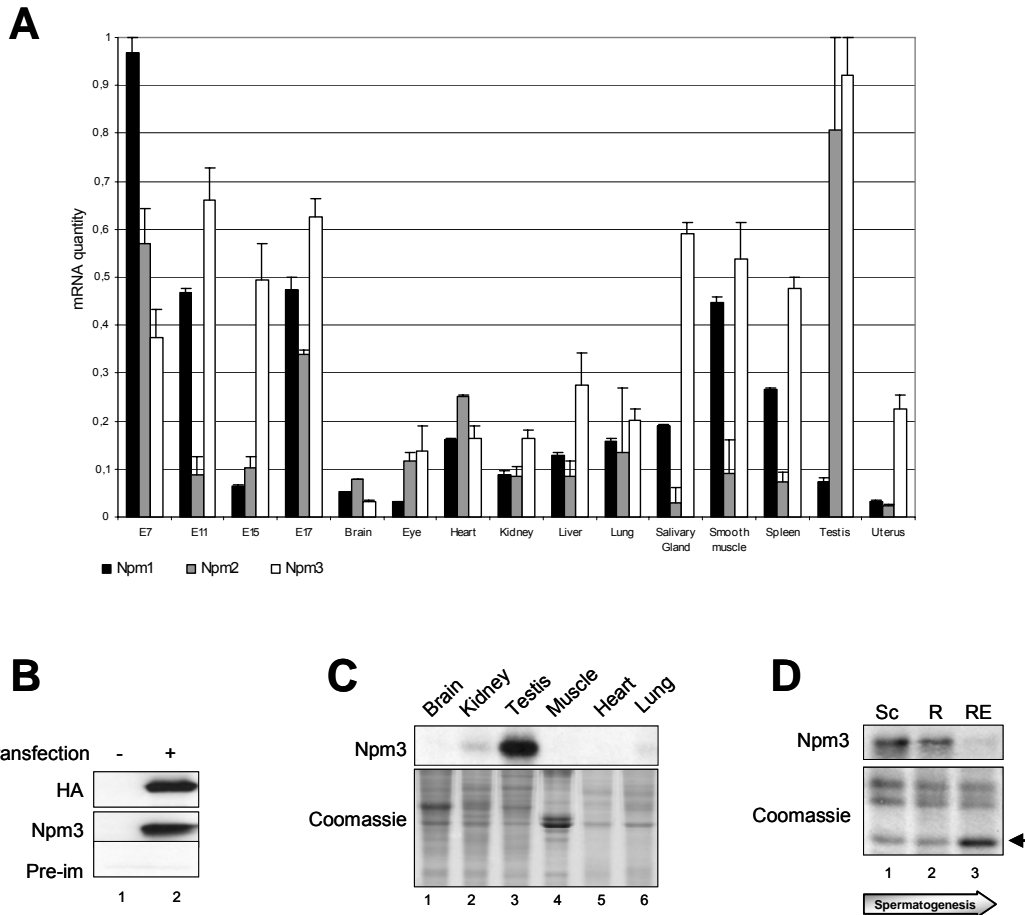


Figure II.3.2 **Caractérisation fonctionnelle de Npm3**

(A) **Profil d'expression des ARNm des nucléoplasmines murines.** L'abondance des ARNm de Npm1, Npm2 et Npm3 a été évaluée dans quinze tissus murins (embryon de 7, 11, 15 et 17 jours, cerveau, œil, cœur, rein, foie, poumon, glande salivaire, muscle lisse, rate, testicule, utérus). La quantité d'ARNm a été normalisée par rapport au snRNA U6. L'abondance est exprimée en unité arbitraire, 1 correspondant au taux maximal détecté (embryon 7 jours pour Npm1, testicule pour Npm2 et Npm3).

(B) **Validation de l'anticorps développé.** L'anticorps (Ac Npm3) reconnaît HA-Npm3 transfecté transitoirement dans des cellules somatiques, alors que le sérum préimmun (Pre-im.) ne reconnaît rien. La spécificité de la réaction (masse moléculaire, intensité d'expression) est contrôlée par une détection de l'étiquette HA

(C) **Npm3 est enrichi dans les testicules.** La protéine Npm3 a été détectée sur une sélection de tissus murins (cerveau, rein, testicule, muscle, cœur, poumon), et est très enrichie dans le testicule. Un gel coloré au Coomassie atteste l'égalité des charges.

(D) **Profil d'expression de Npm3 au cours de la spermatogénèse.** Npm3 a été détecté par western blot dans des extraits réalisés à partir de fractions enrichies en spermatocytes (Sc), spermatoïdes ronds (R), et un mix de spermatoïdes ronds et allongés (RE). Une coloration Coomassie atteste l'égalité des charges. Seules les histones sont présentées, et l'accumulation de TP1 au niveau d'H4 atteste la qualité du fractionnement cellulaire (flèche).

caractérisés. Ils reconnaissent spécifiquement Npm3 transfectée dans des cellules somatiques, aussi bien en western blot (Figure II.3.2 B) qu'en immunofluorescence (données non montrées).

L'abondance de Npm3 endogène a été analysée sur une sélection de tissus murins adultes (cerveau, rein, testicule, muscle squelettique, cœur, poumon). Ainsi, nous mettons en évidence que l'ARNm de Npm3 et la protéine endogène sont enrichis dans le testicule. Des expériences sont actuellement en cours afin de diversifier les tissus utilisés en western blot, et de comparer le profil d'expression de Npm3 à celui de Npm1.

Le profil d'expression de Npm3 a été également caractérisé au cours de la spermatogénèse (Figure II.3.2 D). Cette protéine est présente au cours de la méiose et au début des stades post méiotiques, mais son taux décroît rapidement dans les phases tardives de la spermatogénèse. Ainsi, le rôle fonctionnel de Npm3 serait restreint à la méiose, excluant une implication massive de Npm3 dans le remodelage post méiotique de la chromatine.

II.3.3. Caractérisation fonctionnelle de NAP1L4

NAP1L4 a été étudiée en suivant la même approche que Npm3. La famille NAP contient cinq gènes chez les mammifères. L'expression de quatre des cinq gènes a été étudiée par RT-qPCR (Figure II.3.3 A). L'ARNm de NAP1L5 n'a pas pu être quantifié, car aucun primer testé n'a validé les critères de qPCR.

Nous confirmons que NAP1L2 est enrichi dans le cerveau (Rogner *et coll.*, 2000). NAP1L2 a été identifié comme jouant un rôle essentiel dans la neurulation et la régulation de la prolifération des cellules neuronales. L'invalidation de son gène conduit à la mort des embryons au milieu du développement (Rogner *et coll.*, 2000). Le faible taux de NAP1L2 au cours de l'embryogenèse s'explique vraisemblablement par le fait que les ARNm proviennent d'embryons entiers.

NAP1L4 est la NAP majoritairement exprimée dans le testicule, mais est également exprimée dans le cœur, la rate et le poumon. Enfin, les taux d'expression de NAP1L1 et NAP1L4 semblent corrélés, ainsi que ceux de NAP1L2 et NAP1L3. Ceci suggère des voies de régulation communes aux ARN de NAP1L1/4 et NAP1L2/3. Il serait intéressant de confirmer ce résultat à un niveau protéique, et de compléter ces données par l'étude phylogénétique de la famille des NAP.

Un anticorps anti NAP1L4 a été développé afin de préciser le rôle de cette protéine au cours de la spermatogénèse. Le sérum a été purifié de la même manière que celui anti-Npm3. L'anticorps

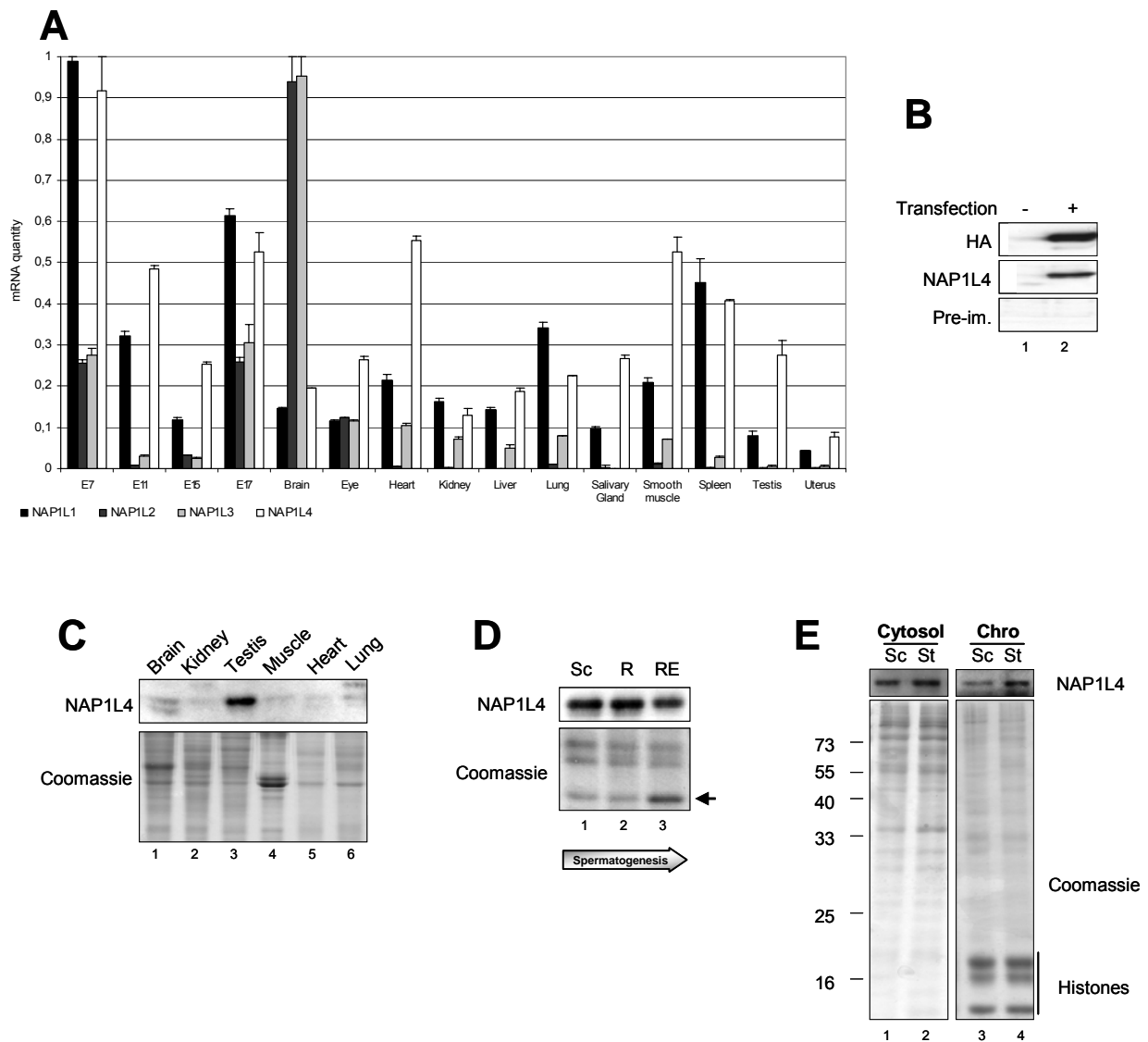


Figure II.3.3 Caractérisation fonctionnelle de NAP1L4

(A) **Profil d'expression des ARNm des NAP murins.** L'abondance des ARNm de NAP1L1, NAP1L2, NAP1L3 et NAP1L4 a été évaluée dans quinze tissus murins (embryon de 7, 11, 15 et 17 jours, cerveau, œil, cœur, rein, foie, poumon, glande salivaire, muscle lisse, rate, testicule, utérus). La quantité d'ARNm a été normalisée par rapport au snRNA U6. L'abondance est exprimée en unité arbitraire, 1 correspondant au taux maximal détecté (embryon 7 jours pour NAP1L1 et NAP1L4, cerveau pour NAP1L2 et NAP1L3).

(B) **Validation de l'anticorps développé.** L'anticorps (Ac NAP1L4) reconnaît HA-NAP1L4 transfecté transitoirement dans des cellules somatiques, alors que le sérum pré-immun (Pre-im.) ne reconnaît rien. La spécificité de la réaction (masse moléculaire, intensité d'expression) est contrôlée par une détection de l'étiquette HA.

(C) **NAP1L4 est enrichi dans les testicules.** La protéine NAP1L4 a été détectée sur une sélection de tissus murins (cerveau, rein, testicule, muscle, cœur, poumon), et apparaît très enrichie dans le testicule. Un gel coloré au Coomassie atteste l'égalité des charges.

(D) **Profil d'expression de NAP1L4 au cours de la spermatogénèse.** NAP1L4 a été détecté par western blot dans des extraits réalisés à partir de fractions enrichies en spermatocytes (Sc), spermatides rondes (R), et un mix de spermatides rondes et allongées (RE). Une coloration Coomassie atteste l'égalité des charges. Seules les histones sont présentées, et l'accumulation de TP1 au niveau d'H4 atteste la qualité du fractionnement cellulaire (flèche).

(E) **Distribution sub-cellulaire de NAP1L4.** La répartition de NAP1L4 a été évaluée dans des extraits protéiques cytosolubles (Sol) et chromatiniens (Chro), réalisés à partir de spermatocytes (Sc) et d'un mix de spermatides (St). Des gels colorés au Coomassie attestent l'égalité des charges et le fractionnement biochimique.

purifié reconnaît spécifiquement NAP1L4 transfectée dans des cellules somatiques, aussi bien par western blot (Figure II.3.3 B) que par immunofluorescence (données non montrées).

L'abondance de NAP1L4 endogène a été analysée sur une sélection de tissus murins adultes (cerveau, rein, testicule, muscle squelettique, cœur, poumon). NAP1L4 est enrichie dans le testicule, tant au niveau de son ARNm qu'à un niveau protéique. Des expériences sont actuellement en cours afin de diversifier les tissus utilisés en western blot.

Le profil d'expression de NAP1L4 a ensuite été caractérisé au cours de la spermatogénèse (Figure II.3.3 D). NAP1L4 est présente au cours de la méiose, et de la majeure partie de la spermiogénèse. Elle est notamment présente de manière plus tardive que Npm3, laissant supposer un rôle dans la mise en place de la structure finale de la chromatine.

Plusieurs travaux décrivent que la localisation cellulaire de NAP est dépendante de la phase du cycle. NAP1L4 est notamment présente dans le cytoplasme en phase G0/G1, et dans le noyau en phase S (Rodriguez *et coll.*, 1997). Seules les spermatogonies se divisent par mitose, et la distribution sub-cellulaire de NAP1L4 a été étudiée dans les spermatides. Bien que l'anticorps anti NAP1L4 reconnaisse parfaitement par immunofluorescence la protéine surexprimée dans des cellules somatiques, la protéine endogène n'a jamais pu être détectée *in situ*. Un fractionnement biochimique entre protéines cytosolubles et nucléaires a permis d'étudier sa distribution subcellulaire. NAP1L4 est présente dans les deux fractions tout au long de la spermatogénèse, et semble enrichie dans la fraction nucléaire des spermatides en cours d'allongement. Ainsi, NAP1L4 serait recrutée au sein de la chromatine lors de la réorganisation post méiotique de la chromatine.

II.3.4. NAP1L4 chaperonne H2AL2

Nous avons alors cherché à préciser le rôle fonctionnel de NAP1L4 en purifiant le complexe associé. La quantité d'extrait nécessaire à la purification du complexe nous a amené à travailler avec les cellules testiculaires totales. Plusieurs partenaires spécifiques de NAP1L4 ont été identifiés par spectrométrie de masse (voir Figure II.3.3 F). NAP1L4 interagit avec la protéine chaperon GRP75. GRP75 fait partie de la famille des protéines similaires à HSP70, et est associée à de nombreuses fonctions cellulaires (pour revue Wadhwa *et coll.*, 2002). GRP75 est notamment retrouvée au sein du réticulum endoplasmique, où NAP1L4 pourrait prendre en charge certaines protéines néosynthétisées.

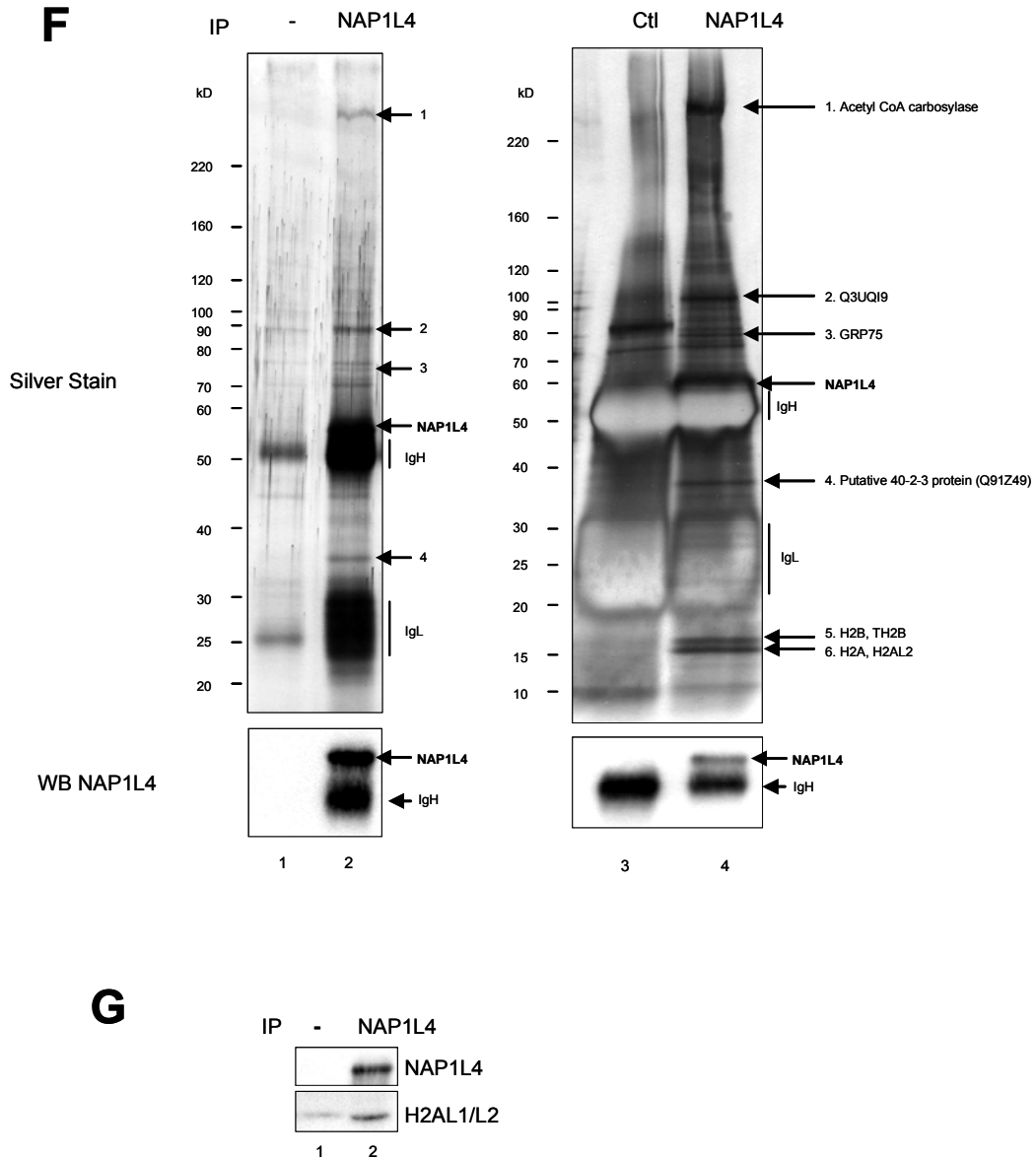


Figure II.3.3 (F) et (G) **Purification des complexes NAP1L4**

(F) **Identification des complexes NAP1L4.** Le complexe NAP1L4 a été purifié à partir d'extraits cytosolubles de testicule entier. Deux purifications sont présentées (gel SDS PAGE coloré à l'argent). Les partenaires spécifiques ont été identifiés par spectrométrie de masse. La détection de NAP1L4 par western blot valide la spécificité des purifications. « - », pas d'anticorps ; Ctl, anticorps contrôle isotypique (lapin).

(G) **NAP1L4 chaperonne H2AL2.** Le complexe NAP1L4 a été purifié dans des spermatides condensées de type 12-16. NAP1L4 interagit spécifiquement avec le variant d'histone H2AL2.

De plus, les histones H2B, TH2B, H2A et le variant d'histone H2AL2 copurifient avec NAP1L4. Il est très surprenant d'avoir identifié H2AL2 lors de ce crible, car les purifications ont été réalisées à partir de testicule entier, et le profil d'expression d'H2AL2 est restreint aux derniers stades de la spermatogénèse (voir Résultats I.1). L'interaction entre NAP1L4 et H2AL2 a été confirmée dans des spermatides allongées de type 12-16 (Figure II.3.3 G).

Ainsi, NAP1L4 pourrait prendre en charge les histones canoniques et leurs variants lors de leur syntèse, les transporter dans le noyau et participer à leur incorporation à la chromatine. NAP1L4 chaperonne notamment H2AL2, et pourrait le cibler au niveau de régions particulières, dans les dernières étapes de réorganisation de la chromatine (voir Résultats I.1).

II.3.5. Npm3 et NAP1L4 lient spécifiquement la zone 22-29 d'H3

Nous nous sommes alors demandé si NAP1L4 et Npm3 présentaient une affinité différentielle pour les histones de cœur et leurs queues N terminales. En effet, ces queues N terminales sont le site de nombreuses modifications post traductionnelles, qui pourraient moduler l'action des chaperons d'histones. Des peptides correspondant aux queues N terminales des quatre histones de cœur ont été attachés à des billes, et utilisé pour des expériences de pull down (voir Figure II.3.5 A). NAP1L4 se lie spécifiquement à la queue H3, et Npm3 aux queues d'H3 et H4 (Figure II.3.5 B). L'acétylation des lysines présentes au sein de ces queues N terminales empêche la liaison des deux chaperons.

La zone d'interaction de NAP1L4 et Npm3 sur H3 a été cartographiée à l'aide de peptides de différentes longueurs (Figure II.3.5 C). NAP1L4 et Npm3 se fixent sur des peptides correspondant aux acides aminés 1-29 mais ne se fixent pas aux peptides 1-21 : ils reconnaîtraient donc spécifiquement la zone située entre les acides aminés 21 et 29.

Ainsi, la zone 21-29 d'H3 pourrait recruter les chaperons NAP1L4 et Npm3 au sein de la chromatine, et favoriser l'échange de dimères H2A/H2B avec ceux portés par NAP1L4 et Npm3. De plus, ce recrutement est modulé par les modifications post traductionnelles de cette zone, puisque l'acétylation d'H3 bloque la liaison de Npm3 et de NAP1L4.

Enfin, la présence ou l'absence de modifications spécifiques régulerait la cinétique de dépôt/enlèvement des histones par NAP1L4 et Npm3. Dans les spermatides condensées, le recrutement de NAP1L4 au niveau des satellites majeurs pourrait notamment restreindre le dépôt d'H2AL2 à l'hétérochromatine péricentrique (voir Résultats I.1).

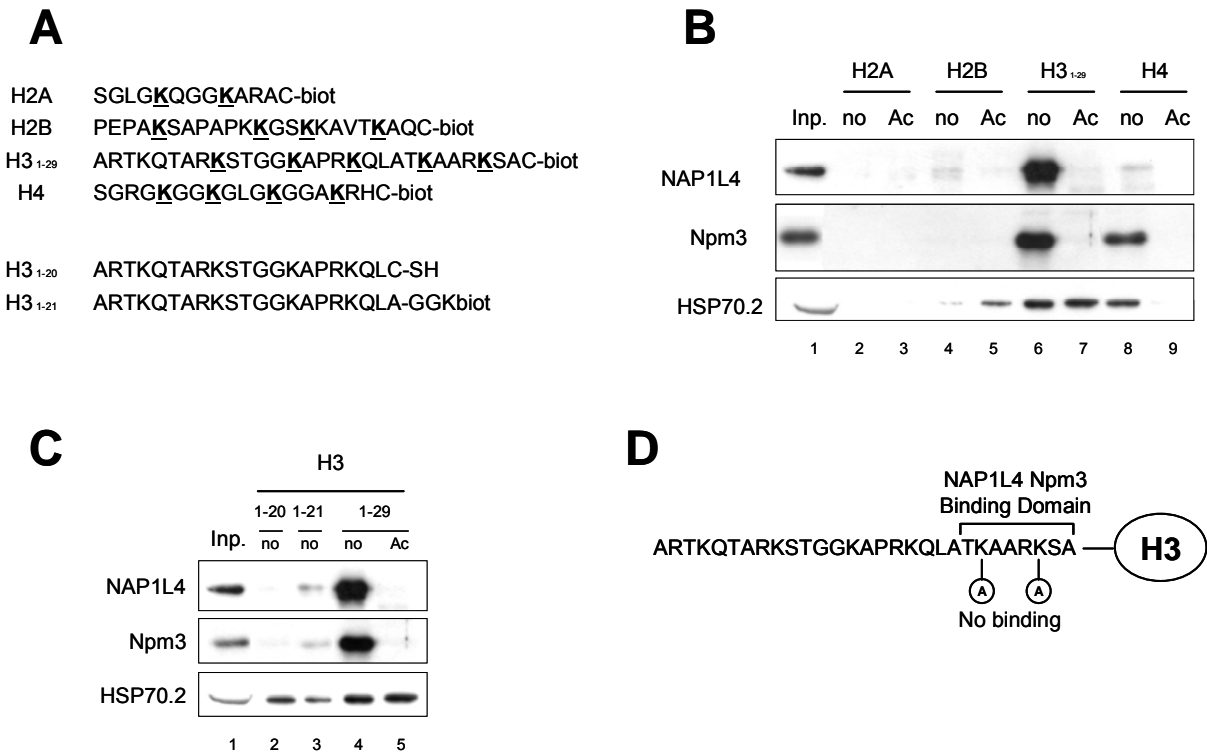


Figure II.3.5 **NAP1L4 et Npm3 lient spécifiquement les acides aminés 21-29 d'H3**

(A) **Séquence des peptides utilisés.** Biot, biotine. Le peptide H3¹⁻²⁰ a été crosslinké à des billes d'agarose fonctionnalisées *via* son résidu cystéine.

(B) **NAP1L4 et Npm3 reconnaissent H3 non modifié.** Des pull downs ont été réalisés sur des extraits cytosolubles de testicule entier, avec les queues N terminales de quatre histones de cœur, acétylées ou non. Inp, Input.

(C) **NAP1L4 et Npm3 lient la zone 22-29 d'H3.** Différents peptides de la queue N terminale d'H3 ont permis de cartographier la zone d'interaction de NAP1L4 et Npm3. La liaison ubiquitaire d'HSP70.2 est utilisée comme contrôle de charge.

(D) **Schématisation de la reconnaissance d'H3 par NAP1L4 et Npm3.** NAP1L4 et Npm3 lient spécifiquement la zone 22-29 d'H3. Une acétylation des lysines 23 et 27 bloque cette interaction.

II.3.6. Protocoles des méthodes développées

~ Colonne d'affinité pour TP1

TP1 murine a été produite en bactérie, purifiée et couplée à de la résine CnBr-Agarose (Amersham), suivant les recommandations du fournisseur. De la BSA (Euromedex) a été couplée dans les mêmes conditions pour servir de contrôle négatif.

La purification des protéines reconnaissant TP1 a été réalisée avec des extraits totaux de spermatides rondes et allongées, réalisés dans Hepes 50mM pH 7.9, Glycérol 20%, KCl 150mM, MgCl₂ 3mM, DTT, 1mM, TSA 300nM, cocktail d'antiprotéases Complete (Roche). Les extraits sont incubés dans ce tampon avec la résine couplée à TP1 ou à la BSA, pendant 2 heures sous rotation à 4°C. La résine est lavée trois fois dans le même tampon, et les protéines retenues sont éluées dans du tampon Laemli, analysées sur gel SDS-PAGE et colorées à l'argent (SilverQuest, Invitrogen) ou au bleu de Coomassie. Les bandes d'intérêt sont découpées, décolorées, et identifiées par spectrométrie de masse suivant les protocoles décrits dans la partie Résultats II.2.

~ RT-qPCR

Les RT ont été réalisées sur une sélection de tissus avec le kit StrataScript First-Stand Synthesis System (Stratagen #200420), en utilisant des primers hexamériques, et en suivant les recommandations du fournisseur. Les qPCR ont été réalisées en utilisant les produits de RT à une dilution finale de 1/250, à l'aide du mix SYBR Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems #4309155) sur un thermocycler Mx3005p (Stratagene). Les courbes standard ont été réalisées avec un pool des ADNc de tous les tissus et les données normalisées par rapport au taux de snRNA U6. Les données présentées doivent être considérées comme préliminaires, car représentent la quantification en duplicat des ADNc d'une seule RT. Des expériences sont en cours afin de moyennner ces résultats sur plusieurs RT indépendantes.

Les primers de qPCR sont (F, primer forward ; R, primer reverse) :

Nom	Concentration (nM)	Primer
NAP1L1	150 nM	F ATCAAAGCACGTCAGCTAACTG
		R TTGAGAGCATTCACTCGTCTTTT
NAP1L2	150 nM	F GTCTCCCAGTGAAAGTTAAGTGC
		R ACTGCATTGATGATCTGTCGTC
NAP1L3	300 nM	F GTCAAAGAAGTTACCCAGGCAA

		R	TAGGTTTTCCCTTTTCGAGCCC
NAP1L4	300 nM	F	CAGCCTTGTACCAGCCTCTAT
		R	CCTTTGGGGTTCAGCTCTTC
Npm1	150 nM	F	TAGGGGGCTTTGAAATTACACC
		R	CATGCCTAAGAGTTTTACGTCCT
Npm2	150 nM	F	GGCAGAAAACCACCAATCACT
		R	CCAGTCCTGAGCCGAAAAGTTA
Npm3	150 nM	F	CCGGTCACAATGGACAGTTTC
		R	CACAGCATGTTCAACGCCAG
U6 snRNA	300 nM	F	CTCGCTTCGGCAGCACA
		R	AACGCTTCACGAATTTGCGT

~ *Production d'anticorps*

Les anticorps dirigés contre Npm3 et NAP1L4 ont été générés chez des lapins par trois injections de 200 µg de protéines recombinantes produites chez *E. coli*. Les anticorps ont été purifiés pour reconnaître spécifiquement la protéine injectée. Les protéines recombinantes portent une étiquette GST, et les sérums ont été épuisés en anticorps anti GST, avant de purifier les anticorps spécifiques pour Npm3 et NAP1L4.

~ *Caractérisation des anticorps*

Les anticorps purifiés reconnaissent spécifiquement les protéines transfectées temporairement dans des cellules somatiques, aussi bien par western blot que par immunofluorescence. Ils sont utilisés au 1/2500 en western blot et au 1/250 en immunofluorescence. Ils détectent une protéine endogène à la taille attendue dans des extraits testiculaires. Les différences de poids moléculaires entre les trois isoformes de Npm et les 5 de NAP1L4 permettent d'exclure une réaction croisée avec d'autres isoformes.

~ *Fractionnement cellulaire cytosol / chromatine*

Les cellules sont resuspendues dans Hepes 50mM pH 7.9, Glycérol 20%, NaCl 150mM, MgCl₂ 3mM, DTT, 1mM, TSA 300nM, NaF 5mM, beta glycérophosphate 25mM, cocktail d'antiprotéases Complete (Roche), et incubées 30 min sur glace dans ce tampon. Après une centrifugation de 15 min à 20 000 g à 4°C, le surnageant et le culot sont séparés. Le surnageant est l'extrait

cytosoluble. Le culot est lavé dans un grand volume du même tampon, et repris dans Urée 8M. Une sonication à 150 J suivi de 30 min d'incubation à température ambiante permettent de solubiliser l'ensemble de la chromatine et des protéines non cytosolubles. Cette fraction, appelée chromatine, est séparée par centrifugation des débris cellulaires non solubles. Les fractions cytosoluble et chromatine sont dosées par Bradford (BioRad), et analysées sur gel SDS-PAGE.

~ *Purification des complexes NAP1L4*

L'ensemble des étapes de purification a lieu dans Hepes 50mM pH 7.9, Glycérol 20%, NaCl 150mM, MgCl₂ 3mM, DTT, 1mM, TSA 300nM, NaF 5mM, beta glycérophosphate 25mM, cocktail d'antiprotéases Complete (Roche). Les purifications sont effectuées à partir d'extraits cytosolubles de testicule entier. 4 mg d'extraits à 10 µg/µL sont incubés pendant une nuit sous rotation à 4°C avec 15 µg d'anticorps purifiés anti NAP1L4 ou d'anticorps isotypiques (anti HA de lapin). Les anticorps sont capturés par de la protéine G couplée à des billes magnétiques (Dynabeads, Invitrogen), suivant les recommandations du fournisseur. Les billes sont lavées trois fois, et les protéines retenues sont éluées dans du tampon Laemli et analysées sur gel SDS-PAGE coloré à l'argent (SilverQuest, Invitrogen). Les bandes d'intérêt sont découpées, décolorées, et identifiées par spectrométrie de masse suivant les protocoles décrits dans la partie Résultats II.2. La détection de NAP1L4 par western blot permet de vérifier que la purification est spécifique.

Les immunoprécipitations sur spermatides allongées (Figure II.3.3 G) ont lieu de la même manière que sur testicule entier, mais sont effectuées dans Tris 50mM pH 7.4, NP-40 1%, Sodium Deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, NaCl 150mM, DTT, 1mM, TSA 300nM, NaF 5mM, beta glycérophosphate 25mM, cocktail d'antiprotéases Complete (Roche). Les extraits sont préparés dans ce même tampon, et les spermatides allongées sont soniquées pour faciliter la solubilisation des protéines. La purification des spermatides allongées est décrite dans la partie Résultats I.1.

CHAPITRE III : DISCUSSION

I. Le code des histones et celui de leurs variants reprogramment l'épigénome au cours de la spermiogénèse

Le remodelage de la chromatine au cours de la spermatogénèse se déroule en présence de nombreuses modifications post traductionnelles d'histones, et de nombreux variants d'histones (voir Introduction III.2). Cette première partie s'efforcera de discuter les résultats de mes travaux relatifs au code des histones et des variants d'histone lors du remodelage post méiotique de la chromatine.

I.1. Dialogue entre les modifications d'H4

I.1.1. Dynamique d'acétylation des histones

L'étude de différentes modifications d'histones, notamment d'H4 (voir Résultats I.1) confirme qu'une hyperacétylation induite dans les spermatides de type 9-10 affecte les histones et leurs lysines de manière différentielle (Hazzouri *et coll.*, 2000). Les lysines les plus touchées par cette hyperacétylation sont les lysines 5, 8 et 12 d'H4 et la lysine 5 d'H2A (voir Résultats I.1 et données non montrées).

Bien que cette hyperacétylation soit décrite depuis plus de 20 ans, la HAT responsable n'a pas encore été identifiée. Il a été proposé que CDYL possède une telle activité (Lahn *et coll.*, 2002), mais cette information a été infirmée par la suite (communication personnelle de C. Caron et CD. Allis). Les résidus acétylés suggèrent que la HAT impliquée soit homologue à la HAT de levure Esa1 (famille MYST), qui acétyle préférentiellement *in vitro* H2A et H4.

L'acétylation est une marque très dynamique, et le taux d'acétylation d'un résidu naît de l'équilibre des activités HAT et HDAC impliquées. Ainsi, une hyperacétylation des histones peut être déclenchée par une activation des HAT et/ou une inhibition des HDAC. Cécile Caron a montré que les principales HDAC nucléaires, HDAC1 et HDAC2, sont dégradées au moment où les histones sont hyperacétylées (Caron *et coll.*, 2003). Ainsi, cette dégradation pourrait être un des facteurs déclenchant l'hyperacétylation des histones, mais les facteurs et les voies de régulation impliquées sont encore inconnues.

Les HAT utilisent l'acétyl-coenzyme A, et transfèrent son groupement acétyl sur les lysines ciblées. Une acétylation massive des histones nécessite donc un approvisionnement généreux en acétyl-coenzyme A. L'acétyl-coenzyme A synthétase (Acs) a récemment été décrite comme indispensable au bon fonctionnement des HAT nucléaires (Takahashi *et coll.*, 2006). Cette enzyme convertit l'acétate en acétyl-coenzyme A et son invalidation entraîne à une déacétylation rapide d'H3 et H4 (l'état d'acétylation d'H2A n'est pas évoqué par les auteurs). Ainsi, il est fort probable qu'une activité acétylcoenzyme A synthase soit associée à l'action massive des HAT lors de la spermiogénèse.

Enfin, une analyse informatique prédit que CDYL possède une activité enoyl-coenzyme A hydratase. Cette activité enzymatique est impliquée dans la β -oxydation des acides gras, qui se termine par la production d'acétyl-coenzyme A. Ainsi, même si CDYL n'est pas la HAT responsable de l'acétylation des histones au stade VIII, elle pourrait néanmoins réguler la dynamique d'acétylation des protéines en modulant le taux d'acétyl-coenzyme A.

1.1.2. H4S1P régule l'hyperacétylation d'H4

L'analyse d'une autre modification d'histone, la phosphorylation de la sérine 1 de l'histone 4 (H4S1P), suggère une deuxième voie de régulation de la cinétique d'acétylation des histones. En effet cette marque est présente dans la phase post méiotique de la différenciation des gamètes mâles, aussi bien durant la sporulation d'un organisme unicellulaire (levure) que durant la spermatogénèse d'un insecte (drosophile) et d'un mammifère (souris). H4S1P est impliquée dans la compaction du génome, car son absence entraîne des problèmes de sporulation et une augmentation du volume des spores de levures. Son rôle au cours de la spermatogénèse des organismes métazoaires est en cours d'étude. H4S1P disparaît au moment de l'hyperacétylation des histones, et n'est sans doute pas impliquée directement dans la compaction du génome des spermatozoïdes. La cristallisation de

nucléosomes de levures indique que la queue N terminale d'H4 interagit avec l'ADN d'une particule voisine, suggérant que H4S1P régule l'organisation de la fibre de 30nm (Suto *et coll.*, 2000 ; Zheng et Hayes, 2003). Cet effet internucléosomal peut expliquer comment H4S1P favorise la compaction de la chromatine.

Des tests HAT réalisés sur des peptides représentant la queue N terminale d'H4, phosphorylée ou non, indiquent que H4S1P inhibe *in vitro* l'activité HAT de Esa1 et NuA4 (Utley *et coll.*, 2005). Ce résultat est très surprenant, car la phosphorylation d'un seul résidu, situé à l'extrémité d'un peptide, inhibe l'action des HAT sur l'ensemble de la longueur. De plus, H4S1P préviendrait la fixation de facteurs sur la queue N terminale d'H4. En effet, des pulls down ont été réalisés avec des peptides H4 non modifiés (acides aminés 1-19) et H4 phosphorylée (H4S1P, acides aminés 1-19). L'analyse des protéines retenues souligne une affinité différente de l'ensemble des protéines pour ces deux peptides (voir Résultats I.3.3).

Une manière d'expliquer l'effet d'H4S1P est d'envisager une modification de la structure de la queue N terminale d'H4. Les queues N terminales des histones n'ont pas de structure stable (Khorasanizadeh, 2004), malgré une organisation en hélice α des queues N terminales d'H3 et H4 (Baneres *et coll.*, 1997). Des études biochimiques ont montré que la région 14-19 d'H4 joue un rôle fondamental dans la compaction de la chromatine (Dorigo *et coll.*, 2003).

A pH physiologique, un grand nombre de charges positives sont exposées au niveau d'un stretch d'acides aminés basiques de la queue N terminale d'H4 (acides aminés 16-20). La phosphorylation de la sérine 1 accumule des charges positives à l'extrémité de la queue N terminale, qui pourraient interagir avec le stretch basique et former une boucle au sein de la queue N terminale. Cette boucle pourrait bloquer l'accès des lysines aux complexes HAT, et aux protéines liant habituellement la queue N terminale d'H4.

Au début de la spermiogénèse, les queues N terminales d'H4 seraient verrouillées par la structure induite par H4S1P (voir Figure I.1.2). Au stade VIII, la déphosphorylation d'H4S1P libérerait la queue N terminale, alors accessible aux complexes HAT. Cette déphosphorylation préalable permet également d'expliquer l'exclusion mutuelle d'H4S1P et H4ac observée à ce stade de la spermatogénèse. Enfin, la dégradation conjointe des HDAC amplifierait la dynamique d'acétylation des histones.

H4S1 est phosphorylée chez la levure par CK2 (Cheung *et coll.*, 2005). CK2 est un hétérodimère entre des sous unités α et β . Lors de la spermatogénèse murine, la sous unité α est remplacée par une sous unité α' exprimée spécifiquement dans le testicule (Escalier *et coll.*, 2003). Le gène codant cette sous unité α' a été invalidé chez la souris, ce qui conduit à une infertilité des souris mâles, et à des problèmes d'organisation du noyau (Escalier *et coll.*, 2003). Il serait intéressant d'étudier l'état de la chromatine, et notamment l'état de phosphorylation de H4S1 dans les souris invalidées.

1.1.3. H4S1P, un interrupteur épigénétique ?

Ainsi que nous venons de le voir, H4S1P rend masquer certains résidus inaccessibles à certains complexes HAT. Il serait très intéressant de déterminer si cette propriété régule uniquement la dynamique d'acétylation d'H4, ou agit également sur d'autres modifications. En effet, H4S1P pourrait jouer un rôle d'interrupteur épigénétique. La phosphorylation d'H4S1 pourrait masquer temporairement les modifications des autres résidus d'H4 aux facteurs environnants. L'action d'une phosphatase révélerait aussitôt l'information portée par la queue N terminale d'H4.

Les implications d'un tel modèle sont fondamentales. Au cours de la sporulation, H4S1P pourrait masquer certaines modifications, et faciliter la compaction de la chromatine. L'acétylation de H4K16 limite notamment la structuration de la chromatine, en empêchant la formation de la fibre de 30 nm (Shogren-Knaak *et coll.*, 2006). La phosphorylation de H4S1 pourrait annuler l'action d'H4K16ac en masquant cette modification à l'intérieur de la boucle. Lors du développement des spores, il suffirait de déphosphoryler H4S1P pour décompacter le génome et révéler le programme épigénétique existant.

Au cours de la spermiogénèse, H4S1P permettrait de masquer les marques épigénétiques préexistantes sur d'H4. Par exemple, H4S1P est présente au cours de la méiose, et pourrait masquer des marques incompatibles avec la bonne réalisation des crossing overs de la méiose. De plus, le maintien d'H4S1P dans la phase post méiotique permettrait d'uniformiser le statut épigénétique de toutes les histones H4. Les facteurs de remodelage seraient recrutés par des marques épigénétiques différentes. Le complexe HAT responsable de l'hyperacétylation des histones serait recruté indépendamment des marques portées par H4. Si ce complexe contient une phosphatase capable d'enlever la marque H4S1P, les histones seraient ainsi toutes acétylées de manière uniforme, et indépendante de leur mémoire épigénétique.

I.2. Un code pour les variants d'histone ?

I.2.1. Tous les variants connus sont présents lors de la spermiogénèse

De nombreuses publications décrivent le profil d'expression de variants d'histone, ubiquitaires ou spécifiques du testicule, au cours de la spermatogénèse. Cependant, la majeure partie de ces études a été réalisée par hybridation *in situ*, quantifiant le taux des ARNm. La présence des protéines de chaque variant méritait d'être confirmée, car de nombreux ARNm sont stockés pour être traduit plus tard.

Les approches protéomiques ont permis d'identifier l'ensemble des histones suivantes : H2A, H2A.Z, H2A.X, TH2A, H2B, TH2B, H3.1, H3.3, H3t, H1.1 à H1.5, H1°, H1t et H1t2 (voir Résultats I.1). CENP-A n'a pas été identifié par spectrométrie de masse, mais est présent au cours de la spermatogénèse (Courrens *et coll.*, 1992). De même macroH2A n'a pas été identifié mais est enrichi dans la vésicule sexuelle au cours de la méiose, et au sein du chromosome Y dans les spermatides rondes (HoyerFender *et coll.*, 2000a ; Namekawa *et coll.*, 2006). Ainsi, tous les variants connus sont présents dans les spermatides rondes ou allongées, à l'exception de H1oo, spécifique des ovocytes (Tanaka *et coll.*, 2001), et H2Abbd, dont la présence de la protéine endogène dans le testicule n'a jamais été confirmée (Chadwick et Willard, 2001). Il est intéressant de noter que l'identification d'H3t constitue la première preuve de la présence de cette protéine chez la souris car seul son gène avait été identifié par homologie à H3t humain.

Le rôle supposé de chaque variant a été détaillé dans la partie introduction (voir Introduction II.3 et III.2.3), mais comment expliquer que tous soient présent au cours de la spermiogénèse ?

La reprogrammation épigénétique de l'intégralité du génome paternel laisse supposer des mécanismes complexes, qui pourraient mettre en jeu l'ensemble des variants d'histone identifiés à ce jour, et la quantification du taux protéique de chaque variant serait très instructive. Cependant, certains variants sont si proches les uns des autres (H3.1 et H3.3 ont quatre acides aminés différents) que les approches par anticorps sont impossibles. Seules des approches plus complexes, par étiquetage de la protéine endogène chez la souris, ou par spectrométrie de masse quantitative permettront de répondre à cette question.

Enfin, la raison d'être de chaque variant est qu'il porte une information différente de son histone de référence. Ainsi, chaque variant doit être différencié pour être incorporé à la chromatine selon un schéma particulier. Cela laisse supposer l'existence d'au moins de 9 chaperons spécifique de chaque

histone de cœur, capables de les reconnaître, et chaperonner et les cibler dans les régions chromatiniennes adéquates. Ainsi, chez l'homme, certains variants d'H2B s'accumulent préférentiellement au niveau des télomères (Gineitis *et coll.*, 2000 ; Zalensky *et coll.*, 2002 ; Churikov *et coll.*, 2004). Leur déposition spécifique dans certaines régions du génome constituerait une mémoire de l'identité épigénétique, qui pourrait être transmise par les spermatozoïdes.

1.2.2. Identification de nouveaux variants d'histone

Trois nouvelles protéines similaires à H2A et H2B ont été identifiées lors de ce travail, appelées H2AL1, H2AL2 et H2BL1 (voir Résultats I.1). Ces variants sont exprimés uniquement dans les stades tardifs de la spermatogénèse, et participent à la réorganisation finale de l'hétérochromatine péricentrique (voir ci-dessous).

Le rôle fonctionnel précis de chaque variant est en cours d'étude, mais leur implication dans la restructuration de la chromatine est certaine. Ainsi, H2AL1/2 sont associés à une nouvelle structure de la chromatine, non nucléosomale et moins stable que les nucléosomes. Cette structure pourrait représenter une forme intermédiaire de structuration de la chromatine, dont l'instabilité témoigne de la dynamique de réorganisation.

Enfin, H2AL1/2 et H2BL1 sont maintenus dans les spermatozoïdes, et sont probablement impliqués dans la transmission d'une information épigénétique. L'étude de leur devenir au moment de la fécondation est en cours, et nous aidera sans doute à comprendre la nature et le rôle de l'information épigénétique qu'ils portent.

I.3. Reprogrammation de l'hétérochromatine péricentrique

L'état épigénétique du plus grand domaine d'hétérochromatine du génome murin a été caractérisé au cours de la spermatogénèse. Plusieurs états épigénétiques successifs ont été mis en évidence, suggérant une reprogrammation active de ce domaine.

1.3.1. L'hétérochromatine péricentrique porte un code des histones original

A l'issue de la méiose, l'hétérochromatine péricentrique est dans un état épigénétique de type somatique, avant d'être entièrement reprogrammée lors de l'allongement des spermatides. La vague

d'acétylation, qui touche l'ensemble du génome, marque le début de la décondensation du chromocentre. L'hétérochromatine péricentrique adopte alors une organisation originale, en perdant HP1beta et en affichant les marques H3K9me3 et H4ac.

Il a déjà été décrit qu'une hyperacétylation prolongée de l'hétérochromatine péricentrique, induite par un traitement long à la tricostatine A, entraîne une perte d'HP1beta (Taddei *et coll.*, 2001). Ainsi, la vague d'acétylation observée au stade VIII pourrait conduire à l'éviction et la disparition d'HP1beta des spermatides allongées.

A l'opposé de HP1, H3K9me3 reste présente lorsque la vague d'acétylation envahi les satellites majeurs. Ainsi, les deux marques colocalisent au sein des spermatides allongées. Cependant, l'étude détaillée de leur distribution *in situ*, et certaines données biochimiques, suggèrent que les deux marques ne sont pas présentes au sein des mêmes nucléosomes. La marque H3K9me3 serait donc retirée lors de l'acétylation du nucléosome concerné, et la disparition d'H3K9me3 nécessiterait la déméthylation d'H3 ou l'extraction de l'histone entière.

Les déméthylases JMJD2A, JHDM3A et JMJB2D pourraient déméthyliser H3K9me3 (Chen *et coll.*, 2006 ; Fodor *et coll.*, 2006 ; Klose *et coll.*, 2006 ; Whetstine *et coll.*, 2006). Cependant, ces enzymes ne permettent pas de retirer les trois groupements méthyle d'H3K9me3, et aucun signal H3K9me2 n'a été détecté *in situ* à ce stade. Ainsi, l'action conjointe d'une autre déméthylase, JHDM2A, pourrait déméthyliser entièrement H3K9me3 (Yamane *et coll.*, 2006). On peut également supposer qu'une enzyme encore non identifiée, peut être spécifique du testicule, soit capable de retirer les trois groupements méthyles d'H3K9me3. Cette enzyme pourrait même être intégrée au complexe HAT qui acétyle H4. La protéine JMJD1A constitue un candidat intéressant, car elle fait partie de la plus grande famille d'enzymes capables de déméthyliser des lysines, et son ARNm est enrichi dans le testicule (profil obtenu sur SymAtlas, <http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>).

La disparition d'H3K9me3 peut également s'expliquer par l'échange des histones portant cette marque avec des histones non modifiées. Les approches protéomiques ont notamment identifié H3.3 et H3t dans les spermatides allongées de type 12-16. Ces variants pourraient être incorporés à la chromatine lors de l'acétylation d'H4, ce qui expliquerait la disparition d'H3K9me3.

Ni H4ac, ni H3K9me3 ne sont détectées dans les stades plus tardifs. La perte du signal est probablement due à la disparition réelle de ces marques, et à la compaction croissante du noyau, qui limite l'accessibilité des anticorps. Ainsi, H4ac est toujours détectée par immunofluorescence, mais

avec un signal plus faible, au sein des spermatozoïdes matures qui ont été décompactés à l'aide d'agent réducteur (van der Heijden *et coll.*, 2006).

1.3.2. Une nouvelle structure de l'ADN, non nucléosomale, organise l'hétérochromatine péricentrique dans les spermatides condensées.

L'analyse biochimique de la chromatine des spermatides condensées (type 12-16) a révélé l'existence de deux types de structuration de l'ADN : une structure de type nucléosomale, et une nouvelle structure, non nucléosomale. Cette nouvelle structure, spécifique du testicule, apparaît lors d'une digestion ménagée avec la nucléase micrococcale, et contient un fragment d'ADN d'environ 60 paires de bases.

Dans les spermatides condensées, l'hétérochromatine péricentrique est la dernière région encore structurée en nucléosomes, et par cette nouvelle structure. Ceci suggère un état épigénétique particulier des satellites majeurs à ce stade de différenciation. La résolution *in situ* ne permet pas de déterminer si les deux types de structures chromatiniennes colocalisent, ou sont mutuellement exclusifs. Cependant, la structure non nucléosomale est plus fragile que la structure nucléosomale, et pourrait être ainsi associée à un état chromatinien intermédiaire.

1.3.3. De nouveaux variants d'histone sont présents dans la structure non nucléosomale

Cette nouvelle structure a seulement été détectée au sein des spermatides condensées, suggérant l'implication de protéines spécifiques. Une analyse protéomique globale a identifié trois nouveaux variants d'histone, appelés H2AL1, H2AL2 et H2BL1, spécifiquement exprimés dans les derniers stades de la spermatogénèse. De plus, ces trois variants sont retrouvés au sein de la structure non nucléosomale, ainsi que TH2B.

TH2B est exprimé pendant et après la méiose, alors que H2AL1/2 et H2BL1 sont présent uniquement dans les derniers stades de la spermatogénèse. De plus, *ex vivo*, H2AL1/2 ont une affinité supérieure pour TH2B que pour H2B. *In vivo*, TH2B, et non H2B, est associé à la nouvelle structure chromatinienne, ce qui suggère la formation préférentielle de dimères TH2B-H2AL1/2 dans les spermatides condensées.

Enfin, l'incorporation de TH2B au sein de nucléosomes contenant des histones canoniques déstabilise le nucléosome chimère (Li *et coll.*, 2005). Nous avons montré que les nucléosomes contenant TH2B et H2AL2 sont moins stables que des nucléosomes conventionnels. Ainsi, la présence préalable de TH2B favoriserait l'incorporation de H2AL1/2. Les nouveaux nucléosomes seraient alors le site d'une réorganisation profonde de l'agencement de la chromatine, formant les nouvelles structures mises en évidence dans les spermatoïdes condensés. Ce processus impliquerait d'autres protéines encore inconnues, car il n'a jamais été observé en transfectant TH2B et H2AL1/2 dans des cellules somatiques.

H2AL1/2 et H2BL1 sont maintenus dans le spermatozoïde, alors que la majorité des autres histones, dont TH2B est dégradée. Cependant, TH2B n'est pas totalement absent des spermatozoïdes, et hTH2B, homologue humain de TH2B, a été détecté par immunofluorescence dans les spermatozoïdes (Zalensky *et coll.*, 2002). La nature exacte des structures contenant H2AL1/2 dans les spermatozoïdes est encore inconnue, mais une hypothèse séduisante suppose qu'une partie de TH2B soit échangé au profit de H2BL1, retrouvée elle aussi dans la structure non nucléosomale et au sein du spermatozoïde.

Les variants H2AL1/2 et H2BL1 sont proches de leurs histones canoniques respectives, mais ne sont pas conservés chez l'homme. Cependant, d'autres variants d'histone spécifique du testicule pourraient être présents dans les cellules germinales humaines, et remplir un rôle comparable. Par exemple, H2BFWT, un variant humain d'H2B spécifique du testicule, est présent uniquement chez les primates (Churikov *et coll.*, 2004).

La reprogrammation épigénétique de l'hétérochromatine péricentrique pourrait être importante pour la réorganisation de la chromatine qui suit la fécondation. En effet, le pronoyau mâle est entièrement reprogrammé afin d'assurer la totipotence du zygote. De manière très intéressante, l'hétérochromatine péricentrique d'origine paternelle et maternelle porte des marques épigénétiques différentes dans les premières étapes de développement de l'embryon (Santos *et coll.*, 2005 ; Martin *et coll.*, 2006). Il est très tentant de supposer que la présence d'H2AL1/2 puisse guider la réorganisation de l'hétérochromatine péricentrique du pronoyau mâle. De plus, ces variants, bien qu'enrichis sur l'hétérochromatine péricentrique, sont également présents dans d'autres régions du génome (Escoffier E., Caron C., données non publiées). Le rôle épigénétique H2AL1/2 ne se limiterait pas à l'hétérochromatine péricentrique et pourrait être associé à d'autres types de structure chromatinienne.

I.4. Etat de la chromatine des régions de contrôle de l’empreinte parentale (ICR)

Les deux allèles de certaines zones du génome ont une structure chromatinienne et un profil d’expression différents : ces zones sont dites « soumises à empreinte parentale ». Une région régulatrice (ICR) dirige le profil d’expression des gènes, et des différences d’expression entre les deux allèles. L’ADN des allèles paternel et maternel des ICR a un taux de méthylation différent : la majorité des sites soumis à empreinte est qualifiée d’empreinte maternelle, car l’ADN de l’allèle maternel de l’ICR est méthylé, et l’allèle paternel de l’ICR ne l’est pas. De plus, ce profil de méthylation est associé à un contexte chromatinien particulier, mis en évidence par une association de modifications d’histones particulières (Umlauf *et coll.*, 2004).

I.4.1. ICR soumises à empreinte maternelle et paternelle ont un statut épigénétique équivalent dans les cellules somatiques

Seules trois ICR sont décrites comme soumises à empreinte paternelle. Dans un premier temps, les modifications des histones associées aux ICR méthylées sur l’ADN paternel ont été étudiées dans des cellules somatiques (culture de cellules souches et foie). Ces régions portent le même profil de modifications d’histones que les ICR méthylées sur l’ADN maternel : les allèles méthylés sont enrichis en H4K20me3 et H3K9me3, alors que les allèles non méthylés sont enrichis en H3K4me3 et H3ac.

La corrélation entre profil de méthylation de l’ADN et code des histones associé est encore mal comprise. L’association d’H3K9me3 et H4K20me3 sur les allèles ICR méthylées rappelle la structure de l’hétérochromatine péricentrique, et des mécanismes similaires pourraient lier le dépôt d’H3K9me3 et H4K20me3 sur l’allèle méthylé.

Il est moins simple d’expliquer l’absence de méthylation sur l’autre allèle de l’ICR. H3K4me3 est une marque retrouvée sur les promoteurs en cours d’activation (Bernstein *et coll.*, 2006). La plupart des ICR soumises à empreinte maternelles est située au niveau de promoteurs de gènes, et la transcription de l’allèle non méthylé préviendrait la méthylation de l’ADN. Par contre les ICR soumises à empreinte paternelle ne sont pas situés au niveau de promoteurs ni même à proximité de gènes. Ainsi, la présence même d’H3K4me3 est surprenante au vu de l’absence de transcription. Certains facteurs pourraient néanmoins être liés à ces régions, et protéger de l’action de DNMT :

par exemple, CTCF lie l'allèle maternel de l'ICR *H19* (site soumis à empreinte paternelle) et le protégerait de la méthylation de l'ADN (Schoenherr *et coll.*, 2003).

1.4.2. Statut épigénétique des ICR au cours de la spermatogénèse

Les modifications des histones associées aux ICR ont été caractérisées dans le cadre de la spermatogénèse. En effet, la production de gamètes, mâles ou femelles, impose l'uniformisation de l'empreinte parentale, afin que les ovocytes ne transmettent qu'une empreinte maternelle et que les spermatozoïdes ne transmettent qu'une empreinte paternelle.

Le profil de méthylation des ICR a été évalué, et les ICR soumises à empreinte paternelle sont fortement méthylé, alors que les ICR soumises à empreinte maternelle ne le sont pas. De plus, les ICR soumises à empreinte maternelle sont enrichies en H3K4me3 et H3ac au cours de la spermatogénèse, indiquant une conservation des marques épigénétiques de ces loci dans les tissus somatiques et les cellules germinales mâles.

En revanche, les ICR soumises à empreinte paternelle ne sont pas enrichies en H3K9me3 ni en H4K20me3, malgré le haut niveau de méthylation de l'ADN. Ceci n'est pas du à l'absence des enzymes qui déposent ces marques car H3K9me3 et H4K20me3 sont présentes au niveau des séquences répétées LINE1. Ainsi, au niveau des ICR soumises à empreinte paternelle, le dialogue entre méthylation de l'ADN et code des histones, ne serait pas le même dans les tissus somatiques et au cours de la spermatogénèse. Ce statut épigénétique particulier est sans aucun doute en lien avec la mise en place d'une structure permettant la transmission de l'empreinte paternelle par le spermatozoïde.

1.4.3. Quelles marques sont associées aux ICR dans le spermatozoïde ?

Un fort taux d'acétylation d'H4 a été détecté au niveau de toutes les ICR, qu'elles soient soumises à empreinte maternelle ou paternelle. Cette marque pourrait témoigner de la restructuration de la chromatine associée à ces régions, et recruter certains facteurs à bromodomains spécifiques, comme par exemple Brdt (voir ci-dessous et Pivot-Pajot *et coll.*, 2003 ; voir ci-dessous et Govin *et coll.*, 2006).

Une déméthylation massive du pronoyau mâle a lieu juste après la fécondation, mais épargne la méthylation des ICR des régions soumises à empreinte paternelle. Ainsi, la chromatine des

spermatozoïdes contient une information épigénétique qui protège ces régions de la déméthylation. Notre étude a mis en évidence un profil épigénétique différent entre les ICR soumises à empreinte maternelle et paternelle dans les cellules germinales, mais l'élément clé protégeant de la déméthylation n'est pas encore identifié. Un remodelage particulier des ICR pourrait conduire à l'incorporation de variants d'histone encore inconnus et/ou à l'établissement de structures nucléo-protéiques différentes. La nouvelle structure décrite dans la partie précédente n'est pas enrichie au niveau des ICR (Delaval K. Escoffier E., Caron C., Feil R. données non publiées), mais on peut imaginer que d'autres types de structures soient mis en place.

Enfin, environ 15% des histones sont maintenues dans le gamète mâle humain (Gatewood *et coll.*, 1987). Il a notamment été montré que le gène *Igf2*, soumis au contrôle de l'ICR paternelle *H19*, est enrichi en histones dans les spermatozoïdes (Wykes et Krawetz, 2003). De manière plus générale, la chromatine des ICR soumises à empreinte paternelle pourrait rester sous forme nucléosomale dans le spermatozoïde. Cette structure chromatiniennne pourrait leur permettre de résister à la déméthylation du pronoyau mâle d'une manière encore inconnue.

II. Aspects fonctionnels de reprogrammation de l'épigénome au cours de la spermatogénèse

II.1. Rôle fonctionnel de l'hyperacétylation des histones

II.1.1. Acétylation des histones et compaction de la chromatine

Le remodelage post méiotique de la chromatine est marqué par une hyperacétylation des histones (Hazzouri *et coll.*, 2000 ; Govin *et coll.*, 2004) au stade VIII. Dans les cellules somatiques, l'acétylation des histones est une marque globalement associée à l'activation de la transcription, dans un contexte de chromatine ouverte et décompactée. Or ce contexte chromatinien est totalement opposé à la structure compacte et répressive à la transcription mise en place au sein des spermatides.

L'hyperacétylation des histones marque très certainement les premières étapes de la réorganisation finale du génome. L'extraction de l'ensemble des histones nécessite sans aucun doute l'intervention de complexes spécifiques. Ainsi, Brdt est une protéine à double bromodomaines, exprimé spécifiquement dans les testicules, et fait partie de la famille BET. Cette famille est composée des protéines Brd2 à Brd4 et de Brdt. Il a été montré que Brdt est capable de compacter *ex vivo* la totalité de la chromatine de cellules somatiques, lorsqu'une hyperacétylation est induite par la TSA (Pivot-Pajot *et coll.*, 2003). *In vivo*, Brdt est détecté au moment où les histones sont hyperacétylées, et suit exactement le profil de leur distribution (voir Résultats II.1). Brdt agit sans doute en faveur d'une compaction de la chromatine acétylée au cours de la spermiogénèse. Brdt est également capable d'éjecter les histones de liaison de la chromatine (Govin *et coll.*, 2006), et pourrait favoriser leur échange avec les variants d'histone de liaison H1t2 et HILS1, qui sont incorporés à la chromatine dans les spermatides allongées.

Ainsi la chromatine pourrait être compactée de manière globale par certains facteurs de remodelage, assurant la mise en place de la majeure partie de la structure chromatinienne spermatique.

II.1.2. Acétylation des histones et reprogrammation de l'épigénome

Le rôle fonctionnel de l'acétylation des histones n'est pas limité à une compaction générale de la chromatine. En effet, nous mettons en évidence que cette modification pourrait participer à la reprogrammation de deux types de régions chromatinienne.

~ Acétylation des histones et reprogrammation de l'hétérochromatine péricentrique

H4ac est détecté au sein de l'hétérochromatine péricentrique des spermatides condensées, avant de disparaître dans les stades plus tardifs. Néanmoins, une partie des histones modifiées serait maintenue dans les spermatozoïdes. H4K8ac et H4K12ac sont notamment détectées au sein de l'hétérochromatine péricentrique des gamètes mâles (van der Heijden *et coll.*, 2006).

Ainsi, l'état épigénétique de l'hétérochromatine péricentrique des spermatozoïdes serait le résultat d'un équilibre entre mise en place de nouvelles structures de la chromatine et maintien de marques épigénétiques présentes lors de cette réorganisation.

Plusieurs protéines de la famille BET pourraient protéger les histones acétylées du remodelage de la chromatine. Il est connu que chez la levure, la protéine Bdf1, homologue aux protéines de la

famille des BET, est capable de protéger des résidus acétylés d'une déacétylation active (Ladurner *et coll.*, 2003). Nous avons montré que Brdt se relocalise au niveau de l'hétérochromatine péricentrique dans les spermatides allongées. Outre son rôle dans la compaction de la chromatine, Brdt pourrait avoir un rôle similaire à celui de Bdf1, et protéger l'extraction de certaines histones acétylées de l'hétérochromatine péricentrique.

De plus, certains membres de la famille BET pourraient faciliter l'incorporation de variants d'histones. En effet, Bdf1 fait partie du complexe SWR-C, responsable de l'incorporation d'H2A.Z au sein de la chromatine. Ainsi, certains complexes protéiques pourraient relier acétylation des histones et dépôt des variants d'histones. Il serait intéressant de déterminer si l'incorporation de H2AL1/2 dans les satellites majeurs est lié à la dynamique d'acétylation des histones.

~ *Acétylation des histones et transmission de l'empreinte paternelle*

L'acétylation d'H4 marque fortement les ICR tout au long de la spermatogénèse. Il serait intéressant de déterminer si cette marque recrute des protéines de la famille BET, et notamment Brdt, au niveau des ICR. De manière similaire à l'hétérochromatine péricentrique, des membres de la famille BET pourraient protéger la chromatine des ICR, qui seraient alors maintenues dans une structure nucléosomale dans les spermatozoïdes. En effet, il a déjà été montré qu'un ICR, *H19*, est enrichie en histones dans les spermatozoïdes (Wykes et Krawetz, 2003).

De plus, si les nucléosomes organisant les ICR dans le gamète mâle sont acétylés, des protéines de la famille BET pourraient restées liées à ces régions dans le spermatozoïde, puis dans le pronoyau mâle, et les protéger de la déméthylation générale du génome paternel.

II.1.3. Acétylation des histones comme marque de dégradation

Les voies de dégradation des histones libres dans des cellules somatiques sont encore mal connues (Gunjan *et coll.*, 2006) mais un couplage entre taux de production et taux d'incorporation à la chromatine lors de la réplication évite leur accumulation excessive (Gunjan *et coll.*, 2005). Le contexte de la spermatogénèse constitue bel et bien un exemple unique de dégradation massive des histones, mettant en jeu des mécanismes encore inconnus.

Les protéines sont généralement dégradées par les lysosomes, ou par un complexe protéique spécialisé, le protéasome. Une polyubiquitination des protéines à dégrader permet leur ciblage vers protéasome, et leur dégradation. Les histones sont monoubiquitinées, mais cette marque est indépendante de leur dégradation (voir Introduction II.3). De plus, aucun signe de

polyubiquitination des histones n'a été détecté au cours de la spermatogénèse (données non publiées).

Il est intéressant de noter que la dégradation massive des histones est précédée par leur hyperacétylation. L'acétylation pourrait-elle sceller le devenir des histones, et servir de marque de dégradation ?

L'identification récente de 3A-Brd vient conforter l'hypothèse que l'acétylation des histones serve également de marque de dégradation (Lestrat *C et coll.*, manuscrit en préparation). 3A-Brd est une protéine spécifique du testicule, qui contient deux domaines spécifiques : un bromodomaine fonctionnel capable de reconnaître les histones acétylées, et un domaine AAA-ATPase commun avec certaines sous unités du protéasome. Ainsi, 3A-Brd pourrait recruter le protéasome, véritable usine de dégradation des protéines, au niveau des histones acétylées, et favoriser ainsi leur dégradation.

II.2. Incorporation et extraction des histones de la chromatine

II.2.1. Quels chaperons d'histone ?

Le remodelage post méiotique de la chromatine est caractérisé par l'incorporation de nombreux variants d'histone, l'extraction de plus de 95% des histones et leur remplacement par les protéines de transition puis par les protamines (Govin *et coll.*, 2004). Ainsi, la concentration en protéines basiques au sein du noyau des spermatides atteint sans doute un des niveaux plus élevés de la vie cellulaire, et implique une régulation fine de l'ensemble de ces mécanismes.

La quasi-totalité des variants d'histone connus sont présents dans les spermatides allongées. Leur présence suppose l'existence de chaperons spécifiques de chaque variant, capables de les déposer dans les régions qui leur sont attribuées, et déposer ainsi une information épigénétique fiable.

Les chaperons connus des variants d'histone ubiquitaires pourraient être présents lors de la spermatogénèse. Ainsi, HIRA pourrait incorporer H3.3 (Tagami *et coll.*, 2004), et le complexe SCRAP pourrait prendre en charge H2A.Z (Ruhl *et coll.*, 2006). Très peu de données discutent les chaperons potentiels des variants d'histone spécifiques du testicule. Seul tNASP est connu pour être impliqué dans le dépôt du variant d'histone de liaison H1t (Richardson *et coll.*, 2000 ; Alekseev *et coll.*, 2005).

Nos approches protéomiques ont permis d'identifier deux chaperons d'histone enrichis au sein du testicule, la nucléoplasmine 3 (Npm3) et NAP1L4.

II.2.2. Quel est le rôle de la nucléoplasmine 3 au cours de la méiose ?

Trois isoformes composent la famille des nucléoplasmines. Une approche protéomique globale a identifié l'isoforme Npm3 dans le testicule. La quantification de son ARNm et de la protéine endogène indique que Npm3 est enrichie dans ce tissu. De plus, nous montrons que Npm3 est présente majoritairement lors de la méiose.

Actuellement, seule une implication de Npm3 dans la maturation des ribosomes a été décrite (Huang *et coll.*, 2005). Dans les cellules somatiques, Npm3 interagit avec Npm1, et inhibe la synthèse et la maturation des ARNr (Huang *et coll.*, 2005). Cette interaction a été confirmée au sein du testicule (données non montrées), mais le rôle de Npm3 reste incertain. Au début de la prophase I de méiose (leptotène), les nucléoles sont répartis sur les paires de chromosomes en cours de synapse. Puis au stade pachytène, les nucléoles se regroupent pour former un seul grand nucléole, qui migre vers les chromosomes sexuels (pour revue Tres, 2005). A ce stade, les chromosomes X et Y sont regroupés au sein de la vésicule sexuelle, sous forme d'hétérochromatine facultative.

Ainsi, le rôle fonctionnel des nucléoles semble changer lors de la transition leptotène/pachytène. Au stade leptotène, les nucléoles associés aux autosomes ont une forte activité de synthèse d'ARN et cette activité diminue fortement lors de leur association à la vésicule sexuelle (Kierszenbaum et Tres, 1974). Quel serait alors le rôle d'un nucléole unique associé à la vésicule sexuelle ? Les fonctions des nucléoles ne seraient pas limitées à la fabrication des ribosomes, mais ils seraient également impliqués dans l'export nucléaire, la ségrégation de protéines régulatrices, les mécanismes de sénescence, etc (Olson *et coll.*, 2002). Le peu de connaissances des fonctions « non conventionnelles » des nucléoles laisse cette liste encore ouverte.

Malheureusement, la localisation de Npm3 n'a pas pu être étudiée *in vivo* car l'anticorps ne reconnaît pas *in situ* la protéine endogène. Cependant, Npm3 a été transfectée dans des cellules somatiques, et est localisée dans leurs nucléoles (données non présentées et Huang *et coll.*, 2005). Ceci nous laisse supposer que Npm3 serait également présente dans le nucléole au cours de la méiose. La vésicule sexuelle est fortement enrichie en macroH2A et γ H2A.X (HoyerFender *et coll.*, 2000a ; Turner *et coll.*, 2001 ; Namekawa *et coll.*, 2006) et Npm3, surexprimée dans des cellules somatiques, est capable de chaperonner H2A-H2B (données non présentées). Si Npm3 est capable

de chaperonner macroH2A et/ou H2A.X, Npm3 pourrait également favoriser l'incorporation de ces variants au sein de la vésicule sexuelle, et instaurer ainsi un couplage entre les dynamiques d'organisation des nucléoles et de la vésicule sexuelle.

Enfin, Npm3 interagit spécifiquement avec les acides aminés 22 à 29 de la queue N terminale d'H3. Ainsi, H3 pourrait recruter Npm3 au sein de la chromatine. De plus, l'acétylation des lysines 23 et 27 inhibe l'interaction entre H3 et Npm3. Le profil d'acétylation de ces résidus n'a jamais été décrit au cours de la spermatogénèse, mais il serait intéressant de déterminer si la méthylation de la lysine 27 d'H3 influence l'affinité de Npm3 pour H3. En effet, cette modification est détectée dans l'ensemble des noyaux des spermatocytes pachytène, mais est exclue de la vésicule sexuelle (Namekawa *et coll.*, 2006). Si H3K27me inhibe la reconnaissance d'H3 par Npm3, l'absence de cette marque permettrait le ciblage de Npm3 et de ses partenaires vers la vésicule sexuelle, où Npm3 pourrait favoriser l'incorporation de variants d'histone.

II.2.3. NAP1L4 favoriserait l'incorporation de variants d'histone

Cinq gènes codant une protéine contenant un domaine NAP ont été identifiés chez les mammifères, appelées NAP1L1 à NAP1L5. La levure compte deux isoformes de NAP, appelées yNAP1 et yNAP2. L'isoforme NAP1L4, qui est homologue à yNAP2, a été identifiée par une approche protéomique. Nous montrons que NAP1L4 est enrichi dans le testicule, tant au niveau de son ARNm que de la protéine endogène. De plus, NAP1L4 est présent tout au long de la spermatogénèse, aussi bien lors de la méiose que dans les stades post méiotiques. Les NAP sont des chaperons des dimères H2A-H2B. Lors de la réplication, yNAP1 chaperonne les histones néosynthétisées, les importe dans le noyau et favorise leur incorporation à la chromatine (Chang *et coll.*, 1997 ; Mosammaparast *et coll.*, 2002 ; Okuwaki *et coll.*, 2005). Mais seules les spermatogonies se divisent par mitose, et le rôle de NAP1L4 est donc indépendant d'un contexte répliatif.

~ Rôle méiotique de NAP1L4

Des études *in vitro* ont prouvé que NAP1L4 peut transférer des histones sur de l'ADN nu (Rodriguez *et coll.*, 1997). De plus, nous montrons *in vivo* que NAP1L4 chaperonne H2A, H2B et certains de leurs variants dans des extraits cytosolubles (voir Résultats II.3 et ci dessous). Ainsi, il est fort probable que NAP1L4 participe à l'organisation de la chromatine, lors de la méiose et de la spermiogénèse. Peu de données documentent le rôle méiotique de NAP1L4. Cependant, yNAP1

chaperonne le variant d'histone H2A.Z avant de le confier au complexe chargé de son incorporation (Mizuguchi *et coll.*, 2004). H2A.Z est peu abondant dans les premières étapes de la spermatogénèse, mais sa quantité augmente lors de la méiose, et atteint son maximum au sein des spermatides rondes (Greaves *et coll.*, 2006). Ainsi, NAP1L4 pourrait chaperonner H2A.Z lors de sa synthèse, et l'incorporer à la chromatine. Il est intéressant de noter que les NAP sont généralement associées en dimères (McBryant et Peersen, 2004 ; Toth *et coll.*, 2005), et que H2A.Z est présent en deux exemplaires au sein d'un nucléosome (Suto *et coll.*, 2000). Ainsi, les deux molécules de NAP1L4 associées en dimères pourraient chaperonner chacune un dimère H2A.Z-H2B et les incorporer au même nucléosome.

NAP1L4 est présent dans la fraction cytosoluble et chromatinienne des cellules. La fraction de NAP1L4 liée à la chromatine est légèrement enrichie dans les spermatides rondes, ce qui pourrait correspondre au pic d'incorporation d'H2A.Z.

~ *NAP1L4 chaperonne H2AL2 dans les spermatides allongées*

La purification des complexes NAP1L4 a montré que NAP1L4 chaperonne H2A, H2B, mais également les variants TH2B et H2AL2. TH2B est présent tout au long de la spermatogénèse, et NAP1L4 pourrait chaperonner et incorporer ce variant avec H2A.Z lors de la méiose.

H2AL2 est exprimé dans les spermatides de type 12-15, et est associé à la mise en place de structures chromatiniennes particulières dans les satellites majeurs. H2AL2 s'associe préférentiellement à TH2B, et NAP1L4 pourrait favoriser l'incorporation de dimères H2AL2/TH2B au sein de l'hétérochromatine péricentrique. De plus, seule l'hétérochromatine péricentrique est encore sous forme nucléosomale dans les spermatides allongées (voir Résultats I.1 et van der Heijden *et coll.*, 2006). Ainsi, NAP1L4 ciblerait H2AL1/2 dimérisé avec TH2B dans les seules régions nucléosomales résiduelles.

De la même manière que Npm3, NAP1L4 reconnaît préférentiellement la zone 22-29 de l'histone H3, et cette interaction est inhibée par l'acétylation des lysines 23 et 27 d'H3. Ainsi, si la méthylation d'H3K27 a le même effet que l'acétylation de ce résidu, les modifications d'H3 pourraient réguler la dynamique d'incorporation de certains variants d'histones en modifiant l'affinité de NAP1L4 pour H3. De plus, il a été montré que yNAP1 est capable de mobiliser localement les nucléosomes le long de la fibre de chromatine (Park *et coll.*, 2005). De manière similaire, l'action de NAP1L4 pourrait moduler la « fluidité » de la chromatine, en fonction des modifications d'histone affichées localement.

~ *Aspects fonctionnels du complexe protéique contenant NAP1L4*

Le complexe NAP1L4 a pu être purifié à partir d'extraits cytosolubles de testicule entier, et huit partenaires de NAP1L4 ont été identifiés. Outre des histones et certains variants, NAP1L4 interagit avec plusieurs protéines de fonctions inconnues. NAP1L4 interagit avec GRP75, une protéine chaperonne appartenant à la famille HSP70. Cette interaction pourrait cibler NAP1L4 vers le réticulum endoplasmique, et lui permettre de prendre en charge les histones néosynthétisées.

NAP1L4 est également associé à l'acétyl-coenzyme A carboxylase 1 (Acc1). Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme des lipides, et ajoute un groupement méthyl à l'acétyl coenzyme A pour former du malonyl-coenzyme A. Cette réaction constitue la première étape de la chaîne de synthèse des acides gras (Barber *et coll.*, 2005). Le rôle fonctionnel de l'interaction entre NAP1L4 et Acc1 reste mal compris, mais est mis en lumière par les travaux récents de Takahashi *et coll.* (Takahashi *et coll.*, 2006). En effet, la présence de l'acétyl-coenzyme A synthase est nécessaire à l'approvisionnement des HAT en acétyl-coenzyme A. Ainsi, métabolisme et remodelage de la chromatine sont étroitement liés. Acc1 convertit habituellement l'acétyl-coenzyme A en malonylcoenzyme A. Ainsi, Acc1 pourrait appauvrir l'environnement de NAP1L4 en acétylcoenzyme A, et conduire à une déacétylation locale des histones. Par ailleurs, il se peut que le malonylcoenzyme A créé soit utilisé localement par une autre enzyme à des fins inconnues. L'interaction entre NAP1L4 et Acc1 a été mise en évidence avec des extraits de testicules entiers. Le rôle fonctionnel de cette interaction sera sans doute mieux compris si l'on arrive à déterminer le lieu et le moment de cette interaction au cours de la spermatogénèse.

II.3. Et les autres protéines basiques ?

Au même titre que les histones, de nombreuses protéines basiques sont mises en jeu lors de la spermiogénèse. Les protéines de transition et les protamines sont les plus connues, mais nos études protéomiques ont également identifiés de nombreuses protéines HMG au sein des spermatides rondes. Il subsiste un manque d'informations considérable sur les systèmes de chaperons de ces protéines basiques.

Pour la première fois, l'activité d'une protéine chaperon a été suivie tout au long de la spermatogénèse. HSP70.2, malgré sa grande similarité avec les autres membres de la famille HSP70, remplit un rôle essentiel au bon déroulement de la spermatogénèse. Malgré la présence d'un

autre variant d'HSP70 spécifique du testicule, HSP70t, et d'HSP70 lui-même, les souris mâles invalidées pour HSP70.2 sont stériles (Dix *et coll.*, 1996). En effet, HSP70.2 est associée aux complexes synaptonémaux, et module l'association du complexe Cdc2-cyclin B1 (Allen *et coll.*, 1996 ; Dix *et coll.*, 1996 ; Dix *et coll.*, 1997 ; Zhu *et coll.*, 1997). Nos travaux ont montré qu'HSP70.2 est également présente après la méiose. De plus, une fraction d'HSP70.2 devient soluble dans l'acide dans les spermatides allongées. L'association d'HSP70.2 avec des protéines basiques, dont TP1 et TP2, explique la solubilisation d'HSP70.2 observée dans les spermatides allongées et condensées. Ainsi, HSP70.2 pourrait chaperonner certaines protéines basiques, et favoriser leur incorporation à la chromatine.

L'analyse détaillée de la localisation d'HSP70.2 met en évidence l'existence d'un sous compartiment nucléaire, situé sous l'acrosome, dans les spermatides allongées. Présente de manière homogène dans le noyau des spermatides rondes, HSP70.2 se relocalise dans cette zone apicale au stade VIII de la spermatogénèse. Ce compartiment avait déjà été remarqué par Davidson *et coll.*, lors de l'étude de la localisation du variant d'histone de liaison H1t2 (Martianov *et coll.*, 2005).

La relocalisation d'HSP70.2 coïncide avec la disparition des histones acétylées. L'acétylation des histones est probablement reliée à leur extraction et à leur remplacement par de nouvelles structures chromatinienne (voir Discussion I.1). Ainsi, la présence d'HSP70.2 dans des zones dépourvues d'histones acétylées suggère fortement que ce chaperon soit impliqué dans l'incorporation de nouvelles protéines basiques et la mise en place de structures chromatinienne spécifiques. Cette hypothèse est renforcée par la détection de complexes entre HSP70.2 et protéines basiques, dont TP1 et TP2.

A ce jour, aucun élément structural fiable ne décrit l'organisation chromatinienne du génome des spermatozoïdes par les protamines. De plus, bien que les protéines de transition représentent plus de 90% des protéines basiques des spermatides de type 12-13 (Meistrich *et coll.*, 2003), très peu de données fonctionnelles relatent le mode d'action de ces protéines. HSP70.2 est la première protéine chaperon décrite comme étant impliquée dans leur incorporation à la chromatine.

III. Conséquences d'une dérégulation de l'épigénome spermatique

III.1. Les risques de l'assistance médicale à la procréation

Depuis plus de dix ans, les nouvelles techniques d'assistance médicale à la procréation ont révolutionné la prise en charge de l'infertilité masculine (Winston et Hardy, 2002). Les techniques de fécondation *in vitro* (FIV) avec micro-injection d'un spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire (ICSI) ont permis aux hommes, dont la production de spermatozoïdes est sévèrement altérée, d'avoir des enfants. Ainsi, une anomalie génétique ou épigénétique, présente au sein des spermatozoïdes, peut être transmise à leur descendance. Plus d'un million d'enfants sont nés dans le monde à l'aide de ces techniques, et différentes études internationales ont analysé les anomalies présentes chez les enfants (Anastasiou et Mandelbaum, 2006). Bien que certaines études soient contradictoires, et que la fréquence des anomalies soit très faible, la possibilité d'un lien direct avec l'utilisation de ces techniques ne peut être exclue (Anastasiou et Mandelbaum, 2006). De plus, il est intéressant de noter que le faible taux d'implantation des embryons reste une des limites majeures de ces techniques. Ces problèmes d'implantation peuvent être expliqués par un développement embryonnaire aberrant, combinant des causes génétiques et/ou épigénétiques.

Brdt est sans doute un facteur clé de la spermatogénèse, car cette protéine est probablement impliquée dans plusieurs étapes de reprogrammation de l'épigénome. Ainsi, des mutations au sein du gène *Brdt* ont été recherchées dans une cohorte d'hommes infertiles (Thevenon *et al*, manuscrit en préparation). Plusieurs variations ont été détectées spécifiquement chez les hommes infertiles. L'une d'entre elles est présente à l'état homozygote chez un patient, et mute un acide aminé situé dans un bromodomaine de Brdt. Des études fonctionnelles sont en cours afin de déterminer si cette mutation affecte la reconnaissance des lysines acétylées par Brdt.

On ne sait pas encore si une telle mutation peut conduire à la transmission d'une information épigénétique erronée lors de la fécondation. Cependant, cet exemple illustre la réalité des risques liés à l'utilisation massive des techniques d'AMP. En effet, une information épigénétique aberrante pourrait être transmise par l'ensemble de l'épigénome, au niveau du profil de méthylation de l'ADN, de la mise en place de structures chromatinienne particulières, des histones et de leurs

variants présents dans le spermatozoïde, sans oublier les autres facteurs protéiques et nucléiques transmis lors de la fécondation –notamment les petits ARN (Ostermeier *et coll.*, 2004 ; Ostermeier *et coll.*, 2005).

III.2. Épigénome spermatique et cancer

Des travaux anciens ont mis en évidence la présence, dans des sérums de patients cancéreux, d'anticorps dirigés contre des protéines de leurs cellules tumorales, et absentes des cellules somatiques (Knuth *et coll.*, 1984). Ces données offraient pour la première fois la perspective de vaccins anti-cellules tumorales utilisables en traitement anti-cancéreux. L'identification de ces protéines tumorales antigéniques a révélé qu'un grand nombre d'entre elles est exprimé normalement exclusivement dans les cellules germinales, au cours de la spermatogénèse. Elles ont été appelées « cancer testis antigens » (antigènes CT).

Plusieurs arguments sont en faveur d'une participation active des antigènes CT au cours de la tumorigénèse (Simpson *et coll.*, 2005). Certains antigènes CT sont spécifiques des spermatocytes et des spermatides. Comme nous venons de le voir, ces cellules sont le siège de réorganisations globales très importantes de leur génome, sans équivalent dans les cellules somatiques. L'expression illégitime, dans les cellules somatiques, des protéines testiculaires impliquées dans le remodelage de la chromatine pourrait avoir des conséquences dramatiques sur l'organisation et les fonctions du génome et de l'épigénome, et participer ainsi à la transformation cellulaire.

Par exemple, la protéine Spo11, qui induit des cassures double brins d'ADN lors de la méiose, est exprimée dans des cellules cancéreuses et pourrait faciliter des translocations chromosomiques (Keeney *et coll.*, 1997). L'antigène CT9 est la protéine BRDT elle-même, qui peut compacter la chromatine acétylée. Ainsi, une expression anormale de BRDT pourrait fortement perturber les fonctions génomiques impliquant l'acétylation des histones, en particulier la transcription des gènes. HSP70.2, impliquée dans l'incorporation de protéines basiques au sein de la chromatine, est également décrite comme nécessaire à la croissance et la survie de cellules tumorales (Daugaard *et coll.*, 2005). Enfin, un variant d'histone spécifique du testicule, H3t, a été identifié au sein de cellules cancéreuses (voir Introduction IV.2 et Govin *et coll.*, 2005).

Ainsi, les facteurs testiculaires organisant la chromatine des cellules germinales pourraient constituer une nouvelle classe d'antigènes CT. Une meilleure compréhension de leur rôle au cours de la spermatogénèse aiderait à mieux appréhender leur rôle dans la transformation et la

tumorigénèse. Enfin, l'identification de nouveaux antigènes CT pourrait être utilisée pour le dépistage et le diagnostic précoce en cancérologie : par exemple, il serait intéressant de déterminer si Npm3 et NAP1L4 sont dérégulés dans les processus de cancérisation.

CHAPITRE IV : CONCLUSION GENERALE

Il est connu depuis plus de vingt ans que l'information portée par le gamète maternel et le gamète paternel sont indispensables au bon développement de l'embryon, car un zygote formé avec deux pronoyaux de même origine ne se développe pas normalement (McGrath et Solter, 1984 ; Surani *et coll.*, 1984). Ainsi, l'information portée par l'épigénome des gamètes joue un rôle clé lors du développement embryonnaire.

Les cellules germinales reprogramment intégralement leur épigénome lors de leur différenciation en gamète. Malgré l'importance de cette restructuration, très peu de données apportent une vision fonctionnelle et intégrée des mécanismes mis en jeu.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont révélé plusieurs aspects de la dynamique de l'épigénome lors de la spermatogénèse. Le code des histones dans les cellules post méiotiques a été précisé, et dévoile un dialogue original entre les différentes modifications d'H4. De nouveaux variants d'histone participeraient à la mise en place d'une structure chromatinienne inédite. Enfin, la chromatine des régions de contrôle de l'empreinte parentale pourrait conditionner la transmission de l'empreinte paternelle.

Plusieurs mécanismes moléculaires sont proposés. Deux chaperons d'histones, Npm3 et NAP1L4, pourraient favoriser l'incorporation de variants d'histone au sein certains domaines chromatiniens. De plus, un chaperon moléculaire généraliste serait impliqué dans l'incorporation des protéines basiques spécifiques des derniers stades de la spermatogénèse.

Ce travail ouvre de nombreuses perspectives de travail. Le code des histones utilisé lors de la spermatogénèse ne se limite pas à une vague d'acétylation globale au stade VIII, mais semble être spécifique de chaque région chromatinienne. De plus, les rôles fonctionnels des vingt variants

d'histone identifiés dans des spermatides sont encore loin d'être tous connus. Enfin, de nombreuses protéines, associées à la chromatine dans les spermatides et identifiées par spectrométrie de masse, ont un rôle encore mystérieux.

Les conséquences directes de ces travaux touchent naturellement le domaine de la « dynamique de l'épigénome », mais ne sont pas limitées à la spermatogénèse. Ainsi, les implications médicales de ces travaux de recherche fondamentale concernent non seulement les pratiques médicales à l'assistance médicale à la procréation, mais aussi la lutte contre le cancer, ou le développement de nouvelles technologies comme le clonage thérapeutique.

CHAPITRE V : BIBLIOGRAPHIE

- Adenot P. G., Mercier Y., Renard J. P., Thompson E. M.** (1997) Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* **124**(22): 4615-25.
- Adham I. M., Nayernia K., Burkhardt-Gottges E., Topaloglu O., Dixkens C., Holstein A. F., Engel W.** (2001) Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol Hum Reprod* **7**(6): 513-520.
- Adkins M. W., Tyler J. K.** (2004) The histone chaperone Asf1p mediates global chromatin disassembly in vivo. *J Biol Chem* **279**(50): 52069-74.
- Ahmad K., Henikoff S.** (2002) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* **9**(6): 1191-200.
- Akey C. W., Luger K.** (2003) Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr Opin Struct Biol* **13**(1): 6-14.
- Akhmanova A., Miedema K., Wang Y., van Bruggen M., Berden J. H., Moudrianakis E. N., Hennig W.** (1997) The localization of histone H3.3 in germ line chromatin of Drosophila males as established with a histone H3.3-specific antiserum. *Chromosoma* **106**(6): 335-347.
- Albig W., Bramlage B., Gruber K., Klobeck H. G., Kunz J., Doenecke D.** (1995) The human replacement histone H3.3B gene (H3F3B). *Genomics* **30**(2): 264-272.
- Albig W., Ebentheuer J., Klobeck G., Kunz J., Doenecke D.** (1996) A solitary human H3 histone gene on chromosome 1. *Hum Genet* **97**(4): 486-491.
- Alekseev O. M., Widgren E. E., Richardson R. T., O'Rand M. G.** (2005) Association of NASP with HSP90 in mouse spermatogenic cells: stimulation of ATPase activity and transport of linker histones into nuclei. *J Biol Chem* **280**(4): 2904-11.
- Allen J. W., Dix D. J., Collins B. W., Merrick B. A., He C., Selkirk J. K., Poorman-Allen P., Dresser M. E., Eddy E. M.** (1996) HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma* **104**(6): 414-21.
- Almouzni G., Mechali M.** (1988) Assembly of spaced chromatin involvement of ATP and DNA topoisomerase activity. *Embo J* **7**(13): 4355-65.
- Amor D. J., Kalitsis P., Sumer H., Choo K. H.** (2004) Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol* **14**(7): 359-68.
- Anastasiou O., Mandelbaum J.** (2006) Risque épigénétique et assistance médicale à procréation. *Médecine de la Reproduction* **8**(3): 190-99.
- Angelov D., Molla A., Perche P. Y., Hans F., Cote J., Khochbin S., Bouvet P., Dimitrov S.** (2003) The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell* **11**(4): 1033-41.

- Aravin A., Gaidatzis D., Pfeffer S., Lagos-Quintana M., Landgraf P., Iovino N., Morris P., Brownstein M. J., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Chien M., Russo J. J., Ju J., Sheridan R., Sander C., Zavolan M., Tuschl T.** (2006) A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*.
- Aul R. B., Oko R. J.** (2001) The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis. *Dev Biol* **239**(2): 376-87.
- Avalos J. L., Bever K. M., Wolberger C.** (2005) Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol Cell* **17**(6): 855-68.
- Avery O. T., MacLeod C. M., McCarthy M.** (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* **79**: 137-158.
- Baarends W. M., Hoogerbrugge T. W., Roest H. P., Ooms M., Vreeburg J., Hoeijmakers J. H. J., Grootegoed J. A.** (1999) Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Develop Biol* **207**(2): 322-333.
- Balhorn R.** (1982) A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* **93**(2): 298-305.
- Baneres J. L., Martin A., Parello J.** (1997) The N tails of histones H3 and H4 adopt a highly structured conformation in the nucleosome. *J Mol Biol* **273**(3): 503-8.
- Barber M. C., Price N. T., Travers M. T.** (2005) Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. *Biochim Biophys Acta* **1733**(1): 1-28.
- Barlow C., Liyanage M., Moens P. B., Tarsounas M., Nagashima K., Brown K., Rottinghaus S., Jackson S. P., Tagle D., Ried T., Wynshaw-Boris A.** (1998) Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptoneura of prophase I. *Development* **125**(20): 4007-17.
- Beaujean N., Hartshorne G., Cavilla J., Taylor J., Gardner J., Wilmut I., Meehan R., Young L.** (2004) Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr Biol* **14**(7): R266-7.
- Beaujean N., Taylor J. E., McGarry M., Gardner J. O., Wilmut I., Loi P., Ptak G., Galli C., Lazzari G., Bird A., Young L. E., Meehan R. R.** (2004) The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20): 7636-40.
- Bellani M. A., Romanienko P. J., Cairatti D. A., Camerini-Otero R. D.** (2005) SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of Atm^{-/-} spermatocytes. *J Cell Sci* **118**(Pt 15): 3233-45.
- Belotserkovskaya R., Oh S., Bondarenko V. A., Orphanides G., Studitsky V. M., Reinberg D.** (2003) FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* **301**(5636): 1090-3.
- Belotserkovskaya R., Reinberg D.** (2004) Facts about FACT and transcript elongation through chromatin. *Curr Opin Genet Dev* **14**(2): 139-46.
- Benson L. J., Gu Y., Yakovleva T., Tong K., Barrows C., Strack C. L., Cook R. G., Mizzen C. A., Annunziato A. T.** (2006) Modifications of H3 and H4 during chromatin replication, nucleosome assembly, and histone exchange. *J Biol Chem* **281**(14): 9287-96.
- Bernstein B. E., Mikkelsen T. S., Xie X., Kamal M., Huebert D. J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Wernig M., Plath K., Jaenisch R., Wagschal A., Feil R., Schreiber S. L., Lander E. S.** (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**(2): 315-26.
- Bhattacharya S. K., Ramchandani S., Cervoni N., Szyf M.** (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* **397**(6720): 579-83.

- Blower M. D., Karpen G. H.** (2001) The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol* **3**(8): 730-9.
- Boeger H., Griesenbeck J., Strattan J. S., Kornberg R. D.** (2003) Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Mol Cell* **11**(6): 1587-98.
- Bourc'his D., Bestor T. H.** (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* **431**(7004): 96-9.
- Bowen N. J., Fujita N., Kajita M., Wade P. A.** (2004) Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes. *Biochim Biophys Acta* **1677**(1-3): 52-7.
- Bramlage B., Kosciessa U., Doenecke D.** (1997) Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation* **62**(1): 13-20.
- Brand M., Moggs J. G., Oulad-Abdelghani M., Lejeune F., Dilworth F. J., Stevenin J., Almouzni G., Tora L.** (2001) UV-damaged DNA-binding protein in the TFIIIC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation. *Embo J* **20**(12): 3187-96.
- Brenner C., Deplus R., Didelot C., Loriot A., Vire E., De Smet C., Gutierrez A., Danovi D., Bernard D., Boon T., Pelicci P. G., Amati B., Kouzarides T., de Launoit Y., Di Croce L., Fuks F.** (2005) Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *Embo J* **24**(2): 336-46.
- Burke T. W., Cook J. G., Asano M., Nevins J. R.** (2001) Replication factors MCM2 and ORC1 interact with the histone acetyltransferase HBO1. *J Biol Chem* **276**(18): 15397-408.
- Burlingame R. W., Love W. E., Wang B. C., Hamlin R., Nguyen H. X., Moudrianakis E. N.** (1985) Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å. *Science* **228**(4699): 546-53.
- Burma S., Chen B. P., Murphy M., Kurimasa A., Chen D. J.** (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**(45): 42462-7.
- Burns K. H., Viveiros M. M., Ren Y., Wang P., DeMayo F. J., Frail D. E., Eppig J. J., Matzuk M. M.** (2003) Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* **300**(5619): 633-6.
- Cairns B. R.** (2004) Around the world of DNA damage INO80 days. *Cell* **119**(6): 733-5.
- Calvin H. I., Bedford J. M.** (1971) Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* **13**(Suppl): 65-75.
- Camerini-Otero R. D., Felsenfeld G.** (1977) Histone H3 disulfide dimers and nucleosome structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5519-23.
- Candido E. P., Dixon G. H.** (1972) Amino-terminal sequences and sites of in vivo acetylation of trout-testis histones 3 and Iib 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(8): 2015-9.
- Cao R., Wang L., Wang H., Xia L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Jones R. S., Zhang Y.** (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**(5595): 1039-43.
- Caron C., Govin J., Rousseaux S., Khochbin S.** (2005) How to pack the genome for a safe trip. *Prog Mol Subcell Biol* **38**: 65-89.
- Caron C., Pivot-Pajot C., van Grunsven L. A., Col E., Lestrat C., Rousseaux S., Khochbin S.** (2003) Cdy1: a new transcriptional co-repressor. *EMBO Rep* **4**(9): 877-82.

- Carrozza M. J., Utley R. T., Workman J. L., Cote J.** (2003) The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* **19**(6): 321-9.
- Carthew R. W.** (2006) Gene regulation by microRNAs. *Curr Opin Genet Dev* **16**(2): 203-8.
- Celeste A., Fernandez-Capetillo O., Kruhlak M. J., Pilch D. R., Staudt D. W., Lee A., Bonner R. F., Bonner W. M., Nussenzweig A.** (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* **5**(7): 675-9.
- Celeste A., Petersen S., Romanienko P. J., Fernandez-Capetillo O., Chen H. T., Sedelnikova O. A., Reina-San-Martin B., Coppola V., Meffre E., Difilippantonio M. J., Redon C., Pilch D. R., Oлару A., Eckhaus M., Camerini-Otero R. D., Tessarollo L., Livak F., Manova K., Bonner W. M., Nussenzweig M. C., Nussenzweig A.** (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* **296**(5569): 922-927.
- Chadwick B. P., Valley C. M., Willard H. F.** (2001) Histone variant macroH2A contains two distinct macrochromatin domains capable of directing macroH2A to the inactive X chromosome. *Nucleic Acids Res* **29**(13): 2699-2705.
- Chadwick B. P., Willard H. F.** (2001) A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol* **152**(2): 375-84.
- Chakravarthy S., Gundimella S. K., Caron C., Perche P. Y., Pehrson J. R., Khochbin S., Luger K.** (2005) Structural characterization of the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol* **25**(17): 7616-24.
- Chang L., Loranger S. S., Mizzen C., Ernst S. G., Allis C. D., Annunziato A. T.** (1997) Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry* **36**(3): 469-80.
- Chargaff** (1950) *Experimentia* **6**: 201-209.
- Chaumeil J., Okamoto I., Guggiari M., Heard E.** (2002) Integrated kinetics of X chromosome inactivation in differentiating embryonic stem cells. *Cytogenet Genome Res* **99**(1-4): 75-84.
- Chen H. Y., Sun J. M., Zhang Y., Davie J. R., Meistrich M. L.** (1998) Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J Biol Chem* **273**(21): 13165-13169.
- Chen L., MacMillan A. M., Chang W., Ezaz-Nikpay K., Lane W. S., Verdine G. L.** (1991) Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Biochemistry* **30**(46): 11018-25.
- Chen Z., Zang J., Whetstine J., Hong X., Davrazou F., Kutateladze T. G., Simpson M., Mao Q., Pan C. H., Dai S., Hagman J., Hansen K., Shi Y., Zhang G.** (2006) Structural Insights into Histone Demethylation by JMJD2 Family Members. *Cell*.
- Cheung W. L., Ajiro K., Samejima K., Kloc M., Cheung P., Mizzen C. A., Beeser A., Etkin L. D., Chernoff J., Earnshaw W. C., Allis C. D.** (2003) Apoptotic Phosphorylation of Histone H2B Is Mediated by Mammalian Sterile Twenty Kinase. *Cell* **113**(4): 507-517.
- Cheung W. L., Turner F. B., Krishnamoorthy T., Wolner B., Ahn S. H., Foley M., Dorsey J. A., Peterson C. L., Berger S. L., Allis C. D.** (2005) Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* **15**(7): 656-60.
- Cho C., Willis W. D., Goulding E. H., Jung-Ha H., Choi Y. C., Hecht N. B., Eddy E. M.** (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* **28**(1): 82-86.
- Choi Y. C., Gu W., Hecht N. B., Feinberg A. P., Chae C. B.** (1996) Molecular cloning of mouse somatic and testis-specific H2B histone genes containing a methylated CpG island. *DNA Cell Biol* **15**(6): 495-504.

- Chow C. M., Georgiou A., Szutorisz H., Maia e Silva A., Pombo A., Barahona I., Dargelos E., Canzonetta C., Dillon N.** (2005) Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep* **6**(4): 354-60.
- 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): 745-56.
- Col E., Caron C., Chable-Bessia C., Legube G., Gazzeri S., Komatsu Y., Yoshida M., Benkirane M., Trouche D., Khochbin S.** (2005) HIV-1 Tat targets Tip60 to impair the apoptotic cell response to genotoxic stresses. *Embo J* **24**(14): 2634-45.
- Cosgrove M. S., Boeke J. D., Wolberger C.** (2004) Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1037-43.
- Costanzi C., Pehrson J. R.** (1998) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**(6685): 599-601.
- Costanzi C., Pehrson J. R.** (2001) MACROH2A2, a New Member of the MACROH2A Core Histone Family. *J. Biol. Chem.* **276**(24): 21776-21784.
- Couldrey C., Carlton M. B., Nolan P. M., Colledge W. H., Evans M. J.** (1999) A retroviral gene trap insertion into the histone 3.3A gene causes partial neonatal lethality, stunted growth, neuromuscular deficits and male sub-fertility in transgenic mice. *Hum Mol Genet* **8**(13): 2489-95.
- Courtens J. L., Biggiogera M., Rothfield N. F., Burnier M., Fakan S.** (1992) Migration of centromere proteins in rabbit spermatids. *Mol Reprod Dev* **32**(4): 369-77.
- Cremer T., Cremer C.** (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* **2**(4): 292-301.
- Cuthbert G. L., Daujat S., Snowden A. W., Erdjument-Bromage H., Hagiwara T., Yamada M., Schneider R., Gregory P. D., Tempst P., Bannister A. J., Kouzarides T.** (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**(5): 545-53.
- Dadoune J. P., Pawlak A., Alfonsi M. F., Siffroi J. P.** (2005) Identification of transcripts by microarrays, RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **11**(2): 133-40.
- Daugaard M., Jaattela M., Rohde M.** (2005) Hsp70-2 is required for tumor cell growth and survival. *Cell Cycle* **4**(7): 877-80.
- Davis T. L., Trasler J. M., Moss S. B., Yang G. J., Bartolomei M. S.** (1999) Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics* **58**(1): 18-28.
- Davuluri R. V., Grosse I., Zhang M. Q.** (2001) Computational identification of promoters and first exons in the human genome. *Nat Genet* **29**(4): 412-7.
- De Lucia F., Faraone-Mennella M. R., D'Erme M., Quesada P., Caiafa P., Farina B.** (1994) Histone-induced condensation of rat testis chromatin: testis-specific H1t versus somatic H1 variants. *Biochem Biophys Res Commun* **198**(1): 32-39.
- de Napoles M., Mermoud J. E., Wakao R., Tang Y. A., Endoh M., Appanah R., Nesterova T. B., Silva J., Otte A. P., Vidal M., Koseki H., Brockdorff N.** (2004) Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* **7**(5): 663-76.
- Debarle M., Martinage A., Sautiere P., Chevillier P.** (1995) Persistence of protamine precursors in mature sperm nuclei of the mouse. *Mol Reprod Dev* **40**(1): 84-90.

- Delaval K., Feil R.** (2004) Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* **14**(2): 188-95.
- Dix D. J., Allen J. W., Collins B. W., Mori C., Nakamura N., Poorman-Allen P., Goulding E. H., Eddy E. M.** (1996) Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3264-8.
- Dix D. J., Allen J. W., Collins B. W., Poorman-Allen P., Mori C., Blizard D. R., Brown P. R., Goulding E. H., Strong B. D., Eddy E. M.** (1997) HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* **124**(22): 4595-603.
- Domenjoud L., Fronia C., Uhde F., Engel W.** (1988) Sequence of human protamine 2 cDNA. *Nucleic Acids Res* **16**(15): 7733.
- Dorigo B., Schalch T., Bystricky K., Richmond T. J.** (2003) Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J Mol Biol* **327**(1): 85-96.
- Dorigo B., Schalch T., Kulangara A., Duda S., Schroeder R. R., Richmond T. J.** (2004) Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* **306**(5701): 1571-3.
- Downs J. A., Allard S., Jobin-Robitaille O., Javaheri A., Auger A., Bouchard N., Kron S. J., Jackson S. P., Cote J.** (2004) Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell* **16**(6): 979-90.
- Doyen C. M., An W., Angelov D., Bondarenko V., Mietton F., Studitsky V. M., Hamiche A., Roeder R. G., Bouvet P., Dimitrov S.** (2006) Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol* **26**(3): 1156-64.
- Drabent B., Bode C., Bramlage B., Doenecke D.** (1996) Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis. *Histochemistry Cell Biol* **106**(2): 247-251.
- Drabent B., Saftig P., Bode C., Doenecke D.** (2000) Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochemistry Cell Biol* **113**(6): 433-442.
- Duncan T., Trewick S. C., Koivisto P., Bates P. A., Lindahl T., Sedgwick B.** (2002) Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 16660-5.
- DuPraw E. J.** (1974) Quantitative constraints in the arrangement of human DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **38**: 87-98.
- Eddy E. M.** (1999) Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod* **4**(1): 23-30.
- Ehrenhofer-Murray A. E.** (2004) Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur J Biochem* **271**(12): 2335-49.
- Eirin-Lopez J. M., Frehlick L. J., Ausio J.** (2006) Long-term evolution and functional diversification in the members of the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Genetics*.
- Escalier D., Silvius D., Xu X.** (2003) Spermatogenesis of mice lacking CK2alpha': failure of germ cell survival and characteristic modifications of the spermatid nucleus. *Mol Reprod Dev* **66**(2): 190-201.
- Ezhkova E., Tansey W. P.** (2004) Proteasomal ATPases link ubiquitylation of histone H2B to methylation of histone H3. *Mol Cell* **13**(3): 435-42.
- Fan J. Y., Rangasamy D., Luger K., Tremethick D. J.** (2004) H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1alpha-mediated chromatin fiber folding. *Mol Cell* **16**(4): 655-61.

- Fang J., Chen T., Chadwick B., Li E., Zhang Y.** (2004) Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J Biol Chem* **279**(51): 52812-5.
- Fantz D. A., Hatfield W. R., Horvath G., Kistler M. K., Kistler W. S.** (2001) Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis. *Biol Reprod* **64**(2): 425-431.
- Felsenfeld G., Groudine M.** (2003) Controlling the double helix. *Nature* **421**(6921): 448-53.
- Filion G. J., Zhenilo S., Salozhin S., Yamada D., Prokhortchouk E., Defossez P. A.** (2006) A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol* **26**(1): 169-81.
- Fischle W., Tseng B. S., Dormann H. L., Ueberheide B. M., Garcia B. A., Shabanowitz J., Hunt D. F., Funabiki H., Allis C. D.** (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**(7071): 1116-22.
- Fischle W., Wang Y., Allis C. D.** (2003) Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* **425**(6957): 475-9.
- Fita I., Campos J. L., Puigjaner L. C., Subirana J. A.** (1983) X-ray diffraction study of DNA complexes with arginine peptides and their relation to nucleoprotamine structure. *J Mol Biol* **167**(1): 157-77.
- Fitzsimmons D. W., Wolstenholme G. E. W.** (1976) *The Structure and Function of Chromatin*.
- Flemming W.** (1882) *Zellsubstanz, Kern und Zellheilung*
F.C.W. Vogel, Leipzig.
- Fodor B. D., Kubicek S., Yonezawa M., O'Sullivan R. J., Sengupta R., Perez-Burgos L., Opravil S., Mechtler K., Schotta G., Jenuwein T.** (2006) Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev* **20**(12): 1557-62.
- Foltz D. R., Jansen L. E., Black B. E., Bailey A. O., Yates J. R., Cleveland D. W.** (2006) The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol* **8**(5): 458-69.
- Franke K., Drabent B., Doenecke D.** (1998) Testicular expression of the mouse histone H1.1 gene. *Histochem Cell Biol* **109**(4): 383-390.
- Funabiki H., Hagan I., Uzawa S., Yanagida M.** (1993) Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J Cell Biol* **121**(5): 961-76.
- Gao L., Cueto M. A., Asselbergs F., Atadja P.** (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* **277**(28): 25748-55.
- Gardiner-Garden M., Ballesteros M., Gordon M., Tam P. P.** (1998) Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol Cell Biol* **18**(6): 3350-6.
- Gatewood J. M., Cook G. R., Balhorn R., Bradbury E. M., Schmid C. W.** (1987) Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* **236**(4804): 962-4.
- Gatewood J. M., Cook G. R., Balhorn R., Schmid C. W., Bradbury E. M.** (1990) Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J Biol Chem* **265**(33): 20662-6.
- Gautier T., Abbott D. W., Molla A., Verdel A., Ausio J., Dimitrov S.** (2004) Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep* **5**(7): 715-20.
- Ge Y. Z., Pu M. T., Gowher H., Wu H. P., Ding J. P., Jeltsch A., Xu G. L.** (2004) Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *J Biol Chem* **279**(24): 25447-54.

- Gineitis A. A., Zalenskaya I. A., Yau P. M., Bradbury E. M., Zalensky A. O.** (2000) Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J Cell Biol* **151**(7): 1591-8.
- Girard A., Sachidanandam R., Hannon G. J., Carmell M. A.** (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*.
- Gjerset R., Gorka C., Hasthorpe S., Lawrence J. J., Eisen H.** (1982) Developmental and hormonal regulation of protein H1 degrees in rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(7): 2333-7.
- Goll M. G., Bestor T. H.** (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* **74**: 481-514.
- Goll M. G., Kirpekar F., Maggert K. A., Yoder J. A., Hsieh C. L., Zhang X., Golic K. G., Jacobsen S. E., Bestor T. H.** (2006) Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* **311**(5759): 395-8.
- Gotta M., Laroche T., Formenton A., Maillet L., Scherthan H., Gasser S. M.** (1996) The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **134**(6): 1349-63.
- Govin J., Caron C., Lestrat C., Rousseaux S., Khochbin S.** (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* **271**(17): 3459-69.
- Govin J., Caron C., Rousseaux S., Khochbin S.** (2005) Testis-specific histone H3 expression in somatic cells. *Trends Biochem Sci* **30**(7): 357-9.
- Govin J., Lestrat C., Caron C., Pivot-Pajot C., Rousseaux S., Khochbin S.** (2006) Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis. *Ernst Schering Res Found Workshop*(57): 155-72.
- Greaves I. K., Rangasamy D., Devoy M., Marshall Graves J. A., Tremethick D. J.** (2006) The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z, containing facultative heterochromatin, following meiosis. *Mol Cell Biol* **26**(14): 5394-405.
- Gregorette I. V., Lee Y. M., Goodson H. V.** (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* **338**(1): 17-31.
- Grigoryev S. A., Nikitina T., Pehrson J. R., Singh P. B., Woodcock C. L.** (2004) Dynamic relocation of epigenetic chromatin markers reveals an active role of constitutive heterochromatin in the transition from proliferation to quiescence. *J Cell Sci* **117**(Pt 25): 6153-62.
- Grimes S. R., Jr., Platz R. D., Meistrich M. L., Hnilica L. S.** (1975) Partial characterization of a new basic nuclear protein from rat testis elongated spermatids. *Biochem Biophys Res Commun* **67**(1): 182-189.
- Grimes S. R., Wolfe S. A., Anderson J. V., Stein G. S., Stein J. L.** (1990) Structural and functional analysis of the rat testis-specific histone H1t gene. *J Cell Biochem* **44**(1): 1-17.
- Grune T., Brzeski J., Eberharter A., Clapier C. R., Corona D. F., Becker P. B., Muller C. W.** (2003) Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Mol Cell* **12**(2): 449-60.
- Guillemette B., Bataille A. R., Gevry N., Adam M., Blanchette M., Robert F., Gaudreau L.** (2005) Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* **3**(12): e384.
- Gunjan A., Paik J., Verreault A.** (2005) Regulation of histone synthesis and nucleosome assembly. *Biochimie* **87**(7): 625-35.

- Gunjan A., Paik J., Verreault A.** (2006) The emergence of regulated histone proteolysis. *Curr Opin Genet Dev* **16**(2): 112-8.
- Gusse M., Chevaillier P.** (1980) Electron microscope evidence for the presence of globular structures in different sperm chromatins. *J Cell Biol* **87**(1): 280-4.
- Gusse M., Sautiere P., Belaiche D., Martinage A., Roux C., Dadoune J. P., Chevaillier P.** (1986) Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim Biophys Acta* **884**(1): 124-34.
- Hake S. B., Allis C. D.** (2006) Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: The "H3 barcode hypothesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6428-35.
- Hake S. B., Garcia B. A., Duncan E. M., Kauer M., Dellaire G., Shabanowitz J., Bazett-Jones D. P., Allis C. D., Hunt D. F.** (2006) Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J Biol Chem* **281**(1): 559-68.
- Harp J. M., Uberbacher E. C., Roberson A. E., Palmer E. L., Gewiess A., Bunick G. J.** (1996) X-ray diffraction analysis of crystals containing twofold symmetric nucleosome core particles. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **52**(Pt 2): 283-8.
- Hassan A. H., Prochasson P., Neely K. E., Galasinski S. C., Chandy M., Carrozza M. J., Workman J. L.** (2002) Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* **111**(3): 369-79.
- Hazzouri M., Pivot-Pajot C., Faure A. K., Usson Y., Pelletier R., Sele B., Khochbin S., Rousseaux S.** (2000) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**(12): 950-960.
- Heard E.** (2004) Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol* **16**(3): 247-55.
- Heard E.** (2005) Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev* **15**(5): 482-9.
- Hendrich B., Hardeland U., Ng H. H., Jiricny J., Bird A.** (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* **401**(6750): 301-4.
- Henikoff S., Ahmad K.** (2005) Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 133-53.
- Henry K. W., Wyce A., Lo W. S., Duggan L. J., Emre N. C., Kao C. F., Pillus L., Shilatifard A., Osley M. A., Berger S. L.** (2003) Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* **17**(21): 2648-63.
- Hirota T., Lipp J. J., Toh B. H., Peters J. M.** (2005) Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* **438**(7071): 1176-80.
- Hoek M., Stillman B.** (2003) Chromatin assembly factor 1 is essential and couples chromatin assembly to DNA replication in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(21): 12183-8.
- Holbert M. A., Marmorstein R.** (2005) Structure and activity of enzymes that remove histone modifications. *Curr Opin Struct Biol* **15**(6): 673-80.
- HoyerFender S., Costanzi C., Pehrson J. R.** (2000a) Histone MacroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Exp Cell Res* **258**(2): 254-260.
- Huang N., Negi S., Szebeni A., Olson M. O.** (2005) Protein NPM3 interacts with the multifunctional nucleolar protein B23/nucleophosmin and inhibits ribosome biogenesis. *J Biol Chem* **280**(7): 5496-502.

- Hubbert C., Guardiola A., Shao R., Kawaguchi Y., Ito A., Nixon A., Yoshida M., Wang X. F., Yao T. P.** (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**(6887): 455-8.
- Hutchins A. S., Mullen A. C., Lee H. W., Sykes K. J., High F. A., Hendrich B. D., Bird A. P., Reiner S. L.** (2002) Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator. *Mol Cell* **10**(1): 81-91.
- Hwang I., Chae C. B.** (1989) S-phase-specific transcription regulatory elements are present in a replication-independent testis-specific H2B histone gene. *Mol Cell Biol* **9**(3): 1005-1013.
- Iguchi N., Tanaka H., Yomogida K., Nishimune Y.** (2003) Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *Int J Androl* **26**(6): 354-365.
- Ito T., Bulger M., Kobayashi R., Kadonaga J. T.** (1996) Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol Cell Biol* **16**(6): 3112-24.
- Jacobson R. H., Ladurner A. G., King D. S., Tjian R.** (2000) Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* **288**(5470): 1422-5.
- Jacque J. M., Stevenson M.** (2006) The inner-nuclear-envelope protein emerlin regulates HIV-1 infectivity. *Nature* **441**(7093): 641-5.
- Jason L. J., Moore S. C., Lewis J. D., Lindsey G., Ausio J.** (2002) Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays* **24**(2): 166-174.
- Jeltsch A., Nellen W., Lyko F.** (2006) Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. *Trends Biochem Sci* **31**(6): 306-8.
- Joshi A. A., Struhl K.** (2005) Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol Cell* **20**(6): 971-8.
- Kasten M., Szerlong H., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Werner M., Cairns B. R.** (2004) Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *Embo J* **23**(6): 1348-59.
- Keeney S., Giroux C. N., Kleckner N.** (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**(3): 375-84.
- Kelly W. K., O'Connor O. A., Krug L. M., Chiao J. H., Heaney M., Curley T., MacGregore-Cortelli B., Tong W., Secrist J. P., Schwartz L., Richardson S., Chu E., Olgac S., Marks P. A., Scher H., Richon V. M.** (2005) Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* **23**(17): 3923-31.
- Kennedy B. P., Davies P. L.** (1980) Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins. *J Biol Chem* **255**(6): 2533-2539.
- Kennedy B. P., Davies P. L.** (1981) Phosphorylation of a group of high molecular weight basic nuclear proteins during spermatogenesis in the winter flounder. *J Biol Chem* **256**(17): 9254-9259.
- Keohane A. M., O'Neill L P., Belyaev N. D., Lavender J. S., Turner B. M.** (1996) X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. *Dev Biol* **180**(2): 618-30.
- Khadake J. R., Rao M. R.** (1995) DNA- and chromatin-condensing properties of rat testes H1a and H1t compared to those of rat liver H1bdec; H1t is a poor condenser of chromatin. *Biochemistry* **34**(48): 15792-15801.
- Khalil A. M., Boyar F. Z., Driscoll D. J.** (2004) Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16583-7.
- Khochbin S.** (2001) Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* **271**(1): 1-12.

- Khochbin S., Verdel A., Lemerrier C., Seigneurin-Berny D.** (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* **11**(2): 162-6.
- Khorasanizadeh S.** (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* **116**(2): 259-72.
- Kierszenbaum A. L., Tres L. L.** (1974) Nucleolar and perichromosomal RNA synthesis during meiotic prophase in the mouse testis. *J Cell Biol* **60**(1): 39-53.
- Kimmins S., Sassone-Corsi P.** (2005) Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* **434**(7033): 583-9.
- Klenova E. M., Morse H. C., 3rd, Ohlsson R., Lobanenko V. V.** (2002) The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* **12**(5): 399-414.
- Klose R. J., Bird A. P.** (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* **31**(2): 89-97.
- Klose R. J., 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**(7100): 312-6.
- Knoepfler P. S., Eisenman R. N.** (1999) Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* **99**(5): 447-50.
- Knuth A., Danowski B., Oettgen H. F., Old L. J.** (1984) T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(11): 3511-5.
- Kondo E., Gu Z., Horii A., Fukushige S.** (2005) The thymine DNA glycosylase MBD4 represses transcription and is associated with methylated p16(INK4a) and hMLH1 genes. *Mol Cell Biol* **25**(11): 4388-96.
- Kornberg R. D.** (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**(139): 868-71.
- Kossel A.** (1911) Ueber die chemische Beschaffenheit des Zellkerns. *Munchen Med. Wochenschrift* **58**: 65-69.
- Krawetz S. A.** (2005) Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet* **6**(8): 633-42.
- Kress C., Thomassin H., Grange T.** (2006) Active cytosine demethylation triggered by a nuclear receptor involves DNA strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Kumar G., Patel D., Naz R. K.** (1993) c-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cell Mol Biol Res* **39**(2): 111-7.
- Kusch T., Florens L., Macdonald W. H., Swanson S. K., Glaser R. L., Yates J. R., 3rd, Abmayr S. M., Washburn M. P., Workman J. L.** (2004) Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* **306**(5704): 2084-7.
- Kustatscher G., Hothorn M., Pugieux C., Scheffzek K., Ladurner A. G.** (2005) Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat Struct Mol Biol* **12**(7): 624-5.
- Ladurner A. G., Inouye C., Jain R., Tjian R.** (2003) Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell* **11**(2): 365-76.
- Lahn B. T., Tang Z. L., Zhou J., Barndt R. J., Parvinen M., Allis C. D., Page D. C.** (2002) Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13): 8707-12.

- Lee J., Inoue K., Ono R., Ogonuki N., Kohda T., Kaneko-Ishino T., Ogura A., Ishino F.** (2002) Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* **129**(8): 1807-17.
- Lee Y. H., O'Rand M. G.** (1993) Ultrastructural localization of a nuclear autoantigenic sperm protein in spermatogenic cells and spermatozoa. *Anat Rec* **236**(3): 442-8.
- Lewis J. D., Saperas N., Song Y., Zamora M. J., Chiva M., Ausio J.** (2004) Histone H1 and the origin of protamines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(12): 4148-52.
- Lewis J. D., Song Y., de Jong M. E., Bagha S. M., Ausio J.** (2003) A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* **111**(8): 473-482.
- Li A., Eirin-Lopez J. M., Ausio J.** (2005) H2AX: tailoring histone H2A for chromatin-dependent genomic integrity. *Biochem Cell Biol* **83**(4): 505-15.
- Li A., Maffey A. H., Abbott W. D., Conde e Silva N., Prunell A., Siino J., Churikov D., Zalensky A. O., Ausio J.** (2005) Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry* **44**(7): 2529-35.
- Li E., Bestor T. H., Jaenisch R.** (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**(6): 915-26.
- Lin Q., Inselman A., Han X., Xu H., Zhang W., Handel M. A., Skoultchi A. I.** (2004) Reductions in linker histone levels are tolerated in developing spermatocytes but cause changes in specific gene expression. *J Biol Chem*.
- Lin Q., Sirotkin A., Skoultchi A. I.** (2000) Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Mol Cell Biol* **20**(6): 2122-2128.
- Lippman Z., Gendrel A. V., Black M., Vaughn M. W., Dedhia N., McCombie W. R., Lavine K., Mittal V., May B., Kasschau K. D., Carrington J. C., Doerge R. W., Colot V., Martienssen R.** (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* **430**(6998): 471-6.
- Loppin B., Bonnefoy E., Anselme C., Laurencon A., Karr T. L., Couble P.** (2005) The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature* **437**(7063): 1386-90.
- Lorincz M. C., Dickerson D. R., Schmitt M., Groudine M.** (2004) Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1068-75.
- Loyola A., Almouzni G.** (2004) Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim Biophys Acta* **1677**(1-3): 3-11.
- Loyola A., LeRoy G., Wang Y. H., Reinberg D.** (2001) Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes Dev* **15**(21): 2837-51.
- Lucifero D., Mann M. R., Bartolomei M. S., Trasler J. M.** (2004) Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* **13**(8): 839-49.
- Luderus M. E., van Steensel B., Chong L., Sibon O. C., Cremers F. F., de Lange T.** (1996) Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J Cell Biol* **135**(4): 867-81.
- Luger K., Mader A. W., Richmond R. K., Sargent D. F., Richmond T. J.** (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**(6648): 251-60.
- Lusser A., Kadonaga J. T.** (2004) Strategies for the reconstitution of chromatin. *Nat Methods* **1**(1): 19-26.

- Maison C., Almouzni G.** (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4): 296-304.
- Maison C., Bailly D., Peters A. H., Quivy J. P., Roche D., Taddei A., Lachner M., Jenuwein T., Almouzni G.** (2002) Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* **30**(3): 329-34.
- Malik H. S., Henikoff S.** (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* **10**(11): 882-91.
- Marcon L., Boissonneault G.** (2004) Transient DNA Strand Breaks During Mouse and Human Spermiogenesis: New Insights in Stage Specificity and Link to Chromatin Remodeling. *Biol Reprod.*
- Margueron R., Trojer P., Reinberg D.** (2005) The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* **15**(2): 163-76.
- Marmorstein R., Roth S. Y.** (2001) Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* **11**(2): 155-61.
- Martens J. A., Winston F.** (2003) Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev* **13**(2): 136-42.
- Martianov I., Brancorsini S., Catena R., Gansmuller A., Kotaja N., Parvinen M., Sassone-Corsi P., Davidson I.** (2005) Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 2808-13.
- Martin C., Beaujean N., Brochard V., Audouard C., Zink D., Debey P.** (2006) Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development. *Dev Biol* **292**(2): 317-32.
- Marzluff W. F., Gongidi P., Woods K. R., Jin J., Maltais L. J.** (2002) The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics* **80**(5): 487-98.
- Mayer W., Niveleau A., Walter J., Fundele R., Haaf T.** (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**(6769): 501-2.
- McBryant S. J., Peersen O. B.** (2004) Self-association of the yeast nucleosome assembly protein 1. *Biochemistry* **43**(32): 10592-9.
- McGrath J., Solter D.** (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**(1): 179-83.
- McKittrick E., Gafken P. R., Ahmad K., Henikoff S.** (2004) Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(6): 1525-30.
- Meetei A. R., Ullas K. S., Vasupradha V., Rao M. R.** (2002) Involvement of protein kinase A in the phosphorylation of spermatidal protein TP2 and its effect on DNA condensation. *Biochemistry* **41**(1): 185-95.
- Meistrich M. L., Bucci L. R., Trostle-Weige P. K., Brock W. A.** (1985) Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Dev Biol* **112**(1): 230-340.
- Meistrich M. L., Mohapatra B., Shirley C. R., Zhao M.** (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* **111**(8): 483-488.
- Meistrich M. L., Trostle-Weige P. K., Lin R., Bhatnagar Y. M., Allis C. D.** (1992) Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol Reprod Dev* **31**(3): 170-181.
- Mellor J.** (2006) Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet.*

- Memili E., First N. L.** (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**(1): 87-96.
- Metivier R., Penot G., Hubner M. R., Reid G., Brand H., Kos M., Gannon F.** (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**(6): 751-63.
- Miescher F.** (1871) Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Hopple-Seyler, med chem Untersuch* **4**: 441-460.
- Mizuguchi G., Shen X., Landry J., Wu W. H., Sen S., Wu C.** (2004) ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**(5656): 343-8.
- Molenaar C., Wiesmeijer K., Verwoerd N. P., Khazen S., Eils R., Tanke H. J., Dirks R. W.** (2003) Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes. *Embo J* **22**(24): 6631-41.
- Morgan H. D., Santos F., Green K., Dean W., Reik W.** (2005) Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* **14 Spec No 1**: R47-58.
- Morillon A., Karabetsou N., Nair A., Mellor J.** (2005) Dynamic lysine methylation on histone H3 defines the regulatory phase of gene transcription. *Mol Cell* **18**(6): 723-34.
- Morison I. M., Ramsay J. P., Spencer H. G.** (2005) A census of mammalian imprinting. *Trends Genet* **21**(8): 457-65.
- Morrison A. J., Highland J., Krogan N. J., Arbel-Eden A., Greenblatt J. F., Haber J. E., Shen X.** (2004) INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* **119**(6): 767-75.
- Mosammamaparast N., Ewart C. S., Pemberton L. F.** (2002) A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *Embo J* **21**(23): 6527-38.
- Murr R., Loizou J. I., Yang Y. G., Cuenin C., Li H., Wang Z. Q., Hecceg Z.** (2006) Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* **8**(1): 91-9.
- Namekawa S. H., Park P. J., Zhang L. F., Shima J. E., McCarrey J. R., Griswold M. D., Lee J. T.** (2006) Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. *Curr Biol* **16**(7): 660-7.
- Ng H. H., Zhang Y., Hendrich B., Johnson C. A., Turner B. M., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Reinberg D., Bird A.** (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* **23**(1): 58-61.
- Nightingale K. P., O'Neill L. P., Turner B. M.** (2006) Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr Opin Genet Dev* **16**(2): 125-36.
- Nuber U. A., Kriaucionis S., Roloff T. C., Guy J., Selfridge J., Steinhoff C., Schulz R., Lipkowitz B., Ropers H. H., Holmes M. C., Bird A.** (2005) Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* **14**(15): 2247-56.
- O'Carroll D., Scherthan H., Peters A. H., Opravil S., Haynes A. R., Laible G., Rea S., Schmid M., Lebersorger A., Jerratsch M., Sattler L., Mattei M. G., Denny P., Brown S. D., Schweizer D., Jenuwein T.** (2000) Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol* **20**(24): 9423-9433.
- O'Neill L. P., Vermilyea M. D., Turner B. M.** (2006) Epigenetic characterization of the early embryo with a chromatin immunoprecipitation protocol applicable to small cell populations. *Nat Genet* **38**(7): 835-41.

- Ohkuni K., Shirahige K., Kikuchi A.** (2003) Genome-wide expression analysis of NAP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **306**(1): 5-9.
- Okada M., Cheeseman I. M., Hori T., Okawa K., McLeod I. X., Yates J. R., Desai A., Fukagawa T.** (2006) The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nat Cell Biol* **8**(5): 446-57.
- Okano M., Bell D. W., Haber D. A., Li E.** (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**(3): 247-57.
- Okuwaki M., Kato K., Shimahara H., Tate S., Nagata K.** (2005) Assembly and disassembly of nucleosome core particles containing histone variants by human nucleosome assembly protein I. *Mol Cell Biol* **25**(23): 10639-51.
- Olins A. L., Olins D. E.** (1974) Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* **183**(122): 330-2.
- Olins D. E., Olins A. L.** (2003) Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(10): 809-14.
- Oliva R., Dixon G. H.** (1991) Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **40**: 25-94.
- Oliva R., Mezquita C.** (1982) Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Res* **10**(24): 8049-8059.
- Olson M. O., Hingorani K., Szebeni A.** (2002) Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int Rev Cytol* **219**: 199-266.
- Ostermeier G. C., Goodrich R. J., Moldenhauer J. S., Diamond M. P., Krawetz S. A.** (2005) A suite of novel human spermatozoal RNAs. *J Androl* **26**(1): 70-4.
- Ostermeier G. C., Miller D., Huntriss J. D., Diamond M. P., Krawetz S. A.** (2004) Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* **429**(6988): 154.
- 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.
- Paik W. K., Kim S.** (1973) Enzymatic demethylation of calf thymus histones. *Biochem Biophys Res Commun* **51**(3): 781-8.
- Palladino F., Laroche T., Gilson E., Axelrod A., Pillus L., Gasser S. M.** (1993) SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* **75**(3): 543-55.
- Palmer D. K., O'Day K., Margolis R. L.** (1990) The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei. *Chromosoma* **100**(1): 32-6.
- Park E. J., Chan D. W., Park J. H., Oettinger M. A., Kwon J.** (2003) DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Res* **31**(23): 6819-27.
- Park Y. J., Chodaparambil J. V., Bao Y., McBryant S. J., Luger K.** (2005) Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J Biol Chem* **280**(3): 1817-25.
- Park Y. J., Luger K.** (2006) The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1248-53.
- Pavri R., Zhu B., Li G., Trojer P., Mandal S., Shilatfard A., Reinberg D.** (2006) Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* **125**(4): 703-17.

- Payne C., Braun R. E.** (2006) Histone lysine trimethylation exhibits a distinct perinuclear distribution in Plzf-expressing spermatogonia. *Dev Biol* **293**(2): 461-72.
- Pehrson J. R., Costanzi C., Dharja C.** (1997) Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes. *J Cell Biochem* **65**(1): 107-113.
- Pehrson J. R., Fried V. A.** (1992) MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* **257**(5075): 1398-400.
- Peters A. H., 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): 323-37.
- Phillips D. M., Johns E. W.** (1965) A Fractionation of the Histones of Group F2a from Calf Thymus. *Biochem J* **94**: 127-30.
- Pivot-Pajot C., Caron C., Govin J., Vion A., Rousseaux S., Khochbin S.** (2003) Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* **23**(15): 5354-65.
- Pogany G. C., Corzett M., Weston S., Balhorn R.** (1981) DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp Cell Res* **136**(1): 127-36.
- Polo S. E., Almouzni G.** (2006) Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours. *Curr Opin Genet Dev* **16**(2): 104-11.
- Prigent C., Dimitrov S.** (2003) Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* **116**(Pt 18): 3677-3685.
- Qiu C., Sawada K., Zhang X., Cheng X.** (2002) The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds. *Nat Struct Biol* **9**(3): 217-24.
- Quivy J. P., Roche D., Kirschner D., Tagami H., Nakatani Y., Almouzni G.** (2004) A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. *Embo J* **23**(17): 3516-26.
- Rabini S., Franke K., Saftig P., Bode C., Doenecke D., Drabent B.** (2000) Spermatogenesis in mice is not affected by histone H1.1 deficiency. *Exp Cell Res* **255**(1): 114-124.
- Raisner R. M., Hartley P. D., Meneghini M. D., Bao M. Z., Liu C. L., Schreiber S. L., Rando O. J., Madhani H. D.** (2005) Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* **123**(2): 233-48.
- Ramakrishnan V., Finch J. T., Graziano V., Lee P. L., Sweet R. M.** (1993) Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature* **362**(6417): 219-23.
- Rangasamy D., Berven L., Ridgway P., Tremethick D. J.** (2003) Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *Embo J* **22**(7): 1599-607.
- Rao B. J., Brahmachari S. K., Rao M. R.** (1983) Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *J Biol Chem* **258**(22): 13478-85.
- Raska I.** (2003) Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol* **13**(10): 517-25.
- Rasmussen T. P., Huang T., Mastrangelo M. A., Loring J., Panning B., Jaenisch R.** (1999) Messenger RNAs encoding mouse histone macroH2A1 isoforms are expressed at similar levels in male and female cells and result from alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **27**(18): 3685-3689.

- Rassoulzadegan M., Grandjean V., Gounon P., Vincent S., Gillot I., Cuzin F.** (2006) RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* **441**(7092): 469-74.
- Raukas E., Mikelsaar R. H.** (1999) Are there molecules of nucleoprotamine? *Bioessays* **21**(5): 440-8.
- Ray-Gallet D., Quivy J. P., Scamps C., Martini E. M., Lipinski M., Almouzni G.** (2002) HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell* **9**(5): 1091-100.
- Reese B. E., Bachman K. E., Baylin S. B., Rountree M. R.** (2003) The methyl-CpG binding protein MBD1 interacts with the p150 subunit of chromatin assembly factor 1. *Mol Cell Biol* **23**(9): 3226-36.
- Reinke H., Horz W.** (2003) Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol Cell* **11**(6): 1599-607.
- Richardson R. T., Batova I. N., Widgren E. E., Zheng L. X., Whitfield M., Marzluff W. F., O'Rand M. G.** (2000) Characterization of the histone H1-binding protein, NASP, as a cell cycle-regulated somatic protein. *J Biol Chem* **275**(39): 30378-86.
- Richmond T. J., Davey C. A.** (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* **423**(6936): 145-50.
- Richmond T. J., Finch J. T., Rushton B., Rhodes D., Klug A.** (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* **311**(5986): 532-7.
- Risley M. S.** (1990) *Chromatin organization in sperm*, CRC Press.
- Robinson P. J., Fairall L., Huynh V. A., Rhodes D.** (2006) EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6506-11.
- Robinson P. J., Rhodes D.** (2006) Structure of the '30nm' chromatin fibre: A key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol*.
- Rodriguez P., Munroe D., Prawitt D., Chu L. L., Bric E., Kim J., Reid L. H., Davies C., Nakagama H., Loebbert R., Winterpacht A., Petrucci M. J., Higgins M. J., Nowak N., Evans G., Shows T., Weissman B. E., Zabel B., Housman D. E., Pelletier J.** (1997) Functional characterization of human nucleosome assembly protein-2 (NAPIL4) suggests a role as a histone chaperone. *Genomics* **44**(3): 253-65.
- Rogakou E. P., Nieves-Neira W., Boon C., Pommier Y., Bonner W. M.** (2000) Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* **275**(13): 9390-5.
- Rogner U. C., Spyropoulos D. D., Le Novere N., Changeux J. P., Avner P.** (2000) Control of neurulation by the nucleosome assembly protein-1-like 2. *Nat Genet* **25**(4): 431-5.
- Ross E. D., Minton A., Wickner R. B.** (2005) Prion domains: sequences, structures and interactions. *Nat Cell Biol* **7**(11): 1039-44.
- Rountree M. R., Bachman K. E., Baylin S. B.** (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* **25**(3): 269-77.
- Rousseaux S., Caron C., Govin J., Lestrat C., Faure A. K., Khochbin S.** (2005) Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* **345**(2): 139-53.
- Rowley A., Singer R. A., Johnston G. C.** (1991) CDC68, a yeast gene that affects regulation of cell proliferation and transcription, encodes a protein with a highly acidic carboxyl terminus. *Mol Cell Biol* **11**(11): 5718-26.
- Ruhl D. D., Jin J., Cai Y., Swanson S., Florens L., Washburn M. P., Conaway R. C., Conaway J. W., Chrivia J. C.** (2006) Purification of a Human SRCAP Complex That Remodels Chromatin by Incorporating the Histone Variant H2A.Z into Nucleosomes. *Biochemistry* **45**(17): 5671-5677.

- Saha A., Wittmeyer J., Cairns B. R.** (2006) Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(6): 437-47.
- Sahasrabudde C. G., Van Holde K. E.** (1974) The effect of trypsin on nuclease-resistant chromatin fragments. *J Biol Chem* **249**(1): 152-6.
- Sansom O. J., Berger J., Bishop S. M., Hendrich B., Bird A., Clarke A. R.** (2003) Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis. *Nat Genet* **34**(2): 145-7.
- Santos F., Hendrich B., Reik W., Dean W.** (2002) Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* **241**(1): 172-82.
- Santos F., Peters A. H., Otte A. P., Reik W., Dean W.** (2005) Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev Biol* **280**(1): 225-36.
- Sarma K., Reinberg D.** (2005) Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2): 139-49.
- Sarraf S. A., Stancheva I.** (2004) Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell* **15**(4): 595-605.
- Schalch T., Duda S., Sargent D. F., Richmond T. J.** (2005) X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* **436**(7047): 138-41.
- Schoenherr C. J., Leorse J. M., Tilghman S. M.** (2003) CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. *Nat Genet* **33**(1): 66-9.
- Schwabish M. A., Struhl K.** (2006) Asf1 Mediates Histone Eviction and Deposition during Elongation by RNA Polymerase II. *Mol Cell* **22**(3): 415-22.
- Seigneurin-Berny D., Verdel A., Curtet S., Lemerrier C., Garin J., Rousseaux S., Khochbin S.** (2001) Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* **21**(23): 8035-44.
- Sharp J. A., Fouts E. T., Krawitz D. C., Kaufman P. D.** (2001) Yeast histone deposition protein Asf1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing. *Curr Biol* **11**(7): 463-73.
- Shaw P. J., Jordan E. G.** (1995) The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 93-121.
- Sherwood P. W., Osley M. A.** (1991) Histone regulatory (hir) mutations suppress delta insertion alleles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **128**(4): 729-38.
- Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstine J. R., Cole P. A., Casero R. A., Shi Y.** (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**(7): 941-53.
- Shirley C. R., Hayashi S., Mounsey S., Yanagimachi R., Meistrich M. L.** (2004) Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol Reprod* **71**(4): 1220-9.
- Shirohzu H., Kubota T., Kumazawa A., Sado T., Chijiwa T., Inagaki K., Suetake I., Tajima S., Wakui K., Miki Y., Hayashi M., Fukushima Y., Sasaki H.** (2002) Three novel DNMT3B mutations in Japanese patients with ICF syndrome. *Am J Med Genet* **112**(1): 31-7.
- Shogren-Knaak M., Ishii H., Sun J. M., Pazin M. J., Davie J. R., Peterson C. L.** (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**(5762): 844-7.

- Shroff R., Arbel-Eden A., Pilch D., Ira G., Bonner W. M., Petrini J. H., Haber J. E., Lichten M.** (2004) Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr Biol* **14**(19): 1703-11.
- Simpson A. J., Caballero O. L., Jungbluth A., Chen Y. T., Old L. J.** (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* **5**(8): 615-25.
- Simpson R. T.** (1978) Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* **17**(25): 5524-31.
- Singh J., Rao M. R.** (1987) Interaction of rat testis protein, TP, with nucleic acids in vitro. Fluorescence quenching, UV absorption, and thermal denaturation studies. *J Biol Chem* **262**(2): 734-740.
- Smit A. F., Riggs A. D.** (1996) Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4): 1443-8.
- Smith E. R., Pannuti A., Gu W., Steurnagel A., Cook R. G., Allis C. D., Lucchesi J. C.** (2000) The drosophila MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation. *Mol Cell Biol* **20**(1): 312-8.
- Stedman E., Stedman E.** (1947) The chemical nature and functions of components of cell nuclei not histone but protein. *Cold Spring Harbor Symp.* **12**: 224-236.
- Steger K., Klonisch T., Gavenis K., Drabent B., Doenecke D., Bergmann M.** (1998) Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* **4**(10): 939-945.
- Sterner D. E., Berger S. L.** (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 435-59.
- Stiff T., O'Driscoll M., Rief N., Iwabuchi K., Loblrich M., Jeggo P. A.** (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* **64**(7): 2390-6.
- Strahl B. D., Allis C. D.** (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765): 41-45.
- Su I. H., Tarakhovskiy A.** (2006) Lysine methylation and 'signaling memory'. *Curr Opin Immunol* **18**(2): 152-7.
- Suetake I., Shinozaki F., Miyagawa J., Takeshima H., Tajima S.** (2004) DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem* **279**(26): 27816-23.
- Sullivan T., Escalante-Alcalde D., Bhatt H., Anver M., Bhat N., Nagashima K., Stewart C. L., Burke B.** (1999) Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* **147**(5): 913-20.
- Sun Z. W., Allis C. D.** (2002) Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**(6893): 104-8.
- Sung P., Prakash S., Prakash L.** (1988) The RAD6 protein of *Saccharomyces cerevisiae* polyubiquitinates histones, and its acidic domain mediates this activity. *Genes Dev* **2**(11): 1476-1485.
- Surani M. A., Barton S. C., Norris M. L.** (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308**(5959): 548-50.
- Suto R. K., Clarkson M. J., Tremethick D. J., Luger K.** (2000) Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol* **7**(12): 1121-4.
- Sutton A., Bucaria J., Osley M. A., Sternglanz R.** (2001) Yeast ASF1 protein is required for cell cycle regulation of histone gene transcription. *Genetics* **158**(2): 587-96.

- Taddei A., Hediger F., Neumann F. R., Gasser S. M.** (2004) The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu Rev Genet* **38**: 305-45.
- Taddei A., Maison C., Roche D., Almouzni G.** (2001) Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol* **3**(2): 114-20.
- 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.
- Takahashi H., McCaffery J. M., Irizarry R. A., Boeke J. D.** (2006) Nucleocytosolic acetyl-coenzyme a synthetase is required for histone acetylation and global transcription. *Mol Cell* **23**(2): 207-17.
- Takami Y., Kikuchi H., Nakayama T.** (1999) 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* **274**(34): 23977-90.
- Tamada H., Van Thuan N., Reed P., Nelson D., Katoku-Kikyo N., Wudel J., Wakayama T., Kikyo N.** (2006) Chromatin decondensation and nuclear reprogramming by nucleoplasmin. *Mol Cell Biol* **26**(4): 1259-71.
- Tanaka H., Iguchi N., Isotani A., Kitamura K., Toyama Y., Matsuoka Y., Onishi M., Masai K., Maekawa M., Toshimori K., Okabe M., Nishimune Y.** (2005) HANP1/HIT2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol* **25**(16): 7107-19.
- Tanaka M., Hennebold J. D., Macfarlane J., Adashi E. Y.** (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): 655-64.
- Tanphaichitr N., Sobhon P., Taluppeth N., Chalermisarachai P.** (1978) Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* **117**(2): 347-56.
- Thoma F., Koller T., Klug A.** (1979) Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol* **83**(2 Pt 1): 403-27.
- Toth K. F., Mazurkiewicz J., Rippe K.** (2005) Association states of nucleosome assembly protein 1 and its complexes with histones. *J Biol Chem* **280**(16): 15690-9.
- Tovich P. R., Oko R. J.** (2003) Somatic histones are components of the perinuclear theca in bovine spermatozoa. *J Biol Chem* **278**(34): 32431-8.
- Tres L. L.** (2005) XY chromosomal bivalent: nucleolar attraction. *Mol Reprod Dev* **72**(1): 1-6.
- Trojer P., Reinberg D.** (2006) Histone lysine demethylases and their impact on epigenetics. *Cell* **125**(2): 213-7.
- Trostle-Weige P. K., Meistrich M. L., Brock W. A., Nishioka K.** (1984) Isolation and characterization of TH3, a germ cell-specific variant of histone 3 in rat testis. *J Biol Chem* **259**(14): 8769-8776.
- Tudor M., Akbarian S., Chen R. Z., Jaenisch R.** (2002) Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15536-41.
- Turner B. M.** (1993) Decoding the nucleosome. *Cell* **75**(1): 5-8.
- Turner B. M.** (2005) Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat Struct Mol Biol* **12**(2): 110-2.
- Turner J. M., Burgoyne P. S., Singh P. B.** (2001) M31 and macroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis. *J Cell Sci* **114**(Pt 18): 3367-3375.

- Tyler J. K., Collins K. A., Prasad-Sinha J., Amiott E., Bulger M., Harte P. J., Kobayashi R., Kadonaga J. T.** (2001) Interaction between the *Drosophila* CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. *Mol Cell Biol* **21**(19): 6574-84.
- Ullas K. S., Rao M. R.** (2003) Phosphorylation of rat spermatidal protein TP2 by sperm-specific protein kinase A and modulation of its transport into the haploid nucleus. *J Biol Chem* **278**(52): 52673-80.
- Umlauf D., Goto Y., Cao R., Cerqueira F., Wagschal A., Zhang Y., Feil R.** (2004) Imprinting along the Kcnq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nat Genet* **36**(12): 1296-300.
- Utley R. T., Lacoste N., Jobin-Robitaille O., Allard S., Cote J.** (2005) Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4. *Mol Cell Biol* **25**(18): 8179-90.
- Vagin V. V., Sigova A., Li C., Seitz H., Gvozdev V., Zamore P. D.** (2006) A Distinct Small RNA Pathway Silences Selfish Genetic Elements in the Germline. *Science*.
- Valencia-Sanchez M. A., Liu J., Hannon G. J., Parker R.** (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* **20**(5): 515-24.
- van Attikum H., Fritsch O., Hohn B., Gasser S. M.** (2004) Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* **119**(6): 777-88.
- van der Heijden G. W., Derijck A. A., Ramos L., Giele M., van der Vlag J., de Boer P.** (2006) Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol*.
- van Roijen H. J., Ooms M. P., Spaargaren M. C., Baarends W. M., Weber R. F., Grootegoed J. A., Vreeburg J. T.** (1998) Immunoexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Hum Reprod* **13**(6): 1559-1566.
- Verdel A., Curtet S., Brocard M. P., Rousseaux S., Lemercier C., Yoshida M., Khochbin S.** (2000) Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol* **10**(12): 747-9.
- Verdel A., Jia S., Gerber S., Sugiyama T., Gygi S., Grewal S. I., Moazed D.** (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* **303**(5658): 672-6.
- Verdel A., Khochbin S.** (1999) Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem* **274**(4): 2440-5.
- Verreault A.** (2000) De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev* **14**(12): 1430-1438.
- Verreault A., Kaufman P. D., Kobayashi R., Stillman B.** (1996) Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* **87**(1): 95-104.
- Vignali M., Steger D. J., Neely K. E., Workman J. L.** (2000) Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes. *Embo J* **19**(11): 2629-40.
- Wadhwa R., Taira K., Kaul S. C.** (2002) An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where? *Cell Stress Chaperones* **7**(3): 309-16.
- Wallace J. A., Orr-Weaver T. L.** (2005) Replication of heterochromatin: insights into mechanisms of epigenetic inheritance. *Chromosoma* **114**(6): 389-402.

- Wang L., Brown J. L., Cao R., Zhang Y., Kassis J. A., Jones R. S.** (2004) Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell* **14**(5): 637-46.
- Wang L., Mizzen C., Ying C., Candau R., Barlev N., Brownell J., Allis C. D., Berger S. L.** (1997) Histone acetyltransferase activity is conserved between yeast and human GCN5 and is required for complementation of growth and transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **17**(1): 519-27.
- Wang Y., Wysocka J., Sayegh J., Lee Y. H., Perlin J. R., Leonelli L., Sonbuchner L. S., McDonald C. H., Cook R. G., Dou Y., Roeder R. G., Clarke S., Stallcup M. R., Allis C. D., Coonrod S. A.** (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science* **306**(5694): 279-83.
- Watanabe T., Takeda A., Tsukiyama T., Mise K., Okuno T., Sasaki H., Minami N., Imai H.** (2006) Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev* **20**(13): 1732-43.
- Watson J. D., Crick F. H.** (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**(4356): 737-8.
- Watt F., Molloy P. L.** (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* **2**(9): 1136-43.
- Weiss A., Keshet I., Razin A., Cedar H.** (1996) DNA demethylation in vitro: involvement of RNA. *Cell* **86**(5): 709-18.
- Whetstone J. R., Nottke A., Lan F., Huarte M., Smolikov S., Chen Z., Spooner E., Li E., Zhang G., Colaiacovo M., Shi Y.** (2006) Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* **125**(3): 467-81.
- Williamson R.** (1970) Properties of rapidly labelled deoxyribonucleic acid fragments isolated from the cytoplasm of primary cultures of embryonic mouse liver cells. *J Mol Biol* **51**(1): 157-68.
- Wilson E. B.** (1896) *The cell in Development and Inheritance*, MacMillan, New York.
- Winston R. M., Hardy K.** (2002) Are we ignoring potential dangers of in vitro fertilization and related treatments? *Nat Cell Biol* **4** Suppl: s14-8.
- Witt O., Albig W., Doenecke D.** (1996) Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp Cell Res* **229**(2): 301-306.
- Wittmeyer J., Formosa T.** (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha catalytic subunit interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG1-like protein. *Mol Cell Biol* **17**(7): 4178-90.
- Wittschieben B. O., Otero G., de Bizemont T., Fellows J., Erdjument-Bromage H., Ohba R., Li Y., Allis C. D., Tempst P., Svejstrup J. Q.** (1999) A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell* **4**(1): 123-8.
- Wong E., Yang K., Kuraguchi M., Werling U., Avdievich E., Fan K., Fazzari M., Jin B., Brown A. M., Lipkin M., Edelmann W.** (2002) Mbd4 inactivation increases Cright-arrowT transition mutations and promotes gastrointestinal tumor formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 14937-42.
- Woodcock C. L., Safer J. P., Stanchfield J. E.** (1976) Structural repeating units in chromatin. I. Evidence for their general occurrence. *Exp Cell Res* **97**: 101-10.
- Woodland H. R., Adamson E. D.** (1977) The synthesis and storage of histones during the oogenesis of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **57**(1): 118-35.
- Wu C., Morris J. R.** (2001) Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* **293**(5532): 1103-5.

- Wu J. Y., Ribar T. J., Cummings D. E., Burton K. A., McKnight G. S., Means A. R. (2000) Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat Genet* **25**(4): 448-52.
- Wu W. H., Alami S., Luk E., Wu C. H., Sen S., Mizuguchi G., Wei D., Wu C. (2005) Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* **12**(12): 1064-71.
- Wykes S. M., Krawetz S. A. (2003) The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* **278**(32): 29471-7.
- Wyrobek A. J., Meistrich M. L., Furrer R., Bruce W. R. (1976) Physical characteristics of mouse sperm nuclei. *Biophys J* **16**(7): 811-25.
- Wysocka J., Allis C. D., Coonrod S. (2006) Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front Biosci* **11**: 344-55.
- Yamamoto T., Horikoshi M. (1997) Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60. *J Biol Chem* **272**(49): 30595-8.
- 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): 483-95.
- Yamazaki Y., Mann M. R., Lee S. S., Marh J., McCarrey J. R., Yanagimachi R., Bartolomei M. S. (2003) Reprogramming of primordial germ cells begins before migration into the genital ridge, making these cells inadequate donors for reproductive cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(21): 12207-12.
- Yan W., Ma L., Burns K. H., Matzuk M. M. (2003) HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10546-10551.
- Yang X. J., Gregoire S. (2005) Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol* **25**(8): 2873-84.
- Yang X. J., Ogryzko V. V., Nishikawa J., Howard B. H., Nakatani Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**(6589): 319-24.
- Yelick P. C., Balhorn R., Johnson P. A., Corzett M., Mazrimas J. A., Kleene K. C., Hecht N. B. (1987) Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Mol Cell Biol* **7**(6): 2173-9.
- Yoon H. G., Chan D. W., Reynolds A. B., Qin J., Wong J. (2003) N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell* **12**(3): 723-34.
- You A., Tong J. K., Grozinger C. M., Schreiber S. L. (2001) CoREST is an integral component of the CoREST-human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1454-8.
- Yu Y. E., Zhang Y., Unni E., Shirley C. R., Deng J. M., Russell L. D., Weil M. M., Behringer R. R., Meistrich M. L. (2000) Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Nat Acad Sci Usa* **97**(9): 4683-4688.
- Zalensky A. O., Siino J. S., Gineitis A. A., Zalenskaya I. A., Tomilin N. V., Yau P., Bradbury E. M. (2002) Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* **277**(45): 43474-43480.
- Zhang H., Roberts D. N., Cairns B. R. (2005) Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* **123**(2): 219-31.
- Zhang R., Poustovoitov M. V., Ye X., Santos H. A., Chen W., Daganzo S. M., Erzberger J. P., Serebriiskii I. G., Canutescu A. A., Dunbrack R. L., Pehrson J. R., Berger J. M., Kaufman P. D., Adams P. D. (2005) Formation

of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* **8**(1): 19-30.

Zhang Y., Griffin K., Mondal N., Parvin J. D. (2004) Phosphorylation of histone H2A inhibits transcription on chromatin templates. *J Biol Chem.*

Zhang Y., Li N., Caron C., Matthias G., Hess D., Khochbin S., Matthias P. (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *Embo J* **22**(5): 1168-79.

Zhao M., Shirley C. R., Mounsey S., Meistrich M. L. (2004) Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biol Reprod* **71**(3): 1016-25.

Zhao M., Shirley C. R., Yu Y. E., Mohapatra B., Zhang Y., Unni E., Deng J. M., Arango N. A., Terry N. H., Weil M. M., Russell L. D., Behringer R. R., Meistrich M. L. (2001) Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol* **21**(21): 7243-7255.

Zheng C., Hayes J. J. (2003) Structures and interactions of the core histone tail domains. *Biopolymers* **68**(4): 539-46.

Zhou Y. B., Gerchman S. E., Ramakrishnan V., Travers A., Muyldermans S. (1998) Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* **395**(6700): 402-5.

Zhu D., Dix D. J., Eddy E. M. (1997) HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development* **124**(15): 3007-14.

Zofall M., Persinger J., Kassabov S. R., Bartholomew B. (2006) Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome. *Nat Struct Mol Biol* **13**(4): 339-46.

CHAPITRE VI : ANNEXE

J'ai également participé à la rédaction de la revue écrite et publiée 2005 dans *Gene* (Rousseaux *et coll.*, 2005), présentée en annexe.

Review

Establishment of male-specific epigenetic information

Sophie Rousseaux*, Cécile Caron, Jérôme Govin, Cécile Lestrat,
Anne-Karen Faure, Saadi Khochbin

Unite INSERM U309, Institut Albert Bonniot, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex, France

Received 7 September 2004; received in revised form 11 November 2004; accepted 6 December 2004

Received by A.J. van Wijnen

Abstract

The setting of male-specific epigenetic information is a complex process, which involves a major global re-organisation, as well as localized changes of the nucleus structure during the pre-meiotic, meiotic and post-meiotic stages of the male germ cell differentiation. Although it has long been known that DNA methylation in targeted regions of the genome is associated with male-specific genomic imprinting, or that most core histones are hyperacetylated and then replaced by sperm-specific proteins during the post-meiotic condensation of the nucleus, many questions remain unanswered. How these changes interact, how they affect the epigenetic information and how the paternal epigenetic marks contribute to the future genome are indeed major issues remaining to be explored.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Chromatin remodelling; Histone acetylation; Mammalian; Spermatogenesis; Spermatid; Sperm nucleus; Protamines; Transition proteins

1. Introduction

Many cases of male infertility associated with a severe impairment of spermatogenesis are now successfully overcome by the technique of intracytoplasmic sperm injection (ICSI), where a spermatozoa of the patient is directly injected into the cytoplasm of his partner's oocyte. Hence, ICSI is nowadays a widely used method, and has allowed many azoospermic or severely oligozoospermic males to become biological fathers. However, very little is known on the risks of an abnormality in the ICSI offspring of such patients (Winston and Hardy, 2002). These include a genetic

risk due to the possible transmission of a genetic defect associated with the paternal infertility, as well as a risk linked to potential "epigenetic" consequences on the development of the embryo and the future individual. Concerning the latter, it is worth noticing that successful fertilizations have been obtained by injecting spermatozoa with an abnormal nuclear structure, or immature spermatozoa, or even their precursors, the spermatids (Ogura and Yanagimachi, 1995; Tesarik et al., 1995; Vanderzwalmen et al., 1998; Ogura et al., 1999; Yanagimachi, 1999). Moreover, recent studies have pointed out possible epigenetic abnormalities in children conceived by ICSI (Cox et al., 2002; De Rycke et al., 2002; DeBaun et al., 2003). A recent study suggests an association between abnormal sperm epigenetic information and altered spermatogenesis (Marques et al., 2004).

Therefore, understanding the events affecting the onset of paternal epigenetic information during spermatogenesis has become a crucial issue. It is now established that, during differentiation of the male gamete, the genome undergoes major changes not only affecting the DNA sequence and genetic information (homologous recombination), but also altering its nuclear structure and epigenetic information. The resulting sperm nucleus is packaged into a highly condensed

Abbreviations: BORIS, brother of the regulator of imprinted sites; BRDT, bromodomain testis-specific; CDYL, chromodomain Y-like; CIS cells, carcinoma in situ cells; CTCF, CCCTC binding factor; DMR, differentially methylated region; Dnmt, DNA methyltransferase; DSB, double strand break; H3K9, lysine 9 of histone H3; HAT, histone acetyl transferase; HDAC, histone deacetylase; HP1, heterochromatin protein 1; ICR, imprinting control region; ICSI, intracytoplasmic sperm injection; Pm, protamine; TNP, transition protein.

* Corresponding author. Tel.: +33 476 54 95 12; fax: +33 476 54 95 95.

E-mail address: sophie.rousseau@ujf-grenoble.fr (S. Rousseaux).

and specialized chromatin structure. The knowledge of the events and molecular mechanisms involved in chromatin re-organization during the main steps of spermatogenesis will provide a basis for a better understanding of important epigenetic modifications in the maturing male germinal cell, which might be altered in cases of defective spermatogenesis and therefore create a wrong environment for appropriate epigenetic information to be transmitted via the sperm nucleus.

The epigenetic information is conveyed by inherited modifications of the chromatin. In somatic cells, chromatin is organised in a nucleohistone structure, of which the basic unit of chromatin is the nucleosome. It consists of an octamer formed by two of each of the four core histones, H2A, H2B, H3 and H4 (MW 10,000–16,000), around which 146 base pairs of DNA are wrapped in 1.75 turns. The central portion of the fifth histone, H1 or linker histone, binds to the DNA as it enters and exits the nucleosome (Wolffe, 1995). In many processes requiring access to DNA, such as transcription or replication, the chromatin has to undergo a very complex and regulated remodelling of its structure. Several mechanisms can actively remodel localised regions of chromatin in somatic cells (Featherstone, 2002), involving factors capable of chromatin remodelling in an ATP-dependent fashion (Lusser and Kadonaga, 2003), enzymes chemically modifying some specific residues of the core histones by acetylation, methylation, phosphorylation or ubiquitination (Berger, 2002), or the incorporation of histones with different primary sequences, named histone variants, instead of conventional histones (Malik and Henikoff, 2003). Interestingly, two of the chromatin remodelling mechanisms described in somatic cells are involved in the global chromatin re-organisation during spermatogenesis: first the incorporation of histone variants and second a hyperacetylation of the core histones, which, unlike that observed in somatic cells, initially affects the whole spermatid nucleus (Lewis et al., 2003a).

Another well-known modification affecting chromatin structure and function is the methylation of the cytosines in CpG-rich regions of the genome. Generally, genes located downstream a highly methylated CpG promoter region are inactive, whereas demethylated CpG-rich promoter regions correspond to active genes. There are many CpG islands (regions enriched with CpGs) with tissue-dependent and differentially methylated regions (Shiota et al., 2002; Shiota, 2004). Differential DNA-methylation is involved in the regulation of transcription in several cellular processes, including parental imprinting, where one parental allele of the gene is expressed and the other is actively silenced (Kierszenbaum, 2002), and early embryonic development (Bourc'his et al., 2001a). During early foetal development, parental imprints are erased in primordial germ cells and then re-established during male and female gametogenesis.

This review aims to summarize our current knowledge on global and local chromatin events associated with the differentiation of the male gametes.

2. Overview of chromatin re-organization during spermatogenesis

During spermatogenesis, the genome undergoes major changes, including meiotic recombination and chromosome segregation directly affecting genetic information, as well as its post-meiotic packaging within a specific highly condensed chromatin structure. Indeed, meiotic recombination and random segregation of the paternal and maternal chromosomes of each pair into the new haploid germinal cells will ensure the genetic diversity of the species. They will also be specifically packaged for a safe transfer to the next generation. Important changes in chromatin structure are involved in the successive steps of this process, including the establishment of paternal imprints, meiotic recombination and post-meiotic chromatin re-organisation and condensation.

Spermatogenesis is the differentiation of germinal cells from spermatogonia to spermatozoa. Beginning at puberty, spermatogenesis is a continuous process, characterized by three major stages: pre-meiotic (or spermatogoniogenesis), meiotic and post-meiotic (or spermiogenesis) (for review, see Holstein et al., 2003). Spermatogonia divide by mitosis. They then enter meiosis by the formation of preleptotene primary spermatocytes, which replicate DNA and subsequently go through the leptotene, zygotene, pachytene and diplotene stages of the first meiotic division prophase. In pachytene spermatocytes, homologous chromosomes are paired and exchange DNA segments through a process of homologous recombination (or meiotic crossing-overs). This is helped by a number of proteins, which are localized in the sites of recombination along the paired chromosomes, in structures called synaptonemal complexes. The partial pairing of the X and Y chromosomes in their pseudo-autosomal region and their inactivation is a poorly understood specific feature of male meiosis, which involves some specific localized modifications of chromatin, including a “heterochromatinization”, in the so-called “sex-vesicle” (or X–Y body). Meiosis is also characterized by the replacement of somatic histones by variants, among which some are testis-specific. Meiotic I division yields secondary spermatocytes which then rapidly go through meiotic II division, generating haploid round spermatids (Hess, 1999). During its post-meiotic maturation, the spermatid undergoes a global remodelling of its nucleus, which elongates and compacts into the very unique nucleus structure of the spermatozoa (Balhorn et al., 1977; Balhorn, 1982; Ward and Coffey, 1991; Ward, 1994; Ward and Zalensky, 1996).

Hence, chromatin undergoes several dramatic changes during spermatogenesis, ranging from localized modifications related to imprinting and regulation of expression of specific genes, to heterochromatinization of specific regions such as the sex vesicle in spermatocytes, and global modifications, including the final histone to protamine exchange and condensation.

3. Establishment of male-specific genomic imprinting and DNA methylation

During gametogenesis, imprinted genes are epigenetically marked, so that in offspring they will be exclusively expressed from either the paternal or the maternal allele (Reik and Walter, 2001). Imprinting involves differential allele DNA methylation in one sex cell lineage (either paternal or maternal) but not in the other. DNA methylation takes place on cytosine residues that are present in dinucleotide motives consisting of a 5' cytosine followed by a guanosine (CpG) in the DMRs (differentially methylated regions) or ICRs (imprinting control regions), and requires the activity of DNA methyltransferases (Dnmts) (Burgers et al., 2002). In primordial germ cells, inherited imprinted genes erase their methylation imprints, and de novo monoallelic sex-specific methylation then takes place during gametogenesis (for review, see Mann, 2001; Kierszenbaum, 2002; Li, 2002). This latter process differs for male and female gametes. Indeed, while maternal methylation imprints are established during oocyte growth in the absence of DNA replication (Obata and Kono, 2002; Lucifero et al., 2004), the establishment of paternal-specific methylation is a continuous process occurring in mitotically dividing spermatogonial stem cell, as well as in the derived meiotically dividing spermatocytes (Davis et al., 1999, 2000; Kerjean et al., 2000; Ueda et al., 2000) (Fig. 1A). This developmental chronology of methylation imprints correlates with the potential of primary spermatocyte nuclei to generate offspring when they are microinjected into mature oocytes (Kimura et al., 1998).

Several questions are currently being explored. One of them concerns the enzymatic activity responsible for setting up a male-specific DNA methylation pattern during spermatogenesis.

3.1. DNA cytosine methyltransferases activity during spermatogenesis

In somatic cells, three distinct DNA cytosine methyltransferases (Dnmts) control DNA methylation patterns: Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b (Bird and Wolffe, 1999). Dnmt1 is known to be responsible for the maintenance of DNA methylation in somatic cells (Jaenisch and Bird, 2003). Dnmt3a and Dnmt3b are required for de novo methylation in embryonic stem cells and early post-implantation embryos (Okano et al., 1999). Interestingly, Dnmt3L, an isoform of Dnmt3a and Dnmt3b lacking enzymatic activity, interacts with Dnmt3a and Dnmt3b to modulate de novo methylation of imprinted genes in the female gamete (Bourc'his et al., 2001b; Hata et al., 2002; Margot et al., 2003). Its human homologue, DNMT3L, was recently shown to enhance the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b via a direct interaction (Suetake et al., 2004). A recent study shows expression profiles of Dnmt3a and Dnmt3L supportive of an involvement of the two

enzymes during prenatal germ cell development and de novo acquisition of DNA methylation patterns in male germ cells (La Salle et al., 2004). This is further supported by the observation that Dnmt3a—but not Dnmt3b—conditional mutant males show severely impaired spermatogenesis, including a complete absence of meiotic and post-meiotic cells, and lack of methylation at two of the three paternally imprinted loci examined in spermatogonia (Kaneda et al., 2004). Moreover, Dnmt3L being able to stimulate de novo methylation by Dnmt3a (Chedin et al., 2002), and Dnmt3L knockout mice showing a phenotype similar to that of Dnmt3a^{-/-} conditional mutants (Bourc'his et al., 2001b; Hata et al., 2002), Dnmt3L could be an important cofactor for Dnmt3a. Hence these data strongly suggest that de novo methylation is involved in the initiation of imprinting during male gametogenesis. However, during spermatogenesis, Dnmt3L could be involved in de novo methylation of genomic sequences other than ICRs and imprinted genes. Indeed, a recent study shows that Dnmt3L is responsible for de novo methylation of dispersed repeated sequences by the non-dividing precursors of spermatogonial stem cells, and that the inactivation of *Dnmt3L* induces an abnormal reactivation of the transcription of these retrotransposons in spermatogonia as well as meiotic failure in spermatocytes, leading to spermatogenesis arrest (Bourc'his and Bestor, 2004).

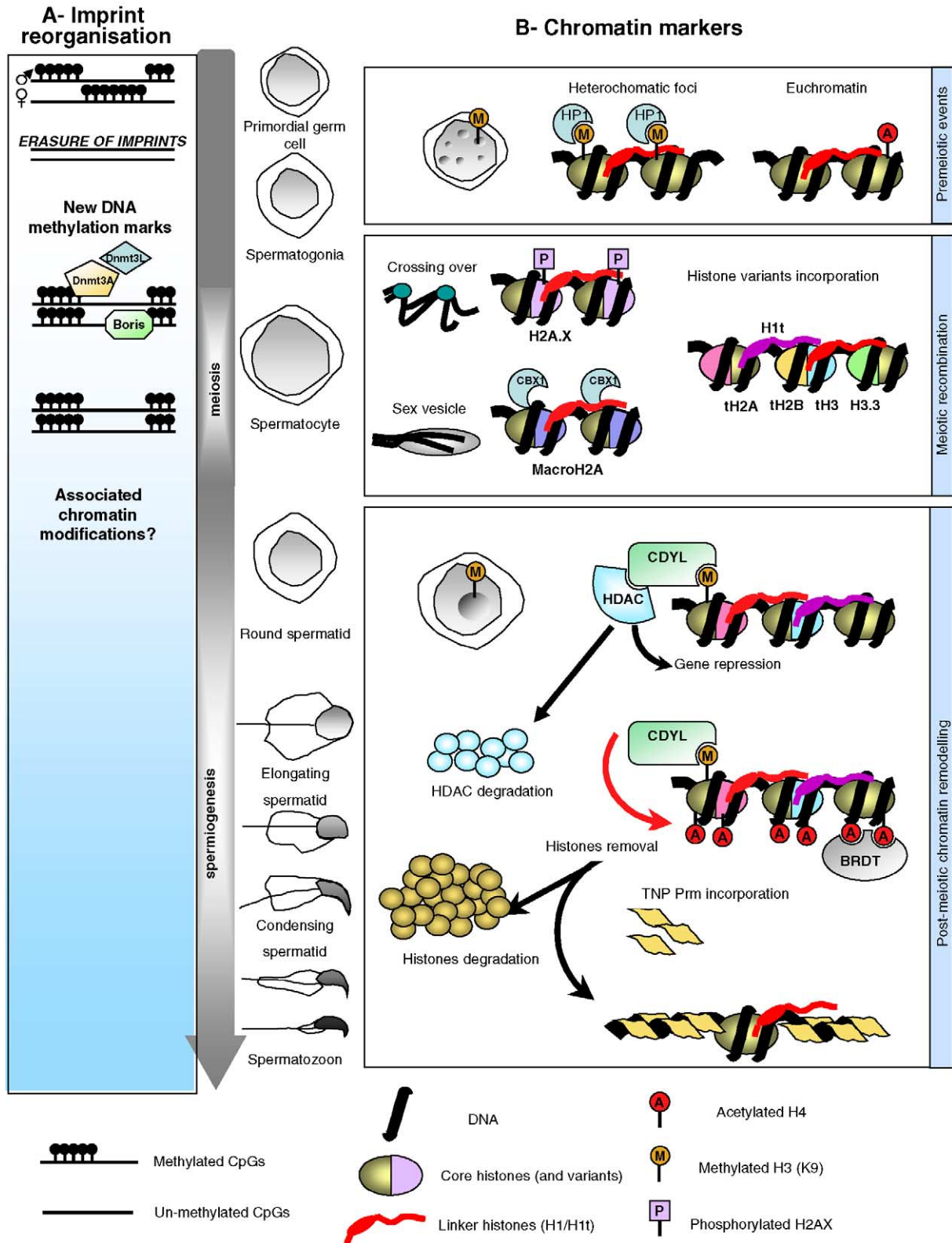
3.2. Mechanisms regulating male-specific imprinting

A second issue concerns the unknown nature of the factors responsible for directing this paternally specific DNA methylation to the ICRs in a germline-specific fashion. In theory, two types of factors could be involved: those protecting ICR from methylation and those targeting methylation to the ICR. A specific DNA binding activity that was restricted to the male germ line and enriched in neonatal testis was identified in the *H19/Igf2* ICR (Bowman et al., 2003). A factor, named BORIS (for brother of the regulator of imprinted sites), specifically expressed in the testis, could be directly involved in the resetting of methylation marks during male germ cell differentiation (Klenova et al., 2002; Loukinov et al., 2002). Indeed, BORIS shares the same 11 Zinc Finger domains (but harbours different amino and carboxy termini) as CTCF (CCCTC binding factor), a somatic regulator of the expression of imprinted genes, which binds to specific target DNA sequences and plays a general role in the maintenance of differential methylation patterns in somatic cells (Schoenherr et al., 2003; Rand et al., 2004). Functional data suggest that, during spermatogenesis, paternal-specific de novo DNA methylation could be associated with silencing of CTCF and activation of BORIS (Klenova et al., 2002). Indeed, sequential up-regulation of *BORIS* in CTCF-negative cells and of *CTCF* in BORIS-negative cells takes place in association with erasure and re-establishment of methylation marks,

respectively (Klenova et al., 2002). According to these data, BORIS could be participating in the early erasure of methylation marks (and could be associated with yet unknown DNA demethylases) as well as selectively occupy CTCF target sequences in the maternally methylated

ICRs, protecting them from being methylated (Loukinov et al., 2002).

Hence, from the above data, the establishment of paternal genomic imprinting during spermatogenesis has been clearly linked to the set-up of a male-specific de novo



methylation pattern in the ICRs, which happens in pre-meiotic cells and in early spermatocytes and involves the DNA methyltransferase Dnmt3a helped by its cofactor Dnmt3L. The factors involved in establishing the male-specificity of this methylation pattern are yet to be discovered.

3.3. Chromatin modifications associated with the set-up of male-specific genomic imprints

Another important issue is whether specific chromatin modifications are also associated to the establishment of male-specific imprinting. Several observations suggest that indeed they are. First, Dnmt3a and Dnmt3L are co-repressor proteins, which can recruit histone deacetylases (HDACs), suggesting that a transcriptionally repressed chromatin organisation through HDAC activity could be important for setting-up sex-specific genomic imprints (Fuks et al., 2001; Aapola et al., 2002; Deplus et al., 2002). Interestingly, a post-translational modification of Dnmt3a by sumoylation was recently shown to disrupt its ability to interact with histone deacetylases (HDAC1/2) and abolish its capacity to repress transcription (Ling et al., 2004), illustrating a potentially complex regulation of Dnmt3a's function.

A second argument for an involvement of chromatin modifications is that, in somatic cells, methylated DNA recruits methyl cytosine binding proteins, such as MeCP2, which themselves recruit HDACs containing co-repressor complexes (Ng and Bird, 1999; Drewell et al., 2002) and direct histone H3 lysine 9 methylation (Fuks et al., 2003).

A third observation linking DNA methylation and chromatin modifications is that Lsh (Lymphoid-specific helicase) (Geiman and Muegge, 2000), a protein belonging to the family of SNF2/helicases, is crucial for regulating both DNA methylation and histone H3 methylation, in several regions of the somatic genome, including those containing repetitive sequences (Dennis et al., 2001; Yan et al., 2003a).

A fourth indicative observation is that the DNA methylation status of the enhancer/promoter regions of *Oct4*, a transcription factor whose expression is restricted to totipotent and pluripotent cells, is linked to its chromatin structure, and in particular to histone acetylation (Hattori et al., 2004). Finally, a fifth supportive argument is that, in somatic cells, imprinted regions are associated with allelic-dependent specific chromatin features. Indeed, on the allele that carries DNA methylation, the ICRs analysed display H3 lysine 9 methylation and hypoacetylation on histones H3 and H4, whereas, on the allele without DNA methylation, chromatin is hyperacetylated and shows H3 lysine 4 methylation (Gregory et al., 2001; Fournier et al., 2002; Yang et al., 2003; Delaval and Feil, 2004). Hence, although chromatin modifications other than differential DNA methylation have not been directly observed in the regions of paternal imprinting during spermatogenesis, it is highly likely that they exist. Interestingly, it has been observed that imprinted genes are expressed biallelically during male (or female) germ cell development, suggesting that either the complete array of epigenetic modifications necessary for paternal- or maternal-specific expression is never in place in germ cells, or that it has no influence over the germ cell's transcriptional machinery (Szabo and Mann, 1995; Villar et al., 1995, discussed in Mann, 2001).

Hence, although DNA methylation could appear as the most likely candidate for conveying parental imprints to the future embryo, data in somatic cells provide evidence that an imprint is a dynamic entity, involving other epigenetic modifications. Moreover, it is known that there is active demethylation of the paternal genome just after fertilisation (Mayer et al., 2000), which suggests that a DNA methyl mark, acquired during spermatogenesis, could recruit a specific histone modification, which could in turn either protect this particular methyl mark from global demethylation (by recruiting a “protective” factor) or carry the imprinting information itself (and be converted into a methyl mark later during embryo development).

Fig. 1. Localized modifications associated with erasure and setting up of male-specific imprints (A) and global changes in chromatin composition during spermatogenesis (B). A: Localized modifications of DNA methylation are involved in the erasure and setting up of male-specific methylation on DMRs (differentially methylated regions) or ICRs (imprinting control regions), in pre-meiotic cells (primordial germ cells as well as in mitotically dividing spermatogonia. B: Global chromatin events are illustrated (i) in pre-meiotic cells; (ii) in pachytene spermatocytes during homologous chromosomes meiotic pairing and cross-overs, sex chromosomes partial pairing and inactivation in the sex vesicle; (iii) in round spermatids during genome global transcriptional inactivation; (iv) in elongating and condensing spermatids during chromatin condensation histones removal and replacement with transition proteins and protamines. Most core and linker histone variants are incorporated during meiosis. Several non-testis-specific core histone variants might play a role during meiosis (see text). Testis-specific core histone variants, including TH2A (Trostle-Weige et al., 1982), TH2B (Hwang and Chae, 1989; Choi and Chae, 1998; Zalensky et al., 2002), tH3 (Albig et al., 1996; Witt et al., 1996), as well as linker histone variants H1t (Drabent et al., 1993, 2000; Lin et al., 2000, 2004) and HILS (Iguchi et al., 2003; Yan et al., 2003b) are probably involved during post-meiotic chromatin re-organization. Several factors might play important roles in the post-meiotic chromatin events including histone deacetylases (HDACs), a chromodomain-containing protein (CDYL) (Caron et al., 2003) and bromodomain-containing proteins, such as BRDT (Pivot-Pajot et al., 2003). According to our current data, the following hypothesis could explain the interplay between these factors and the global chromatin remodelling observed during the spermatids maturation. In round spermatids, CDYL could be recruited to the chromatin via the binding of its “chromodomain” to the methylated lysine 9 of histone H3 (meK9H3). CDYL would initially recruit HDACs themselves actively deacetylating the lysines of the core histones N-terminal tails, thereby contributing to the global silencing of the genes observed at the end of the round spermatids stage. HDACs would then be massively degraded (as shown by Caron et al., 2003), which would allow a yet unknown HAT activity to massively acetylate histone lysine residues, resulting in the global hyperacetylation observed in the elongating spermatids. Bromodomain-containing proteins would then be recruited via their binding to acetylated lysine residues, and would then, either directly or via the recruitment of other factors, contribute to the global chromatin condensation, histone removal and/or degradation, and transition proteins (TNPs) and protamines (Prm) incorporation.

A strong hint for a role of chromatin in conveying specific paternal epigenetic information comes from the highly specific structure of the sperm nucleus. The paternal genetic information will be transmitted to the next generation, via this highly differentiated and transcriptionally silent haploid cell. There is also evidence that the sperm nucleus harbours paternal-specific epigenetic information crucial to pre and post-natal development. Although most proteins constitutive of the sperm nucleus are protamines, it appears that the sperm nucleus presents a heterogeneous structure. This heterogeneity could be the basic support of male-specific epigenetic information.

4. The heterogeneous structure of the sperm nucleus

In the sperm nucleus, the mammalian haploid genome is packaged into a highly compact structure, containing protamines and some remaining histones. An obvious function for the nucleoprotamine structure would be to provide a safe environment, resistant to mutagenic physical and or chemical agents, so that the paternal genetic information can be conveyed unmodified to the female gamete. However, its heterogeneity, and in particular the presence of somatic-like histone-containing regions of chromatin, suggest other important functions to the sperm-specific nuclear structure.

The heterogeneity of the sperm nucleus is the result of a dual nucleoprotamine/nucleohistone structure, which is defined by two groups of DNA-associated proteins, the sperm-specific basic proteins or protamines, and some less abundant somatic-like histones and histone variants.

4.1. Protamines and the nucleoprotamine structure

Protamines are low molecular mass and highly basic proteins associated to nuclear DNA in the spermatozoa, responsible for the DNA being packaged in a very compact manner (Wouters-Tyrou et al., 1998; Lewis et al., 2003b). Mammalian protamines are related to the classic protamines (from fish) (Poccia, 1986; Wouters-Tyrou et al., 1998; Lewis et al., 2003b). Interestingly, recent evidence suggests that protamines could have originated from linker histone H1 (Lewis et al., 2004). In most mammals, the sperm nuclei contain only one protamine called Prm1, an arginine- and cysteine-rich polypeptide of about 50 residues, of which the sequence appears fairly well conserved from species to species (Ammer et al., 1986; Balhorn et al., 1987; Oliva and Dixon, 1991; Lee and Cho, 1999). In a few mammals, including man and mouse, a second class of protamines called Prm2 are also present in sperm nuclei. The most important difference between Prm1 and Prm2 protamines concerns the biosynthesis of Prm2 protamines during spermiogenesis (Yelick et al., 1987; Wouters-Tyrou et al., 1998), whereas Prm1 protamines undergo limited post-translational modifications, e.g. phosphorylation, the Prm2

protamines are the result of a proteolytic processing of a larger precursor. During nucleoprotamine assembly, protamines undergo a variety of chemical alterations, including phosphorylation and dephosphorylation (Marushige and Marushige, 1975), disulfide bond formation (Calvin and Bedford, 1971) and, as mentioned above, proteolytic processing of protamine 2 (Yelick et al., 1987). Purification of the different nuclear basic proteins from human sperm has allowed to show that protamines 1 and 2 remain phosphorylated and two phosphorylated forms of human protamine 1 have been isolated (Chirat et al., 1993).

In vivo studies in mice show that both protamines are necessary for post-meiotic chromatin condensation.

It has indeed been shown that premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious condensation of spermatid nuclear DNA, abnormal head morphogenesis and incomplete processing of Prm2 protein (Lee et al., 1995). Moreover, in mice hemizygous for the transgene, it causes dominant male sterility, which in some cases is accompanied by a complete arrest in spermatid differentiation. These observations suggest that correct temporal synthesis of Prm1 is a requirement for the transition from nucleohistones to nucleoprotamines.

Cho et al. (2001) have shown that both protamines are essential for normal sperm function, and that haploinsufficiency caused by a targeted disruption of one allele of either protamine 1 or protamine 2 results in a reduced amount of the respective protein, an abnormal processing of protamine 2 and prevents genetic transmission of both mutant and wild-type alleles. Moreover, using single cell DNA electrophoresis (comet assay) and ultrastructural analysis, the authors have further demonstrated a direct correlation between haploinsufficiency of protamine 2 and spermatozoa with damaged DNA and a reduced compaction of chromatin (Cho et al., 2003). The use of protamine 2 deficient sperm for intracytoplasmic injection (ICSI) of metaphase II mouse eggs showed that, although most eggs were reactivated, only few were able to develop to the blastocyst stage. According to these results, protamine 2 would be essential for maintaining the integrity of sperm chromatin and early embryo development.

The phosphorylation of protamines has also been shown to be essential. Indeed, mutation of the calmodulin-dependent protein kinase Camk4, which phosphorylates protamine 2, results in defective spermiogenesis and male sterility (Wu and Means, 2000; Wu et al., 2000).

The structure of nucleoprotamine is significantly different from that of nucleosomes. Essentially complete neutralization of DNA negative charge by basic amino acids, present in fish as well as mammalian protamines, results in a tight packaging of DNA. X-ray diffraction of fish sperm nuclei indicates that nucleoprotamine is nearly crystalline (see Risley, 1990). Mammalian nucleoprotamine is less regular than that in fish (Balhorn, 1982), but it is highly stabilized by disulfide bonds, which form between neighbouring protamines (Calvin and Bedford, 1971). Balhorn

(1982) has proposed a model for the structure of the mammalian DNA-protamine complex: the central polyarginine segment of protamine would bind in the minor groove of DNA, cross-linking and neutralizing the phosphodiester backbone, while the C- and N-terminal ends of protamine would participate in the formation of inter- and intra-protamine hydrogen, hydrophobic and disulfide bonds. According to this model, each protamine segment would be of sufficient length to fill one turn of DNA, and adjacent protamines would be locked in place around DNA by multiple disulfide bridges. However, this model is not compatible with the data from Fita et al. (1983) where it was suggested that protamine is bound to the major groove of DNA. Another model has recently been proposed for the nucleoprotamine structure in which protamine molecules would be located in “channels” between the DNA molecules (Raukas and Mikelsaar, 1999).

4.2. Sperm histones and nucleohistone containing regions

Several mammalian species retain a dual nucleohistone/nucleoprotamine organization within their sperm chromatin including human (Gatewood et al., 1987) and mouse (Pittoggi et al., 1999). Indeed, the human sperm nucleus retains about 15% of the usual haploid histone complement and also contains a heterogeneous mixture of protamines (Balhorn et al., 1987) and other basic proteins (Tanphaichitr et al., 1978; Ammer et al., 1986; Gusse et al., 1986; Balhorn et al., 1987). Electron microscopy of spread human sperm chromatin has resolved globular structures, which correspond in size to nucleosomes (Gusse and Chevallier, 1980;

Wagner and Yun, 1981; Sobhon et al., 1982). Gatewood et al. (1987) have demonstrated that the nucleohistone and nucleoprotamine portions of human sperm chromatin form discrete structures, which are, at least partly, sequence-specific. Using high performance liquid chromatography, Gatewood et al. (1990) have purified the four core histones from mature human sperm chromatin including H2A (as well as its variant H2A.X and trace amounts of H2A.Z), H4 (all four acetylated H4 forms as well as unacetylated H4), H3.1 and H3.3 (with multiple bands suggesting acetylation), H2B (one major band and three minor bands) (illustrated in Fig. 2). More recently, a human testis/sperm-specific histone H2B, hTSH2B, was identified (Zalensky et al., 2002), which was found located at the basal nuclear area of a subpopulation (20%) of mature sperm. Interestingly, this histone variant associates with a telomere-binding activity, suggesting a possible role during post-fertilization sperm nucleus decondensation. Other—yet unknown—sperm-specific minor histone variants could also have crucial epigenetic functions before, during and/or after fertilization.

A challenging issue is to understand how the specific nucleoprotamine/nucleohistone structure of the sperm nucleus conveys epigenetic information and how it controls early embryonic events. This question has not been answered yet.

The relationship between function and nuclear organization has been well established in somatic cells (Cremer and Cremer, 2001). Although a few studies have described the position of chromosomes and sub-chromosomal regions within the sperm nucleus (Zalensky et al., 1995, 2000; Hazzouri et al., 2000b; Zalenskaya and Zalensky, 2002), the

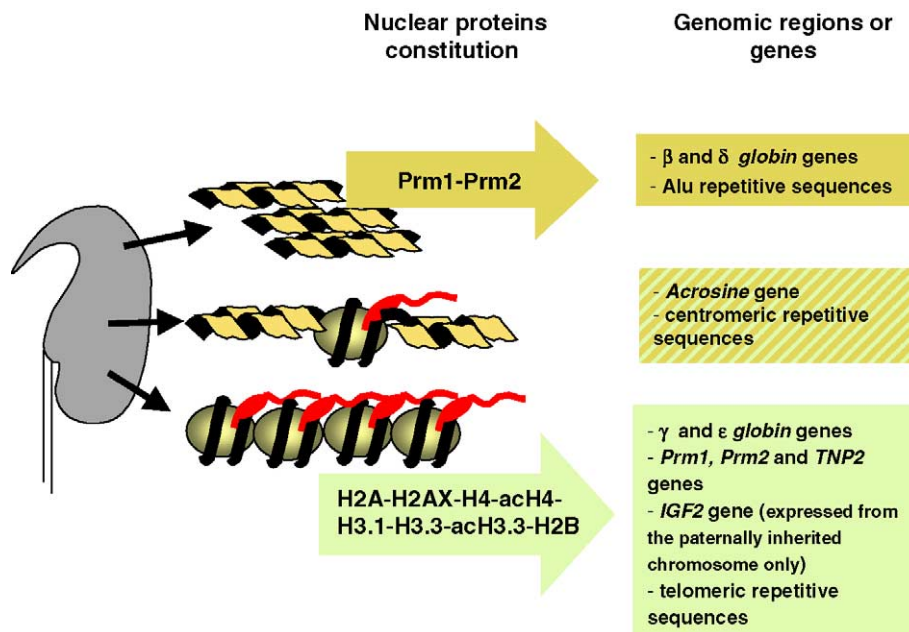


Fig. 2. schematic representation of the sperm heterogeneous nuclear structure. Specific genomic regions or genes have been assigned to regions of the sperm nucleus containing either protamines (Prm1 and Prm2, respectively, protamines 1 and 2, indicated by the top arrow) or nucleosomes (with somatic histone and their variants indicated by the bottom arrow). The acrosine gene and the centromeric repetitive sequences (in hatched box) were shown to be associated with both protamine- and histone-rich regions.

functional significance of a specific sperm nuclear architecture remains to be clearly defined. Ward and collaborators have suggested that an intact sperm nuclear matrix is critical for both sperm function and early development (Ward and Coffey, 1990; Ward and Zalensky, 1996; Ward et al., 1999, 2000).

4.3. Are specific genomic regions associated with a specific nuclear structure in the sperm cell?

Whether the nucleohistone/nucleoprotamine dual structure corresponds to a specific differential arrangement of chromatin regions according to potential functions remains to be explored. A few pioneer studies argue in favour of this hypothesis (see Fig. 2).

Gardiner-Garden et al. (1998) have first examined the chromatin structure in human sperm of several members of the beta-globin gene family, which are expressed at different times in development. Interestingly, they have found that the genes coding for epsilon and gamma globin, which are active in the embryonic yolk sac, are within nucleosomal regions of the sperm nucleus, whereas the beta- and delta-globin genes, which are silent in the embryonic yolk sac, are within the non histone-associated regions.

Using a similar PCR-based method, Wykes and collaborators have recently shown that the genomic region containing the three human *PRM1–PRM2–TNP2* genes, which forms a DnaseI sensitive conformation in pachytene spermatocytes as well as in mature spermatozoa (Kramer et al., 1998, 2000), is histone-enriched (Wykes and Krawetz, 2003). Moreover, they have also observed that the imprinted *IGF2* gene and the telomeric repetitive sequences are also histone-rich, whereas the beta-globin and Alu sequences are protamine-enriched, and the acrosin gene and centromeric sequences contain a mixture of histones and protamines (Wykes and Krawetz, 2003). Hence, the presence of genomic islands that maintain a somatic-like chromatin structure despite the global transition into the nucleoprotamine structure during spermiogenesis could correspond to an essential mark for the establishment of adequate epigenetic information in the offspring. A detailed study of the chromatin features associated with specific genomic regions in the sperm nucleus will help defining these epigenetic marks.

The heterogeneous sperm nucleus structure is the result of a series of events affecting chromatin during meiotic and post-meiotic stages of spermatogenesis. It is important to investigate these events in order to understand how a disturbed spermatogenesis could lead to the production of spermatozoa carrying inappropriate epigenetic information. Our current knowledge about several aspects of these events is summarised below. Although only partial, these findings can be used as starting points for further research aiming to make functional links between the sequence of events and the final epigenetic message conveyed by the sperm nucleus.

5. Chromatin events and molecular mechanisms responsible for the final organization of the sperm nucleus

5.1. Meiosis-related global and localized chromatin events: incorporation of core histone variants and specific core histone modifications

The process of meiosis reduces a diploid cell to four haploid gametes and is accompanied by extensive recombination (for review, see Forsburg, 2002). The “pachytene checkpoint” monitors events specific to meiosis, such as recombination and chromosome synapsis, which are critical for proper meiotic chromosome segregation. Meiotic DNA replication (S phase) is followed by chromosome pairing, recombination and synapsis. The first division (MI) is reductional: it separates the newly recombined homologs from one another, leaving sister chromatids attached. The second, equational, division (MII) is more typical of mitotic divisions in which the sister chromatids segregates (Nasmyth, 2001; Forsburg, 2002). Whereas DNA recombination and chromosome segregation have both been explored in terms of mechanistic and genetic consequences, not much is known about the associated chromatin events and their epigenetic consequences. Descriptive studies have shown that the nucleosome undergoes important changes during meiosis, due to the incorporation of histone variants (non-allelic isoforms of major core or linker histones, which are produced throughout the cell cycle) as well as to post-translational histone modifications. The potential functional implications of these variants and modification of histones during meiosis will not be detailed here, since they have been recently reviewed (see Lewis et al., 2003a; Caron et al., 2004; Govin et al., 2004). As an example, the H2AX variant of core histone H2A, and its phosphorylated form, might be directly involved in DNA cleavage and recombination between homologous chromosomes (Mahadevaiah et al., 2001; Celeste et al., 2002; Hamer et al., 2003). Histone H3 phosphorylation (Wei et al., 1998; Prigent and Dimitrov, 2003), and CenpA (Smith, 2002), both involved in chromosome condensation and/or segregation during mitosis, are present and likely to be involved during meiotic segregation. No clear meiotic function has been identified for any of the known testis-specific variants of the core histones, which are also described elsewhere (Govin et al., 2004).

Interestingly, several arguments suggest a specific role for H3 K9 methylation during meiosis. First, methylated H3-K9 is detected at several pre-meiotic and meiotic stages (Peters et al., 2001). Second, the double knock-out of histone H3 lysine 9-selective methyltransferases, Suv39h1 and Suv39h2, in addition to chromosomal instability and increased tumour frequency results in a severe impairment of male meiosis associated with non-homologous chromosome interactions, delayed synapsis and meiotic I missegregation (Peters et al., 2001). The specific role(s) of heterochromatin and of histone methyl-

ation in directing and/or regulating meiotic events remains to be investigated.

Very recently, roles for posttranslational histone modifications in promoting double strand breaks (DSBs) formation and initiating meiotic recombination have been discussed, in the light of very exciting new observations made in non-mammalian models (Maleki and Keeney, 2004). For instance in *C. elegans*, the factor HIM-17 was shown to be essential for DSBs formation as well as for proper accumulation of histone H3 methylation at lysine 9 on meiotic prophase chromosomes (Reddy and Villeneuve, 2004). In *S. cerevisiae*, a deletion of the SET1 gene (Set1 is a histone methyltransferase that methylates H3 on its lysine 4) significantly reduces DSBs formation at several recombination hotspots (Sollier et al., 2004). In another study, elimination of Rad6, an ubiquitin-conjugating enzyme, Br1, an E3 ubiquitin ligase, or the ubiquitin acceptor lysine on histone H2B, each delays or reduces the frequency of DSBs (Yamashita et al., 2004), suggesting that ubiquitination of histone H2B is also important for DSBs formation. Since Rad6 dependent ubiquitination of H2B was shown to be required for methylation of H3 on its lysine 4 (Fischle et al., 2003), these two events could be linked together. The mechanisms by which these posttranslational modifications act as key contributors to the formation of DSBs remain to be discovered. A hypothesis is that these modifications could differentially affect hot and cold spots of meiotic recombination and induce mechanical constraints on the meiotic chromosomes, either promoting or preventing DSBs in the respective regions (Petes, 2001; Kleckner et al., 2004). Whether differential modifications of chromatin structure in hot and cold spots of meiotic recombination also contribute to the establishment and/or maintenance of the paternal epigenetic marks has not been addressed yet.

Some specific chromatin modifications are associated with the sex vesicle. Their study might shed light on the potential roles of this very particular feature of male meiosis. The large H2A variant, macroH2A1.2, together with the heterochromatin protein 1 (HP1) homolog Cbx-rs1 (chromobox-related sequence 1 in the mouse, CBX1 in the human), is associated with the sex vesicle and probably important for its heterochromatinization (Motzkus et al., 1999; HoyerFender et al., 2000a,b; Turner et al., 2001; Hoyer-Fender, 2003). Other chromatin modifications specific to the X–Y male meiotic sex body were observed, such as an absence of histone H4 underacetylation (in contrary to the female somatic inactivated X, which shows underacetylated H4) (Armstrong et al., 1997), increased levels of histone H2A ubiquitination (Baarends et al., 1999), or the incorporation of the H2AX variant (Fernandez-Capetillo et al., 2003; Hamer et al., 2003), which seem to be required for chromatin remodelling and sex chromosome inactivation. Interestingly, although its precise function during the meiotic process is still unknown, the presence of the sex vesicle seems to be crucial for spermatogenesis to proceed. Indeed in males with an extra X chromosome (somatic

karyotype 47,XXY), spermatogenesis is severely impaired (De Braekeleer and Dao, 1991; Okada et al., 1999), possibly through an absent or an abnormal sex vesicle (Vidal et al., 1984). Similarly, in males carrying constitutional balanced chromosomal structural abnormalities, it has been observed that the frequency of association of the abnormal chromosomes with the sex vesicle could be directly correlated with spermatogenesis impairment (Luciani et al., 1984; Delobel et al., 1998). Another intriguing and unexplained feature of the sex vesicle is that it is frequently associated with the bivalent of human chromosome 15 (whose pericentromeric region contains a large imprinted domain) during normal male meiosis (MetzlerGuillemain et al., 1999), but the consequences of this association are unknown.

It is also worth reminding here that, during meiosis, an intense transcriptional activity takes place (Sassone-Corsi, 2002). Since transcription will stop in post-meiotic cells, it is assumed that highly transcribed genes during meiosis are those encoding factors involved not only in meiosis, but also in post-meiotic stages. As suggested by studies in somatic cells, this high transcriptional activity is likely to be associated with specific chromatin characteristics, which are described and discussed elsewhere (Caron et al., 2004). The mechanisms involved in the complex transcriptional and post-transcriptional regulation of the testis-specific factors are beyond the scope of this review, and are thoroughly described elsewhere (Hecht, 1988a,b; Nayernia et al., 1996; Steger, 1999; Braun, 2000a,b; Kleene, 2001).

5.2. Known actors of histone removal and replacement during spermatids elongation/condensation

In post-meiotic cells, the chromatin nucleosomal structure undergoes a global re-organization. It is generally assumed that, in post-meiotic cells, most histones are removed, exchanged with the so called “transition proteins” (TNPs), which are themselves later replaced by the sperm-specific nuclear proteins, the protamines. Despite much research, most of our knowledge today concerning post-meiotic chromatin remodelling comes from descriptive approaches as well as from a few in vitro molecular experiments. Several events of this global chromatin re-organisation have been extensively described, and key actors of this remodelling can be found at each step. However, the underlying molecular mechanisms remain unclear.

Prior to histone removal, two specific events affect the nucleosome: the incorporation of histone variants and an increased acetylation of the core histones tails. It has been postulated that these two modifications could result in a looser nucleosomal structure, and facilitate the recruitment of factors and complexes further involved in histone replacement (Govin et al., 2004) (see Fig. 1B). Histone acetylation may also serve as a complex signalling system. Indeed, a recent observation suggests that the wave of global core histone acetylation could be involved in cross-talks between Sertoli cells and germinal cells, and that it

could be disturbed in severe spermatogenesis defects, as well as in testicular cancer (Faure et al., 2003). Indeed, the analysis of testis sections of men with severely impaired spermatogenesis showed that, in tubules devoid of germinal cells (including Sertoli Cells Only Syndromes or SCOs) or lacking spermatocytes and spermatids, the Sertoli cells nuclei were intensely labelled with anti-acetylated H4 antibodies. Moreover, in testis biopsies performed in the context of different types of testicular cancer, a similar histone hyperacetylation of Sertoli cells was observed in the peri-tumoral seminiferous tubules, including those containing carcinoma in situ (CIS) cells, whenever they were lacking germinal cells (Faure et al., 2003). This observation is highly interesting since it is the first evidence that a global histone acetylation could be involved in an inter-cellular cross-talk signalling pathway. It also suggests a possible link between the disturbance of a global epigenetic event and the genesis of testicular cancer.

The classic view is that subsequent to histone removal, the transition nuclear proteins (TNPs) are incorporated in the spermatids nucleus. This is supported by the fact that during the steps of spermiogenesis between histone removal and the deposition of the protamines, TNPs constitute 90% of the chromatin basic proteins in mammals (for review, see Poccia and Collas, 1996; Wouters-Tyrou et al., 1998; Meistrich et al., 2003). Despite numerous studies describing their expression during spermiogenesis and their in vitro functional properties (Singh and Rao, 1987, 1988; Baskaran and Rao, 1990; Akama et al., 1998; Levesque et al., 1998; Brewer et al., 2002), their possible function has only recently been approached in vivo, thanks to the production of mice with targeted deletions of the TNPs encoding genes.

Transition proteins are generally more basic than histones and less basic than protamines. In mammals, several TNPs have been characterized. In boar, bull, man, mouse, ram and rat, this family consists of four proteins, TNP1–4, of which TNP1 and TNP2 are best characterized. In the mouse, it was recently shown that both TNPs appear before histone displacement is complete, and that their presence overlap during spermiogenesis (Zhao et al., 2004b). During human spermatogenesis, the TNP1 protein occurred in the nuclei of step 3 and step 4 spermatids. The TNP2 protein was observed in the nuclei of spermatids from step 1 to step 5 (Steger et al., 1998). Although their time of appearance during spermiogenesis suggests that they actively contribute to the process of post-meiotic sperm nuclear packaging, the molecular basis of their action has not been unravelled yet.

The potential functions of TNPs have been extensively investigated in vitro, leading to several, sometimes contradictory, conclusions regarding their condensing/relaxing properties towards DNA molecules or nucleosomal cores.

Experimental disruption of the major TNP genes, *TNP1* (Yu et al., 2000) or *TNP2* (Adham et al., 2001; Zhao et al., 2001), produces subfertile KO mice, with an abnormal processing of protamine 2 (which is normally produced from a large precursor, subsequently undergoing a proteo-

lytic maturation) and insufficient nuclear condensation. Recent data show that the absence of one TNP affects the displacement of the other TNP, leading to its abnormal retention (Zhao et al., 2004b). By examining the effect of the nine possible combinations of heterozygous and homozygous *TNP1* and/or *TNP2* null mutations, Shirley and collaborators have observed a general decrease in normal morphology, motility and chromatin condensation, as well as in protamine 2 processing, with decreasing global levels of transition proteins in epididymal spermatozoa from mutant mice, suggesting some functional redundancy between TNP1 and TNP2 (Shirley et al., 2004). Moreover, the fact that sperm from double heterozygous males (*TNP1*–/+, *TNP2*–/+) show fewer abnormalities than sperm from males homozygous for a single *TNP*-null mutation suggests that the redundancy of TNPs function is only partial.

Interestingly, since DNA strand breaks have been observed during spermiogenesis in rat, mouse and human elongating spermatids (McPherson and Longo, 1992, 1993; Boissonneault, 2002; Marcon and Boissonneault, 2004), another role was suggested for TNPs in repairing these DNA strand breaks (Caron et al., 2001; Kierszenbaum, 2001), assigning TNPs to a crucial function in ensuring the integrity of the sperm DNA.

Potential roles of TNPs in removing and/or degrading histones, directing protamine incorporation, targeting specific chromosomal regions, recruiting complexes, etc. remain unexplored. This knowledge would shed light on potential epigenetic consequences of the absence or mutation of one or both TNPs. Following ICSI with testicular spermatids from mice lacking both TNPs, Shirley and collaborators observed that the success rates of fertilization were divided by three compared to wild-type mice, and that fewer pre-implantation embryos were developing until the morula/blastocyst stage (Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004a).

Although these events are generally described as affecting the entire volume of the nucleus, it is likely that they sequentially affect specific regions of the genome. For instance, it was observed that hyperacetylated H4 is particularly abundant in the heterochromatin-like DAPI-dense central region of the elongating spermatid's nucleus (Hazzouri et al., 2000a). Moreover, a re-localisation of specific chromosomal regions, during meiosis as well as post-meiotic maturation, has been suggested by the few in situ studies carried out on testicular germinal cells (Scherthan et al., 1996, 1998; Meyer-Ficca et al., 1998). The fact that specific chromosome regions themselves could also be involved in chromatin re-organisation is a particularly interesting feature of post-meiotic chromatin remodelling. During rat spermiogenesis, pericentromeric regions were shown to begin tandem associations in round spermatids, and then form elongated clusters in early elongating spermatids, which remain until the sperm nucleus achieves maturation, whereas telomeres have a tendency to associate

pair-wise (Meyer-Ficca et al., 1998). The significance of this specific pattern is unknown. A hypothesis is that specific regions of the genome could—through the binding of specific factors—participate in the initiation and direct further chromatin remodelling (Fuentes-Mascorro et al., 2000). This dynamic distribution of specific chromosome regions could also affect processes involved in modifying the epigenetic environment of given genomic regions. The localization of other specific regions of the genome, such as those containing non-coding stretches of repetitive sequences or imprinted genes, with respect to specific chromatin features, still remains to be investigated. How these regions associate with modified chromatin regions has not been explored yet.

6. Conclusion

Thanks to new assisted reproductive technologies, including intracytoplasmic sperm injection (ICSI), men with severe spermatogenesis impairments can become biological fathers. An important issue is whether the germinal cell used for ICSI is conveying appropriate genetic and epigenetic information. However, to date, there is a huge lack of data concerning which information is epigenetically transmitted to the offspring and how. The sperm nucleus structural heterogeneous constitution is likely to be the basis of the male-specific epigenetic information, which will be transmitted to the next generation. It is the result of major chromatin re-organisations occurring during meiotic and post-meiotic stages of spermatogenesis. How these events relate to the setting up of male-specific epigenetic information, which, upon fertilization, will be conveyed to the offspring by the very unique sperm nucleus is an issue remaining to be explored. To date, our knowledge on the molecular mechanisms involved is only partial, but several potential key actors have been identified thanks to the study of mutated mice as well as to recent data obtained in the field of chromatin research.

Acknowledgments

We would like to thank John Green for his help with English language. Our work is supported by Région Rhone-Alpes (“Emergence” program) and by INSERM (“Assistance Médicale à la Procréation” program). CC is recipient of an INSERM grant. CL is recipient of a Region Rhone-Alpes PhD fellowship.

References

Aapola, U., Liiv, I., Peterson, P., 2002. Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.* 30, 3602–3608.

Adham, I.M., et al., 2001. Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol. Hum. Reprod.* 7, 513–520.

Akama, K., Sato, H., Hasegawa, S., Shimada, I., Nakano, M., 1998. Transition protein 1 from boar late spermatid nuclei having DNA-melting activity is a dimeric protein. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 44, 315–323.

Albig, W., Ebentheuer, J., Klobeck, G., Kunz, J., Doenecke, D., 1996. A solitary human H3 histone gene on chromosome 1. *Hum. Genet.* 97, 486–491.

Ammer, H., Henschen, A., Lee, C.H., 1986. Isolation and amino-acid sequence analysis of human sperm protamines P1 and P2. Occurrence of two forms of protamine P2. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367, 515–522.

Armstrong, S.J., Hulten, M.A., Keohane, A.M., Turner, B.M., 1997. Different strategies of X-inactivation in germinal and somatic cells: histone H4 underacetylation does not mark the inactive X chromosome in the mouse male germline. *Exp. Cell Res.* 230, 399–402.

Baarends, W.M., et al., 1999. Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.* 207, 322–333.

Balhorn, R., 1982. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 93, 298–305.

Balhorn, R., Gledhill, B.L., Wyrobek, A.J., 1977. Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry* 16, 4074–4080.

Balhorn, R., Corzett, M., Mazrimas, J., Stanker, L.H., Wyrobek, A., 1987. High-performance liquid chromatographic separation and partial characterization of human protamines 1, 2, and 3. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9, 82–88.

Baskaran, R., Rao, M.R., 1990. Interaction of spermatid-specific protein TP2 with nucleic acids, in vitro. A comparative study with TP1. *J. Biol. Chem.* 265, 21039–21047.

Berger, S.L., 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 142–148.

Bird, A.P., Wolffe, A.P., 1999. Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell* 99, 451–454.

Boissonneault, G., 2002. Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Lett.* 514, 111–114.

Bourc'his, D., Bestor, T.H., 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431, 96–99.

Bourc'his, D., et al., 2001a. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr. Biol.* 11, 1542–1546.

Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B., Bestor, T.H., 2001b. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 22, 22.

Bowman, A.B., Leverage, J.M., Ingram, R.S., Tilghman, S.M., 2003. Functional characterization of a testis-specific DNA binding activity at the h19/igf2 imprinting control region. *Mol. Cell Biol.* 23, 8345–8351.

Braun, R.E., 2000a. Post-transcriptional control and male infertility. *Results Probl. Cell Differ.* 28, 111–129.

Braun, R.E., 2000b. Temporal control of protein synthesis during spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 23, 92–94.

Brewer, L., Corzett, M., Balhorn, R., 2002. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* 24, 24.

Burgers, W.A., Fuks, F., Kouzarides, T., 2002. DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends Genet.* 18, 275–277.

Calvin, H.I., Bedford, J.M., 1971. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 13, 65–75.

Caron, N., Veilleux, S., Boissonneault, G., 2001. Stimulation of DNA repair by the spermatid TP1 protein. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 437–443.

Caron, C., et al., 2003. Cdy1: a new transcriptional co-repressor. *EMBO Rep.* 4, 877–882.

Caron, C., Govin, J., Rousseaux, S., Khochbin, S., 2004. How to pack the genome for a safe trip. In: Jeanteur, P. (Ed.), *Epigenetics and Chromatin. Progress in Molecular and Subcellular Biology.* Springer-Verlag.

- Celeste, A., et al., 2002. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922–927.
- Chedin, F., Lieber, M.R., Hsieh, C.L., 2002. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16916–16921.
- Chirat, F., Arkhis, A., Martinage, A., Jaquinod, M., Chevaillier, P., Sautiere, P., 1993. Phosphorylation of human sperm protamines HP1 and HP2: identification of phosphorylation sites. *Biochim. Biophys. Acta* 1203, 109–114.
- Cho, C., et al., 2001. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* 28, 82–86.
- Cho, C., et al., 2003. Protamine-2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol. Reprod.* 69, 211–217.
- Choi, Y.C., Chae, C.B., 1998. The genomic and sequence analysis of rat histone H2B genes. *DNA Seq.* 9, 353–358.
- Cox, G.F., et al., 2002. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 162–164.
- Cremer, T., Cremer, C., 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev., Genet.* 2, 292–301.
- Davis, T.L., Trasler, J.M., Moss, S.B., Yang, G.J., Bartolomei, M.S., 1999. Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics* 58, 18–28.
- Davis, T.L., Yang, G.J., McCarrey, J.R., Bartolomei, M.S., 2000. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2885–2894.
- DeBaun, M.R., Niemitz, E.L., Feinberg, A.P., 2003. Association of in vitro fertilization with Beckwith–Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 156–160.
- De Braekeleer, M., Dao, T.N., 1991. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum. Reprod.* 6, 245–250.
- Delaval, K., Feil, R., 2004. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 188–195.
- Delobel, B., et al., 1998. Y-autosome translocation and infertility: usefulness of molecular, cytogenetic and meiotic studies. *Hum. Genet.* 102, 98–102.
- Dennis, K., Fan, T., Geiman, T., Yan, Q., Muegge, K., 2001. Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev.* 15, 2940–2944.
- Deplus, R., et al., 2002. Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res.* 30, 3831–3838.
- De Rycke, M., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., 2002. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Hum. Reprod.* 17, 2487–2494.
- Drabent, B., Bode, C., Doenecke, D., 1993. Structure and expression of the mouse testicular H1 histone gene (H1t). *Biochim. Biophys. Acta* 1216, 311–313.
- Drabent, B., Saftig, P., Bode, C., Doenecke, D., 2000. Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochem. Cell Biol.* 113, 433–442.
- Drewell, R.A., Goddard, C.J., Thomas, J.O., Surani, M.A., 2002. Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. *Nucleic Acids Res.* 30, 1139–1144.
- Faure, A.K., et al., 2003. Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 757–763.
- Featherstone, M., 2002. Coactivators in transcription initiation: here are your orders. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 149–155.
- Fernandez-Capetillo, O., et al., 2003. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev. Cell* 4, 497–508.
- Fischle, W., Wang, Y., Allis, C.D., 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 172–183.
- Fita, I., Campos, J.L., Puigjaner, L.C., Subirana, J.A., 1983. X-ray diffraction study of DNA complexes with arginine peptides and their relation to nucleoprotamine structure. *J. Mol. Biol.* 167, 157–177.
- Forsburg, S.L., 2002. Only connect: linking meiotic DNA replication to chromosome dynamics. *Mol. Cell* 9, 703–711.
- Fournier, C., et al., 2002. Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *EMBO J.* 21, 6560–6570.
- Fuentes-Mascorro, G., Vergara-Onofre, M., Mercado, E., Hernandez-Perez, O., Rosado, A., 2000. Participation of DNA structure on sperm chromatin organization. *Arch. Androl.* 45, 61–71.
- Fuks, F., Burgers, W.A., Godin, N., Kasai, M., Kouzarides, T., 2001. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J.* 20, 2536–2544.
- Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P., Kouzarides, T., 2003. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.* 278, 4035–4040.
- Gardiner-Garden, M., Ballesteros, M., Gordon, M., Tam, P.P., 1998. Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol. Cell Biol.* 18, 3350–3356.
- Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Bradbury, E.M., Schmid, C.W., 1987. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 236, 962–964.
- Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Schmid, C.W., Bradbury, E.M., 1990. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J. Biol. Chem.* 265, 20662–20666.
- Geiman, T.M., Muegge, K., 2000. Lsh, an SNF2/helicase family member, is required for proliferation of mature T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4772–4777.
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., Khochbin, S., 2004. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.* 271, 3459–3469.
- Gregory, R.L., et al., 2001. DNA methylation is linked to deacetylation of histone H3, but not H4, on the imprinted genes *Snrpn* and *U2af1-rs1*. *Mol. Cell Biol.* 21, 5426–5436.
- Gusse, M., Chevaillier, P., 1980. Electron microscope evidence for the presence of globular structures in different sperm chromatins. *J. Cell Biol.* 87, 280–284.
- Gusse, M., et al., 1986. Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim. Biophys. Acta* 884, 124–134.
- Hamer, G., et al., 2003. DNA double-strand breaks and gamma-H2AX signaling in the testis. *Biol. Reprod.* 68, 628–634.
- Hata, K., Okano, M., Lei, H., Li, E., 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 129, 1983–1993.
- Hattori, N., Nishino, K., Ko, Y.G., Ohgane, J., Tanaka, S., Shiota, K., 2004. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J. Biol. Chem.* 279, 17063–17069.
- Hazzouri, M., et al., 2000a. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 950–960.
- Hazzouri, M., et al., 2000b. Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 307–315.
- Hecht, N.B., 1988. Post-meiotic gene expression during spermatogenesis. *Prog. Clin. Biol. Res.* 267, 291–313.
- Hecht, N.B., 1998. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *BioEssays* 20, 555–561.
- Hess, R.A., 1999. Spermatogenesis, overview. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, San Diego, CA.
- Holstein, A.F., Schulze, W., Davidoff, M., 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 107.
- Hoyer-Fender, S., 2003. Molecular aspects of XY body formation. *Cytogenet. Genome Res.* 103, 245–255.
- HoyerFender, S., Costanzi, C., Pehrson, J.R., 2000a. Histone MacroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Exp. Cell Res.* 258, 254–260.
- HoyerFender, S., Singh, P.B., Motzkus, D., 2000b. The murine heterochromatin protein M31 is associated with the chromocenter in round spermatids and is a component of mature spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 254, 72–79.

- Hwang, I., Chae, C.B., 1989. S-phase-specific transcription regulatory elements are present in a replication-independent testis-specific H2B histone gene. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1005–1013.
- Iguchi, N., Tanaka, H., Yomogida, K., Nishimune, Y., 2003. Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *Int. J. Androl.* 26, 354–365.
- Jaenisch, R., Bird, A., 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33, 245–254.
- Kaneda, M., et al., 2004. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429, 900–903.
- Kerjean, A., et al., 2000. Establishment of the paternal methylation imprint of the human *H19* and *MEST/PEG1* genes during spermatogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2183–2187.
- Kierszenbaum, A.L., 2001. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 357–358.
- Kierszenbaum, A.L., 2002. Genomic imprinting and epigenetic reprogramming: unearthing the garden of forking paths. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 269–272.
- Kimura, Y., Tateno, H., Handel, M.A., Yanagimachi, R., 1998. Factors affecting meiotic and developmental competence of primary spermatocyte nuclei injected into mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 59, 871–877.
- Kleckner, N., et al., 2004. A mechanical basis for chromosome function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12592–12597.
- Kleene, K.C., 2001. A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech. Dev.* 106, 3–23.
- Klenova, E.M., Morse III, H.C., Ohlsson, R., Lobanekov, V.V., 2002. The novel BORIS+CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin. Cancer Biol.* 12, 399–414.
- Kramer, J.A., Adams, M.D., Singh, G.B., Doggett, N.A., Krawetz, S.A., 1998. Extended analysis of the region encompassing the PRM1→PRM2→TNP2 domain: genomic organization, evolution and gene identification. *J. Exp. Zool.* 282, 245–253.
- Kramer, J.A., McCarrey, J.R., Djakiew, D., Krawetz, S.A., 2000. Human spermatogenesis as a model to examine gene potentiation. *Mol. Reprod. Dev.* 56, 254–258.
- La Salle, S., Mertineit, C., Taketo, T., Moens, P.B., Bestor, T.H., Trasler, J.M., 2004. Windows for sex-specific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells. *Dev. Biol.* 268, 403–415.
- Lee, C.H., Cho, Y.H., 1999. Aspects of mammalian spermatogenesis: electrophoretic analysis of protamines in mammalian species. *Mol. Cell* 9, 556–559.
- Lee, K., Haugen, H.S., Clegg, C.H., Braun, R.E., 1995. Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 12451–12455.
- Levesque, D., Veilleux, S., Caron, N., Boissonneault, G., 1998. Architectural DNA-binding properties of the spermatid transition proteins 1 and 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 602–609.
- Lewis, J.D., Abbott, D.W., Ausio, J., 2003a. A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem. Cell. Biol.* 81, 131–140.
- Lewis, J.D., Song, Y., de Jong, M.E., Bagha, S.M., Ausio, J., 2003b. A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* 111, 473–482.
- Lewis, J.D., Saperas, N., Song, Y., Zamora, M.J., Chiva, M., Ausio, J., 2004. Histone H1 and the origin of protamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4148–4152.
- Li, E., 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev., Genet.* 3, 662–673.
- Lin, Q., Sirotkin, A., Skoultchi, A.I., 2000. Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2122–2128.
- Lin, Q., et al., 2004. Reductions in linker histone levels are tolerated in developing spermatocytes but cause changes in specific gene expression. *J. Biol. Chem.* 279, 23525–23535.
- Ling, Y., Sankpal, U.T., Robertson, A.K., McNally, J.G., Karpova, T., Robertson, K.D., 2004. Modification of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnm3a) by SUMO-1 modulates its interaction with histone deacetylases (HDACs) and its capacity to repress transcription. *Nucleic Acids Res.* 32, 598–610.
- Loukinov, D.I., et al., 2002. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6806–6811.
- Luciani, J.M., Guichaoua, M.R., Mattei, A., Morazzani, M.R., 1984. Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle. *Cytogenet. Cell Genet.* 38, 14–22.
- Lucifero, D., Mann, M.R., Bartolomei, M.S., Trasler, J.M., 2004. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum. Mol. Genet.* 13, 839–849.
- Lusser, A., Kadonaga, J.T., 2003. Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *BioEssays* 25, 1192–1200.
- Mahadevaiah, S.K., et al., 2001. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* 27, 271–276.
- Maleki, S., Keeney, S., 2004. Modifying histones and initiating meiotic recombination; new answers to an old question. *Cell* 118, 404–406.
- Malik, H.S., Henikoff, S., 2003. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* 10, 882–891.
- Mann, J.R., 2001. Imprinting in the germ line. *Stem Cells* 19, 287–294.
- Marcon, L., Boissonneault, G., 2004. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol. Reprod.* 70, 910–918.
- Margot, J.B., Ehrenhofer-Murray, A.E., Leonhardt, H., 2003. Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. *BMC Mol. Biol.* 4, 7.
- Marques, C.J., Carvalho, F., Sousa, M., Barros, A., 2004. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 363, 1700–1702.
- Marushige, Y., Marushige, K., 1975. Transformation of sperm histone during formation and maturation of rat spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 250, 39–45.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., Haaf, T., 2000. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403, 501–502.
- McPherson, S.M., Longo, F.J., 1992. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 268–279.
- McPherson, S.M., Longo, F.J., 1993. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev. Biol.* 158, 122–130.
- Meistrich, M.L., Mohapatra, B., Shirley, C.R., Zhao, M., 2003. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111, 483–488.
- Metzler-Guillemain, C., Mignon, C., Depetris, D., Guichaoua, M.R., Mattei, M.G., 1999. Bivalent 15 regularly associates with the sex vesicle in normal male meiosis. *Chromosom. Res.* 7, 369–378.
- Meyer-Ficca, M., Muller-Navia, J., Scherthan, H., 1998. Clustering of pericentromeres initiates in step 9 of spermiogenesis of the rat (*Rattus norvegicus*) and contributes to a well defined genome architecture in the sperm nucleus. *J. Cell. Sci.* 111, 1363–1370.
- Motzkus, D., Singh, P.B., Hoyer-Fender, S., 1999. M31, a murine homolog of *Drosophila* HPI, is concentrated in the XY body during spermatogenesis. *Cytogenet. Cell Genet.* 86, 83–88.
- Nasmyth, K., 2001. Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 35, 673–745.
- Nayernia, K., et al., 1996. Stage and developmental specific gene expression during mammalian spermatogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 379–383.

- Ng, H.H., Bird, A., 1999. DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 158–163.
- Obata, Y., Kono, T., 2002. Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J. Biol. Chem.* 277, 5285–5289.
- Ogura, A., Yanagimachi, R., 1995. Spermatids as male gametes. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 155–159.
- Ogura, A., Inoue, K., Matsuda, J., 1999. Mouse spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. *Hum. Reprod.* 14, 1294–1298.
- Okada, H., et al., 1999. Klinefelter's syndrome in the male infertility clinic. *Hum. Reprod.* 14, 946–952.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.
- Olive, R., Dixon, G.H., 1991. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 40, 25–94.
- Peters, A.H., et al., 2001. Loss of the *suv39h* histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107, 323–337.
- Petes, T.D., 2001. Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nat. Rev. Genet.* 2, 360–369.
- Pittoggi, C., et al., 1999. A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J. Cell. Sci.* 112, 3537–3548.
- Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S., Khochbin, S., 2003. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5354–5365.
- Poccia, D., 1986. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int. Rev. Cytol.* 105, 1–65.
- Poccia, D., Collas, P., 1996. Transforming sperm nuclei into male pronuclei in vivo and in vitro. In: Pedersen, R.A., Schatten, G.P. (Eds.), *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 34. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 25–88.
- Prigent, C., Dimitrov, S., 2003. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J. Cell. Sci.* 116, 3677–3685.
- Rand, E., Ben-Porath, I., Keshet, I., Cedar, H., 2004. CTCF elements direct allele-specific undermethylation at the imprinted H19 locus. *Curr. Biol.* 14, 1007–1012.
- Raukas, E., Mikelsaar, R.H., 1999. Are there molecules of nucleoprotamine? *BioEssays* 21, 440–448.
- Reddy, K.C., Villeneuve, A.M., 2004. *C. elegans* HIM-17 links chromatin modification and competence for initiation of meiotic recombination. *Cell* 118, 439–452.
- Reik, W., Walter, J., 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* 2, 21–32.
- Risley, M.S., 1990. *Chromatin Organization in Sperm*. CRC Press.
- Sassone-Corsi, P., 2002. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296, 2176–2178.
- Scherthan, H., Weich, S., Schwegler, H., Heyting, C., Harle, M., Cremer, T., 1996. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J. Cell Biol.* 134, 1109–1125.
- Scherthan, H., et al., 1998. Aspects of three-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase. *J. Cell. Sci.* 111, 2337–2351.
- Schoenherr, C.J., LeVorse, J.M., Tilghman, S.M., 2003. CTCF maintains differential methylation at the *Igf2/H19* locus. *Nat. Genet.* 33, 66–69.
- Shiota, K., 2004. DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. *Cytogenet. Genome Res.* 105, 325–334.
- Shiota, K., et al., 2002. Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells* 7, 961–969.
- Shirley, C.R., Hayashi, S., Mounsey, S., Yanagimachi, R., Meistrich, M.L., 2004. Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from *Tnp1*- and *Tnp2*-null double mutant mice. *Biol. Reprod.* 71, 1220–1229.
- Singh, J., Rao, M.R., 1987. Interaction of rat testis protein, TP, with nucleic acids in vitro. Fluorescence quenching, UV absorption, and thermal denaturation studies. *J. Biol. Chem.* 262, 734–740.
- Singh, J., Rao, M.R., 1988. Interaction of rat testis protein, TP, with nucleosome core particle. *Biochem. Int.* 17, 701–710.
- Smith, M.M., 2002. Centromeres and variant histones: what, where, when and why? *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 279–285.
- Sobhon, P., Tanphaichitr, N., Chutatape, C., Vongpayabal, P., Panuwatsuk, W., 1982. Electron microscopic and biochemical analyses of the organization of human sperm chromatin decondensed with sarkosyl and dithiothreitol. *J. Exp. Zool.* 223, 277–290.
- Sollier, J., et al., 2004. *Set1* is required for meiotic S-phase onset, double-strand break formation and middle gene expression. *EMBO J.* 23, 1957–1967.
- Steger, K., 1999. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat. Embryol.* 199, 471–487.
- Steger, K., Klonisch, T., Gavenis, K., Drabent, B., Doenecke, D., Bergmann, M., 1998. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 939–945.
- Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., Tajima, S., 2004. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J. Biol. Chem.* 279, 27816–27823.
- Szabo, P.E., Mann, J.R., 1995. Biallelic expression of imprinted genes in the mouse germ line: implications for erasure, establishment, and mechanisms of genomic imprinting. *Genes Dev.* 9, 1857–1868.
- Tanphaichitr, N., Sobhon, P., Taluppeth, N., Chalermisarachai, P., 1978. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp. Cell Res.* 117, 347–356.
- Tesarik, J., Mendoza, C., Testart, J., 1995. Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N. Engl. J. Med.* 333, 525.
- Trostle-Weige, P.K., Meistrich, M.L., Brock, W.A., Nishioka, K., Bremer, J.W., 1982. Isolation and characterization of TH2A, a germ cell-specific variant of histone 2A in rat testis. *J. Biol. Chem.* 257, 5560–5567.
- Turner, J.M., Burgoyne, P.S., Singh, P.B., 2001. M31 and macroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis. *J. Cell. Sci.* 114, 3367–3375.
- Ueda, T., et al., 2000. The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes Cells* 5, 649–659.
- Vanderzwalmen, P., et al., 1998. Is there a future for spermatid injections? *Hum. Reprod.* 13, 71–84.
- Vidal, F., Navarro, J., Templado, C., Brusadin, S., Egozcue, J., 1984. Synaptonemal complex studies in a mosaic 46,XY/47,XXY male. *Hum. Genet.* 66, 306–308.
- Villar, A.J., Eddy, E.M., Pedersen, R.A., 1995. Developmental regulation of genomic imprinting during gametogenesis. *Dev. Biol.* 172, 264–271.
- Wagner, T.E., Yun, J.S., 1981. Human sperm chromatin organization: isolation of homogeneous (25 Kb.p.) DNA fragments from in situ chromatin degradation in human sperm cells. *Arch. Androl.* 6, 47–51.
- Ward, W.S., 1994. The structure of the sleeping genome: implications of sperm DNA organization for somatic cells. *J. Cell. Biochem.* 55, 77–82.
- Ward, W.S., Coffey, D.S., 1990. Specific organization of genes in relation to the sperm nuclear matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 20–25.
- Ward, W.S., Coffey, D.S., 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.* 44, 569–754.
- Ward, W.S., Zalensky, A.O., 1996. The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 6, 139–147.
- Ward, W.S., Kimura, Y., Yanagimachi, R., 1999. An intact sperm nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development. *Biol. Reprod.* 60, 702–706.

- Ward, W.S., Kishikawa, H., Akutsu, H., Yanagimachi, H., Yanagimachi, R., 2000. Further evidence that sperm nuclear proteins are necessary for embryogenesis. *Zygote* 8, 51–56.
- Wei, Y., Mizzen, C.A., Cook, R.G., Gorovsky, M.A., Allis, C.D., 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7480–7484.
- Winston, R.M., Hardy, K., 2002. Are we ignoring potential dangers of in vitro fertilization and related treatments? *Nat. Cell Biol.* 4, 14–18.
- Witt, O., Albig, W., Doenecke, D., 1996. Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp. Cell Res.* 229, 301–306.
- Wolffe, A., 1995. *Chromatin—Structure and Function*, (2nd edition) Academic Press, London.
- Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevaillier, P., Sautiere, P., 1998. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* 80, 117–128.
- Wu, J.Y., Means, A.R., 2000. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV is expressed in spermatids and targeted to chromatin and the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* 275, 7994–7999.
- Wu, J.Y., Ribar, T.J., Cummings, D.E., Burton, K.A., McKnight, G.S., Means, A.R., 2000. Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat. Genet.* 25, 448–452.
- Wykes, S.M., Krawetz, S.A., 2003. The structural organization of sperm chromatin. *J. Biol. Chem.* 278, 29471–29477.
- Yamashita, K., Shinohara, M., Shinohara, A., 2004. Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11380–11385.
- Yan, Q., Huang, J., Fan, T., Zhu, H., Muegge, K., 2003a. A modulator of CpG methylation, is crucial for normal histone methylation. *EMBO J.* 22, 5154–5162.
- Yan, W., Ma, L., Burns, K.H., Matzuk, M.M., 2003b. HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10546–10551.
- Yanagimachi, R., 1999. Production of mice through intracytoplasmic injection of sperm or spermatogenic cells. *Protoplasma* 206, 278–281.
- Yang, Y., Li, T., Vu, T.H., Ulaner, G.A., Hu, J.F., Hoffman, A.R., 2003. The histone code regulating expression of the imprinted mouse *Igf2r* gene. *Endocrinology* 144, 5658–5670.
- Yelick, P.C., et al., 1987. Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2173–2179.
- Yu, Y.E., et al., 2000. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4683–4688.
- Zalenskaya, I.A., Zalensky, A.O., 2002. Telomeres in mammalian male germline cells. *Int. Rev. Cytol.* 218, 37–67.
- Zalenskaya, I.A., Bradbury, E.M., Zalensky, A.O., 2000. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 213–218.
- Zalensky, A.O., Allen, M.J., Kobayashi, A., Zalenskaya, I.A., Balhorn, R., Bradbury, E.M., 1995. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* 103, 577–590.
- Zalensky, A.O., et al., 2002. Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* 277, 43474–43480.
- Zhao, M., et al., 2001. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7243–7255.
- Zhao, M., et al., 2004a. Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* 38, 200–213.
- Zhao, M., Shirley, C.R., Mounsey, S., Meistrich, M.L., 2004b. Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein *Tnp1* and *Tnp2* mutations. *Biol. Reprod.* 71, 1016–1025.