



HAL
open science

La réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogénèse

Emmanuelle Escoffier

► **To cite this version:**

Emmanuelle Escoffier. La réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogénèse. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00426877v1

HAL Id: tel-00426877

<https://theses.hal.science/tel-00426877v1>

Submitted on 28 Oct 2009 (v1), last revised 9 Nov 2009 (v2)

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

THÈSE

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier

Discipline Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Emmanuelle Escoffier

Le 15 Octobre 2009

La réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogenèse

Directrice de thèse : Cécile Caron

Jury

Dr Ute Rogner	Rapporteur
Dr Matthieu Gérard	Rapporteur
Dr Benjamin Loppin	Examineur
Dr. Cécile Caron	Examinatrice
Pr. Claire Vourc'h	Examinatrice
Pr. Marc Block	Président du Jury

Thèse préparée au sein de l'équipe « Epigénétique et signalisation cellulaire »

Unité INSERM U 823

Institut Albert Bonniot

Université Joseph Fourier-Grenoble I

A David,
A Jade,
A ma famille,

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury, le Docteur Ute Rogner, le Docteur Matthieu Gérard et le Docteur Benjamin Loppin pour le temps qu'ils ont accepté de me consacrer afin d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie le Professeur Claire Vourc'h d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Docteur Cécile Caron pour avoir dirigé avec enthousiasme ces travaux, pour ses nombreux conseils, pour sa bonne humeur et pour sa disponibilité, surtout pour la correction de ce manuscrit malgré la naissance de la petite Jeanne.

Je remercie le Dr Saadi Khochbin de m'avoir accueilli dans son équipe dès la sortie de ma maîtrise et de m'avoir permis d'y effectuer également ma thèse. Merci aussi pour sa disponibilité, ses conseils et son soutien lorsque les résultats se faisaient attendre.

Je remercie naturellement toutes les personnes de l'équipe 6, qu'elles aient été ou non impliquées dans mes travaux de thèse, pour le cœur mis dans chacune de nos discussions, et dans la résolution de mes problèmes scientifiques et administratifs !

Merci également à toutes les personnes de l'Institut avec lesquelles j'ai pu partager quelques discussions, scientifiques ou non.

Cette thèse n'aurait pas été pareille sans les copines du labo, Edwige, Sandrine et Sandrine, Véro, Aude, Clothilde, Christine, Catherine, sans bien sûr oublier « l'homme de la bande », Sam. Merci de m'avoir rappelé que rire peut faire mal aux côtes...

Merci enfin à toute l'équipe de l'ENS, Céline, Florian, Caro, Julien, Cédric, Natacha, Charly, Réjane, Armelle, Anne-Do et Sylvain (sans oublier le nouvellement arrivé petit Alexandre), et à tous les autres, Marion, Laurent, Anne-lise, Emilien, Marlène, Brice, Maud, Stéphane et la petite Anaïs, sans qui ces dernières années n'auraient pas été les mêmes.

Merci à toute ma famille et plus particulièrement à mes parents, vous qui m'avez toujours encouragé dans cette voie sans jamais m'y pousser. Sans vous, je ne serais pas là (biologiquement, ça tient aussi la route puisque vous êtes mes parents !).

Enfin, mes derniers remerciements iront à ma fille et à mon mari, sans lesquels tout cela n'aurait aucun sens.

Merci Jade, pour tous ces moments de bonheur que tu nous offres depuis maintenant presque un an, pour ces sourires (et ces bêtises) perpétuels, et surtout pour m'avoir réveillé tout l'été à sept heures du matin en chanson pour que je puisse rédiger...

Merci enfin à toi David, d'avoir été patient lorsque certains jours, les expériences ratées et la fatigue déteignaient sur mon humeur, de m'avoir toujours encouragée dans ce que je voulais faire, et d'avoir essayé de me faciliter les choses notamment durant ces derniers longs mois. Merci infiniment...

Résumé

Au cours de la spermiogenèse, une réorganisation très importante de la chromatine se produit : la quasi-totalité des histones sont progressivement enlevées et remplacées par des protéines de transition puis par des protamines. Bien que ce processus soit commun à de nombreuses espèces et concerne la quasi-totalité du génome, très peu de données existent sur l'organisation finale de cette chromatine dans les spermatozoïdes ainsi que sur les mécanismes mis en jeu. Nous avons donc engagé un travail visant à identifier les protéines structurant la chromatine dans les stades tardifs de la spermiogénèse chez la souris ainsi qu'à identifier les acteurs impliqués.

Nos résultats montrent pour la première fois l'existence, dans les spermatides condensées de souris, de structures nucléoprotéiques contenant l'histone testiculaire TH2B ainsi que de nouveaux variants d'histones identifiés au laboratoire. De plus, ces structures organisent de manière préférentielle l'hétérochromatine péricentromérique de ces cellules. Cette réorganisation impliquerait vraisemblablement la protéine chaperonne NAP1L4, car nous avons montré que cette protéine pouvait chaperonner les nouveaux variants d'histones contenus dans la nouvelle structure nucléoprotéique. Cette chaperonne serait ciblée sur la chromatine en interagissant avec les queues N-terminales des histones H3.

D'autres régions particulières du génome pourraient être la cible de cette réorganisation différentielle de la chromatine, constituant ainsi le support d'une information épigénétique mâle transmise lors de la fécondation et permettant ainsi de reconnaître ces régions et de les différencier du reste du génome.

L'analyse des protéines présentes dans les cellules germinales nous a également permis d'identifier deux autres protéines, HMGB4 et FYTTD1, qui ne semblent pas impliqués dans le processus de réorganisation de la chromatine dans les stades tardifs de la spermiogénèse. Néanmoins, le rôle potentiel de FYTTD1 dans le phénomène de maturation des ARN, qui sont actuellement suspectés comme pouvant être un autre support de l'information épigénétique, pourrait s'avérer être un nouveau champ d'investigations très intéressant.

Liste des figures et tables

- Figure 1. La chromatine et son unité de base, le nucléosome
- Figure 2. Les constituants du nucléosome
- Figure 3. Structure de l'histone de liaison H1
- Figure 4. Les niveaux d'organisation de la chromatine
- Figure 5. Les modèles d'organisation de la fibre de 30 nm
- Figure 6. L'organisation en rosette de la fibre de 300 nm
- Figure 7. Modifications post-traductionnelles des histones
- Figure 8: La nomenclature utilisée pour la dénomination des modifications post-traductionnelles des histones
- Figure 9. Dynamique de méthylation des lysines des histones
- Figure 10. Dynamique d'acétylation des histones
- Figure 11. Les complexes de remodelage
- Figure 12. Les protéines HMG
- Figure 13. Organisation du testicule adulte
- Figure 14. Le déroulement de la spermatogénèse
- Figure 15. Schéma récapitulatif de l'évolution des cellules de la lignée germinale mâle
- Figure 16. Les cycles de la spermatogénèse chez la souris
- Figure 17. Etablissement de l'empreinte parentale
- Figure 18. Le remodelage de la chromatine au cours de la spermatogénèse
- Figure 19. Les variants d'histones de liaison au cours de la spermatogénèse
- Figure 20. Représentation schématique des protéines et des gènes des protamines
- Figure 21. Modèle d'organisation de la chromatine spermatique
- Figure 22. Représentation schématique de l'hétérogénéité structurale du noyau spermatique
- Figure 23. Caractérisation des nouveaux variants d'histones
- Figure 24. Les autres régions du génome susceptibles d'être organisées par les nouveaux variants d'histones
- Figure 25. Enrichissement des structures nucléoprotéiques sur certains gènes
- Figure 26. Caractérisation de NAP1L4
- Figure 27. Caractérisation de NAP1L4 au cours de la spermatogénèse
- Figure 28. Test de biotinylation des peptides H3

Figure 29. L'interaction de NAP1L4 sur les queues N-terminales des histones

Figure 30. Caractérisation de FYTTD1

Figure 31. FYTTD1 est enrichi dans le testicule

Figure 32. Profil d'expression de FYTTD1 au cours de la spermatogénèse

Figure 33. Localisation de FYTTD1 au sein des cellules

Figure 34. FYTTD1 colocalise avec les speckles du spliceosome

Figure 35. Caractérisation de nouvelles protéines basiques

Figure 36. Modèle de réorganisation de la chromatine au cours de la spermiogénèse

Figure 37. Des variants et des modifications d'histones spécifiques au sein des cellules germinales mâles

Figure 38. Les principales modifications épigénétiques au cours des étapes précoces du développement

Table 1. Classification des complexes de remodelage.

Table 2. Les protéines High Mobility Group

Table 3. Classification des chaperonnes d'histones

Table 4. Classification des variants d'histones en fonction de leur distribution tissulaire chez les mammifères

Table 5. Analyse des données des puces transcriptomiques

Table 6. Protéines associées à TP1

Table 7. Protéines acido-solubles identifiées par spectrométrie de masse dans les spermatides condensées de stade 12 à 16

Table 8. Liste des gènes identifiés in-silico dans les banques de données

Table 9. Liste des gènes regroupés dans les clusters 4 et 5 de Schultz

Table 10. Tableau récapitulatif des protéines basiques identifiées par différentes approches

Table des matières

INTRODUCTION

A. LA CHROMATINE	15
I. L'organisation de la chromatine.....	15
1. Le nucléosome, unité de base de la chromatine.....	15
1.1 Découverte du nucléosome	15
1.2. Les histones de cœur	17
1.3. Les histones de liaison.....	19
2. Les différents niveaux de structuration de la chromatine	19
3. Compartimentation fonctionnelle de la chromatine.....	24
3.1. Généralités.....	24
3.2. L'euchromatine	24
3.3. L'hétérochromatine	26
3.4. Les territoires chromosomiques	27
II. L'hétérogénéité de la chromatine, support de l'information épigénétique.....	28
1. La méthylation de l'ADN	28
1.1. L'inactivation des transposons	29
1.2. L'empreinte parentale et l'inactivation du chromosome X.....	30
1.3. La régulation de l'expression des gènes.....	30
2. La modification post-traductionnelle des histones	31
2.1. La méthylation.....	34
2.2. L'acétylation.....	36
2.3. L'ubiquitination.....	37
2.4. La phosphorylation.....	39
2.5. L'ADP-ribosylation.....	39
2.6. La biotinylation	39
2.7. La sumoylation	40
2.8. Le code histone.....	40
3. L'incorporation de variants d'histones	41
3.1. Le maintien de l'intégrité du génome.....	41
3.2. La structuration spécifique des centromères	42
3.3. Le marquage des régions transcriptionnellement actives	43
3.4. La répression de la transcription	44
3.5. Une activation ou une répression de la transcription ?.....	44
4. La notion d'information épigénétique	45
III. La dynamique de la chromatine	46
1. Les protéines High Mobility Group.....	49
1.1. La famille des HMGA	49
1.2. La famille des HMGB	52
1.3. La famille des HMGN.....	53
2. Assemblage et dissociation des histones de la chromatine	53
2.1. Stockage et mise en place massive d'histones	55
2.2. Mise en place de variants d'histones localement	58
2.3. Des chaperonnes spécifiques aux variants d'histones	59

B. LE REMODELAGE DE LA CHROMATINE AU COURS DE LA SPERMATOGENESE 60

I. Le déroulement de la spermatogénèse 60

1. La structure du testicule..... 60
2. Les trois phases de la spermatogénèse..... 60
 - 2.1. La phase pré-méiotique 62
 - 2.2. La phase méiotique..... 62
 - 2.3. La spermiogénèse 64
3. La phase additionnelle de maturation des spermatozoïdes 66
4. Les cycles de la spermatogénèse 67

II. Les modifications de la chromatine qui accompagnent la spermatogénèse 69

1. Méthylation de l'ADN et établissement de l'empreinte paternelle 69
2. L'incorporation de nombreux variants d'histones 71
 - 2.1. Les variants d'H1 74
 - 2.2. Les variants d'H2A 76
 - 2.3. Les variants d'H2B..... 79
 - 2.4. Les variants d'H3 80
3. La mise en place de modifications post-traductionnelles des histones..... 81
 - 2.1. La méthylation..... 81
 - 2.2. L'acétylation..... 82
 - 2.3. La phosphorylation..... 83
 - 2.4. L'ubiquitination..... 84
4. Le remplacement des histones par les protéines de transition et les protamines 84
 - 4.1. Les protéines de transition..... 84
 - 4.2. Les protamines 86
 - 4.3. Les mécanismes de cette réorganisation..... 88
5. La structure finale de la chromatine dans le noyau spermatique 89
 - 5.1. La majeure partie du génome est associée aux protamines 89
 - 5.2. Subsistance de régions spécifiquement organisées en nucléosomes dans les spermatozoïdes 89

RESULTATS

A. REORGANISATION FONCTIONNELLE DU GENOME MALE PAR DE NOUVEAUX VARIANTS D'HISTONES AU COURS DE LA SPERMATOGENESE 95

I. Identification et caractérisation fonctionnelle de nouveaux variants d'histones 95

1. Analyse protéomique des protéines des spermatides condensées..... 95
2. Profil d'expression de ces variants 96
3. Nouvelles structures nucléoprotéiques dans les spermatides condensées 98
4. H2AL1/L2 sont présents au sein de nouvelles structures 99
5. H2AL1/L2 forment avec TH2B des nucléosomes moins stables 99
6. H2AL1/L2 colocalise avec l'hétérochromatine péricentromérique..... 100
7. Conclusion et présentation de l'article associé 100

II. Les autres régions du génome susceptibles d'être organisées par ces variants (résultats non publiés)	118
1. Les séquences répétées du génome.....	118
2. Les gènes soumis à l'empreinte parentale	119
3. Les gènes exprimés tardivement au cours de la spermatogénèse	122
4. Les régions codantes de l'ensemble des gènes murins	123
5. Conclusion	125
III. Le mécanisme d'assemblage à la chromatine de ces variants.....	127
1. Identification de NAP1L4.....	127
2. Caractérisation de NAP1L4.....	129
3. NAP1L4 chaperonne les histones canoniques et les variants d'histones.....	131
4. NAP1L4 lie spécifiquement la queue N-terminale de l'histone H3	133
5. Conclusion	137
B. EXISTE T'IL D'AUTRES PROTEINES BASIQUES SUCEPTIBLES D'ORGANISER DE MANIERE DIFFERENTIELLE LE GENOME SPERMATIQUE ?.....	138
I. La protéine FYTTD1	138
1. Caractérisation	139
2. FYTTD1 est enrichi dans les spermatocytes	139
3. FYTTD1 ne colocalise pas avec l'hétérochromatine péricentromérique.....	142
4. FYTTD1 colocalise avec les speckles du spliceosome.....	145
5. Conclusion	145
II. La protéine HMGB4	147
1. Identification.....	149
2. HMGB4 est exprimée dans le testicule et à des stades spécifiques dans les cellules germinales	149
3. HMGB4 lie la chromatine avec moins d'affinité que H1t.....	150
4. HMGB4 est localisée dans le pôle basal des spermatides en élongation.....	150
5. La localisation de HMGB4 est liée à la présence de H1T2	151
6. HMGB4 est un répresseur transcriptionnel	151
7. Conclusion et présentation de l'article publié.....	152
III. Les autres stratégies développées pour l'identification de protéines	163
1. Analyse in silico	163
2. Les groupes de gènes exprimés dans les cellules germinales mâles.....	165
3. Analyse globale des données	167
C. PARTICIPATION AUX AUTRES TRAVAUX DE L'EQUIPE.....	171
1. Résumé de l'article	171
2. Présentation de l'article publié	171
D. ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES	181
I. L'information épigénétique du spermatozoïde	181
1. Résumé de la revue.....	181
2. Présentation de la revue publiée	181
II. La reprogrammation épigénétique du génome mâle au cours de la gamétogénèse et du développement zygotique.....	187
1. Résumé de la revue.....	187
2. Présentation de la revue publiée	187

DISCUSSION

Un modèle de réorganisation de l'hétérochromatine péricentromérique au cours de la spermatogénèse.....	200
Existence d'homologues fonctionnels des nouveaux variants d'histone chez l'homme ?	205
Les autres régions du génome marquées différemment au sein du spermatozoïde.	206
Devenir de l'organisation différentielle du génome spermatique après la fécondation.....	208

MATERIELS ET METHODES

I. BIOLOGIE CELLULAIRE.....	212
Culture cellulaire et transfection.....	212
Séparation des cellules germinales par sédimentation.....	213
Préparation de spermatides condensées par sonication	213
Immunofluorescence sur cellules en culture.....	214
Immunofluorescence sur cellules germinales	214
Hybridisation In-Situ Fluorescente (FISH).....	215
II. BIOLOGIE MOLECULAIRE ET BIOCHIMIE.....	216
Immunoprécipitation.....	216
RT-qPCR	216
Préparation des nucléosomes à partir de spermatides condensées.....	217
Gradient de saccharose	217
Analyse des fragments d'ADN résistants à la MNase sur gels d'agarose	217
Production et purification d'anticorps	218
Biotinylation des peptides et contrôle par spectrométrie de masse Seldi-Tof	218
Pull-down sur les queues N-terminales des histones	219
Western Blot	219
Dot Blot	220

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

A. LA CHROMATINE

I. L'organisation de la chromatine

1. Le nucléosome, unité de base de la chromatine

1.1 Découverte du nucléosome

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN présent dans le noyau est associé à des protéines structurales, pour former une structure nucléoprotéique appelée chromatine.

C'est dans les années 1970, avec les avancées de la microscopie, que furent faites les découvertes majeures concernant la structure de cette chromatine. Ainsi, une digestion partielle de la chromatine par la nucléase de *Micrococcus* permit d'obtenir des fragments d'ADN longs d'environ 200 paires de bases (Williamson, 1970), tandis qu'une digestion d'ADN nu donnait un dégradé de fragments d'ADN de tailles variables. Ceci suggérait que la fixation de protéines à l'ADN empêchait certaines zones de la molécule d'ADN d'être attaquées par la nucléase.

La microscopie électronique permit de révéler la structure de la chromatine « en collier de perles » (figure 1 A) (Olins and Olins, 1974) (Oudet et al., 1975).

Puis Kornberg a identifié l'unité de base, comprenant 146 paires de bases d'ADN, enroulées autour d'un octamère de protéines histones (figure 1 B) (Olins and Olins, 1974) (Oudet et al., 1975). Cet élément de base sera baptisé « nucléosome » par Pierre Chambon en 1975.

La structure du nucléosome a été déterminée par cristallographie aux rayons X (figure 1 C) (Burlingame et al., 1985) (Luger et al., 1997) (Richmond and Davey, 2003).

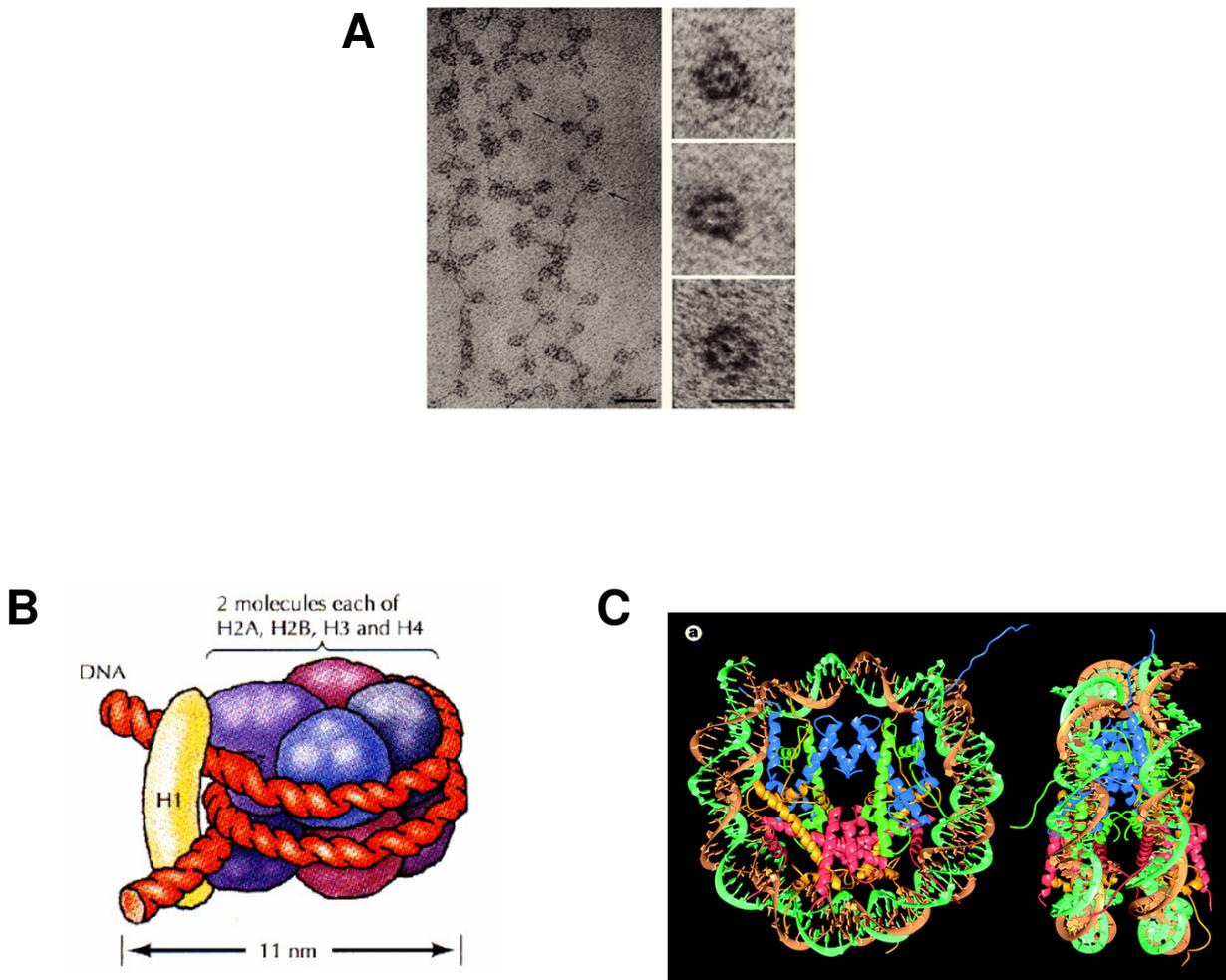


Figure 1. La chromatine et son unité de base, le nucléosome

A. Identification de la structure de la chromatine « en collier de perles » par microscopie électronique. 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 micrococcocale (barre d'échelle 10 nm). (D'après Olins et Olins, 2003)

B. Le nucléosome, unité de base. Le nucléosome est constitué de 2 molécules de chaque histone (2xH2A, 2xH2B, 2xH3, 2xH4), autour desquelles s'enroulent un morceau d'ADN long de 146 paires de bases.

C. Résolution de la structure du nucléosome par cristallographie aux rayons X. La figure montre la structure moléculaire du nucléosome. La double hélice d'ADN s'enroule autour des quatre dimères d'histones situés au centre. Le nucléosome est vu de face à gauche, de profil à droite. (D'après Luger et coll., 1997).

1.2. Les histones de cœur

La particule de cœur du nucléosome est constituée d'un octamère d'histones, c'est-à-dire d'une paire de chacune des histones de cœur, nommées H2A (14 kDa), H2B (14 kDa), H3 (15 kDa) et H4 (11 kDa).

Ces histones sont des petites protéines basiques, très riches en résidus lysine et arginine. En effet, les interactions entre l'ADN et les histones sont de type hydrogène, environ la moitié de ces interactions se font entre des lysines et des arginines chargées positivement et le squelette sucre/phosphate de l'ADN chargé négativement (Luger et al., 1997) ; (Richmond and Davey, 2003). 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.

Chacune de ces histones a une séquence très conservée car les histones sont parmi les protéines les plus conservées au cours de l'évolution.

Chaque histone est organisée en deux domaines : un domaine central globulaire appelé histone-fold et deux extrémités C- et N- terminales.

L'histone fold, composé de trois hélices α reliées entre elles par des boucles flexibles (figure 2 A) constitue un motif de dimérisation, permettant aux histones d'interagir entre elles (H2A-H2B et H3-H4), via des interactions de nature hydrophobe. Ces interactions entre H2A et H2B ainsi qu'entre H3 et H4 sont appelées "poignée de mains" ("handshake") (Arents et al., 1991) (figure 2 B).

En l'absence d'ADN et à une force saline modérée (150 mM NaCl), H3 et H4 s'associent entre elles et forment un tétramère alors que H2A et H2B restent associées sous forme de dimère (figure 2 C et D) (Lusser and Kadonaga, 2004). À forte force saline (2M NaCl), l'octamère d'histones se forme spontanément *in vitro* (Eickbush and Moudrianakis, 1978) (Lusser and Kadonaga, 2004) (figure 2 E).

De part et d'autre de l'histone fold, chaque histone possède des extrémités N-terminales et C-terminales dont la structure n'est pas connue, qui se localisent à l'extérieur du nucléosome. Les parties amino-terminales des histones ne participent pas significativement à la structure du nucléosome. En revanche, les queues N terminales se dégagent de la structure compacte formée par les domaines globulaires, ce qui leur confère une grande accessibilité. Elles sont

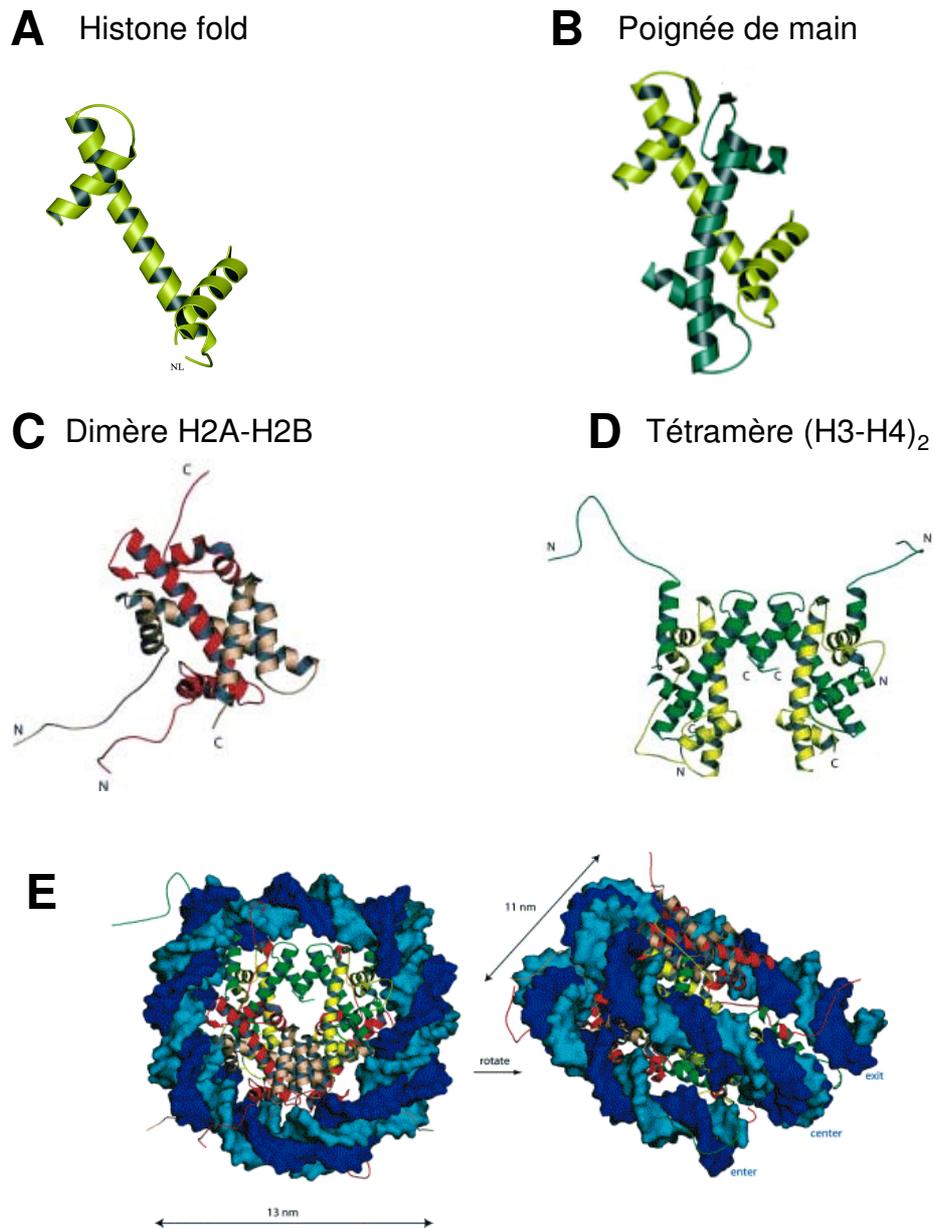


Figure 2. Les constituants du nucléosome

A. Structure du domaine « histone fold » de l'histone H3. Le domaine est construit avec trois hélices α reliées par deux boucles (D'après Harp et coll, 2000).

B. Interaction en poignée de main entre les histones H3-H4. Cette interaction est aussi valable pour l'hétérodimère H2A-H2B. (D'après Harp et coll, 2000).

C. Structure d'un dimère H2A-H2B, respectivement en rouge et violet (D'après Khorasanizadeh, 2004).

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

E. Structure du nucléosome. L'ADN s'enroule sur 1,7 tours autour de la particule de cœur. Le centre de symétrie du nucléosome est indiqué par une flèche. Le nucléosome est présenté de face à gauche et de côté à droite (D'après Khorasanizadeh, 2004).

d'ailleurs le siège de nombreuses modifications post traductionnelles (Munshi et al., 2009). Ces modifications post-traductionnelles jouent un rôle dans la structure de la chromatine, ou peuvent servir de motifs de reconnaissance à la liaison de facteurs régulateurs.

1.3. Les histones de liaison

La cinquième histone est l'histone de liaison H1. Elle a une structure qui diffère de celles des histones de cœur. Celle-ci adopte une structure tripartite, constituée d'un domaine globulaire central flanqué des extrémités N- et C-terminales mobiles et fortement chargées positivement. Les régions terminales divergent par leur taille et leur séquence (Wolffe et al., 1997), tandis que le domaine globulaire est très conservé entre les variants et structuré par un motif dit en « wing-hélice » (figure 3). Ce domaine globulaire est positionné au niveau des brins d'ADN entrant et sortant et n'interagit pas avec les histones de cœur (Zhou et al., 1998).

Contrairement aux histones de coeur, l'invalidation de l'histone de liaison n'est pas létale (Khochbin, 2001), mais induit une altération globale de la structure de la chromatine, suggérant un mécanisme de régulation complexe entre histones de liaison et structure chromatinienne (Khochbin, 2001) ; (Fan et al., 2005) ; (Robinson and Rhodes, 2006).

2. Les différents niveaux de structuration de la chromatine

Tout d'abord, voici quelques chiffres pour illustrer le problème. Un noyau d'une cellule eucaryote humaine contient environ 3 milliards de paires de bases d'ADN pour une taille d'environ 10 μ m de diamètre. Pour avoir une idée de comparaison, c'est comme si on vous demandait d'introduire un fil de 20 km de long dans une balle de tennis, et cela sans nœud et d'une manière parfaitement fonctionnelle.

Nous voyons donc tout de suite la nécessité d'organiser la chromatine en plusieurs niveaux de structures.

La chromatine est organisée en plusieurs niveaux de compaction (figure 4). Ils peuvent être découpés en trois niveaux d'organisation.

Le premier niveau d'organisation de la chromatine est bien connu. L'enroulement de l'ADN autour des histones forme les nucléosomes, qui sont reliés les uns aux autres par de courts

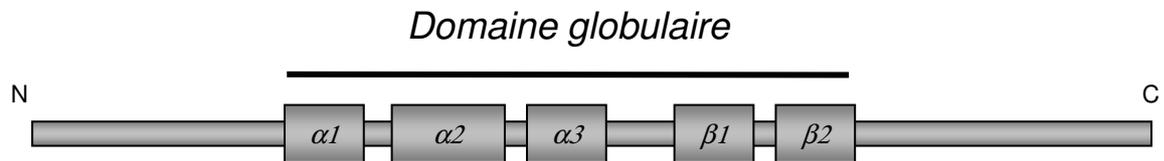
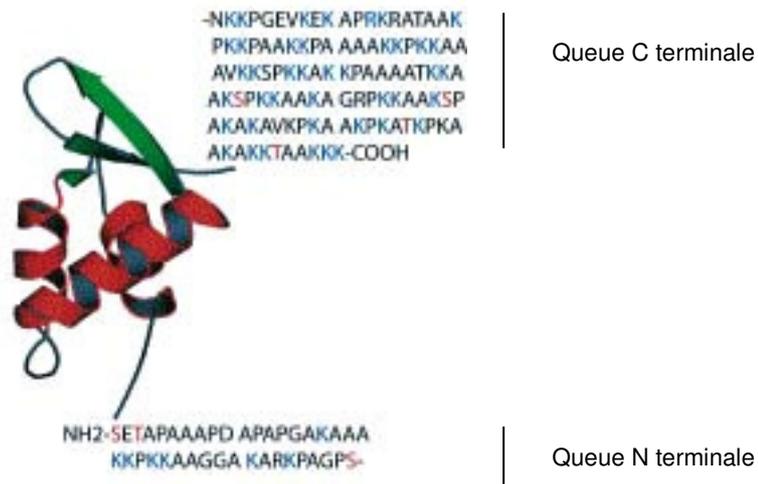
A**B**

Figure 3. Structure de l'histone de liaison H1

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 hélice ». Les zones N et C terminales ne sont pas structurées.

B. Structure tridimensionnelle de l'histone linker H1. Cette histone montre un domaine en « wing-hélice ». Les régions N et C terminales sont riches en lysines et en sérines, comme l'indique la séquence humaine en acide aminés de ces extrémités (D'après Khorasanizadeh, 2004).

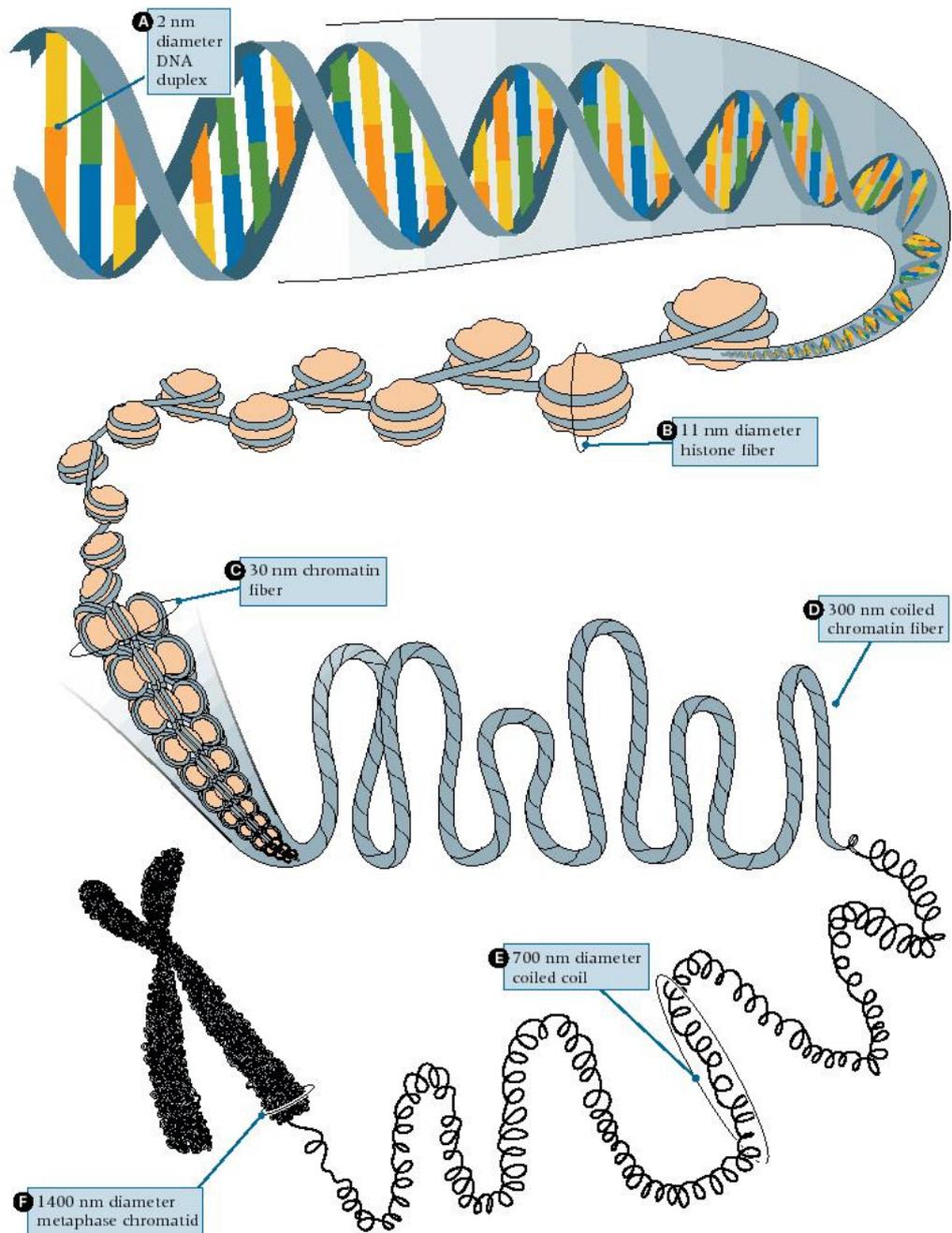


Figure 4. Les niveaux d'organisation de la chromatine

La double hélice d'ADN (taille caractéristique 2 nm) est enroulée autour des nucléosomes, donnant une structure en collier de perles (11 nm). La fibre de chromatine (diamètre 300 nm) résulte de l'enroulement de nucléosomes dans l'espace. L'étape ultime du compactage est le chromosome métaphasique.

segments d'ADN de liaison (15 à 80 paires de bases). Ceci produit une fibre chromatinienne d'environ 11nm de diamètre, qui ressemble à un collier de perles et que l'on appelle nucléofilament. Ce compactage de l'ADN en fibre chromatinienne raccourcit ses dimensions de six fois.

Le second niveau d'organisation correspond à la compaction du nucléofilament. Des interactions spécifiques entre les nucléosomes aboutissent à la formation de la fibre de 30 nm. Ce compactage raccourcit les dimensions de l'ADN de 2 à 3 fois. En dépit de nombreux travaux de recherche depuis plus de 30 ans, la structure de la fibre de chromatine de 30 nm fait encore l'objet de controverse.

Son architecture est encore mal définie, mais deux modèles s'affrontent pour tenter de définir sa structure :

- Le modèle dit "**en zig zag**" (figure 5 A). Ce modèle a été basé sur la cristallisation d'un tétranucléosome, en l'absence de H1 (Dorigo et al., 2004; Schalch et al., 2005). L'ADN linker situé entre chaque nucléosome traverse l'axe d'enroulement entre chaque nucléosome successif. Cet ADN de liaison s'entrecroise ainsi à l'intérieur de la fibre, de telle façon que deux nucléosomes adjacents sur le nucléofilament se retrouvent à des positions diamétralement opposées le long de la fibre de 30nm.

- Le modèle dit "**en solénoïde**" (figure 5 B). Dans ce modèle, la fibre de 30 nm possède une organisation hélicoïdale régulière, formant une hélice d'un pas de six nucléosomes (Bednar et al., 1998).

Des résultats de nouvelles expériences de cryo-microscopie électronique réalisées à partir de longues fibres contenant jusqu'à 70 nucléosomes confirmeraient ce modèle (Robinson et al., 2006; Robinson and Rhodes, 2006).

Le modèle en solénoïde est privilégié car il tient compte de la présence de l'histone de liaison H1. Cependant, ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs : la chromatine pourrait adopter une structure compacte en présence des histones de liaison et relâchée en leur absence.

Les niveaux d'organisation et de compaction supérieurs sont encore mal identifiés (Woodcock, 2006), car moins accessibles par nos méthodes d'étude actuelles.

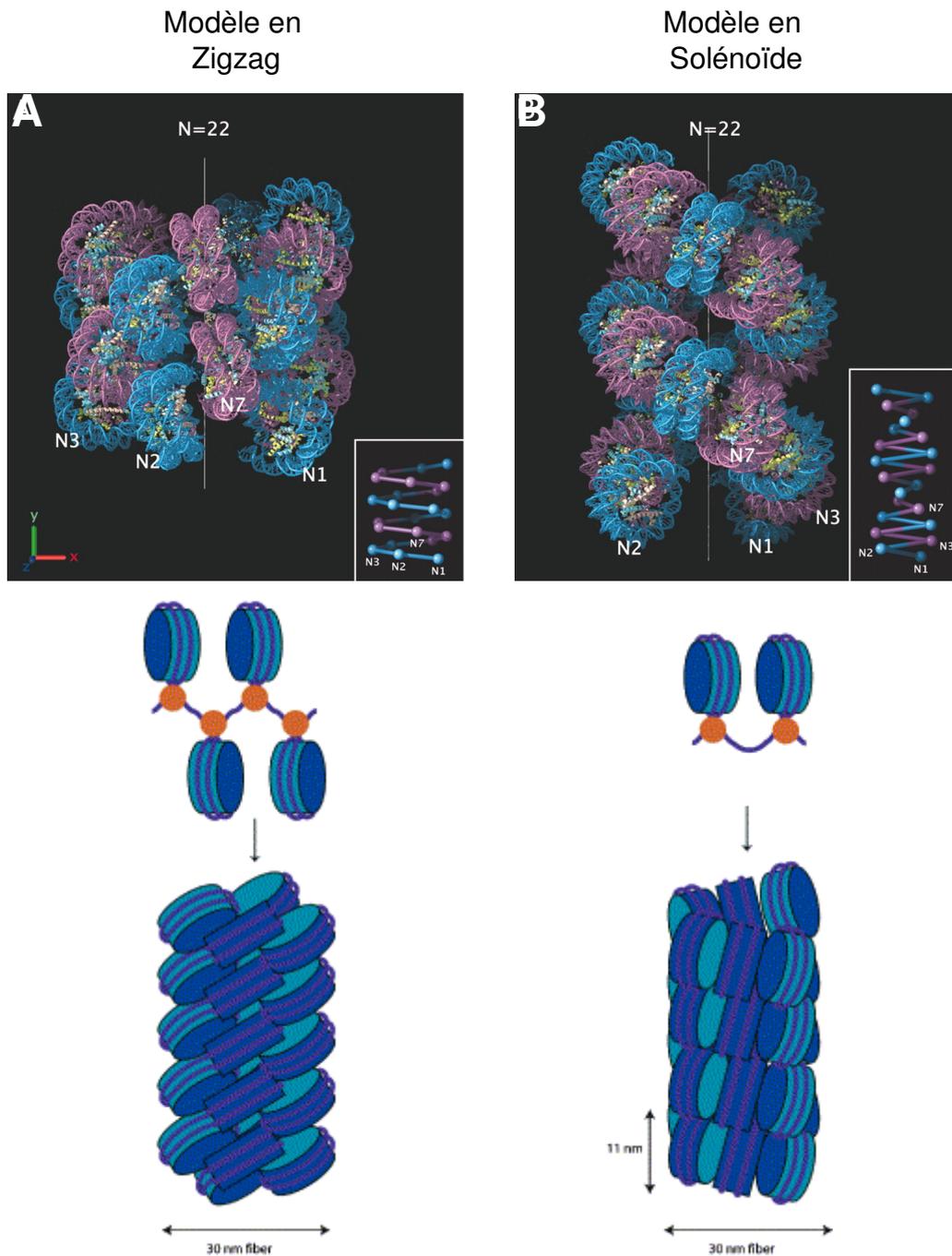


Figure 5. Les modèles d'organisation de la fibre de 30 nm

A. Modèle dit en zig zag. Représentation de l'organisation de la fibre de 30 nm en zig-zag dans laquelle sont représentées des paires de nucléosomes bleu et violet. Cette hélice contenant 22 nucléosomes aurait un diamètre de 28,4 nm.

B. Modèle dit e solénoïde. Représentation de l'organisation de la fibre de 30 nm en solénoïde dans laquelle l'enroulement en solénoïde s'effectue vers la gauche. Cette fibre contenant 22 nucléosomes aurait un diamètre de 33 nm (D'après Robinson et coll, 2006).

Un modèle de compaction final de la chromatine a été proposé à la suite de l'observation de la chromatine après l'enlèvement des protéines histones ainsi qu'un grand nombre de protéines non histones (Paulson and Laemmli, 1977). L'enlèvement de ces protéines n'a pas permis de dérouler totalement l'ADN, d'où l'hypothèse que la fibre de 30 nm se replierait en boucles de 100kb le long d'une matrice protéique du nucléosquelette, appelé « scaffold ». Ces boucles de chromatine seraient attachées à cette matrice au niveau de régions particulières de l'ADN appelées «SAR» pour *Scaffold Attachment Regions*. Ces rosettes formeraient ainsi des domaines de 1 Mb (figure 6).

Enfin cette organisation s'enroule en une spirale pour donner le chromosome métaphasique, où le taux final de compaction du génome est d'environ 10.000 fois par rapport à une molécule d'ADN linéaire (Belmont, 2002).

3. Compartimentation fonctionnelle de la chromatine

3.1. Généralités

Au début des années 1920, on commença à montrer que la chromatine n'était pas organisée de manière aléatoire au sein du noyau. Certaines zones du noyau étaient plus denses que d'autres, et l'euchromatine, représentant la chromatine lâche se distinguait de l'hétérochromatine, représentant la chromatine dense et compacte. De plus, ces régions spécifiques sont associées à des marques épigénétiques particulières, explicitées dans le paragraphe *Introduction A. II*.

3.2. L'euchromatine

L'euchromatine a été définie comme associée à une transcription active des gènes.

Certaines modifications d'histone sont observées avec une plus grande fréquence dans le compartiment euchromatinien, c'est le cas de la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me) (Santos-Rosa et al., 2002), de la méthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me) (Bernstein et al., 2005) et de l'hyperacétylation des histones H3 et H4 (H3ac, H4ac) (Grunstein, 1997).

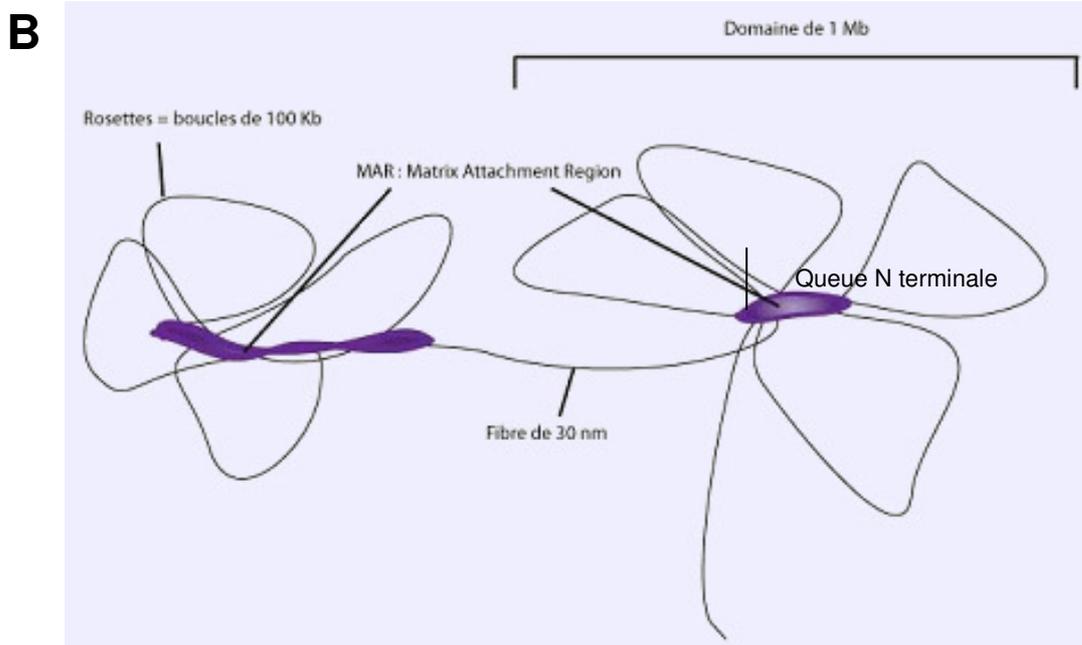
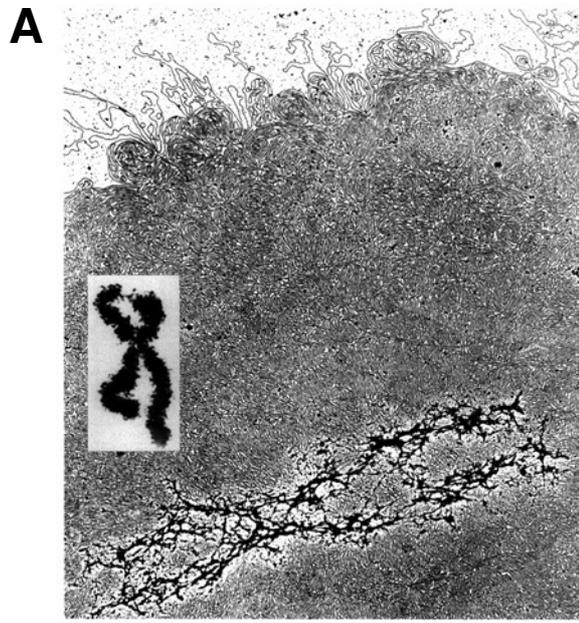


Figure 6. L'organisation en rosette de la fibre de 300 nm

A. Les chromosomes déplétés en histones maintiennent une certaine organisation. L'image en microscopie électronique montre le déroulement de l'ADN lors de l'extraction des histones. Les boucles d'ADN restent attachées à un squelette protéique de la forme caractéristique d'un chromosome en métaphase. Echelle 2 μ m. (D'après Paulson et Laemmli, 1977).

B. L'organisation de la chromatine au niveau des régions d'attachement à la matrice. La fibre de 30 nm s'organise en domaines d'environ 1 Mb, eux-mêmes constitués de sous-domaines (ou « rosettes ») de 100 Kb, maintenues par des liaisons entre la base des boucles (SAR = Scaffold Attachment Region) et des protéines de structure.

3.3. L'hétérochromatine

Au sein de l'hétérochromatine, la transcription est très fortement réprimée. Un certain nombre de marques y sont associées, telles que la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Litt et al., 2001; Taverna et al., 2002) ou la présence de la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1). Cependant, des données récentes réfutent un rôle unique de répression génique de HP1, puisque cette protéine est retrouvée associée à des gènes actifs chez la drosophile (de Wit et al., 2007). Le mécanisme de formation de l'hétérochromatine est très conservé de la levure jusqu'à l'homme (Grewal and Elgin, 2007). La triméthylation de H3K9 se fait par des enzymes conservées entre toutes les espèces (Clr4 (cryptic loci regulator 4) pour la levure, Suv39h1 et Suv39h2 pour la drosophile, la souris et l'homme). Cette triméthylation de H3K9 permet alors le recrutement de facteurs à chromodomaines (liant la chromatine méthylée), telles que swi6 chez la levure, HP1 chez la drosophile, la souris et l'homme. De manière intéressante, des études chez la levure ont permis de découvrir la présence d'un système d'ARN interférence (RNAi) lors de la formation de l'hétérochromatine (Hall et al., 2002; Volpe et al., 2002).

L'hétérochromatine peut être subdivisée en deux groupes.

On distingue d'une part l'*hétérochromatine facultative*, qui correspond aux régions pouvant adopter de façon réversible les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'hétérochromatine constitutive en fonction de stades de développement particuliers ou dans des types cellulaires donnés. C'est notamment le cas du chromosome X inactivé chez les mammifères femelles par exemple, aboutissant à une structuration différente de deux chromosomes.

D'autre part, on distingue l'*hétérochromatine constitutive* qui reste continuellement dans cet état, et qui est riche en séquences répétées du génome. L'hétérochromatine constitutive est généralement pauvre en gènes, riche en séquences hautement et moyennement répétées, telles que les séquences satellites (Grewal and Elgin, 2007). Elle regroupe notamment les télomères, les centromères et les péri-centromères. Chez les mammifères, les centromères et régions péri-centromériques s'associent généralement entre elles, formant des foyers appelés chromocentres (Taddei and Gasser, 2004).

L'hétérochromatine constitutive est un état stable et irréversible de la chromatine qui est transmis entre chaque division cellulaire, constituant donc une forme de mémoire cellulaire (Grewal and Elgin, 2007).

3.4. Les territoires chromosomiques

Malgré l'hypothèse de Rabl en 1885 puis de Boveri en 1909 que les chromosomes sont répartis de manière non aléatoire dans le noyau, les seules preuves avancées étaient limitées aux animaux et aux plantes supérieures.

C'est en 1982 que les travaux de Cremer et coll valident cette hypothèse, à savoir que les chromosomes décondensés sont disposés de façon non aléatoire car chaque chromosome occupe, dans le noyau en interphase, un territoire bien défini (Cremer et al., 1982).

Les chromosomes riches en gènes résident plutôt dans la partie interne du noyau tandis que les chromosomes pauvres en gènes se situent préférentiellement à la périphérie du noyau (Bolzer et al., 2005; Cremer et al., 2003). Typiquement, le chromosome X inactif se localise près de la membrane nucléaire. D'une manière générale, la partie interne du noyau héberge la chromatine transcriptionnellement active tandis qu'est retrouvée en périphérie nucléaire l'hétérochromatine.

Depuis la fin des années 1990, un modèle propose que chacun des territoires chromosomiques soit subdivisé en sous-territoires, à la périphérie desquels les gènes pourraient être transcrits. Ainsi, le noyau des cellules eucaryotes est compartimentalisé et organisé en une structure en trois dimensions appelée territoires chromosomiques (CTs), entourés par un compartiment appelé compartiment interchromatique (IC). Des boucles chromatiniennes permettent de relocaliser des loci dans des sites de transcription ou de répression (Gilbert et al., 2005). Les gènes activement transcrits seraient localisés sur le pourtour de chaque territoire chromosomique, là où ces territoires sont facilement accessibles aux facteurs de transcription. Cette hypothèse est soutenue par la détection d'ARN nouvellement synthétisés en périphérie des territoires. Pourtant, cette hypothèse serait remise en cause par le repérage de sites d'initiation de la transcription à l'intérieur des territoires chromosomiques, dans des zones où la chromatine est peu condensée (Williams, 2003).

II. L'hétérogénéité de la chromatine, support de l'information épigénétique

Il existe une grande hétérogénéité du génome, qui contient différents types de séquences, définissant des gènes (avec promoteurs, séquences introniques, ...), des séquences répétées, des transposons, des télomères, etc...

Cependant, cette hétérogénéité n'est que très minoritairement définie au niveau de la séquence d'ADN. L'hétérogénéité du génome est en fait portée par la chromatine, et fait intervenir de nombreuses modifications de l'ADN et des protéines associées, indépendamment de sa séquence. C'est notamment le cas de la méthylation de l'ADN, des modifications post-traductionnelles des histones et de l'incorporation de variants d'histones.

Ces modifications peuvent être transmises au cours de la division cellulaire et être donc maintenues au cours de la réplication. Lorsque ces modifications, qui définissent des régions fonctionnelles du génome, sont ainsi transmises aux cellules filles, elles constituent ce que l'on nomme l'information épigénétique.

1. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un phénomène que l'on retrouve chez de nombreux êtres vivants (Goll and Bestor, 2005). Chez les mammifères, elle consiste à ajouter un résidu méthyl sur une cytosine précédant un résidu Guanine, située au niveau d'un enchaînement de CG. Environ 60 à 90 % des séquences CpG sont méthylées, tandis que les dinucléotides CpG non méthylés se regroupent en clusters, appelés « îlots CpG » et sont retrouvés au niveau des régions promotrices des gènes (Ng and Bird, 1999).

La méthylation des dinucléotides CpG est catalysée par un groupe conservé de protéines appelées "DNA methyltransferase" (Dnmt), regroupées en trois familles possédant des fonctions précises.

La DNMT 1 maintient les profils de méthylation au cours des divisions cellulaires en copiant les marques de méthylation au cours de la propagation de la fourche de réplication (Rountree et al., 2000). En effet, le profil de méthylation de l'ADN est stable et transmis à chaque division cellulaire (Wigler, 1981).

La DNMT 2, identifiée par homologie de séquence avec DNMT1, est longtemps restée de fonction inconnue. Récemment, il a été montré qu'elle méthyle un ARNt (Goll et al., 2006).

La famille DNMT 3 comprend deux membres enzymatiquement actifs, DNMT3a et DNMT3b et un facteur régulateur, DNMT3-Like (DNMT3L).

DNMT3a et DNMT3b sont toutes les deux impliquées dans la méthylation de nouveaux îlots CpG, notamment lors du développement des cellules germinales et de l'embryogénèse précoce (Goll and Bestor, 2005). DNMT 3a est impliquée dans la méthylation des séquences régulatrices de l'expression des gènes tandis que DNMT 3b est elle impliquée dans la méthylation des séquences satellites des centromères.

DNMT3L ne contient pas de domaine DNMT, mais interagit avec DNMT3a et 3b afin de potentialiser leur activité de méthylation de novo *in vitro* (Chen et al., 2005; Gowher et al., 2005; Kareta et al., 2006; Suetake et al., 2004) et *in vivo* (Chedin et al., 2002).

Les DNMT sont essentielles car les mutants *Dnmt3a^{-/-}* et *Dnmt3b^{-/-}* meurent pendant la gestation (Okano et al., 1999). L'inactivation du gène codant *Dnmt1* chez la souris est létale. L'absence de *Dnmt1* induit une déméthylation massive du génome, provoquant l'expression bi-allélique des gènes soumis à l'empreinte génomique parentale (Li et al., 1992).

La modification covalente des cytosines par méthylation représente une marque épigénétique importante pour de nombreux processus cellulaires chez les organismes eucaryotes. Elle joue un rôle pour l'inactivation des transposons, la mise en place de l'empreinte parentale et l'inactivation du chromosome X ainsi que pour la régulation de l'expression des gènes. Une modification du profil de méthylation a également lieu au sein de cellules cancéreuses (Esteller, 2007).

1.1. L'inactivation des transposons

Les transposons constituent 45% du génome humain et 37% chez la souris (Smit and Riggs, 1996). Leur méthylation inactive l'expression des gènes nécessaires à leur propagation, limitant ainsi les risques de mutagénèse par insertion dans une zone codante (Goll and Bestor,

2005). En effet, l'inactivation de DNMT3L chez *Arabidopsis thaliana* et chez la souris conduit à la réactivation des gènes codés dans les transposons (Bourc'his and Bestor, 2004) (Lippman et al., 2004). A long terme, la méthylation constitutive des transposons conduit à leur inactivation totale, car une déimination spontanée mute les cytosines méthylées en thymines. Une hypométhylation de ces régions semble jouer un rôle lors de la carcinogénèse (Wilson et al., 2007).

1.2. L'empreinte parentale et l'inactivation du chromosome X

L'empreinte parentale est définie par l'établissement de modifications épigénétiques spécifiques de la lignée germinale qui conduisent à l'expression spécifique d'un seul allèle parental d'un nombre limité de gènes, environ une centaine chez la souris (Ferguson-Smith and Surani, 2001; Reik and Walter, 2001). Ces gènes se retrouvent souvent en clusters régulés par des régions riches en CpG nommées ICR (Imprinted Control Region) ou DMR (Differentially Methylated Regions) (Lopes et al., 2003 ; Edwards and Ferguson-Smith, 2007). Les îlots CpG de ces ICR se retrouvent méthylés ou non, selon leur expression allélique. Typiquement, dans les cellules somatiques, ils montrent des profils de méthylation différents selon l'allèle parental (Delaval et al., 2007). Cette méthylation de l'ADN est maintenue au cours des divisions cellulaires somatiques par la DNA methyltransferase Dnmt1 (Vilkaitis et al., 2005). De même, la méthylation de l'ADN est un des mécanismes nécessaires à l'inactivation du chromosome X chez les femelles (Chang et al., 2006).

1.3. La régulation de l'expression des gènes

Les îlots CpG se retrouvent au niveau des promoteurs des gènes (Larsen et al., 1992). Tandis que la méthylation de l'ADN est plutôt associée à un état de répression transcriptionnelle, les îlots CpG non méthylés sont généralement associés à un état chromatinien transcriptionnellement actif (Guenther et al., 2007; Weber et al., 2007). Plusieurs explications ont été proposées pour expliquer cette régulation. La méthylation de l'ADN empêcherait directement la fixation des facteurs de transcription sur les promoteurs. Des travaux ont

notamment montré que la méthylation des sites de fixation empêchait la liaison du facteur de transcription c-myc (Prendergast and Ziff, 1991) ainsi que du facteur CTCF responsable de la régulation du locus *Igf2/H19* (Bell and Felsenfeld, 2000). La méthylation de l'ADN empêcherait également la propagation des marques de l'hétérochromatine active. Ainsi, il a été récemment montré que la méthylation de l'ADN empêchait l'incorporation des modifications post-traductionnelles des histones H3K4me2 et H3K4me3, qui constituent des marques de l'hétérochromatine active (Okitsu and Hsieh, 2007).

La méthylation de l'ADN permettrait enfin de recruter des protéines liant l'ADN méthylé, les MBP (Methyl Binding Proteins) nommées MBD1, MBD2, MBD3, MeCP2 et Kaiso (Sansom et al., 2007). Ces protéines semblent jouer un rôle dans la répression transcriptionnelle liée à la méthylation de l'ADN mais le mécanisme n'est encore pas clairement élucidé. Ces MBP pourraient interagir avec des histones déacétylases ou des facteurs répresseurs (Harikrishnan et al., 2005; Jones et al., 1998).

2. La modification post-traductionnelle des histones

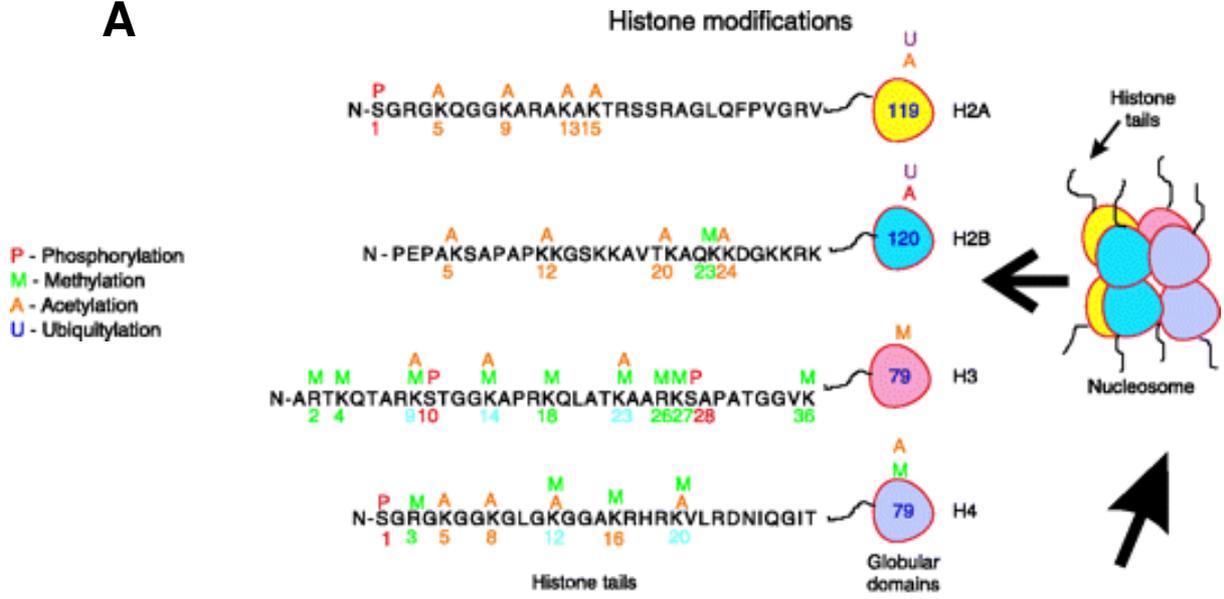
Les histones sont sujettes à de nombreuses modifications post-traductionnelles, incluant la méthylation et l'acétylation des arginines et des lysines, la phosphorylation des serines et des thréonines, l'ubiquitination, la sumolyation et la biotinylation des lysines ainsi que l'ADP-ribosylation. Les queues des histones de coeur, très accessibles, portent l'essentiel des sites de modifications connues à ce jour (figure 7 A) mais elles peuvent aussi toucher les domaines centraux des histones et les histones de liaison. Chacune de ces modifications a un rôle biologique précis (figure 7 B) (Munshi et al., 2009).

Une nomenclature de la dénomination de ces histones a été proposée en 2005, afin d'harmoniser les travaux sur ce sujet (Turner, 2005) (figure 8).

Toutes les modifications d'histones sont réversibles. L'état de modification d'un résidu d'histone est contrôlé par un équilibre entre les enzymes qui catalysent l'ajout et celles qui catalysent le retrait d'une modification donnée.

Les modifications post-traductionnelles des histones sont souvent classées en deux catégories selon qu'elles sont corrélées avec une activation de la transcription ou une répression:

A



B

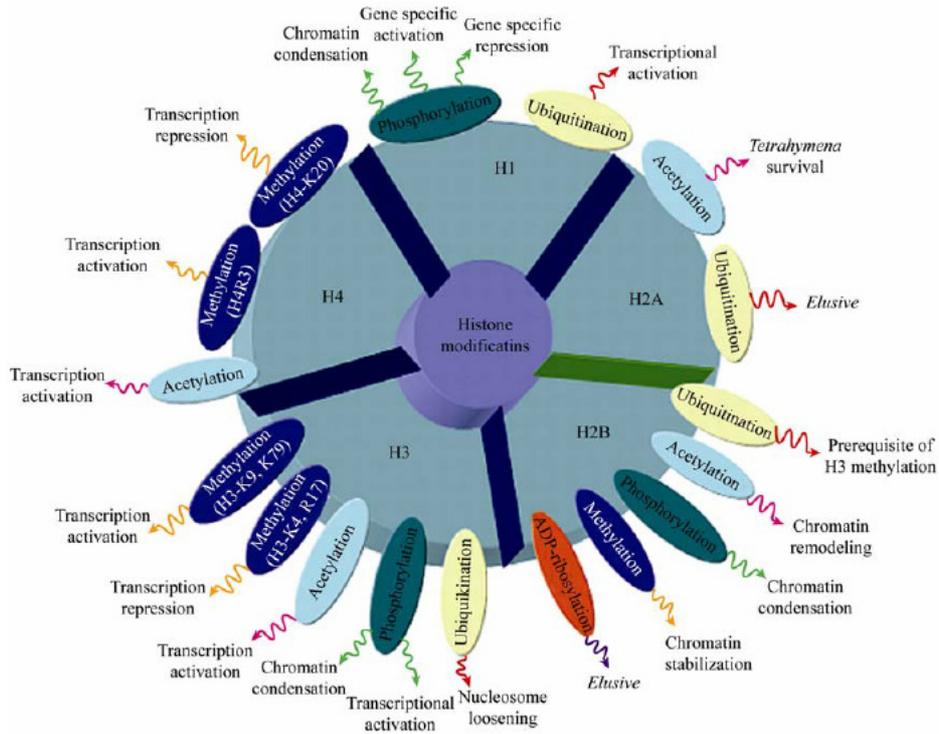


Figure 7. Modifications post-traductionnelles des histones

A. Schématisation des modifications post-traductionnelles des histones. Seule la séquence des queues N-terminales est représentée. Un grand nombre de résidus arginines peuvent être méthylés (R). Les résidus lysines (K) peuvent être acétylés, méthylés ou ubiquitinés. Les résidus sérines (S) peuvent être phosphorylés. La combinaison de toutes ces marques crée le code histone. (D'après Zamudio et al, 2008).

B. les modifications des histones et leurs rôles biologiques. Toutes les histones sont modifiées et chacune de ces modifications sur une histone donnée à un rôle biologique spécifique. (D'après Munshi et al, 2009).

Modifying group	Amino acid(s) modified	Level of modification	Abbreviation for modification ^a	Examples of modified residues ^b
Acetyl- Methyl-	Lysine	mono-	ac	H3K9ac
	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	H3S10ph
Ubiquityl-	Lysine	mono- ^c	ub1	H2BK123ub1
SUMOyl-	Lysine	mono-	su	H4K5su ^d
ADP ribosyl-	Glutamate	mono-	ar1	H2BE2ar1
	Glutamate	poly-	arn	H2BE2arn ^d

Figure 8: La nomenclature utilisée pour la dénomination des modifications post-traductionnelles des histones (D'après Turner, 2005)

- Les modifications associées à une transcription active, telles que l'acétylation des histones H3 et H4, ou la méthylation de H3K4, H3K36 et H3K79 sont considérées comme des marques de l'euchromatine.

- Les modifications fréquemment observées sur une chromatine compactée et transcriptionnellement réprimée, comme la triméthylation de H3K9, H3K27 et H4K20, sont référencées comme des modifications de l'hétérochromatine.

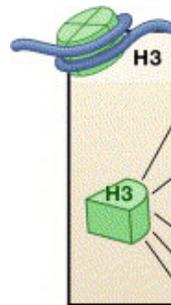
2.1. La méthylation

L'histone la plus méthylée est l'histone H3, suivie par l'histone H4. La méthylation des histones peut se faire sur les lysines (L) par mono-, di-, ou tri- méthylation ou sur les arginines par mono et diméthylation. Les conséquences biologiques de la méthylation d'une lysine sont différentes selon que le résidu modifié se trouve mono-, di-, ou tri-méthylé (Santos-Rosa et al., 2002; Wang et al., 2003). De plus, la méthylation des lysines peut être associée soit à une activation soit à une répression transcriptionnelle selon la position du résidu qui se trouve méthylé (Martin and Zhang, 2005).

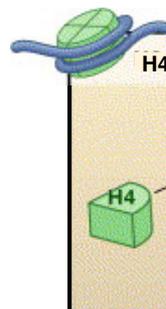
La méthylation des histones est due à l'action des histones méthyltransférases (HMT). Elles sont regroupées en deux classes, celles qui méthylent les arginines (PRMT) et celles qui méthylent les lysines (HKMT). Les HKMT possèdent toutes un domaine conservé appelé domaine « SET », à l'exception de Dot1, et sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, tels que l'activation ou la répression des gènes (Jenuwein and Allis, 2001). La spécificité de l'action des HKMT, ainsi que le nombre de groupements méthyl ajoutés dépend de la nature de chaque enzyme et de la présence de certains cofacteurs. Plus d'une vingtaine de lysine methyltransférases (Qian and Zhou, 2006) et une dizaine d'arginine methyltransférases (Krause et al., 2007) ont été identifiées.

Il a longtemps été admis que la méthylation des histones était un processus irréversible. Mais la découverte dans les années 2000 de deux familles de lysines déméthylases a modifié ce dogme (Figure 9).

En 2004, la première protéine de la classe des histones déméthylases contenant un domaine amine oxydase fut découverte. Il s'agissait de la déméthylase LSD1 qui seule, déméthyle spécifiquement H3K4me1 et H3K4me2, des marques de la chromatine transcriptionnellement



H3	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	?
K36	SET2/HYPB, NSD1	JmjC-proteins
K79	DOT1	?



H4	Histone lysine methyltransferases	Histone lysine demethylases
K20	PR-SET7 (mono), SUV4-20H1, SUV4-20H2 (di/tri)	?

Figure 9. Dynamique de méthylation des lysines des histones

Les méthyltransférases et déméthylases des lysines de chaque histone H3 et H4 sont indiquées. La déméthylase de l'histone H4 n'est pas encore connue. (D'après Trojer and Reinberg, 2006)

active, agissant ainsi comme répresseur transcriptionnel (Shi et al., 2004). En revanche, lorsque LSD1 se complexe avec le récepteur aux androgènes AR, il permet la déméthylation de H3K9me1 et H3K9me2 (Metzger et al., 2005).

En 2006, une nouvelle protéine, appartenant à une deuxième classe de déméthylase possédant un domaine JmjC (jumonji), est identifiée. Il s'agit de la déméthylase JHDM1A, qui déméthyle spécifiquement H3K36me1/2 (Tsukada et al., 2006).

Cette deuxième famille de déméthylases permet la déméthylation de lysines tri-méthylées, réaction que LSD1 n'est pas capable de catalyser. La protéine JMJD2A permet notamment la déméthylation spécifique de H3K9me3 (Whetstine et al., 2006).

Enfin, la seule enzyme connue pour déméthyliser les arginines est PAD4 (peptidyl arginine deiminase 4), qui convertit l'arginine méthylée en citruline (Wang et al., 2004).

2.2. L'acétylation

L'acétylation des lysines sur les parties N-terminales des histones est associée à l'activation de la transcription (Allegra et al., 1987; Tse et al., 1998). Il a été proposé que l'acétylation des histones pouvait altérer les interactions électrostatiques liant l'ADN aux histones, conduisant à une ouverture du nucléosome qui deviendrait ainsi favorable à la transcription (Freitas et al., 2004). Cette idée est soutenue par l'observation que les histones acétylés sont plus facilement dissociés de l'ADN *in vivo* (Reinke and Horz, 2003) et *in vitro* (Hassan and Zemleni, 2006). En plus de la queue N-terminale, des lysines du domaine globulaire peuvent aussi être acétylées : l'acétylation d'une lysine du domaine de coeur de H3 (K56) a été récemment identifiée (Han et al., 2007).

L'acétylation des histones est catalysée par les HAT (histones acétyltransferases) qui utilisent le co-enzyme A comme substrat pour acétyler des résidus lysines spécifiques sur les histones. Il existe deux différents types de HAT. Les HAT de type A, nucléaires, sont responsables de l'acétylation des histones et sont directement impliquées dans la régulation de l'assemblage de la chromatine et la transcription des gènes (Carrozza et al., 2003). Les HAT de type B, cytoplasmiques, catalysent l'acétylation des histones dans le cytoplasme, particulièrement au niveau des lysines 5 et 12 de H4, avant leur dépôt sur la chromatine (Parthun et al., 1996) (Verreault et al., 1998).

Basée sur leur similarité de séquence, les HAT sont organisées en 3 familles majeures: GNAT, P300 et MYST, avec chacune des spécificités de substrat (Figure 10 A).

La déacétylation des histones est catalysée par des protéines possédant une activité de déacétylation des histones. On peut distinguer la famille des HDAC (histones déacétylases) requérant l'ion Zn^{2+} pour fonctionner et regroupée en trois classes (classe I, II et IV) (Figure 10 B) ainsi que la famille des SIR2, dépendant du cofacteur NAD^+ et formant la classe III (de Ruijter et al., 2003; Khochbin et al., 2001).

Les membres de la classe I sont exclusivement localisés dans le noyau (à l'exception de HDAC3 (Takami and Nakayama, 2000)) alors que ceux de la classe II transitent entre le cytoplasme et le noyau.

HDAC11 est le seul membre de la classe IV : bien qu'il possède une activité de déacétylation des histones *in vitro*, sa faible homologie de séquence avec les autres HDAC le rend inclassable dans les classes I et II (Gao et al., 2002).

Les HDAC sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation et sont présentes dans de nombreux complexes, tels que Sin3/HDAC et NuRD/Mi2/NRD pour HDAC1 et HDAC2 (Knoepfler and Eisenman, 1999).

2.3. L'ubiquitination

La mono-ubiquitination consiste en l'accrochage sur une lysine d'un peptide très conservé de 76 résidus appelé ubiquitine (Moore et al., 2002). Contrairement à la poly-ubiquitination, la mono-ubiquitination des histones ne semble pas conduire à la dégradation de la protéine modifiée. L'ubiquitination des histones touche principalement H2A et H2B bien que H3 soit également ubiquitinée dans les spermatides allongées (Moore et al., 2002). L'ubiquitination constitue une modification post-transcriptionnelle essentielle pour la transition histone-protamine (Sassone-Corsi, 2002). En effet, l'inactivation de *HR6* chez la souris, un gène codant une enzyme catalysant l'ubiquitination de H2B, entraîne une stérilité mâle avec des défauts de spermiogénèse suggérant un problème de condensation de la chromatine (Roest et al., 1996).

A

Nom	Spécificité de substrat	Complexes connus
GNAT family of histone acetyltransferases		
Gcn5	H3K9, 14, 36	SAGA, Gcn5/Ada2/Ada3, ATAC, TFTC
p/CAF	H3K14	STAGA
MYST family of histone acetyltransferases		
Esa1 (Tip60 in <i>H. sapiens</i>)	H4K5, K8, K12, K16; Htz1K14	NuA4, Piccolo NuA4
Sas2 (MOF in <i>H. sapiens</i>)	H4K16	SAS-I
Sas3	H3K14, K23	NuA3
MOZ	H3K14	MOZ
p300 family of histone acetyltransferases		
CBP	H2AK5; H2B	Numerous
p300	H2AK5; H2B	Numerous
Rtt109	H3K56, K9, K23	Rtt109-Vps75, Rtt109-Asf1

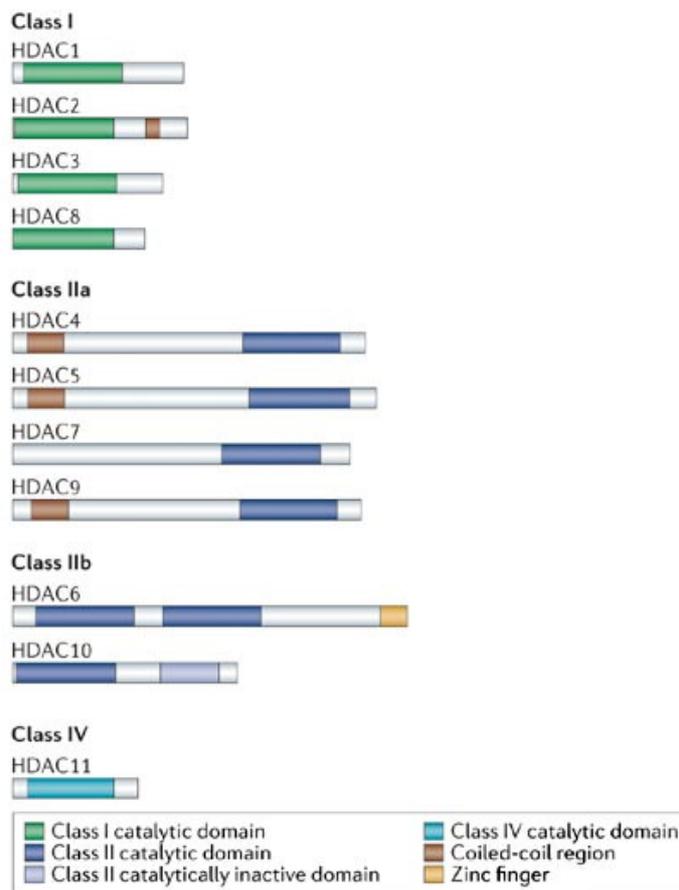
B

Figure 10. Dynamique d'acétylation des histones

A. Les trois familles majeurs d'histones acétyltransférases. Pour chacune des trois familles, il est indiqué son nom, sa spécificité de substrat ainsi que les complexes connues auxquels chaque protéine s'associe. GNAT= Gcn5-related N-acetyltransferase; MYST= MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60. (D'après Berndsen and Denu, 2008)

B. Les histones déacétylases. Les histones déacétylases sont regroupées en 4 classes, selon leur homologie de séquence avec les protéines de la levure. Les domaines catalytiques sont représentés en couleur. (D'après Bolden et al, 2006)

2.4. La phosphorylation

La majorité des travaux effectués sur cette modification ont été réalisés sur la sérine 10 de l'histone H3. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la phosphorylation se produit lors de l'activation transcriptionnelle et durant la condensation des chromosomes mitotiques (Berger, 2002). La phosphorylation des histones joue également un rôle dans la réparation de l'ADN ayant subi des cassures doubles brins. Chez la levure, Mec1 phosphoryle la sérine 129 de l'histone H2A en réponse à certains dommages de l'ADN (Downs et al., 2000). Le résidu 139 de l'histone variant H2A.X est ciblé par une kinase ATM/ATR dans des conditions similaires chez les mammifères (Redon et al., 2002). D'autres résidus des histones peuvent être phosphorylés, notamment la sérine 28 de H3, la sérine 14 de H2B, ainsi que les sérines 1 de H4 et de H2A.

2.5. L'ADP-ribosylation

La mono-ADP-ribosylation est une modification post-traductionnelle mal connue dont les conséquences biologiques ne sont pas bien comprises. Les histones peuvent être mono- (par les mono-ADP-ribosyltransférases (MARTS)) ou poly-ADP ribosylés (par les poly-ADP-ribose polymérase (PARPs)).

La famille des PARP compte 17 membres qui catalysent le transfert séquentiel d'ADP-ribose sur des acides glutamiques ou acides asparagiques, en utilisant le NAD⁺ comme cofacteur (Schreiber et al., 2006).

PARP1, une poly-ADP-ribose polymérase, est l'enzyme la plus étudiée. PARP1 est un senseur des dommages à l'ADN, et joue un rôle dans l'organisation spatiale et temporelle de la réparation (de Murcia et al., 1997; Wang et al., 1997). Les souris déficientes en PARP1 sont plus sensibles aux agents causant des dommages à l'ADN tels que les rayons ionisants.

2.6. La biotinylation

Cette modification post-traductionnelles des histones a été découverte au début de la décennie (Stanley et coll, 2001). La réaction de biotinylation permet de fixer un résidu biotine sur une lysine par l'intermédiaire de biotinidase ou de holocarboxylase synthetase (HCS)

(Narang et al., 2004). Les biotinidases utilisent la biocytine comme substrat tandis que les HCS utilisent la biotine et l'ATP.

Les lysines K4, K9 et K18 de l'histone H3 ainsi que les lysines K8 et K12 de l'histone H4 ont été identifiées comme des sites de biotinylation (Camporeale et al., 2004).

2.7. La sumolyation

Les protéines SUMO (Small ubiquitin-related modifier) sont très proches de par leur taille et leur structure à l'ubiquitine.

Shiio et Eisenman ont montré que l'histone H4 est sumoylée *in vivo* et *in vitro*. De plus, ils montrent que cette sumoylation entraîne une répression transcriptionnelle par recrutement de HDAC et de la protéine HP1 (Shiio and Eisenman, 2003).

2.8. Le code histone

Chez l'homme, on compte plus de cinquante résidus modifiables au sein des histones, certains de ces acides aminés pouvant l'être de plusieurs manières, donnant au total une estimation de plus d'un milliard de milliard de combinaisons possibles !

Mais certaines de ces combinaisons semblent préférentiellement se produire. En effet, ces modifications ont une influence les unes sur les autres lorsqu'elles sont présentes sur une même queue d'histone. Par exemple, l'acétylation de H3K4, une marque de la chromatine transcriptionnellement active, inhibe la méthylation de H3K9, une marque de l'hétérochromatine.

De plus, elles auraient également des influences sur d'autres modifications en trans, c'est-à-dire positionnées sur d'autres histones. En effet, l'ubiquitylation de la lysine 123 de H2B stimulerait la méthylation des lysines 4 et 79 de H3 (Briggs et al., 2002).

La combinaison spécifique de ces marques crée ainsi le « code des histones ».

L'hypothèse du code histone propose que ces combinaisons spécifiques de modifications d'histones définissent un signal. Elles servent ainsi de langage intermédiaire entre les histones et les activités du génome, afin d'assigner une fonction à une structure ou une région particulière de la chromatine (Strahl and Allis, 2000).

3. L'incorporation de variants d'histones

Les variants d'histones sont des protéines homologues à l'une des cinq histones de canoniques mais possédant des propriétés spécifiques. Leur incorporation au sein de la chromatine est un moyen d'introduire des différences de structure et d'activité au sein de la chromatine, importantes au niveau de domaines spécifiques du génome. Ce rôle structural et fonctionnel de ces variants a fait et fait encore l'objet de nombreuses études.

On peut distinguer des variants ubiquitaires comme des variants spécifiques d'un tissu, en particulier le testicule (Table 4). La majorité de ces variants étant incorporés à la chromatine au cours de la spermatogénèse, leur rôle dans ce processus sera étudié par la suite (paragraphe *Résultats B. II. 2.*).

Un rapide survol de leurs caractéristiques et leurs fonctions principales dans les cellules somatiques sera présenté ici.

Selon les variants d'histones, leur homologie avec l'histone canonique correspondante est très proche ou au contraire très éloignée. Les variants de l'histone H3 sont par exemple très proches de leur homologue canonique. Nous pouvons notamment prendre l'exemple du variant H3.3, qui chez l'homme, diffère de l'histone canonique H3.1 de seulement 4 acides aminés. Au contraire, les variants de H2A sont extrêmement divergents. Nous pouvons prendre l'exemple du variant macroH2A qui possède à son extrémité C-terminale une extension, appelée « macrodomaine », représentant les deux tiers de la protéine.

L'incorporation de ces variants au sein de nucléosomes, marquant ainsi des régions chromatiniennes, a un impact sur de nombreux événements cellulaires tels que la réplication, la transcription ou la réparation des cassures doubles brins.

3.1. Le maintien de l'intégrité du génome

L'implication de H2A.X dans la réparation des cassures doubles brins est maintenant démontrée. Jouant un rôle critique dans le maintien de la stabilité du génome, le variant H2A.X est logiquement conservé chez tous les eucaryotes supérieurs étudiés et représente même l'unique forme de l'histone H2A chez *Saccharomyces cerevisiae* (Malik and Henikoff,

2003). Des travaux ont ainsi montré que des cellules embryonnaires (MEF) dérivées de souris H2A.X^{-/-} présentaient un niveau important d'aberrations chromosomiques induites par un rayonnement ionisant, confirmant l'implication d'H2A.X dans la signalisation et/ou la réparation des cassures doubles brins (Stucki et al., 2005).

Le variant H2A.X serait présent dans tout le génome, à raison de deux molécules H2A.X tous les dix nucléosomes (Pilch et al., 2003). Juste après un dommage à l'ADN, H2A.X serait phosphorylée (γ H2A.X) au niveau du site de cassure de l'ADN (Rogakou et al., 1998). Cette phosphorylation permettrait alors le recrutement de facteurs de réparation, ceux-ci formant de larges foyers cytologiquement visibles (Bassing et al., 2002; Celeste et al., 2002).

Il a été récemment montré que H2A.X pouvait subir d'autres modifications post-traductionnelles. Des travaux chez l'homme ont montré qu'elle pouvait également être acétylée sur K5 par l'acétyltransférase Tip60, puis ubiquitinée sur K19 par l'enzyme UBC13 (Ikura et al., 2007). Ces modifications faciliteraient le relargage de H2A.X. Ainsi, H2A.X pourrait jouer deux rôles distincts dans les premiers temps de la réponse aux dommages à l'ADN : la phosphorylation de H2A.X permettrait le recrutement de facteurs de réparation tandis que l'ubiquitination et l'acétylation faciliteraient le relargage de H2A.X au niveau du site de cassure.

3.2. La structuration spécifique des centromères

CENP-A est un variant de H3 impliqué dans la formation du nucléosome au niveau des centromères (Sullivan et al., 1994). Sa synthèse semble couplée avec la réplication des centromères durant les phases S/G2 (Shelby et al., 1997). La présence de ce variant au niveau des centromères est capitale pour le recrutement des composants du kinétochore, nécessaires au bon déroulement de la mitose et donc du cycle cellulaire (Amor et al., 2004).

Ce variant semble indispensable à la survie de la cellule. En effet, après invalidation du gène chez la souris, les souris hétérozygotes sont saines et fertiles tandis que les mutants homozygotes ne survivent que quelques jours après la conception, les cellules montrant de gros problèmes mitotiques (Howman et al., 2000). Inversement, une surexpression de ce variant dans des cellules conduit à la formation de sites ectopique de recrutement des kinétochores et de d'assemblage de faisceaux de microtubules, donnant lieu à une instabilité

génomique (Heun et al., 2006). Ce phénomène est fréquemment observé dans des cellules cancéreuses (Tomonaga et al., 2005; Tomonaga et al., 2003).

3.3 Le marquage des régions transcriptionnellement actives

Les régions transcriptionnellement actives sont marquées par la présence de 2 variants d'histones, les variants H2A.Bbd et H3.3

Le variant H2A.Bbd a été décrit pour la première fois chez l'homme par Chadwick et Willard (Chadwick and Willard, 2001b) comme exclus du chromosome X inactif, d'où lui vient son nom (H2A-bar body deficient).

Des travaux par FRAP ont montré que le dimère H2B/H2A.Bbd s'échangeait beaucoup plus rapidement que le dimère H2A/H2B au sein du nucléosome, suggérant une conformation beaucoup plus lâche du nucléosome contenant ce variant (Angelov et al., 2004; Gautier et al., 2004). Cette conformation plus lâche serait due au fait que l'octamère contenant H2B.Bbd serait associé à un ADN plus court, de 118 à 130 paires de bases selon les travaux (Bao et al., 2004; Doyen et al., 2006).

Le fait qu'il soit exclus du chromosome X inactif et qu'il colocalise avec les régions riches en histone H4 acétylée suggère son association avec les régions transcriptionnellement actives de l'euchromatine (Chadwick and Willard, 2001b; Gautier et al., 2004). La conformation relâchée du nucléosome contenant H2A.Bbd est très proche de la conformation obtenue chez un nucléosome contenant des histones acétylées, suggérant que l'incorporation de H2A.Bbd serait un mécanisme alternatif à l'acétylation des histones dans les régions transcriptionnellement actives (Eirin-Lopez et al., 2008).

La chaperonne NAP1 serait responsable de l'assemblage et de la dissociation du dimère H2B/H2A.Bbd au sein de la particule nucléosomale, cette réaction étant potentialisée par la présence au sein du nucléosome du variant H3.3 (Okuwaki et al., 2005).

Le variant H3.3 est enrichi dans les régions transcriptionnellement actives du génome (Mito et al., 2005), où il remplace l'histone H3 durant l'élongation de la transcription (Schwartz and Ahmad, 2005). Cette incorporation au sein de la chromatine serait médiée par une chaperonne spécifique, la chaperonne HIRA (Tagami et al., 2004). Ce variant est également marqué par des modifications post-traductionnelles spécifiques des régions transcriptionnellement actives, telle que la diméthylation de H3K56 et H3K79 (Hake et al., 2006).

3.4. La répression de la transcription

MacroH2A est un variant spécifique des vertébrés dont la particularité réside en sa grande taille, 42kDa, soit trois fois la taille de l'histone canonique H2A (Pehrson and Fried, 1992). Ceci est dû à la présence au niveau C-terminal d'un grand domaine d'environ 20 kDa appelé "domaine macro" (macrodomain) ou NHR pour Non Histone Region. Deux isoformes non-alléliques sont retrouvées, H2A1 et H2A2, identiques à 80% (Chadwick and Willard, 2001a; Costanzi and Pehrson, 2001). Le splicing alternatif de l'ARNm issu du gène H2A1 produit deux isoformes protéiques, macroH2A1.1 et macroH2A1.2, exprimées différemment dans les tissus (Pehrson et al., 1997).

Les premiers travaux sur macroH2A ont montré qu'il était impliqué dans la formation et la maintenance du chromosome X inactif chez les mammifères femelles et de l'hétérochromatine constitutive (Costanzi and Pehrson, 1998; Costanzi et al., 2000; Mermoud et al., 1999). Le fait que macroH2A soit exprimé en quantité équivalente chez la femelle et chez le mâle et qu'il ne se localise pas exclusivement sur le Xi (Costanzi and Pehrson, 1998; Mermoud *et coll.*, 1999) indique que la fonction de macroH2A n'est pas restreinte au processus conduisant à l'inactivation du X. De plus macroH2A existe aussi chez les oiseaux qui ont des chromosomes sexuels différents et ne possèdent pas le mécanisme d'inactivation du X (Ellegren, 2002), suggérant que la fonction première de macroH2A n'est pas l'inactivation du X.

Ainsi, macroH2A pourrait être impliqué dans la régulation globale de la transcription. En effet, des travaux *ex vivo* ont montré que le domaine NHR réprime l'expression des gènes (Perche et al., 2000). D'autres travaux ont permis de montrer *in vivo* qu'une fois incorporé dans un nucléosome, il empêche les facteurs de transcription et les facteurs de remodelage de venir se fixer. De plus, interagissant avec HDAC1 et HDAC2, il jouerait un rôle dans la formation de l'hétérochromatine par recrutement de HDAC (Chakravarthy et al., 2005).

3.5. Une activation ou une répression de la transcription ?

H2A.Z est l'un des variants les plus étudiés, mais son rôle reste encore extrêmement controversé sur l'activation ou la répression de la transcription.

Des travaux sur colonne hydroxyapatite ont montré que H2A.Z était élué beaucoup plus tardivement que H2A, montrant une stabilité plus élevée du dimère H2A.Z/H2B comparé au

dimère H2A/H2B. Ces résultats sont réversibles si H2A.Z est acétylé (Thambirajah et al., 2006). L'acétylation de H2A.Z au niveau de sa queue N-terminale pourrait ainsi moduler la conformation du nucléosome au niveau des régions de transcription.

Ces résultats seraient confirmés par la présence au niveau des gènes actifs de H2A.Z acétylé chez la levure (Santisteban et al., 2000) et chez l'homme (Bruce et al., 2005). De plus, H2A.Z est souvent associé aux nucléosomes positionnés au niveau des régions promotrices des gènes (Schones et al., 2008) où il est souvent colocalisé avec H4K16Ac (Shia et al., 2006).

Mais H2A.Z semble aussi impliqué dans la répression de l'expression des gènes. En effet, d'autres travaux ont montré que H2A.Z était présent au niveau des gènes inactifs chez la levure (Guillemette et al., 2005) et qu'il s'associait avec la protéine spécifique de l'hétérochromatine HP1 α (Fan et al., 2004). Chez les mammifères, H2A.Z mono-ubiquitiné est retrouvé au niveau du chromosome X inactif (Sarcinella et al., 2007).

Les chaperonnes NAP1 et Chz1 sont les deux protéines liant les dimères H2A.Z/H2B. NAP1 peut lier H2A comme H2A.Z (Park et al., 2005). Chz1 chaperonne uniquement le variant H2A.Z (Luk et al., 2007).

4. La notion d'information épigénétique

Ainsi, en plus de la séquence de l'ADN qui doit être répliquée à l'identique au cours de chaque division cellulaire, toutes ces modifications (méthylation de l'ADN, modifications des histones et variants d'histones) doivent elles aussi être transmises et donc maintenues au cours de la réplication.

Cette information, non codée par la séquence de l'ADN et qui est transmise de façon stable et héréditaire, est qualifiée d'*information épigénétique*.

III. La dynamique de la chromatine

La structure de la chromatine, organisée par les protéines histones, permet de contrôler l'accès à de nombreuses enzymes et facteurs, nécessaires à de nombreux processus tels que la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN, etc...L'ensemble de ces événements nécessaires à la vie cellulaire implique donc une réorganisation très dynamique de la chromatine, où les histones ont besoin d'être enlevées ou déplacées, et ceci de manière massive ou très locale. Cette réorganisation nécessite donc la présence de facteurs responsables de l'assemblage et la dissociation des histones au sein de la chromatine, ainsi que de la mobilisation des nucléosomes le long de la fibre de chromatine.

Les facteurs de remodelage, permettent de mobiliser les nucléosomes le long de la fibre de chromatine (Almouzni and Mechali, 1988). Ils peuvent mobiliser l'octamère d'histones de différentes manières, par glissement sur l'ADN (déplacement en cis), par sa déstructuration, par déplacement sur un autre brin d'ADN (déplacement en trans) ou par remplacement des histones par des variants (Figure 11 A). La sous unité catalytique de chacun des complexes de remodelage possède en commun un domaine ATPase/hélicase, qui permet l'hydrolyse de l'ATP et apporte l'énergie nécessaire à la perturbation des interactions ADN-histones (Figure 11 B). Des domaines spécifiques à chaque famille sont ensuite retrouvés, responsables d'actions diverses leur conférant des spécificités de fonction au cours de la transcription, de la réplication, etc..., (Table 1) ceci constituant un vaste sujet d'étude qui ne sera pas développé ici.

En plus de facteurs nécessitant de l'ATP pour fonctionner, d'autres facteurs permettent de réorganiser de manière dynamique la chromatine de manière indépendante de l'ATP. En effet, les protéines de la famille des High Mobility Group permettent de lier la chromatine et d'agir comme des éléments architecturaux qui induisent des modifications de structure de l'ADN au niveau de leur site de liaison. D'autres protéines, appelés chaperonnes d'histones, sont elles responsables de la prise en charge des histones pour leur assemblage et leur dissociation le long de la fibre d'ADN.

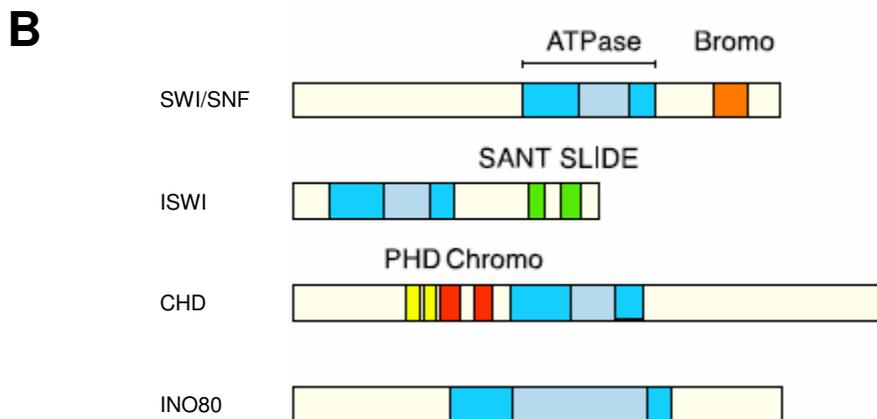
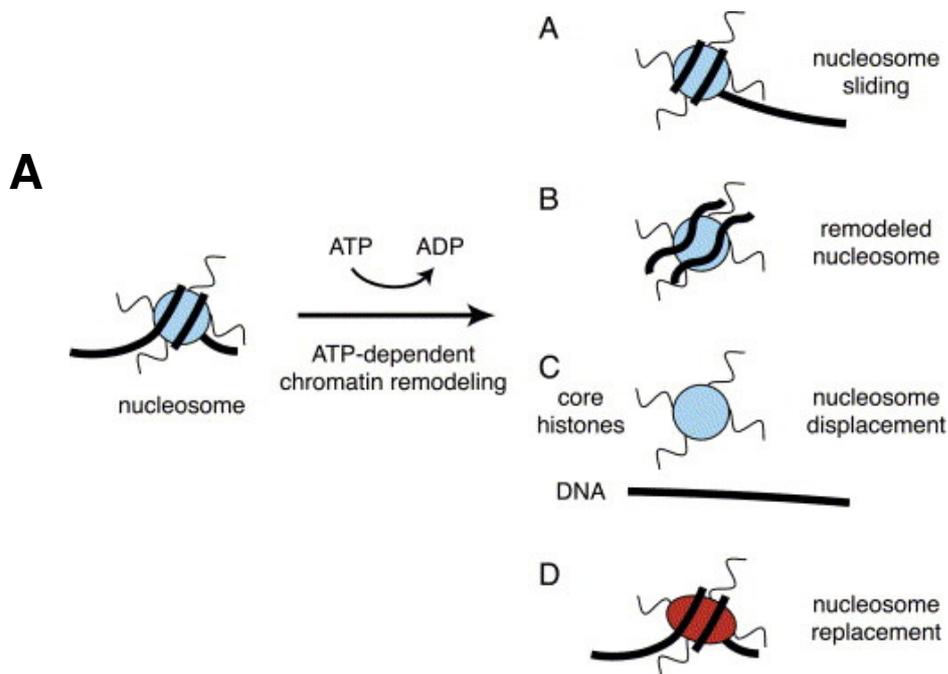


Figure 11. Les complexes de remodelage

A. Les différents modes d'action des complexes de remodelage ATP-dépendants. Ces complexes peuvent faire glisser le nucléosomes le long de la fibre de chromatine (A), dissocier partiellement l'ADN du nucléosome (B), dissocier complètement les histones de l'ADN (C) ou incorporer des variants d'histones. A noter que ces modes d'action ne sont pas incompatibles entre eux (D'après Mohrmann, 2004).

B. Structure des quatre familles de complexes de remodelage. Chaque famille est définie par la présence d'une sous unité ATPase de structure particulière. La famille SWI/SNF est caractérisée par la présence d'un domaine ATPase/hélicase et d'un bromodomaine. La famille ISWI est caractérisée par la présence d'un domaine SANT et SLIDE. La famille CHD est caractérisée par la présence de deux domaines PHD et de deux chromodomains. (D'après Mohrmann, 2004).

Nom de la famille	Membres de la famille	Principales fonctions
SWI/SNF		Activateur transcriptionnel
ISWI		Répresseur transcriptionnel
CHD	NuRD (<i>H.s.</i>), Mi-2 (<i>D.m.</i> , <i>M.m.</i> , <i>X.l.</i>)	Répresseur transcriptionnel
INO80	INO80 (<i>S.c.</i> , <i>D.m.</i>); SCRIP (<i>H.s.</i> , <i>M.m.</i>) SWR1 (<i>S.c.</i>); p400 (<i>D.m.</i> , <i>H.s.</i> , <i>M.m.</i>)	In vitro, glissement du nucléosome. In vivo, enlèvement des nucléosomes Remplacement de l'histone canonique H2A par le variant H2AZ dans les nucléosomes

Table 1. Classification des complexes de remodelage

Le nom des membres de chaque complexe est parfois différent selon les espèces. S.c., *S. cerevisiae*; D.m., *D. melanogaster*; X.l., *X. laevis*; M.m., *Mus musculus*; H.s., *Homo sapiens*.

1. Les protéines High Mobility Group

Les protéines HMG (High Mobility Group) sont des protéines nucléaires ubiquitaires qui jouent un rôle dans le maintien de la structure et de la fonction de la chromatine, en participant notamment à la transcription, à la réplication, à la recombinaison et à la réparation de l'ADN. Elles lient la chromatine et agissent comme des éléments architecturaux qui induisent des modifications de structure au niveau de leur site de liaison.

Les protéines HMG sont réparties en 3 superfamilles. La famille des HMGA, qui contient un domaine AT-hook, la famille des HMGB, qui contient un domaine HMG-box et la famille des HMGN, qui contient un domaine d'interaction avec les nucléosomes (NBD, pour nucleosomal binding domain) (Table 2).

1.1. La famille des HMGA

La famille HMGA comporte quatre membres: HMGA1a, HMGA1b et HMGA1c qui proviennent de l'épissage alternatif du transcrite codé par le gène *hmga1* et HMGA2, qui est codée par le gène *hmga2*.

Les protéines HMGA sont présentes de manière ubiquitaire dans le noyau des cellules végétales et animales (Bustin and Reeves, 1996; Reeves and Beckerbauer, 2001). Les membres de cette famille ont une masse moléculaire d'environ 11 kDa, contiennent 3 domaines AT-hook qui permettent la liaison à l'ADN ainsi qu'une queue C-terminale acide (figure 12 A). Le motif AT-hook interagit avec l'ADN au niveau du sillon mineur de la double hélice, préférentiellement riche en bases A et T. De plus, des travaux récents montrent que HMGA2 lie deux séquences consensus, suggérant une interaction séquence-spécifique (Cui and Leng, 2007).

Les protéines HMGA sont directement impliquées dans le contrôle transcriptionnel de certains gènes. Ce sont en effet des facteurs clés dans la formation de l'« enhanceosome », ces complexes d'assemblage de facteurs de transcriptions au niveau de régions exemptes de nucléosomes. Leur premier rôle est de tordre l'ADN de manière à augmenter l'affinité des autres protéines sur leur site de liaison et d'établir ensuite des interactions avec les facteurs de

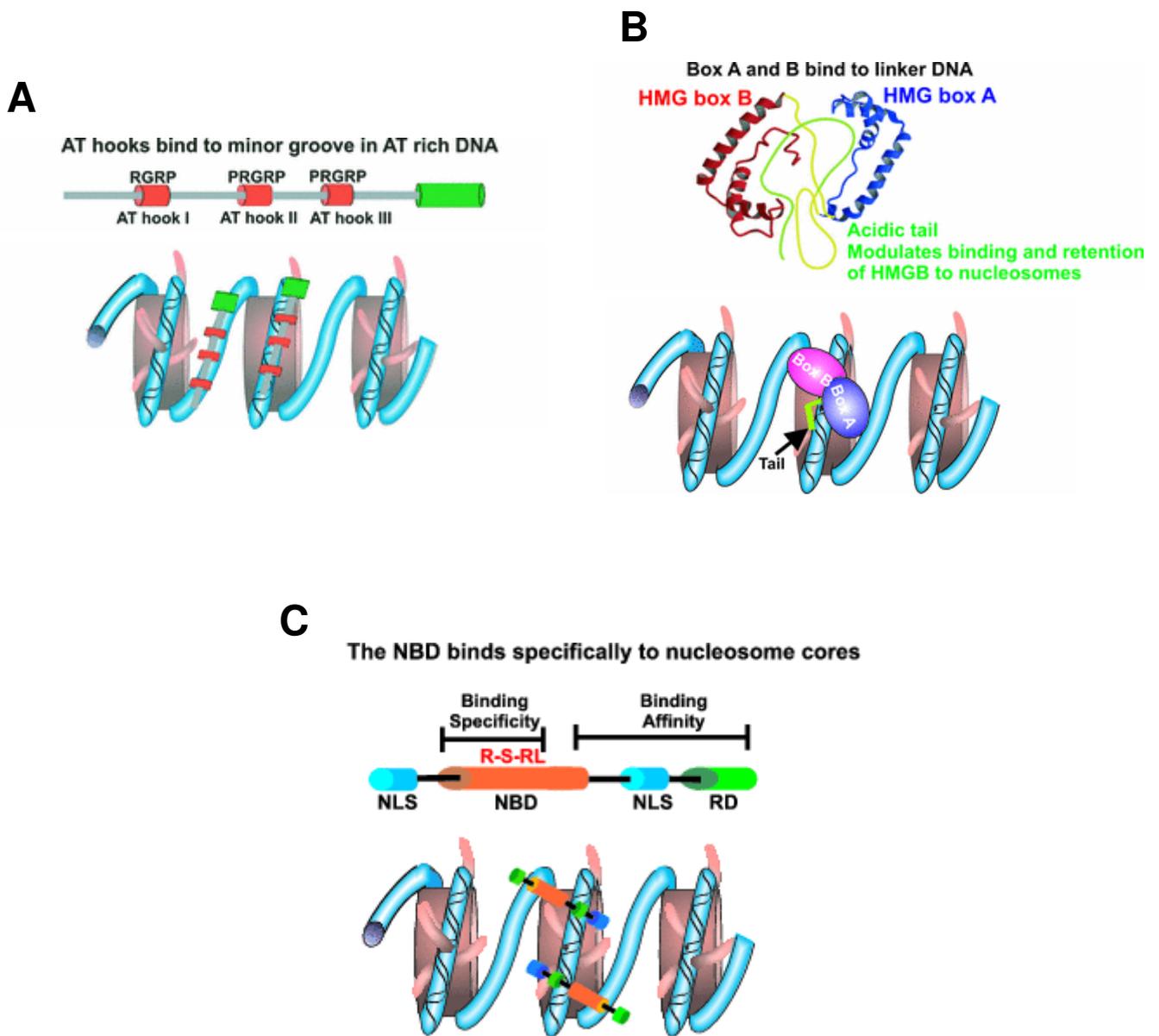


Figure 12. Les protéines HMG

A. La famille des HMGA. Les domaines AT-hook apparaissent en rouge, la queue acide en vert. Le motif AT-hook interagit avec l'ADN au niveau du sillon mineur de l'ADN.

B. La famille des HMGB. Les domaines HMG-box, représentés respectivement en bleu et en rouge, sont composés de trois hélices α . Les domaines HMG-box lie l'ADN linker.

C. La famille des HMGN. Les membres de la famille des HMGN lient les nucléosomes en formant des homodimères. La spécificité de la liaison des HMGN est déterminée par le domaine de liaison au nucléosomes, indiqué en rouge, tandis que la région C-terminale de la protéine détermine l'affinité de la liaison.

(D'après Gerlitz et coll, 2009).

Famille	Ancien nom	Nouveau nom	HMG Motif Proteins	Motif fonctionnel
HMGA	HMG-I/Y/C	HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c, HMGA2	HMG-box proteins	AT-hook (ATH)
HMGB	HMG-1/-2	HMGB1, HMGB2, HMGB3, HMGB4	NBD proteins	HMG-box
HMGN	HMG-14/-17	HMGN1, HMGN2, HMGN3a, HMGN3b, HMGN4	AT-hook proteins	nucleosome binding domain (NBD)

Table 2. Les protéines High Mobility Group

transcription. Les protéines HMGA exercent ainsi une régulation positive sur les gènes codant pour la E-sélectine et les interférons γ entre autres (Chau et al., 2005; Whitley et al., 1994).

Les protéines HMGA participent également aux niveaux supérieurs d'organisation de la chromatine, en se liant aux régions associées au squelette protéique, qui contient des segments d'ADN riches en bases A et T. Ainsi, HMGA1a est localisée préférentiellement sur l'hétérochromatine et est associée aux chromosomes condensés durant la mitose (Harrer et al., 2004).

1.2. La famille des HMGB

Les membres de la famille des HMGB sont au nombre de quatre, HMGB1, HMGB2, HMGB3, et HMGB4, codés par quatre gènes spécifiques.

HMGB-1, -2 et -3, d'une masse moléculaire d'environ 25 kDa, sont caractérisées par la présence de deux HMG-box, formée chacune par trois hélices alpha en L (Thomas, 2001; Thomas and Travers, 2001) qui lient le sillon mineur de l'ADN ainsi que d'une longue queue acide d'environ 30 acides aminés (Bianchi and Agresti, 2005; Landsman and Bustin, 1993; Stott et al., 2006) (figure 12 B).

Les protéines HMGB agissent comme des facteurs architecturaux capables de structurer la chromatine en pliant l'ADN (Thomas and Travers, 2001), afin de maintenir une structure ouverte de la chromatine, jouant un rôle d'activateur transcriptionnel. Elles peuvent ainsi interagir directement avec les nucléosomes (Bonaldi et al., 2002; Wu and Travers, 2004) en déplaçant l'histone de liaison H1 et facilitant donc le remodelage du nucléosome (figure 8 B). Elles peuvent également interagir avec des facteurs de transcription (Das and Scovell, 2001; Dasgupta and Scovell, 2003) : une fois liée, HMGB1 courbe l'ADN et stabilise ainsi son partenaire protéique, qui peut alors recruter d'autres protéines.

Des travaux ont montré que la queue acide liait le premier domaine HMG-box et empêchait son interaction avec l'ADN. Ainsi, la perte de cette queue augmente la liaison avec l'ADN et bloque le remodelage des nucléosomes (Knapp et al., 2004; Lee and Thomas, 2000).

Le quatrième membre de cette famille, HMGB4, a été découvert récemment (Catena et al., 2009). Cette protéine, majoritairement exprimée dans le testicule, a la particularité de ne pas posséder de queue acide. Elle est très fortement exprimée au niveau du pôle basal des noyaux

des spermatides allongées et l'invalidation du variant de l'histone H1, H1t2, affecte cette localisation (Paragraphe *Résultats B. II.*).

1.3. La famille des HMGN

Cette famille est composée de cinq membres, nommés HMGN1, HMGN2, HMGN3a, HMGN3b et HMGN4, d'une masse moléculaire d'environ 10 kDa (Bustin, 2001). Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un domaine NBD (nucleosomal binding domain), qui permet leur interaction spécifique avec les nucléosomes (figure 12 C). Un motif de 8 acides aminés conservé entre toutes les HMGNs est impliqué dans cette interaction. La région C-terminale de la protéine est elle déterminante dans l'affinité de la liaison. Ainsi, des protéines tronquées dans cette région interagissent beaucoup moins bien avec les nucléosomes (Ueda et al., 2004).

Les protéines HMGN reconnaissent spécifiquement le cœur histone du nucléosome, indépendamment de la séquence ou de la modification de la queue N-terminale des histones (Ueda et al., 2004). Le complexe contient 2 molécules HMGN1 ou HMGN2, mais jamais une de chaque.

2. Assemblage et dissociation des histones de la chromatine

La réorganisation dynamique de la chromatine nécessite un assemblage et une dissociation des histones. Ces protéines, très basiques, nécessitent d'être prises en charge par des protéines spécifiques, des chaperonnes d'histones, afin d'éviter qu'elles n'interagissent de manière non spécifique avec d'autres protéines ou qu'elles ne s'agrègent sur l'ADN.

Une chaperonne d'histones est caractérisée par le fait qu'elle peut s'associer à une histone et qu'elle possède une activité d'assemblage des nucléosomes *in vitro* indépendante de l'ATP. Il existe un grand nombre de chaperonnes d'histones, présentées dans un tableau récapitulatif (Table 3).

L'action de ces chaperonnes est nécessaire pour le stockage des histones néosynthétisées après une synthèse massive ainsi que pour des incorporations d'histones lors de phénomènes plus locaux. Nous passerons en revue l'action des principales chaperonnes mises en œuvre lors de ces deux événements cellulaires.

Nom selon les espèces	Histones chaperonnées	Principales fonctions
ASF1 (H.s.,M.m., X.l., S.c., D.m.) CIA (S.p.)	H3/H4	Stockage H3/H4 Réplication (couplée à CAF1) Transcription (couplée à HIRA)
HIRA (H.s., M.m., X.l., D.M.) HIR1/HIR2 (S.c.)	H3.3/H4	Dépôt sur pronucléus mâle Transcription
NASP (H.s.,M.m.) N1/N2 (X.l.) Hif1 (S.c.)	H3/H4	Stockage chez le xénope Chaperonne H1 pour NASP
Spt6 (H.s.,M.m., X.l., D.m.)	H3/H4	Transcription
NPM1 (Nucleophosmine) (H.s., M.m, X.l.) NPM2 (Nucleoplasmine) (H.s., M.m, X.l.) NPM3	H2A/H2B	Stockage et dépôt sur le pronucleus mâle pour NPM1/NPM3 Transcription
NAP1 (H.s.,M.m., X.l., D.m.)	H2A/H2B	Transport cytosol/noyau Réplication Transcription
CAF1	H3/H4 H3.1/H4	Réplication Transcription
FACT	H2A/H2B	Réplication Transcription

Table 3. Classification des chaperonnes d'histones

Le nom de chaque chaperonne est parfois différent selon les espèces. Les sous unités des complexes sont listées. L'interaction spécifique avec H2A/H2B ou H3/H4 est indiquée, ainsi que les variants d'histones. S.c., *S. cerevisiae*; D.m., *D. melanogaster*; X.l., *X. laevis*; M.m., *Mus musculus*; H.s., *Homo sapiens*.

2.1. Stockage et mise en place massive d'histones

Un assemblage massif des histones a lieu lors de deux événements cellulaires, la réplication et la réorganisation du génome paternel après la fécondation.

~ La réplication

La duplication des structures chromatiniennes lors de la réplication implique la présence de nombreuses chaperonnes d'histones, responsables du stockage et de l'import des histones nouvellement synthétisées, de l'enlèvement des histones avant le passage de la fourche de réplication, puis du redépôt d'histones sur le brin néo-synthétisé.

Chez les mammifères, la chaperonne ASF1 pourrait stocker les histones H3/H4 néosynthétisées. En effet, lorsque des cellules sont traitées à l'hydroxyurée, bloquant ainsi la réplication, le pool de H3/H4 soluble associé à ASF1 augmente (Groth et al., 2005). Ces complexes semblent contenir d'autres chaperonnes d'histones, telles que NASP, qui serait lui aussi impliqué dans le stockage de H3/H4.

Les histones H2A/H2B semblent elles chaperonnées par NAP1. En effet, il a été montré chez la drosophile que NAP1 était présente dans le noyau durant la phase S, tandis qu'elle se retrouve dans le cytoplasme pendant la phase G2 (Ito et al., 1996). Cette localisation différentielle au cours du cycle cellulaire semble être régulée par sa phosphorylation par la Casein Kinase II (Calvert et al., 2008; Li et al., 1999; Rodriguez et al., 2000). Chez la levure, yNAP1 permettrait l'interaction de H2A/H2B avec la karyophérine, nécessaire à leur import dans le noyau (Mosammaparast et al., 2002). Au contraire, l'export de NAP1 du noyau serait régulé par l'exportine Crm1 (Chromosome Maintenance Region 1) (Mosammaparast et al., 2002).

L'enlèvement des histones avant le passage de la fourche de réplication, puis le redépôt d'histones sur le brin néo-synthétisé fait intervenir un grand nombre de chaperonnes.

Le complexe FACT (Facilitates Chromatin Transcription) a été retrouvé au niveau des complexes présents le long de la fourche de réplication (Gambus et al., 2006). Le complexe FACT interagit directement avec l'ADN polymérase mais également avec l'hélicase MCM, facilitant

le déroulement de l'ADN nucléosomal *in vitro* (Tan et al., 2006). Chaperonnant les dimères H2A/H2B, il serait essentiel pour le déplacement de ces dimères lors du passage de la fourche de réplication (Belotserkovskaya et al., 2003).

La chaperonne ASF1 a été co-purifiée en association avec l'hélicase MCM et avec les histones H3/H4 (Groth et al., 2007). De par cette association, elle permet l'enlèvement des histones H3/H4 avant le passage de la fourche de réplication, puis le redépôt de ces mêmes histones après le passage de la fourche.

La chaperonne ASF1 serait également indirectement impliquée dans l'assemblage d'histones nouvellement synthétisées sur l'ADN répliqué en coopération avec la chaperonne CAF1 (Mello et al., 2002; Sanematsu et al., 2006; Tyler et al., 1999).

Enfin, bien que NASP semble interagir avec les histones H3.1 et H3.3 (Tagami et al., 2004), son action principale reste l'incorporation de l'histone linker H1 au sein de la chromatine (Richardson et al., 2000). Au cours du cycle cellulaire, NASP transiterait entre le noyau et le cytoplasme, permettant le transport de H1 dans le noyau et son incorporation sur l'ADN nouvellement synthétisé au cours de la phase S. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le knock-down chez la souris ou la surexpression *in vitro* dans des cellules Hela de NASP inhibe la progression en phase S (Alekseev et al., 2003; Richardson et al., 2006).

~ La réorganisation du génome paternel après la fécondation

Après la fécondation, le génome paternel, organisé majoritairement en protamines (Paragraphe *Introduction B. II.*), doit se décompacter et réintégrer des histones. Celles-ci sont synthétisées en grande quantité à partir du génome maternel, et stockées dans l'ovocyte.

Chez la Drosophile, la chaperonne HIRA lie spécifiquement les histones H3.3 (Tagami et al., 2004) et dépose ce variant au cours de la décondensation du noyau spermatique après la fécondation (Loppin et al., 2005). Chez des drosophiles HIRA^{-/-}, le dépôt de H3.3 sur le noyau spermatique ne se fait pas, suggérant un rôle indispensable de HIRA dans l'assemblage de la chromatine paternelle (Bonney et al., 2007). Il a notamment été montré l'implication de la protéine CHD1 dans l'incorporation de H3.3 chez la drosophile (Konev et al., 2007).

Chez la souris, HIRA possède le même rôle (Torres-Padilla et al., 2006; van der Heijden et al., 2005). De plus, HIRA semble être cruciale dans le développement embryonnaire chez la souris, car le knock-down du gène chez la souris est létal au stade embryonnaire (Roberts et al., 2002).

Chez le xénope, d'autres chaperonnes ont pu être identifiées.

Au sein de la famille des nucleoplasmines/nucleophosmines, comportant trois membres chez les mammifères et les amphibiens (NPM1, NPM2, NPM3), seuls NPM2 et NPM3 semblent avoir un rôle lors de la décondensation de la chromatine dans le pronucléus mâle après la fécondation.

La chaperonne NPM2 (nucléoplasmine) a été identifiée pour la première fois dans des œufs de xénopes comme un facteur d'assemblage des nucléosomes (Laskey et al., 1978). Ce fut la première chaperonne d'histone découverte. Elle lie les histones et permet l'assemblage des nucléosomes (Earnshaw et al., 1980; Laskey et al., 1978). Elle serait impliquée dans la décondensation de la chromatine dans le pronucléus mâle, en permettant l'enlèvement des protamines et leur remplacement par les histones (Ohsumi and Katagiri, 1991; Philpott et al., 1991). Ainsi, un modèle a été proposé chez le xénope (Prado et al., 2004). NPM2 interagirait avec les dimères H2A/H2B, permettant leur stockage dans les ovocytes. Après la fécondation, au contact des protamines, le complexe NPM2-H2A/H2B se dissocierait, permettant le relargage des dimères H2A/H2B. Ces derniers s'associeraient avec les tétramères (H3-H4)₂ paternels présents dans le pronucléus mâle, permettant la formation de nucléosomes.

Chez la souris, NPM2 n'aurait pas tout à fait le même rôle. En effet, des souris femelles n'exprimant pas cette protéine montrent des ovocytes ainsi que les embryons anormaux, alors que la décondensation du pronucléus mâle a bien lieu après la fécondation (Burns et al., 2003). Un deuxième membre de la famille des nucleoplasmines/nucleophosmines, NPM3, serait nécessaire à la décondensation de la chromatine du pronucléus mâle après la fécondation. En effet, le blocage de la traduction de cette protéine par injection d'oligonucléotides antisens dans des ovocytes de mammifères empêche l'assemblage des histones et la décondensation du pronucléus mâle.

En plus de la nucléoplasmine qui chaperonne les dimères H2A/H2B, les chaperonnes N1/N2 ont été retrouvées complexées à H3/H4 dans des ovocytes de xénope (Kleinschmidt et al., 1985). Ces chaperonnes et la nucléoplasmine auraient un rôle synergique lors de la réplication de l'ADN paternel: N1/N2 déposerait H3/H4 sur l'ADN pour former un complexe intermédiaire, puis la nucléoplasmine viendrait ajouter H2A/H2B pour former le nucléosome (Dilworth et al., 1987; Kleinschmidt et al., 1990).

Enfin, la chaperonne xNAP1 déposerait spécifiquement l'histone de liaison embryonnaire B4 sur la chromatine après la fécondation (Shintomi et al., 2005).

2.2. Mise en place de variants d'histones localement

A l'inverse de la réplication, la transcription ne mobilise qu'une partie de la chromatine, nécessitant la mise en place très locale de variants d'histones spécifiques.

La processus de transcription par l'ARN polymérase II implique un enlèvement local des histones de cœur pour permettre le passage de la machinerie transcriptionnelle, contrôlé par de nombreuses chaperonnes d'histones. Une fois la transcription terminée, il faut alors rapidement que des facteurs remettent en place des histones, soit en redéposant les histones enlevées avant le passage de l'ARN polymérase II, soit en déposant des histones nouvellement synthétisées. Il s'agit dans ce cas de variants d'histones, les histones canoniques étant synthétisées uniquement en phase S. Plusieurs chaperonnes d'histones sont impliquées dans cette dynamique.

Le rôle de NAP1 au cours de la transcription a pu être défini par des expériences de transcription *in vitro*. NAP1 permettrait la dissociation de deux dimères H2A/H2B avant le passage de l'ARN polymérase, puis la reformation de nucléosomes en redéposant ces dimères sur les tétramères H3/H4 laissés sur l'ADN après le passage de l'ARN polymérase (Levchenko et al., 2005; Levchenko and Jackson, 2004).

In vitro, le complexe FACT est capable de déplacer les dimères H2A/H2B du nucléosome, permettant le passage de l'ARN polymérase (Belotserkovskaya et al., 2003; Orphanides et al., 1998). *In vivo*, FACT participerait également à la réassociation des histones au sein des

nucléosomes après le passage de l'ARN polymérase (Formosa et al., 2002; Mason and Struhl, 2003; Schwabish and Struhl, 2004).

Spt6 (Supressor of Ty) est une protéine qui possède une activité d'assemblage des nucléosomes *in vitro* (Bortvin and Winston, 1996). *In vitro* et *in vivo*, elle interagirait avec l'ARN polymérase et FACT au cours de la transcription (Endoh et al., 2004; Krogan et al., 2002). De plus, elle permettrait à la chromatine de retrouver sa structure initiale en redéposant les histones sur le brin transcrit (Kaplan et al., 2003; Nourani et al., 2006; Orphanides et al., 1999).

Chez la levure, la chaperonne ASF1 semble nécessaire pour la dissociation du nucléosome (Adkins et al., 2004; Korber et al., 2006). Elle agirait comme un facteur d'élongation, voyageant avec l'ARN polymérase II, dissociant et réassociant les histones durant l'élongation (Schwabish and Struhl, 2006). De même que lors de la réplication, il existe un phénomène permettant le dépôt d'histones nouvellement synthétisées au niveau de l'ADN après la transcription. Ce phénomène ferait intervenir ASF1 qui, en se complexant avec la chaperonne HIRA, déposerait spécifiquement des dimères H3.3/H4 (Green et al., 2005; Tagami et al., 2004; Tang et al., 2006).

2.3. Des chaperonnes spécifiques aux variants d'histones

Comme nous l'avons déjà vu, certaines chaperonnes interagissent de manière spécifiques avec certaines formes d'histones. C'est notamment le cas de des chaperonnes CAF1 et HIRA, qui interagissent spécifiquement avec les variant d'histone H3.1 et H3.3 respectivement et les déposent soit au niveau des sites de réplication pour CAF1, soit potentiellement au niveau des sites de transcription pour HIRA (Tagami et al., 2004).

Très peu de données sont disponibles sur les chaperonnes potentielles des variants d'histone spécifiques du testicule. Seule la chaperonne tNASP, une isoforme testiculaire du facteur NASP, est connue pour être impliquée dans le dépôt du variant d'histone de liaison H1t au cours de la spermatogénèse (Alekseev et al., 2005; Richardson et al., 2000).

De plus, des travaux récents montrent qu'*in vitro*, la chaperonne humaine NAP1L4 interagit préférentiellement avec le variant d'histone H3t par rapport à l'histone canonique H3 (Tachiwana et al., 2008). La chaperonne NAP1L4 étant le membre de la famille des NAP le plus exprimé dans le testicule, il semblerait que les variants d'histones spécifiques du testicule soient pris en charge par des chaperonnes spécifiques du testicule.

B. LE REMODELAGE DE LA CHROMATINE AU COURS DE LA SPERMATOGENESE

I. Le déroulement de la spermatogénèse

1. La structure du testicule

La spermatogénèse se déroule chez les mammifères dans le testicule, dans les tubes séminifères. Ces derniers sont repliés en une structure hélicoïdale au sein de lobules, séparés par des cloisons interlobulaires. Leurs deux extrémités sont ouvertes dans le *rete testis*, qui collecte les spermatozoïdes qui sont ensuite dirigés vers l'épididyme (Figure 13).

Au sein de ces tubes séminifères, les cellules germinales forment l'épithélium séminifère, regroupant les spermatogonies, les spermatocytes primaires et secondaires, et les spermatides. Toutes ces cellules sont localisées à l'intérieur d'invaginations formées par les cellules de Sertoli (Figure 15).

2. Les trois phases de la spermatogénèse

La spermatogénèse est le procédé par lequel sont produits les gamètes mâles, les spermatozoïdes. Elle se déroule en trois phases majeures (Figures 14 et 15). *Le stade pré-méiotique* des spermatogonies, *la méiose* des spermatocytes pour donner des cellules haploïdes, les spermatides et enfin *la maturation post-méiotique* des spermatides en spermatozoïdes. Cette différenciation se fait de la paroi vers la lumière des tubes séminifères. Ainsi, sur une coupe transversale d'un tube séminifère, on peut suivre cette évolution des

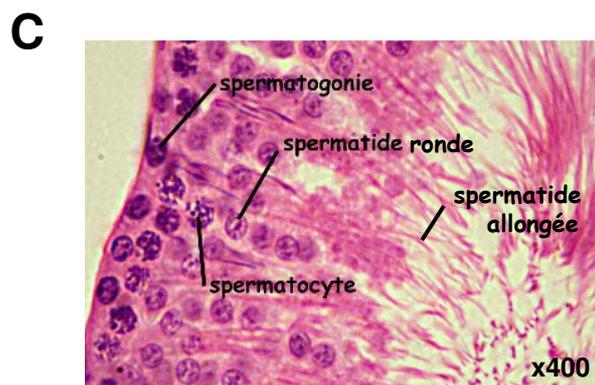
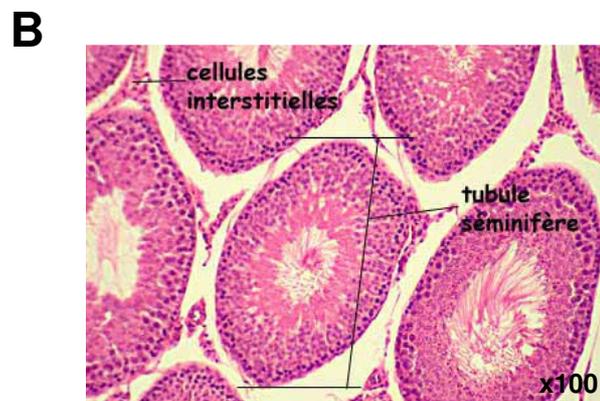
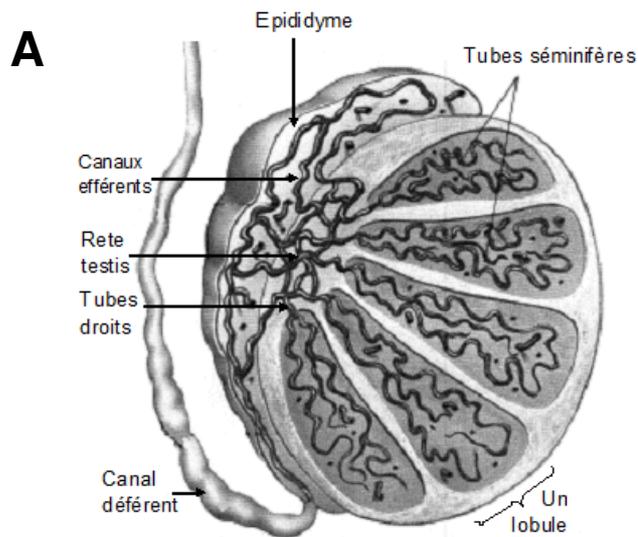


Figure 13. Organisation du testicule adulte

A. Schéma de l'organisation d'un testicule humain.

B. Coupe transversale des tubes séminifères, grossie x100 (Image de Michel pronovost).

C. Agrandissement d'une coupe transversale des tubes séminifères: portion d'épithélium séminifère, grossie x400 (Image de Michel pronovost).

cellules germinales mâles, les spermatogonies tapissant la paroi externe du tube pour aboutir aux spermatides libérées dans la lumière du tube.

Une dernière phase de maturation s'effectue ensuite dans l'épididyme, permettant aux spermatozoïdes d'acquérir leur pouvoir fécondant.

2.1. La phase pré-méiotique

Les cellules germinales souches, appelées spermatogonies, sont localisées à proximité de la paroi du tube séminifère. Plusieurs types de spermatogonies se distinguent. Les spermatogonies de type A, considérées comme des cellules souches, prolifèrent par mitose afin d'assurer leur renouvellement. Après trois à quatre divisions, elles 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 de méiose qui va suivre.

2.2. La phase méiotique

La phase méiotique est précédée par une interphase au cours de laquelle chaque cellule germinale va doubler son contenu en ADN. Puis au cours de la méiose, chaque cellule germinale (appelée spermatocyte durant cette phase) va subir deux divisions nucléaires successives afin de donner naissance à quatre cellules germinales haploïdes. C'est un processus fragile car près de la moitié des cellules germinales est perdue après la prophase méiotique chez l'homme.

Chaque division méiotique est composée de quatre phases successives : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la cytodièrese.

La prophase de la première division méiotique (prophase I) est très longue. Elle comprend cinq phases successives: leptotène, zygotène, pachytène, diplotène, diacinèse.

Au début de la prophase méiotique, durant la phase préleptotène, les spermatocytes I synthétisent l'ADN nécessaire à la réplication des chromosomes. Les chromosomes se condensent ensuite durant le stade leptotène. Les chromosomes homologues s'apparient lors du stade zygotène grâce à l'assemblage des complexes synaptonémaux. Ils vont permettre, au stade pachytène, l'échange de matériel génétique par recombinaison homologue entre deux chromatides d'une paire de chromosomes. La décondensation de la chromatine nécessaire à

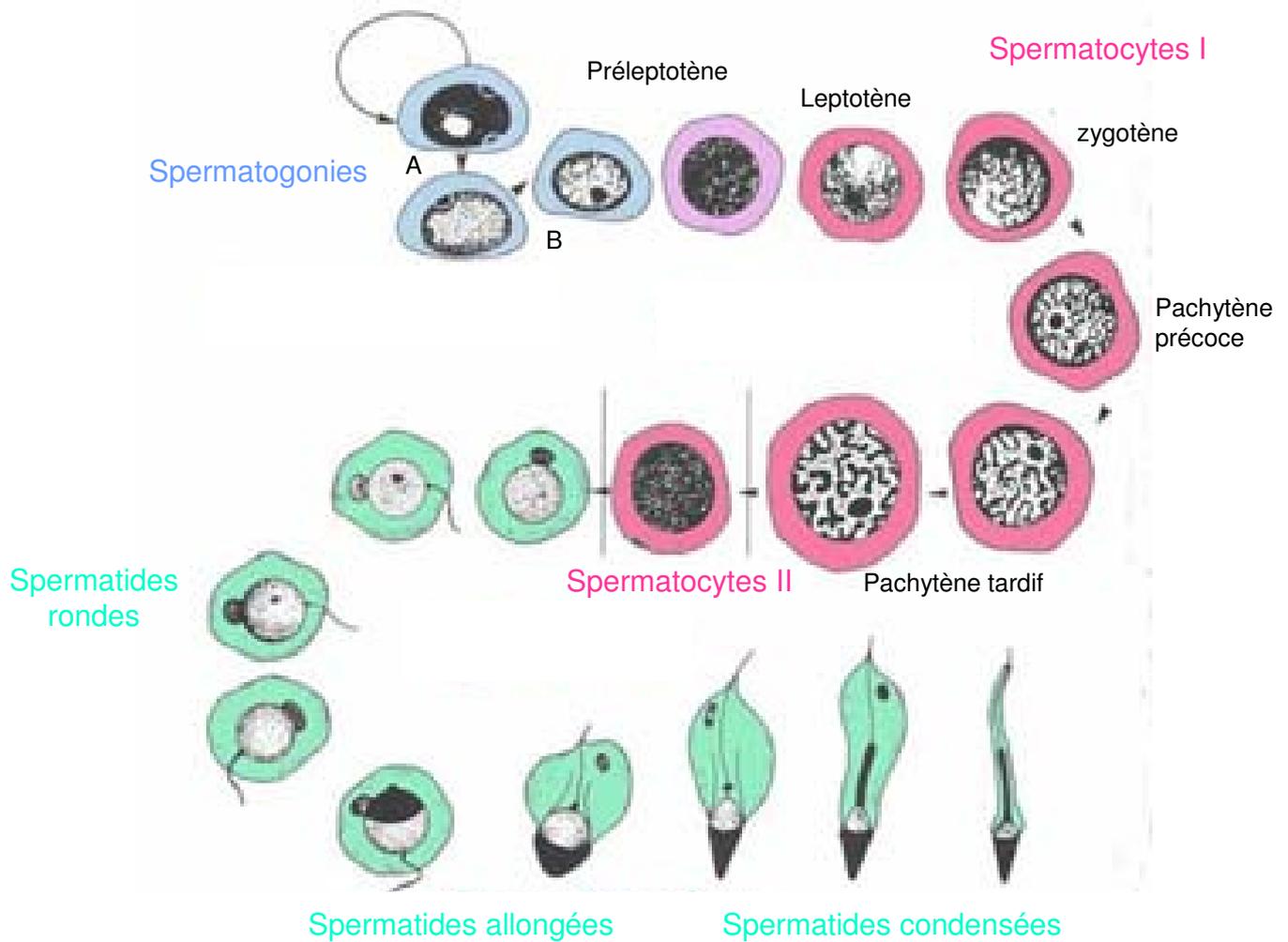


Figure 14. Le déroulement de la spermatogénèse

Les spermatogonies se divisent par mitose lors de la phase pré-méiotique. La méiose est la période la plus longue et est composée des stades préleptotène, leptotène, zygotène, pachytène. La première division méiotique donne naissance aux spermatocytes secondaires. La deuxième division méiotique produit les spermatides haploïdes. La spermiogénèse permet ensuite la différenciation des spermatides rondes, allongées, condensées et finalement en spermatozoïdes.

cette étape induit la formation de grandes boucles permettant un fort taux de transcription. Ces complexes synaptonémaux se rompent lors du stade diplotène, entraînant la séparation des chromosomes homologues. L'enveloppe nucléaire disparaît au cours de la diacynèse.

Au cours de **la métaphase**, les chromosomes migrent vers la plaque équatoriale.

Lors **de l'anaphase**, les chromosomes homologues de chaque paire migrent de façon aléatoire vers un pôle cellulaire différent. L'enveloppe nucléaire qui avait disparu en prophase se reforme durant **la cytotélerèse**.

Les deux cellules qui résultent de cette première division méiotique sont donc haploïdes : il y a eu réduction de moitié du nombre de chromosomes par cellule. C'est pourquoi la première division de méiose est appelée division réductionnelle.

La deuxième division méiotique n'est pas précédée par une interphase. Elle se déroule comme une mitose classique, avec séparation des chromatides sœurs de chaque chromosome. Elle est dite équationnelle car le stock génétique est conservé. Cette deuxième division méiotique produit de petites cellules rondes, ou spermatides, qui entrent dans la phase finale de la spermatogenèse, la spermiogénèse.

2.3. La spermiogénèse

Cette phase de différenciation terminale s'achève par la libération des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère.

Elle est caractérisée par plusieurs événements majeurs qui modifient de manière importante la morphologie des cellules :

- Le développement du flagelle
- Le développement de l'acrosome. Les vésicules du Golgi se développent, se différencient en granules semblables aux lysosomes, puis fusionnent pour donner une vésicule unique, l'acrosome. Il contient ainsi les enzymes hydrolytiques essentielles aux interactions entre l'ovule et les spermatozoïdes ainsi qu'à la fécondation.
- l'élimination de l'excès de cytoplasme sous forme de corps résiduels.
- La compaction du noyau et de la chromatine. Le noyau des spermatides s'allonge et la chromatine se condense en une structure très compacte. Cette condensation se caractérise

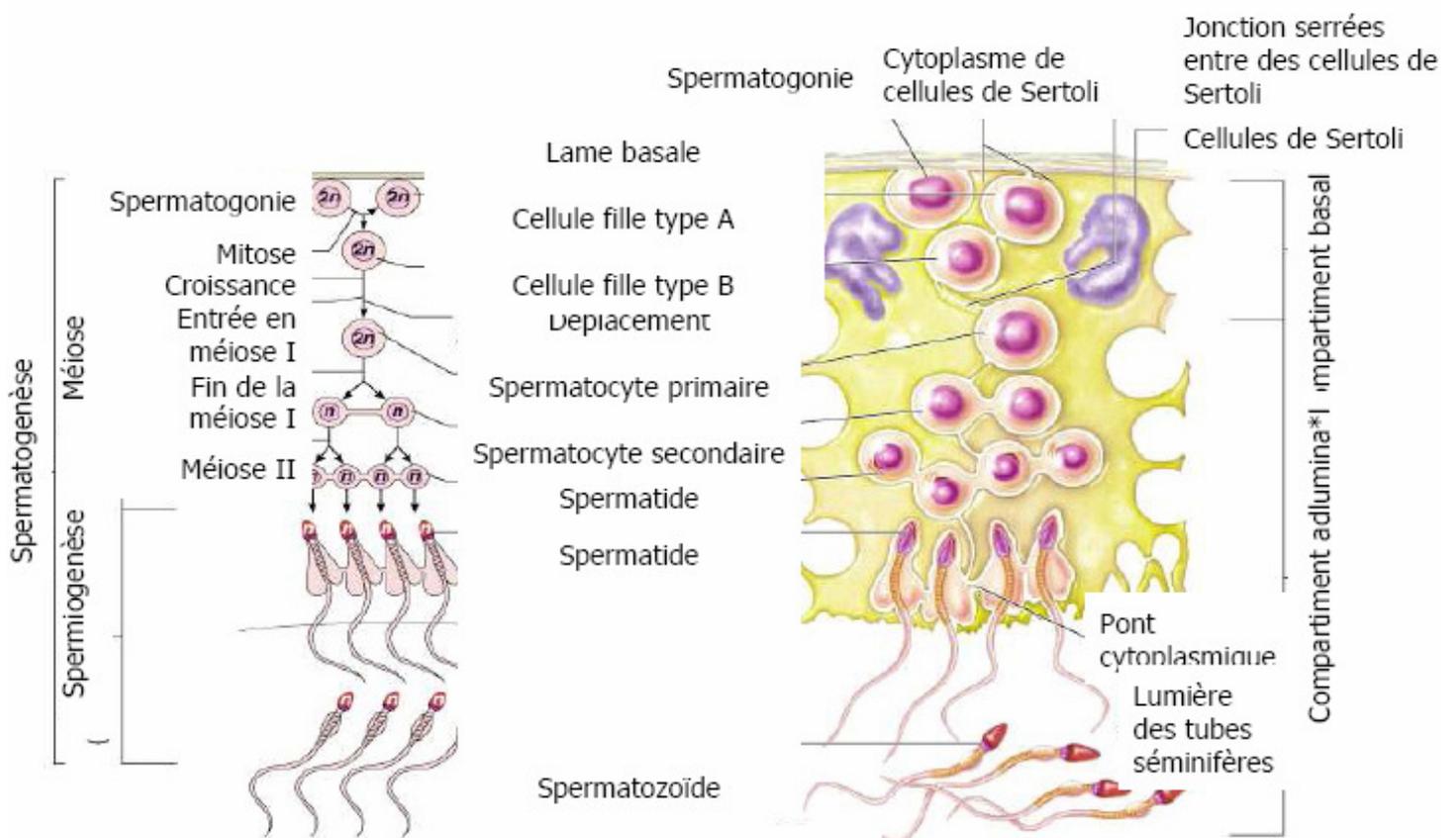


Figure 15. Schéma récapitulatif de l'évolution des cellules de la lignée germinale mâle

Les spermatogonies, situées contre la paroi externe des tubes séminifères, subissent les différentes étapes de la spermatogénèse (méiose et spermiogénèse) dans un mouvement centripète. Ainsi, à la fin de ces étapes, les spermatozoïdes condensés sont libérés dans la lumière du tube, avant de subir l'étape de maturation dans l'épididyme.

par une réorganisation complète de la structure de la chromatine, pour aboutir à partir d'une structure nucléosomale de type somatique à une structure spécifique des spermatozoïdes.

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 réduite. Celle-ci concerne essentiellement les gènes codants pour des protéines importantes pour les stades tardifs de la spermatogénèse (par exemple les protéines de transition, les protamines, etc...). Dans un deuxième temps, le noyau des spermatides en élongation (type 8 à 11) s'allonge, et la transcription s'arrête complètement lorsque leur chromatine commence à se condenser. Enfin la maturation des spermatides dites « en condensation » (type 12 à 16) aboutit aux 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.

3. La phase additionnelle de maturation des spermatozoïdes

A la sortie du testicule, les spermatozoïdes ne sont pas matures : ils ne sont ni mobiles, ni féconds. Ils ont ainsi besoin d'une étape de maturation, qui s'effectue dans l'épididyme et qui est essentielle pour l'acquisition d'une mobilité et d'un pouvoir fécondant. En effet, du fait de la condensation extrême de son génome, le spermatozoïde ne peut synthétiser aucune protéine : ses modifications sont donc entièrement contrôlées par les cellules de l'épithélium.

Ainsi, durant le passage dans l'épididyme, la chromatine continue à se condenser (notamment par la formation de ponts disulfures entre les protamines), le cytoplasme déjà clairsemé diminue encore de volume et la structure de la membrane plasmique change.

En plus de son rôle de maturation, l'épididyme a un rôle de stockage des spermatozoïdes matures. En effet, un éjaculat peut contenir un nombre de spermatozoïdes plus élevé que la production journalière.

4. Les cycles de la spermatogénèse

La durée de la spermatogénèse est constante pour une espèce donnée. Chez la souris, elle est de 35 jours avec une durée de vie de 13 jours pour les spermatocytes I, de 1 jour pour les spermatocytes II, et de 13 jours pour les spermatides. Ainsi, dans les premiers jours après la naissance, les tubes séminifères contiennent principalement des spermatogonies. Les spermatocytes vont apparaître chez des souris âgées de 11 à 14 jours et les premières spermatides apparaîtront chez des souris âgées au minimum de 21 jours.

L'entrée en différenciation des spermatogonies ne se fait pas de manière aléatoire. Les spermatogonies s'engagent de façon irréversible dans le processus de la spermatogénèse à intervalle régulier, tous les 8,8 jours chez la souris. Elles se différencieront ensuite au même rythme.

Ainsi, il n'est pas possible d'observer tous les stades de la spermatogénèse sur une coupe transversale de tube séminifère. L'étude histologique de ces coupes montre la présence de 3 ou 4 générations de cellules germinales disposées en couches superposées. Les générations des cellules jeunes sont disposées le long de la membrane basale du tube séminifère, les générations des cellules les plus matures sont en bordure de la lumière. Cette observation a ainsi permis de découper la spermatogénèse en 12 stades chez la souris (Figure 16). Un stade est caractérisé par l'association de cellules à des étapes spécifiques et différentes de la 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. Ces cellules sont étroitement associées, « imbriquées » entre les cellules de Sertoli, sortes de cellules nourricières, qui assurent et contrôlent la différenciation coordonnée des cellules d'un stade donné.

La migration des cellules germinales en différenciation est exclusivement centripète, aucune migration latérale au sein du tube n'est observée. En un point donné du tube séminifère, les stades apparaissent avec le temps et dans un ordre précis : le stade I est situé à côté du stade II, lui-même situé à côté du stade III, etc.... La succession de tous ces stades correspond au cycle de l'épithélium séminal. Cet arrangement spatial a été désigné sous le nom d'onde spermatogénétique (Dadoune and Demoulin, 2001).

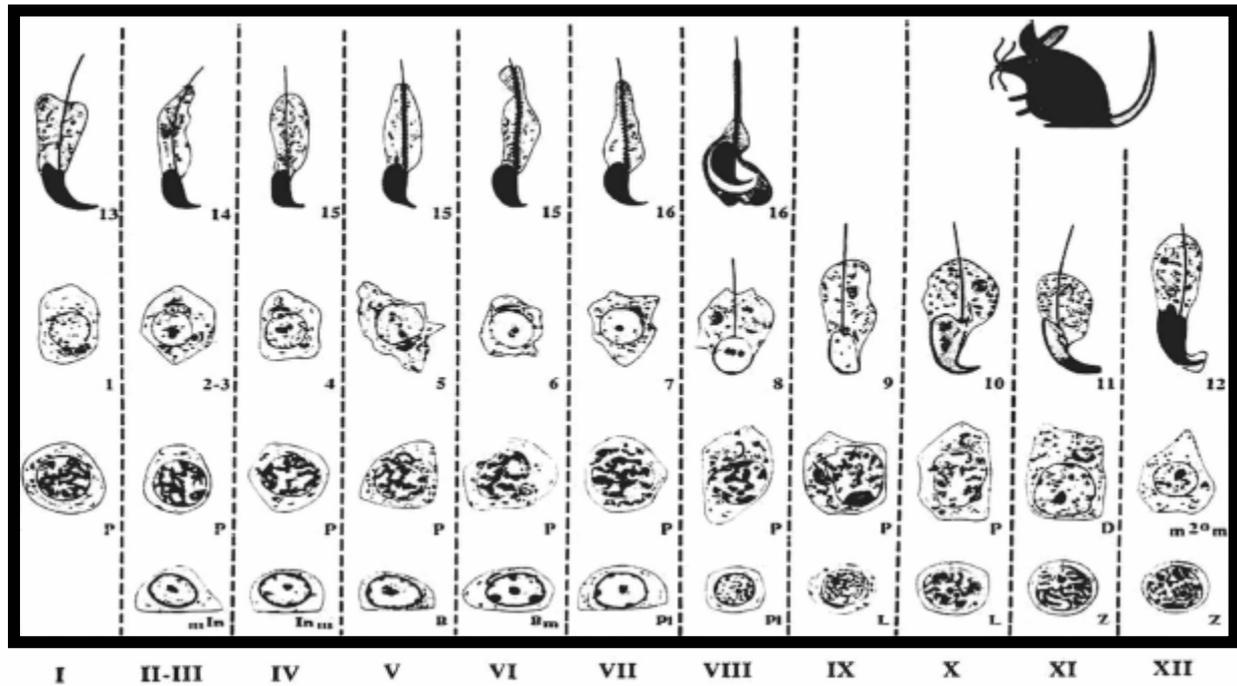


Figure 16. Les cycles de la spermatogénèse chez la souris

Ce tableau représente de gauche à droite, et de bas en haut, la chronologie de la spermatogénèse. Douze stades ont été identifiés chez la souris (I à XII). Chaque stade correspond à une association de cellules de la spermatogénèse comprenant des spermatogonies, des spermatocytes et un stade précis de spermatides. En coupe, chaque tubule est caractérisé par un stade déterminé. (In, B : spermatogonies type intermédiaire et type B; PI : préleptotène ; L : leptotène ; Z : zygotène ; P : pachytène ; D :diplotène ; m²m : spermatocyte secondaire ; 1, 2, ...16 : différents types de spermatides)

(D'après de Russell et al., 1990).

II. Les modifications de la chromatine qui accompagnent la spermatogénèse

Tout comme dans les cellules somatiques, au cours de la spermatogénèse, les événements chromatinien nécessaires à la survie de la cellule, tels que la transcription, la réparation de l'ADN, etc... ont encore lieu. Mais les cellules germinales sont également le lieu d'événements chromatinien uniques, spécifiques à ces cellules. Au cours du stade pré-méiotique, l'ADN va subir la méthylation permettant la mise en place de l'empreinte paternelle. Au cours de la méiose, des recombinaisons entre chromosomes homologues vont avoir lieu, assurant un brassage génétique. Enfin, le fait le plus marquant concerne la réorganisation de la chromatine au cours de la phase post-méiotique. En effet, la quasi-totalité des histones vont être enlevées pour être remplacées par les protamines, aboutissant à une structure chromatinienne finale différente de la structure somatique. Ces remaniements sont accompagnés de nombreuses modifications post-traductionnelles des histones ainsi que de l'incorporation de nombreux variants.

1. Méthylation de l'ADN et établissement de l'empreinte paternelle

L'empreinte parentale permet de déterminer l'expression d'un certain nombre de gènes en fonction de leur origine parentale. L'empreinte paternelle permet l'expression uniquement de l'allèle d'origine maternelle. La production de gamètes implique donc une uniformisation de l'empreinte parentale pour que l'ensemble des gamètes porte une empreinte unique (Figure 17).

La méthylation de l'ADN est effacée au cours du développement embryonnaire dans les cellules primordiales germinales au niveau des crêtes génitales (E11,5 à 12,5 chez la souris) (Lee et al., 2002; Yamazaki et al., 2003). Cependant, cette perte générale de méthylation de l'ADN ne concerne pas les rétrotransposons et les séquences répétées, ce qui préviendrait l'apparition de mutations dues à la propagation de transposons réactivés (Morgan et al., 2005). Puis la méthylation spécifique des gènes soumis à l'empreinte paternelle débute quelques jours plus tard, dans les cellules germinales primordiales de l'embryon âgé de 15,5 jours chez la souris, puis se poursuit dans les spermatogonies. Seulement trois régions soumises à l'empreinte paternelle ont été identifiées : H19-Igf2 (Thorvaldsen et al., 1998), Rasgrf (Yoon

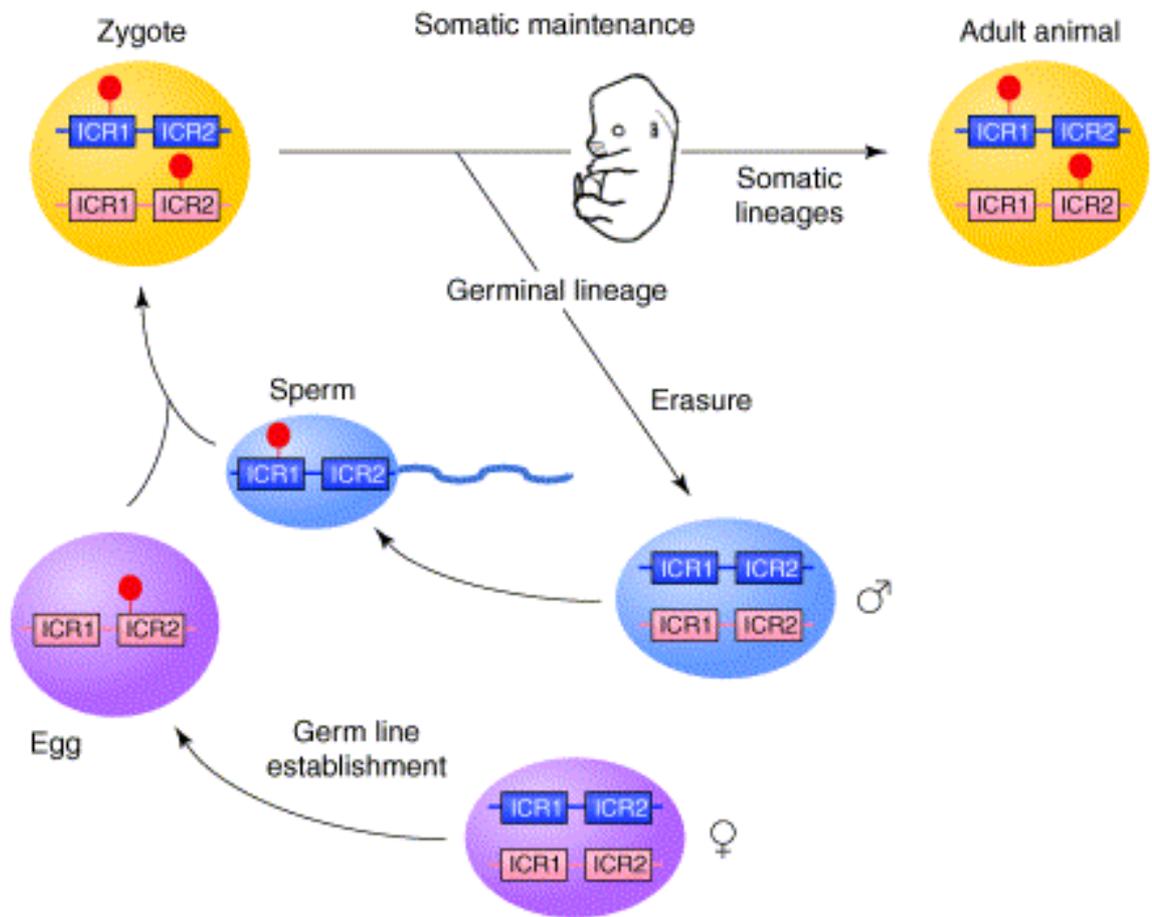


Figure 17. Etablissement de l’empreinte parentale

Les empreintes parentales sont établies durant l’ovogenèse et durant la spermatogenèse, au niveau de séquences qui contrôlent l’expression des gènes soumis à l’empreinte (ICR, imprinted control region). Après la fécondation, l’empreinte est maintenue dans les tissus somatiques de l’embryon tandis qu’elle est effacée dans la lignée germinale, pour ensuite être rétablie différemment selon le sexe. Le schéma prend l’exemple de deux ICR, l’un soumis à l’empreinte paternelle (ICR1) et l’autre soumis à l’empreinte maternelle (ICR2).

(D’après Delaval et Feil, 2004).

et al., 2002) et Dlk1-Gtl2 (Lin et al., 2003), tandis que les gènes soumis à l’empreinte maternelle sont beaucoup plus nombreux.

Dans les cellules germinales mâles, l’établissement de l’empreinte paternelle implique les DNA méthyltransférases DNMT3A, DNMT3B et DNMT3L (Kato et al., 2007), ainsi que le facteur BORIS (brother of the regulator of imprinted sites) qui favorise l’action des DNMT3a et DNMT3b sur des sites spécifiques (Klenova et al., 2002). L’inactivation du gène Dnmt3l induit une perte de méthylation sur les régions soumis à l’empreinte paternelle. De même, l’inactivation des gènes Dnmt3a et Dnmt3b montrent des variations dans les profils de méthylation.

De plus, DNMT1 semble également jouer un rôle dans ce processus. Des embryons déficients de DNMT1 montre une baisse de méthylation de 30% ainsi qu’un profil de méthylation aberrant (Li et al., 1993; Li et al., 1992).

Des travaux récents ont montré qu’une mauvaise mise en place de l’empreinte paternelle pouvait être à l’origine d’infertilités. En effet, une méthylation anormale au niveau des gènes soumis à l’empreinte était observée beaucoup plus souvent chez des patients souffrant d’une baisse du nombre de spermatozoïdes par rapport à des patients sains (Kobayashi et al., 2007).

2. L’incorporation de nombreux variants d’histones

Les variants d’histones sont des protéines homologues à l’une des cinq histones de base mais possédant des propriétés spécifiques. Leur incorporation au sein de la chromatine permet l’établissement d’un signal spécifique ou d’une propriété structurale et fonctionnelle d’une région donnée.

La majorité des variants d’histones connus sont incorporés au sein de la chromatine durant la spermatogénèse, qu’ils soient spécifiques ou non du testicule (Figure 18) (Table 4).

Les principales caractéristiques et fonctions dans les cellules somatiques de ces variants d’histones ont déjà été présentées (Paragraphe *Introduction A. II. 3.*).

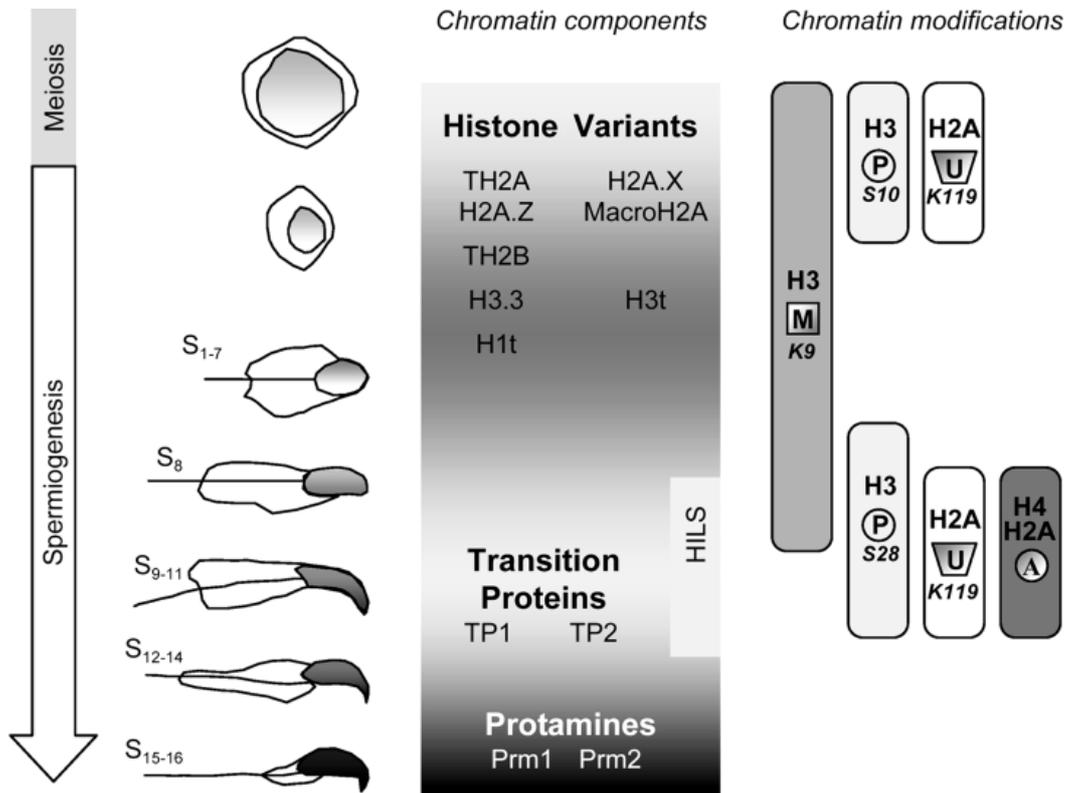


Figure 18. Le remodelage de la chromatine au cours de la spermatogénèse

La majorité des variants d'histones est incorporée au cours de la méiose. Puis les protéines de transition et les protamines sont incorporées au sein de la chromatine. La distribution temporelle des modifications post-traductionnelles majoritaires des histones est également représentée (A, acétylation; U, ubiquitination; M, méthylation; P, phosphorylation).

(D'après Rousseaux et al, 2005)

Histones	Variants somatiques	Variants spécifiques des cellules germinales mâles
H1	H1.1 à H1.5, H1°	H1t, H1t2, H1LS1
H2A	H2AX, H2AZ, macroH2A, H2ABbd	TH2A, H2AL1, H2AL2
H2B	Pas de variants	TH2B, H2BFWT, SubH2Bv, TSH2B, H2BL1, H2BL2
H3	H3.1 à H3.3, CENP-A	TH3, H3t
H4	Pas de variants	Pas de variants

Table 4. Classification des variants d'histones en fonction de leur distribution tissulaire chez les mammifères

Les variants exprimés de manière somatique ou spécifique des cellules germinales mâles ont été séparés. Toutes les histones ont des variants, à l'exception de l'histone H4.

Nous allons maintenant passer en revue le rôle de l'incorporation des variants d'histones au cours de la spermatogénèse. La plupart des variants d'histones sont incorporés au sein de la chromatine durant la phase de méiose, et leur fonction reste encore à définir.

2.1. Les variants d'H1

Chez les mammifères, onze variants différents de H1 ont été identifiés, dont sept variants somatiques (H1.1 à H1.5, H1° et H1x), un exprimé dans l'ovocyte (H1oo) et trois spécifiquement exprimés dans le testicule (H1t, H1T2, H1LS1) (Figure 19). Seuls les trois derniers sont mis en place au cours de la spermatogénèse, nous discuterons donc uniquement de ceux-ci.

~ H1t

Chez la souris, l'histone de liaison H1 est partiellement remplacée par le variant H1t à partir des spermatocytes au stade pachytène. A ce stade, il représente jusqu'à 60% des histones H1 totaux (Grimes et al., 2003). Ce variant H1t persiste dans le noyau des cellules germinales jusqu'aux spermatides en élongation de stade 8. Il a été montré que H1t était le variant de H1 ayant la plus faible capacité de compaction de l'ADN (De Lucia et al., 1994; De et al., 2002; Khadake and Rao, 1995; Ramesh et al., 2006; Talasz et al., 1998; Wellman et al., 1999). H1t pourrait donc conférer une structure chromatiniennne plus ouverte, favorisant ainsi l'accessibilité aux facteurs de transcription, et aux facteurs nécessaires à la recombinaison homologue (Doenecke et al., 1997).

Cependant des souris knock-out pour H1t restent fertiles et ont une spermatogénèse normale. Selon une première hypothèse, la perte de H1t serait seulement en partie compensée par des histones de liaison somatiques. Etant donné que H1t induit une chromatine moins compacte, une chromatine dépourvue d'histone de liaison aurait une fonctionnalité similaire à celle contenant ce variant (Fantz et al., 2001).

Une autre explication pour cette absence de phénotype serait que l'absence de H1t pourrait être compensée par la surexpression des variants H1.1 et H1.2 (Lin et al., 2000; Drabent et al., 2000).

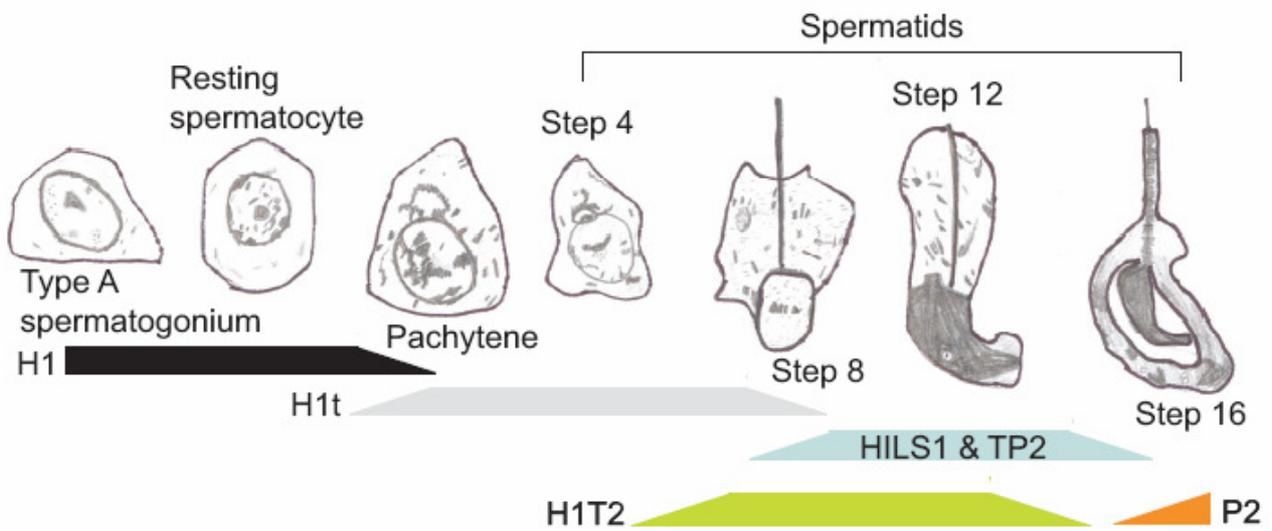


Figure 19. Les variants d'histones de liaison au cours de la spermatogénèse

Une vue d'ensemble de la spermatogénèse est représentée par les stades les plus remarquables et l'apparition des variants est indiquée par des barres de couleur. L'histone canonique H1 est présente dans les spermatogonies et jusqu'au stade pachytène, puis est remplacée par le variant H1t. Ce variant persiste dans le noyau des cellules germinales jusqu'aux spermatides en élongation de stade 8. Durant la phase d'élongation des spermatides, le variant H1t2 va progressivement remplacer H1t, lui-même remplacé au stade final par les protamines. Les variant HILS1 est lui exprimé à partir des spermatides au stade 9 et son apparition coïncide celle de TP2 et avec la disparition de l'histone H1.

(D'après Godde et Ura K, 2009)

~ *H1t2*

Durant la phase d'élongation des spermatides rondes, le variant H1t2 va progressivement remplacer le variant H1t (Martianov et al., 2005; Tanaka et al., 2005). Ce variant est spécifiquement localisé sur la chromatine au niveau du pôle apical juste sous l'acrosome en formation (Martianov et al., 2005). D'autres travaux ont montré que cette localisation n'était pas nécessaire à la formation de l'acrosome, mais qu'elle dépendait d'une organisation correcte de la chromatine (Catena et al., 2006).

La délétion du gène H1t2 réduit significativement la fertilité chez des souris mâles, donnant lieu à des cellules germinales morphologiquement aberrantes, avec un cytoplasme résiduel, un détachement de l'acrosome et une fragmentation de l'ADN (Martianov et al., 2005). En revanche, les rares spermatozoïdes obtenus de ces mutants sont capables de féconder un ovule après injection intracytoplasmique (Tanaka et al., 2005).

~ *HILS1*

Un troisième variant de H1, HILS1 (H1-like protein in spermatids 1), est exprimé chez l'homme et la souris à partir des spermatides au stade 9, juste après l'apparition du flagelle, et persiste jusqu'aux spermatides de stade 15 (Iguchi et al., 2004; Iguchi et al., 2003; Yan et al., 2003). Son apparition coïncide avec la disparition de l'histone H1t (Yan et al., 2003). Bien que HILS1 possède des propriétés similaires aux histones de liaison (telles que la capacité à s'associer à des nucléosomes *in vitro* et d'agréger la chromatine), le fait qu'il soit exprimé dans les spermatides de stades tardifs, c'est-à-dire ne contenant plus d'histones, suggère qu'il participerait à la condensation de la chromatine via un mécanisme distinct des autres histones de liaison (Yan et al., 2003). Son rôle semble essentiel à la spermatogenèse, car la délétion de son homologue chez la drosophile empêche une élongation du noyau dans les spermatides et induit une stérilité chez les mâles (Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005). De plus, une réduction des ARNm correspondant est observée chez des hommes souffrant d'une réduction de la mobilité spermatique (Jedrzejczak, 2007).

2.2. Les variants d'H2A

C'est l'histone pour laquelle il existe le plus de variants.

Il existe de nombreux variants d'H2A, certains spécifiques du testicule, d'autres non mais qui tous sont exprimés dans le testicule et semblent jouer un rôle dans la spermatogenèse. Il existe

quatre variants d'H2A ubiquitaires (H2A.Bbd –bien que plus largement exprimé dans le testicule, H2A.Z, H2A.X et macroH2A) et quatre variants spécifiques du testicule (TH2A, H2AL1, H2AL2 et H2AL3).

~ H2A.Bbd

A ce jour, l'expression du variant H2A.Bbd a été démontrée uniquement chez l'homme (Chadwick and Willard, 2001b). Cependant, une analyse *in silico* chez la souris a permis de prédire la séquence en acides aminés de la protéine H2A.Bbd. Ainsi, une étude par northern blot a permis de tester la présence de l'ARNm de H2A.Bbd dans différents tissus de souris. L'ARNm correspondant a été détecté à un fort taux dans le testicule, comparé aux autres tissus (Eirin-Lopez and Ausio, 2007).

L'abondance de H2A.Bbd dans le testicule comparé aux autres tissus où sa présence est à peine détectable, laisse penser que cette histone serait l'un des nombreux variants impliqués dans le remodelage de la chromatine au cours de la spermatogénèse.

~ H2A.Z

Très peu d'études ont été réalisées sur la variant H2A.Z au cours de la spermatogénèse. Une publication a démontré chez la souris que l'expression de ce variant était très fortement augmentée dans les spermatides rondes, où il permettrait de compenser la perte de macroH2A au niveau de la vésicule sexuelle des chromosomes sexuels X et Y (Greaves et al., 2006). Il serait ainsi associé à l'hétérochromatine facultative et aurait comme rôle de garder les chromosomes sexuels dans un état de répression transcriptionnelle.

~ H2A.X

Dans les cellules somatiques, H2A.X est impliqué dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN. De part la présence au cours de la méiose de recombinaisons homologues entre chromosomes nécessitant des cassures et des réparations des brins d'ADN, l'importance de H2A.X pour un bon déroulement de la spermatogénèse prend tout son sens.

Il a ainsi été rapporté qu'un déficit en H2A.X résulte en un arrêt de la spermatogénèse au stade des spermatocytes pachytène. En effet, dans ces cellules, une protéine nécessaire à la réparation des cassures doubles brins ne se localise plus au niveau de foyers caractéristiques des sites de recombinaison et les chromosomes sexuels se retrouvent appariés aux

autosomes, entraînant l'apoptose des cellules au stade des spermatocytes pachytènes (Celeste et al., 2002). Ceci a été confirmé par les travaux de Fernandez-Capetillo et ses collaborateurs qui ont montré que les chromosomes sexuels des spermatocytes déficients en H2A.X n'étaient pas capables de se condenser pour former la vésicule sexuelle (Fernandez-Capetillo et al., 2003).

~ *MacroH2A*

Dans les cellules somatiques de mammifères femelles, macroH2A est retrouvé au niveau du chromosome X inactif, le maintenant dans un état transcriptionnellement inactif par formation d'hétérochromatine.

MacroH2A1.2 a été trouvé en forte concentration dans le testicule chez la souris (Pehrson et al., 1997; Rasmussen et al., 1999). Il a notamment été localisé dans le noyau des cellules germinales, au niveau des chromosomes sexuels appariés (vésicule sexuelle) et de l'hétérochromatine centromérique (Hoyer-Fender et al., 2000a; Richler et al., 2000).

Le variant macroH2A1.2 et la protéine HP1 β de l'hétérochromatine colocalisent dans les spermatocytes au niveau des régions pseudoautosomales de la vésicule sexuelle (Hoyer-Fender et al., 2000b; Turner et al., 2001). Ainsi, le variant macroH2A serait important pour générer une structure d'hétérochromatine au niveau de la vésicule sexuelle durant la méiose au stade des spermatocytes pachytènes afin de prévenir les réarrangements entre les chromosomes sexuels.

La présence de macroH2A1.2 au sein de spermatozoïdes murins est sujet à débat, deux études contradictoires ayant été publiées (Abbott et al., 2004; Hoyer-Fender et al., 2000b).

~ *TH2A*

Le variant TH2A a été très peu étudié et est spécifiquement exprimé dans le testicule. Il est exprimé et incorporé au sein de la chromatine dans les spermatocytes pachytènes puis disparaît dans les spermatides rondes (Meistrich et al., 1985; Rao et al., 1983). Son rôle est encore inconnu.

~ *H2AL1/2/3*

Récemment, d'autres variants de H2A spécifiques de la souris ont été identifiés au sein de notre laboratoire : H2AL1 (H2A Like1), H2AL2 (H2A Like2) et H2AL3 (H2A Like3) (Govin, Escoffier et al., 2007). L'étude de ces variants est rapportée dans le paragraphe *Résultats A. I.*

2.3. Les variants d'H2B

Les variants connus d'H2B sont tous spécifiques du testicule : TH2B/hTSH2B, H2BFWT et SubH2Bv/H2BL1. Hormis TH2B, ces variants ne sont pas conservés entre toutes les espèces.

~ TH2B/hTSH2B

Contrairement aux autres variants de H2B, TH2B est très conservé entre le rat, la souris et l'homme.

Chez le rat, il est exprimé depuis les spermatocytes précoces jusqu'aux pachytènes, mais reste la forme majeure de H2B dans les spermatides rondes et allongées (Meistrich et al., 1985).

Chez l'homme, ce variant prend le nom de hTSH2B (Human testis/sperm-specific histone H2B). Des expériences d'immunofluorescence ont montré qu'il se concentrait en spots au niveau du pôle basal du noyau des spermatozoïdes matures (Zalensky et al., 2002) ou des télomères (Zalenskaya et al., 2000). Seulement 30% des spermatozoïdes matures humains contiennent ce variant, la décondensation de la chromatine après la fécondation s'effectuant plus rapidement dans ces derniers (Singleton et al., 2007). Ceci pourrait être lié au fait qu'il forme des nucléosomes plus instables que les nucléosomes canoniques (Li et al., 2005). Ainsi, hTSH2B pourrait influencer la formation des pronuclei et l'activation des gènes paternels juste après la fécondation ou durant le développement embryonnaire précoce.

~ H2BFWT

Un autre variant de H2B, H2BFWT, montre très peu d'homologie avec l'histone canonique H2B, surtout au niveau de sa queue N-terminale (Boulard et al., 2006).

Il serait spécifiquement associé aux télomères dans les spermatozoïdes humains matures (Gineitis et al., 2000) (Churikov et al., 2004). Il forme *in vitro* des nucléosomes aussi stables que les nucléosomes canoniques mais est incapable de condenser et d'assembler les chromosomes au cours de la mitose (Boulard et al., 2006). Cette résistance à la compaction de la chromatine située au niveau des télomères pourrait expliquer leur amplification observée durant la phase d'élongation des spermatides (Tanemura et al., 2005).

~ *SubH2Bv/H2BL1*

Un variant de H2B exprimé spécifiquement dans les testicules de taureau a été identifié et nommé SubH2Bv. Ce variant a la particularité de se localiser en périphérie du noyau, au niveau de la région subacrosomale du spermatozoïde, ce qui lui permettrait de participer à l'assemblage de l'acrosome (Aul and Oko, 2002).

Chez la souris, son homologue, identifié au laboratoire, semblerait être H2BL1, mais nos travaux n'ont pas permis de mettre en évidence une telle localisation (données non publiées).

2.4. Les variants d'H3

Il existe de nombreux variants de H3, spécifiques au non du testicule, qui sont mis en place au cours de la spermatogénèse. Il existe deux isoformes ubiquitaires chez les mammifères (H3.3 et CENP-A) et deux variants spécifiques du testicule, H3t et TH3.

~ *H3t*

Le variant H3t a été identifié comme un variant humain et spécifiquement exprimé dans le testicule, au stade des spermatocytes (Albig et al., 1996; Witt et al., 1996). Mais d'autres travaux plus récents ont permis de le détecter dans des cellules HeLa (Govin et al., 2005) ainsi que dans le cerveau et dans des embryons (Govin, Escoffier et al., 2007). Son rôle reste encore inconnu.

~ *TH3*

Le deuxième variant, TH3, est spécifique du rat et a été fortement détecté dans les spermatogonies et plus faiblement dans les spermatocytes et les spermatides rondes. Sa synthèse a lieu dans les spermatogonies mais pas dans les spermatocytes, contrairement aux autres histones spécifiques du testicule tels que TH2A, H1t et TH2B (Meistrich et al., 1985; Trostle-Weige et al., 1984).

~ *H3.3*

Au cours de la spermatogénèse, la majorité des histones H3 est remplacée par le variant H3.3 durant la première prophase de méiose (Akhmanova et al., 1995). Puis ce variant disparaît dans les stades tardifs de la spermiogénèse, au moment où la quasi-totalité des histones est enlevée pour être remplacée par les protéines de transition puis les protamines. La prophase de méiose est une phase importante caractérisée par un niveau élevé de transcription, où la

plupart des ARNm requis pour le développement du spermatozoïde sont synthétisés, juste avant l'inactivation complète du génome. Ainsi, le remplacement de l'histone H3 par l'histone H3.3 pourrait être importante pour l'initiation et le maintien d'une conformation ouverte de la chromatine durant la phase méiotique.

De plus, il a été récemment montré que ce variant était présent avec macroH2A au niveau de la vésicule sexuelle dans les spermatocytes (van der Heijden et al., 2007), puis associé à H2A.X au niveau des chromosomes sexuels dans les stades post-méiotiques. Cet assemblage spécifique de variants pourrait conduire à une différenciation de certaines régions lors de la spermiogénèse, et ainsi participer à la reprogrammation post-méiotique du génome mâle.

~ *CENP-A*

Peu de données sont connues sur le rôle de CENP-A au cours de la spermatogénèse. Au sein des cellules somatiques, CENP-A est nécessaire pour le recrutement des protéines centromériques et des kinétochores au niveau des centromères pour un bon déroulement de la mitose. Une fonction similaire dans les cellules germinales pourrait être nécessaire à la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose et de la méiose.

De plus, une ancienne étude avait montré par immunofluorescence que CENP-A restait présent dans des spermatozoïdes de taureau (Palmer et al., 1990).

3. La mise en place de modifications post-traductionnelles des histones

En plus de l'incorporation de variants d'histones, de nombreuses modifications post-traductionnelles des histones ont lieu au cours de la spermatogénèse. Cependant, bien que la modification post-traductionnelle des histones soit maintenant bien documentée, peu de choses sont connues sur leur potentielle fonction dans la réorganisation de la chromatine et le remplacement des histones au cours de la spermatogénèse.

2.1. La méthylation

Chez la souris, la méthylation de deux résidus en particulier, H3K4 et H3K9, montre une dynamique spécifique au cours de la formation de la lignée germinale.

Hayashi et ses collaborateurs ont identifié une histone méthyltransférase spécifique de la méiose, appelée Meisetz, qui catalyse la méthylation de H3K4 en H3K4me3 (Hayashi et al., 2005). La délétion de Meisetz rend les souris mutantes stériles, avec des testicules ayant un poids réduit de 75% et montrant un arrêt de la spermatogénèse au stade spermatocytes pachytènes.

La méthyltransférase G9a est exprimée durant les stades précoces de la spermatogénèse, dans les spermatogonies et le stade leptotène. Son inactivation conduit à la production de mâles stériles, avec un arrêt au stade pachytène et une entrée en apoptose des cellules (Tachibana et al., 2007). Dans les stades plus tardifs, la méthylation de H3K9 est assurée par les enzymes Suv39h1 et Suv39h2, cette dernière étant spécifiquement exprimée dans le testicule (Smith et al., 2003). L'invalidation d'un des deux gènes n'a pas d'effet sur la viabilité ou la fertilité des souris tandis que l'invalidation des deux gènes donnent des souris montrant des défauts de spermatogénèse, avec des recombinaisons non homologues entre les autosomes et les chromosomes sexuels et une perte de H3K9me au niveau des régions d'hétérochromatine péracentromériques au stade spermatogonies et spermatocytes, mais pas dans les stades plus tardifs (Peters et al., 2001).

Récemment, des travaux ont montré que la déméthylase JHDM2A, qui déméthyle spécifiquement H3K9me3, était importante pour la spermatogénèse (Okada et al., 2007). L'invalidation du gène conduit à des souris stériles, produisant des spermatozoïdes immobiles et moins nombreux. L'analyse des promoteurs de Prm1 et Tnp1 montre une augmentation de la méthylation de H3K9 par rapport au souris sauvages, conduisant à une répression de l'expression de ces protéines dans ces spermatozoïdes. Le rôle de cette protéine pourrait être de déméthyliser les régions qui doivent rester transcriptionnellement actives dans les stades tardifs de la spermatogénèse, comme par exemple les protéines nécessaires à la condensation de la chromatine, Prm1 et Tnp1.

2.2. L'acétylation

Au cours de la spermatogénèse, des vagues d'acétylation des histones ont pu être mises en évidence. En effet, les spermatogonies ainsi que les spermatocytes pré-leptotènes contiennent

des histones H2A, H2B, H3 et H4 acétylées, ce qui pourrait correspondre aux histones des régions transcriptionnellement actives. Puis cette acétylation diminue au cours de la méiose (bien que la transcription persiste) dans les stades leptotène et pachytène et persiste à bas bruit dans les spermatides rondes.

Une deuxième vague d'acétylation massive des histones apparaît dans tout le noyau à partir des spermatides allongées de stade 8, dans un contexte transcriptionnellement inactif, donnant lieu à une situation unique. Cette hyperacétylation coïncide avec la disparition des enzymes histones déacétylases (Caron et al., 2003). Ainsi, un déséquilibre de la balance HAT/HDAC pourrait être à l'origine de cette hyperacétylation. Bien que ces histones acétylées soient enlevées progressivement, elles persistent dans les régions péricentromériques des chromosomes à des stades plus tardifs (stades 10 et 11) (Govin, Escoffier et al., 2007; Hazzouri et al., 2000; van der Heijden et al., 2006). Cette différence d'acétylation au sein du noyau spermatique suggère un rôle particulier lors de la restructuration du génome germlinal mâle.

Le rôle de ces vagues d'acétylation est encore peu connu. Certains travaux ont suggéré le fait que l'acétylation des histones pouvait faciliter leur remplacement par les protamines *in vitro* (Oliva et al., 1987; Oliva and Mezquita, 1986). Une autre hypothèse serait que l'acétylation pourrait jouer le rôle de signal pour initier la réorganisation et la compaction du génome mâle en recrutant des facteurs spécifiques (Paragraphe *Introduction B. II.4.*).

2.3. La phosphorylation

La phosphorylation spécifique de H3 sur la sérine 10 s'effectue au cours de la mitose, mais aussi au cours de la méiose. Des travaux ont permis de montrer que cette phosphorylation était associée à la condensation des chromosomes au cours de la mitose (Ajiro et al., 1996a; Ajiro et al., 1996b; Hendzel et al., 1997), mais également au cours de la méiose (Wei et al., 1998).

La phosphorylation de la sérine 1 de H4 a également été découverte (Sung and Dixon, 1970). Elle joue un rôle crucial, puisqu'elle affecte l'acétylation de la queue N-terminale de H4 (Utley et al., 2005). Chez la levure, la substitution de cet acide aminé affecte la formation de la lignée germinale. Présente également chez la drosophile et les mammifères, cette modification débute pendant la méiose et persiste au cours de la spermiogénèse et pourrait

être déterminante dans le contrôle de l'acétylation de H4 dans les spermatides en élongation (Krishnamoorthy et al., 2006).

Enfin, la phosphorylation du variant H2A.X joue un rôle crucial dans la réparation des cassures doubles brins liées à la recombinaison homologue (Celeste et al., 2002).

2.4. L'ubiquitination

L'ubiquitination des histones au cours de la spermatogénèse a été retrouvée dans de nombreuses espèces, comme le rat, la souris, le coq (Jason et al., 2002). Chez la souris, l'ubiquitination de H2A a été détectée par immunohistochimie colocalisant avec la vésicule sexuelle des spermatocytes pachytènes. La forme ubiquitinée de H2A disparaît dans les spermatides rondes, puis réapparaît dans les spermatides allongées (Baarends et al., 1999). Dans les spermatides allongées, H2A, H2A.Z, H2B, H3 et TH3 ont été trouvés mono- et poly-ubiquitinés chez le rat (Chen et al., 1998).

4. Le remplacement des histones par les protéines de transition et les protamines

Au cours de la spermiogénèse, dans les spermatides en élongation (type 9 à 11 chez la souris), il se produit un événement unique absent de tout autre cellule somatique ou germinale : les histones sont remplacées par des protéines de transition qui sont à leur tour déplacées par des protamines, petites protéines basiques, riche en arginine et cystéine. Chez la souris et chez l'homme, plus de 90% des histones seraient remplacées par les protamines.

Chez les mammifères, les gènes codant pour les protéines de transition et les protamines sont transcrits principalement dans les spermatides rondes. Les ARNm correspondants sont maintenus dans un état de traduction réprimé, et ne sont traduits que dans les stades plus avancés (Steger et al., 2000).

4.1. Les protéines de transition

Les protéines de transition sont des molécules basiques, riches en résidus arginine et lysine. Ces protéines se fixent de manière transitoire à l'ADN avant la mise en place des protamines. Les protéines de transition représentent 90% des protéines basiques de la chromatine dans les

spermatides de stade 12-13, stade où les histones ont été enlevées et où les protamines ne sont pas encore incorporées (Meistrich et al., 2003). Le nombre de protéines de transition est variable selon les espèces. Chez les mammifères, quatre protéines de transition ont été identifiées, TP1 à TP4. TP1 et TP2 représentant respectivement 50% et 40% des protéines nucléaires spermatiques, (Meistrich et al., 2003), elles sont les plus étudiées et les mieux décrites.

Chez la souris, les gènes codant pour les protéines de transition TP1 et TP2 sont transcrits dans les spermatides rondes de type 7 (Mali et al., 1989). Les ARNs messagers correspondants sont stockés dans le cytoplasme pendant 3 à 7 jours après la transcription sous la forme de ribonucléoprotéines (Kwon and Hecht, 1993). Les protéines correspondantes sont traduites dans les spermatides en condensation de type 12 et 13 (Grimes et al., 1977).

Chez la souris, TP1 est une protéine de faible poids moléculaire (6,2 kDa), qui contient environ 20% d'arginine et 20% de lysine. Elle est abondamment exprimée, et sa séquence est relativement bien conservée d'une espèce à l'autre.

TP2 contient 10% d'arginine, 10% de lysine, 5% de cystéine et à un poids moléculaire de 13 kDa. Contrairement à TP1, sa séquence n'est pas très conservée, et son taux d'expression varie d'une espèce à l'autre (Steger et al., 1998).

L'invalidation chez la souris de TP1 ou TP2 ne montre pas un phénotype radical, puisque ces souris sont fertiles, que leurs testicules sont normaux et que l'incorporation des protamines a bien lieu (Adham et al., 2001; Yu et al., 2000; Zhao et al., 2001). Il est toutefois à noter que les souris invalidées pour TP1 montrent une fertilité réduite de moitié tandis que les portées des souris invalidées pour TP2 sont plus petites.

En revanche, l'invalidation simultanée des deux protéines des deux protéines de transition conduit à une stérilité chez la souris (Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004). Les spermatides des stades tardifs de la spermiogénèse montrent des défauts morphologiques et une mauvaise condensation de la chromatine, avec des cassures au niveau de leur ADN et pas de clivage de la pré-protamine 2 en protamine 2. Les mâles montrent une réduction drastique du nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme, ces derniers étant n'étant pas féconds *in vitro* par injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde.

4.2. Les protamines

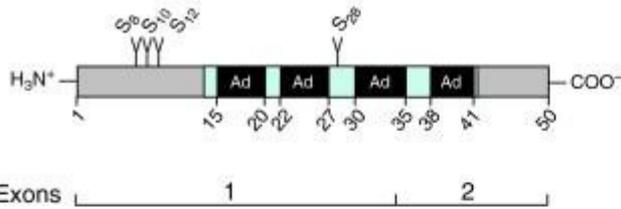
Les protamines sont les protéines nucléaires majeures des spermatides condensées (type 15 et 16) et des spermatozoïdes. Ce sont de petites molécules basiques riches en arginines et en cystéines. Ces dernières permettent la formation de ponts disulfures qui verrouillent la structure condensée dans le noyau des spermatozoïdes. Si la plupart des mammifères possède une seule protamine de 50 acides aminés (environ 5,5 kDa), Prm1, l'homme et la souris entre autres comptent une deuxième protamine, Prm2 (Figure 20). A la différence de Prm1 qui est directement traduite à partir de son ARNm, Prm2 est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 106 acides aminés, qui après 6 clivages protéiques successifs (Chauvière et coll., 1992), donne une protéine mature de 63 acides aminés (environ 7 kDa).

Chez la souris, la transcription des gènes codant pour les protamines Prm1 et Prm2 débute dans les spermatides rondes (type 7), de façon simultanée à celle des gènes des protéines de transition (Mali et al., 1989). Les protéines correspondantes sont principalement traduites dans spermatides condensées de type 14 à 16, Prm2 étant détectée un peu plus tardivement que Prm1 du fait de sa maturation post-traductionnelle (Balhorn et al., 1984; Biggiogera et al., 1992).

De façon similaire aux protéines de transition, les protamines sont capables de condenser l'ADN *in vitro* (Balhorn et al., 2000; Brewer et al., 2003; Kwon and Hecht, 1993). Les deux protamines sont nécessaires à une condensation post méiotique correcte de la chromatine chez la souris. En effet, l'inactivation de *Prm1* ou de *Prm2* rend les souris hétérozygotes stériles, signifiant bien que ces deux protamines sont essentielles pour une fonctionnalité normale des spermatozoïdes (Cho et al., 2001). La diminution de l'expression de l'une ou l'autre des protamines induirait des défauts de formation du noyau et perturberait la maturation post-traductionnelle de la protéine Prm2.

La phosphorylation des protamines semble essentielle à leur fonctionnement. En effet, une mutation de la protéine kinase Camk4, qui phosphoryle Prm2, induit un défaut de spermatogénèse et une stérilité mâle (Wu et al., 2000; Wu and Hecht, 2000) 2000).

(a) Mouse protamine P1



(b) Mouse protamine P2

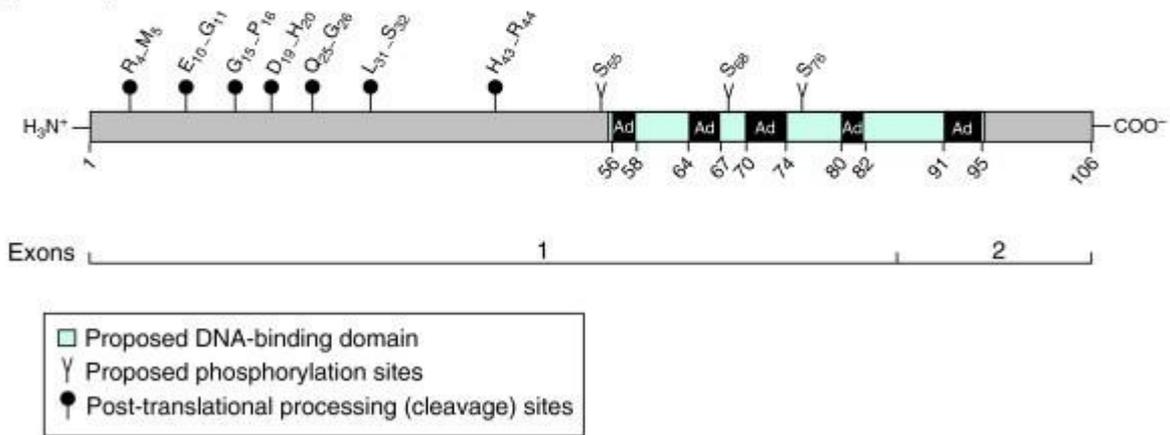


Figure 20. Représentation schématique des protéines et des gènes des protamines

Au niveau de l'ADN, les deux exons sont représentés par les barres sous les protéines. Au niveau protéique, la nature et la position des acides aminés importants pour le clivage post-traductionnel et pour la phosphorylation sont indiqués sur le dessus de la protéine. Les domaines d'interaction à l'ADN sont représentés.

(D'après Balhorn, 2007)

Les histones sont donc progressivement remplacées au cours de la spermatogenèse par les protéines de transition, puis par les protamines. L'explication conventionnelle d'une telle réorganisation nucléaire du noyau spermatique, serait de permettre une meilleure protection contre les potentielles mutations de l'ADN, celui-ci étant dans un état beaucoup plus compacté. L'autre explication possible serait que cette compaction nucléaire du spermatozoïde favoriserait sa pénétration dans l'oeuf (Hennig, 2003).

4.3. Les mécanismes de cette réorganisation

Peu de choses sont connues sur les mécanismes qui permettent ce remodelage de la chromatine au cours de la spermatogénèse. L'identification d'une protéine spécifique du testicule contenant deux bromodomains (domaine liant spécifiquement les histones acétylées), appelée Brdt, a été une première piste pour la compréhension de ces mécanismes.

Chez la souris, Brdt colocalise en immunofluorescence avec la vague d'hyperacétylation des histones (Govin et al., 2006) et possède la propriété d'induire une compaction de la chromatine (Pivot-Pajot et al., 2003). De plus, des travaux *in vitro* et dans les cellules somatiques ont montré que Brdt liait l'histone H4ac, l'intégrité du premier bromodomaine et des régions flanquantes étant nécessaire à cette interaction (Pivot-Pajot et al., 2003). Or le premier bromodomaine semble nécessaire à la spermatogenèse chez la souris. En effet, une mutagenèse dirigée contre le premier domaine donne des souris viables, mais stériles, produisant des gamètes morphogénétiquement aberrantes à partir du stade des spermatides allongées (Shang et al., 2007). De manière identique chez l'homme, des travaux très récents de notre équipe en collaboration avec le laboratoire de Christophe Müller, montrent qu'une mutation ponctuelle dans la région flanquante du premier bromodomaine induit une infertilité chez l'homme (publication acceptée).

Ainsi, BRDT serait un facteur clé dont les propriétés uniques permettent de relier la vague d'acétylation massive des histones précédant leur remplacement à la poursuite correcte de la spermiogenèse.

Bien que la quasi-totalité des histones soit enlevée et remplacée par les protéines de transition et les protamines, aucune chaperonne n'est connue pour contrôler l'assemblage de ces protéines spécifiques. Ainsi, au sein du laboratoire, par co-immunoprécipitation sur un extrait testiculaire acide, nous avons mis en évidence une interaction entre la protéine HSP70.2, un membre de la famille des HSP70 spécifique du testicule, et les protéines de transition TP1 et

TP2, dans les stades post-méiotiques où ces protéines sont incorporées à la chromatine (Govin et al., 2006). HSP70.2 a ainsi été identifiée comme la première chaperonne des protéines de transition. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication dans laquelle j'ai été associée et qui est présentée dans le paragraphe *Résultats C*.

5. La structure finale de la chromatine dans le noyau spermatique

5.1. La majeure partie du génome est associée aux protamines

A l'issue de la spermatogénèse, la structure chromatinienne classique, telle qu'elle est présentée dans la partie I, n'existe plus : la quasi-totalité du génome spermatique est en effet associée aux protamines. La façon précise dont les protamines s'associent à l'ADN n'est pas clairement déterminée, cependant, un modèle a été avancé, le modèle en « doughnut-loop » ou « beignet » (Ward, 1993). Les protamines s'associeraient via leurs résidus arginines positifs aux groupements phosphates négatifs d'une molécule d'ADN par des forces électrostatiques et des liaisons hydrogènes. L'ADN associé à un tour de solénoïde dans les cellules somatiques est alors enroulé en spirale sur deux tours (figure 21 A). Chaque tour d'ADN complexé avec les protamines interagit ensuite avec les tours voisins par l'intermédiaire de forces de Van der Waals, pour aboutir à la structure caractéristique en beignet (figure 21 B).

5.2. Subsistance de régions spécifiquement organisées en nucléosomes dans les spermatozoïdes

Bien que la majorité des histones soient remplacées par les protéines de transition puis par les protamines, il subsiste une proportion non négligeable d'histones dans le génome spermatique, 15% chez l'homme (Gatewood et al., 1987) et environ 4% chez la souris (Pittoggi et al., 1999). Une analyse par microscopie électronique de la chromatine des spermatozoïdes humains a montré la présence de structures globulaires, qui correspondent en taille à des nucléosomes (Gusse and Chevaillier, 1980). Gatewood et ses collaborateurs ont démontré que les histones et les protamines forment des structures bien distinctes, et qu'elles sont spécifiques de certaines séquences (Gatewood et al., 1987). Ils ont également montré par

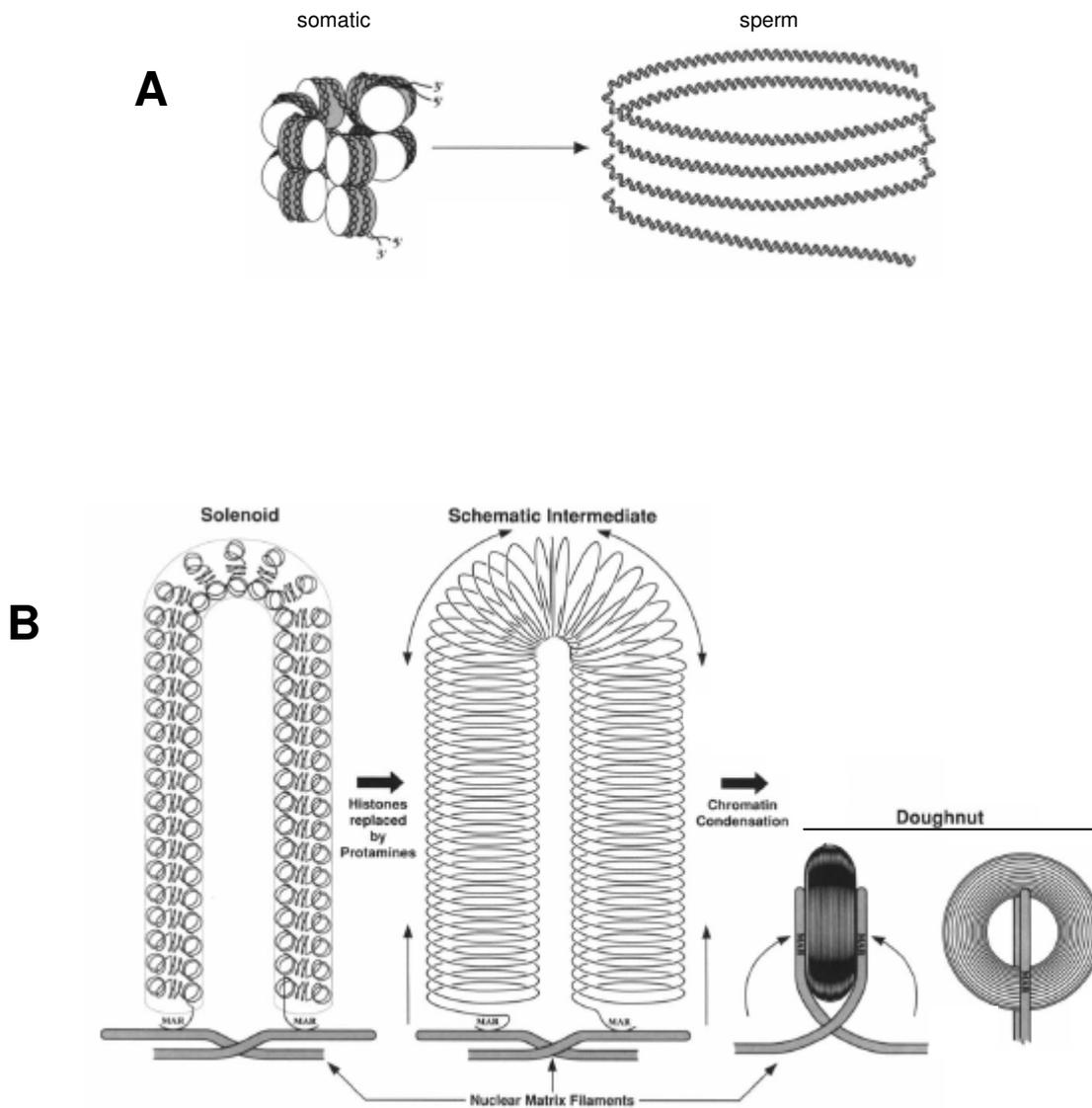


Figure 21. Modèle d'organisation de la chromatine spermatique

A. Modèle de remplacement des protamines dans la chromatine spermatique. Deux tours d'ADN dans le modèle solénoïde somatique aboutissent à la formation de quatre tours spiralés après incorporation des protamines.

B. Modèle d'organisation en doughnut de la chromatine dans la chromatine spermatique. Une boucle d'ADN en conformation solénoïde dans les cellules somatiques passe par un état intermédiaire après remplacement des histones par les protamines (voir A). Chaque tour d'ADN dans la spirale va alors interagir, permettant de compacter l'ADN en une structure de beignet.

(D'après Wald, 1993)

chromatographie liquide à haute performance la présence dans les spermatozoïdes humains d'histones canoniques (H2A, H4, H3, H2B) mais également de nombreux variants d'histones (H2A.X, H2A.Z, H3.3) (Gatewood et al., 1990).

La composition en histones ou en protamines de certains loci est finement régulée. En effet, il a été montré que les gènes exprimés durant la spermatogénèse ou l'embryogenèse étaient plutôt associés à des structures nucléosomales tandis que les gènes réprimés durant cette période étaient plutôt associés aux protamines (Figure 22). Ainsi, les gènes codants pour la globine γ et ϵ , exprimés au début du développement embryonnaire, sont structurés en nucléosomes tandis que les gènes codants pour les formes β et δ de la globine, exprimés à l'âge adulte et réprimés pendant le développement embryonnaire, sont plutôt associés aux protamines (Gardiner-Garden et al., 1998).

De même, d'autres travaux ont montré que les gènes des protamines et des protéines de transition, regroupés en clusters, étaient enrichis en histones (Wykes and Krawetz, 2003). Ces travaux ont également permis de démontrer l'enrichissement en histones du gène soumis à l'empreinte *Igf2* et des séquences répétitives télomériques ainsi que l'enrichissement en protamines des gènes de la globine β et des séquences *Alu*, tandis que le gène de l'acrosine et les séquences centromériques contiennent un mélange des deux.

La persistance de ces nucléosomes sur certaines régions du génome pourrait avoir plusieurs significations.

Le fait que certaines histones subsistent sur les gènes nécessaires à la spermatogénèse pourrait être la conséquence du déroulement de la spermatogénèse. En effet, la présence d'histones sur les gènes des protéines de transition ou des protamines pourrait correspondre à la nécessité de maintenir une structure chromatinienne ouverte, favorable à la transcription, quand les autres régions commencent à être réorganisées par les protéines de transition. Le remplacement n'ayant pas commencé en même temps que la vague générale, il ne peut ensuite plus se faire.

Par ailleurs, la persistance d'une structure nucléosomale sur certaines régions du génome pourrait constituer une marque épigénétique essentielle pour le développement du futur embryon. On peut ainsi supposer que certaines régions ont besoin d'être plus rapidement accessibles aux facteurs de transcription dans les premières étapes du développement

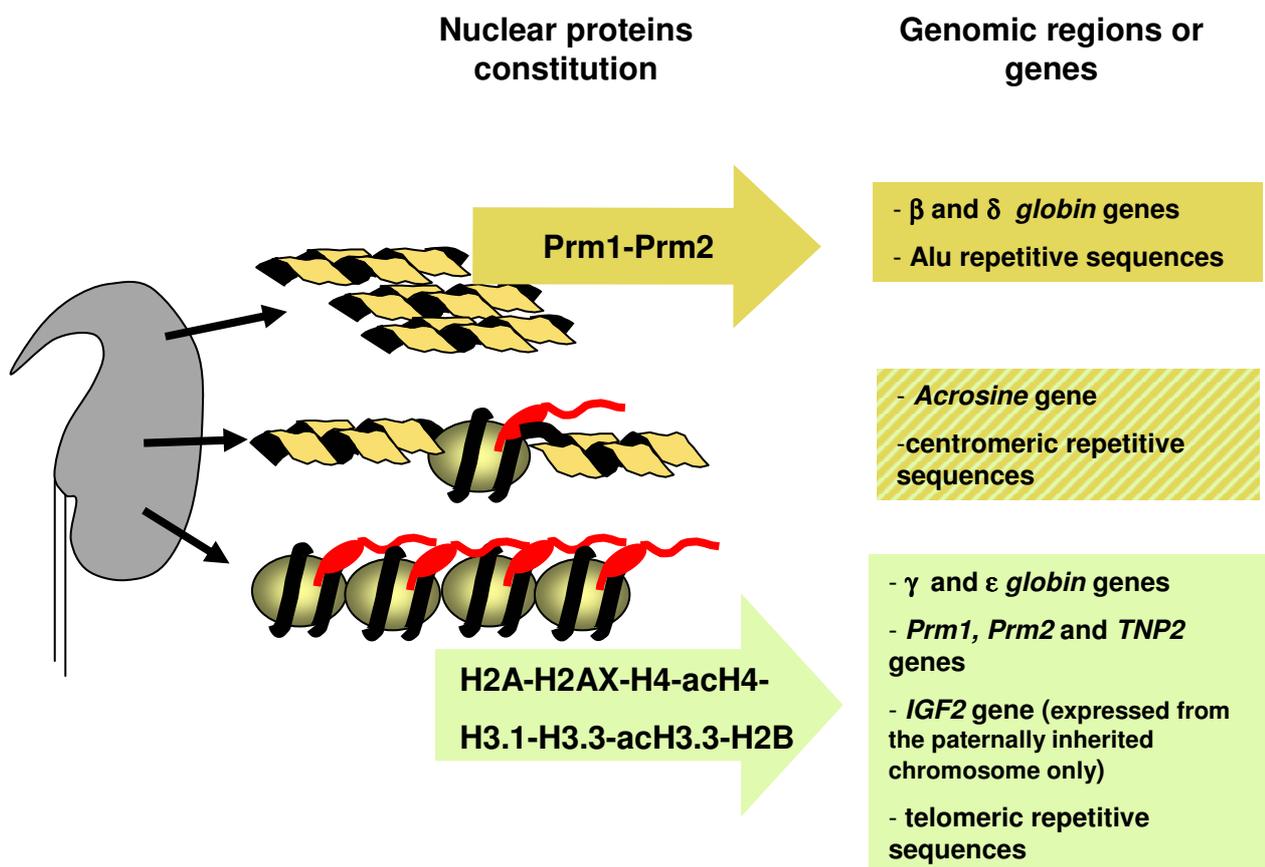


Figure 22. Représentation schématique de l'hétérogénéité structurale du noyau spermatique

La chromatine du noyau spermatique est organisée différemment selon les gènes et les régions du génomes. Certaines parties sont spécifiquement associés aux protamines ou aux nucléosomes contenant des histones canoniques ou des variants. En revanche, le gène de l'acrosine ainsi que les séquences répétitives centromériques sont associés à la fois avec des protamines et des nucléosomes.

(D'après Rousseaux et al, 2005)

embryonnaire (comme les gènes de la globine γ et ϵ par exemple). Cette réorganisation spécifique pourrait également servir à signaler, en plus de la méthylation de l'ADN, les gènes soumis à l'empreinte, qui doivent être activés ou éteints dans le futur individu (comme par exemple H19 qui est exprimé à partir de l'allèle maternel contrairement à Igf2, exprimé à partir de l'allèle paternel).

A l'issue de la spermatogénèse et malgré l'incorporation massive des protamines, le noyau spermatique maintient une certaine hétérogénéité de structure. La persistance de nucléosomes ainsi que de nombreux variants d'histones associés à des régions spécifiques du génome est maintenant démontrée. En effet, le variant CENP-A, spécifique des centromères, resterait présent au sein des spermatozoïdes chez le taureau (Palmer et al., 1990). De même, le variant de H2B, H2BFWT, serait spécifiquement associé aux télomères dans les spermatozoïdes humains matures (Churikov et al., 2004; Gineitis et al., 2000).

Malgré ces quelques données, beaucoup de questions restent actuellement en suspens. En effet, cette hétérogénéité de structure serait-elle associée à des modifications post-traductionnelles d'histones spécifiques ? Existerait-il d'autres variants ou d'autres protéines non histones au sein des spermatozoïdes ?

Toutes ces questions mènent à un champ d'investigation très large, en plein essor actuellement, et ont constitué la problématique de ma thèse.

RESULTATS

Au cours de la spermiogénèse, le génome des cellules germinales mâles va subir une grande réorganisation, passant d'un état de type somatique organisé en nucléosomes à une structure totalement inédite, l'ADN étant très fortement condensé par la présence des protamines.

Bien que la majorité des histones soient remplacées par les protamines, il subsiste une proportion non négligeable d'histones dans le génome spermatique, 15% chez l'homme (Gatewood et al., 1987) et environ 4% chez la souris (Pittoggi et al., 1999), disposés de manière non aléatoire. En effet, il a été montré que les gènes exprimés durant la spermatogénèse ou l'embryogenèse étaient plutôt associés à des structures nucléosomales tandis que les gènes réprimés durant cette période étaient plutôt associés aux protamines. D'autres travaux chez l'homme montrent la présence d'un variant de H2B spécifique du sperme qui s'associe préférentiellement aux télomères (Churikov et al., 2004; Gineitis et al., 2000).

Cette hétérogénéité de la chromatine au sein du génome des spermatozoïdes suggère l'existence d'une reprogrammation spécifique du génome mâle, permettant d'établir une information épigénétique associée à ces cellules. En effet, la persistance de la chromatine de certaines régions du génome à rester organisées en nucléosomes pourrait être essentielle pour le développement du futur embryon. Mais la mise en évidence de cette information épigénétique ainsi que sa transmission reste encore à ce jour inconnue.

Au cours de ma thèse, je me suis attachée à essayer de déterminer quelles étaient les protéines nécessaires à la mise en place de cette information épigénétique au cours de la spermatogénèse ainsi que les mécanismes mis en jeu.

A. REORGANISATION FONCTIONNELLE DU GENOME MALE PAR DE NOUVEAUX VARIANTS D'HISTONES AU COURS DE LA SPERMATOGENESE

I. Identification et caractérisation fonctionnelle de nouveaux variants d'histones

L'étude de ces nouveaux variants a été le thème d'étude central de ma thèse. J'ai ainsi réalisé la majeure partie des travaux portant sur l'étude de ces variants. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication signée en co-premier auteur dans *Journal of Cell Biology* en Janvier 2007.

1. Analyse protéomique des protéines des spermatides condensées

Afin de trouver de nouvelles protéines impliquées dans la réorganisation du génome au cours de la spermatogénèse, une première approche a consisté à effectuer une analyse protéomique des protéines présentes dans les spermatides condensées, c'est-à-dire dans le stade le plus tardif de la spermiogénèse.

Les protéines basiques de noyaux de cellules germinales à différents stades de la spermiogénèse ont été isolées par une technique d'extraction par l'acide. En effet, les protéines qui organisent le génome sont des protéines très basiques car elles doivent pouvoir s'associer à l'ADN chargé négativement, et sont donc solubles dans un extrait acide. Ces protéines extraites ont tout d'abord été analysées sur gel protéique coloré au bleu de Coomassie (figure article 4 A.). On remarque que le profil global des protéines basiques change au cours de la spermiogénèse, avec une diminution de la quantité d'histones et un enrichissement en protéines de transition 1 et 2. Une analyse par spectrométrie de masse des protéines présentes dans l'extrait des spermatides condensées de stade 12 à 16 a alors été réalisée. Cette approche protéomique nous a permis d'identifier un grand nombre de protéines. Nous avons comme attendu retrouvé les histones classiques H2A et H2B, ainsi que les protéines de transition et les protamines. Nous avons également retrouvé des variants d'histones, ubiquitaires ou spécifiques du testicule, comme H3t ou H1t.

Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence trois nouvelles protéines histones, que nous avons nommé H2A-Like 1 (H2AL1 ; Q9DAD9), H2A-like 2 (H2AL2 ; Q9CQ70) et H2B-like 1 (H2BL1 ; Q9D9Z7) en raison de leur forte homologie à H2A et H2B (table I article). Deux autres variants, nommés H2A-Like 3 (H2AL3 ; Q9CR04) et H2B-Like 2 (H2BL2 ; Q9DAB5) ont été identifiés par d'autres approches (Paragraphe *Résultats B. III.*).

Nous avons ainsi pu caractériser au sein de spermatides condensées la présence de nouvelles protéines histones encore jamais identifiées.

2. Profil d'expression de ces variants

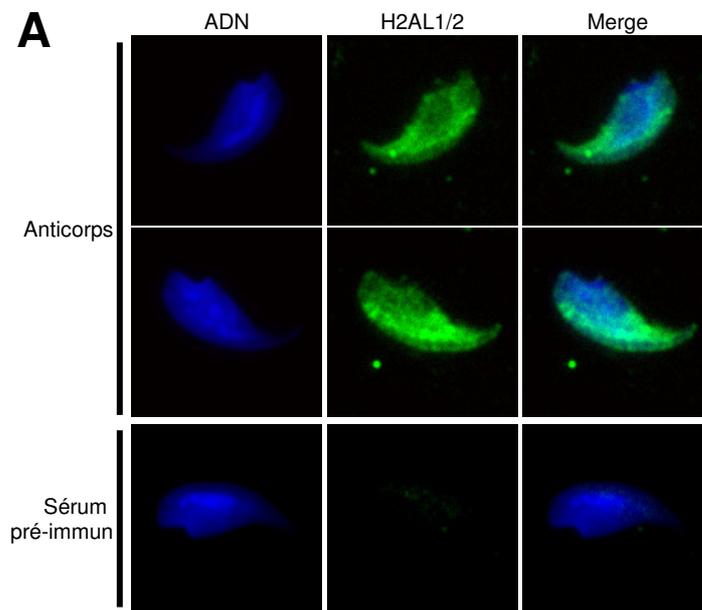
L'expression des gènes codant pour ces protéines a été analysée par RT-PCR sur différents tissus. La figure 4B de l'article montre que ces gènes sont exprimés uniquement dans le testicule, tout comme le variant H3 spécifique du testicule, H3t.

Afin de tester l'expression post-méiotique de ces variants, une RT-qPCR a été effectuée sur des cellules germinales à différents stades de maturation (figure article 4C). Les ARNm de ces nouveaux variants sont enrichis dans les spermatides rondes et allongées par rapport aux spermatocytes (excepté H2BL2 qui est détecté en très faible quantité de manière identique dans tous les stades).

L'analyse de l'expression des protéines a été analysée par western blot. Des anticorps dirigés contre ces variants ont été produits et sont bien spécifiques de chaque protéine, excepté pour les protéines H2AL1 et H2AL2. L'anticorps reconnaît les deux protéines et sera référencé H2AL1/2 par la suite.

Les variants H2AL1/2 et H2BL1 sont enrichis dans les spermatides condensées par rapport à un extrait testiculaire total (figure article 4D) et s'accumulent dans les stades tardifs (figure article 4.). Bien que présent dans l'extrait testiculaire total, le variant H2BL2 n'est pas présent dans les spermatides condensées. H2AL3 n'est lui détecté dans aucun des extraits.

Une immunofluorescence sur des spermatozoïdes épидидymaires montre la persistance de H2AL1/2 dans ces structures (Figure 23 A).



B

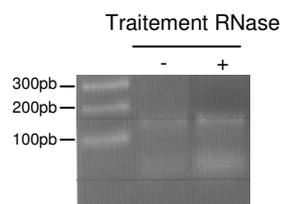


Figure 23. Caractérisation des nouveaux variants d'histones

A. Localisation des variants H2AL1/2 dans les spermatozoïdes. La présence de H2AL1/2 a été analysée par immunofluorescence sur des spermatozoïdes matures et est clairement détectée. L'ADN des cellules a été colorée à l'aide du colorant Hoescht et les images « Merge » représente la superposition du marquage de l'ADN et des variants H2AL1/2. L'utilisation du sérum pré-immun montre la spécificité de l'anticorps.

B. Traitement à la RNase de la fraction solubilisée par la nucléase micrococcalle (SNmnase). La petite structure est toujours présente après le traitement, ce qui prouve qu'il s'agit bien d'un fragment d'ADN.

Ainsi, ces nouveaux variants s'accumulent dans les stades tardifs de la spermatogénèse, au moment où les autres histones sont elles enlevées pour être remplacées par les protéines de transition et les protamines, et restent présents dans le spermatozoïde mature.

3. Nouvelles structures nucléoprotéiques dans les spermatides condensées

Etant donné que ces variants d'histones sont présents dans les stades tardifs de la spermiogénèse, nous avons cherché à savoir par une approche biochimique s'ils pouvaient former des structures nucléosomales. Ainsi, les spermatides condensées de stade 12 à 16 ont été purifiées à partir d'extraits testiculaires totaux. L'extrême compaction de leur noyau rend leur ADN résistant à la digestion par la nucléase micrococcale, classiquement utilisée dans les cellules somatiques. Nous avons donc dû décondenser auparavant la chromatine à l'aide d'un tampon contenant des détergents, afin d'obtenir un surnageant nucléaire soluble (SNsol) et un culot contenant la chromatine, qui a alors pu être soumis à une digestion ménagée par la nucléase micrococcale. La fraction solubilisée par la nucléase micrococcale (SNmnase) est ensuite séparée du culot insoluble (culot) par centrifugation.

L'analyse par western blot de chaque fraction montre que les variants d'histones sont présents dans la fraction solubilisée par la nucléase micrococcale (Supplementary figure 2 article), suggérant leur capacité à former des nucléosomes. Le fait qu'ils soient également présents dans le surnageant nucléaire soluble peut s'expliquer de deux façons : soit ils sont présents dans le noyau à l'état non associé à la chromatine, soit le tampon contenant des détergents dissocie de la chromatine une partie de ces histones.

L'analyse de l'ADN présent dans la fraction solubilisée par la nucléase micrococcale montre la présence de deux fragments d'ADN résistants à la nucléase micrococcale (Figure article 3B). Le plus grand fragment d'ADN étant à environ 150pb, il pourrait correspondre à l'ADN présent sur un mononucléosome de type somatique. Le deuxième fragment d'ADN est lui beaucoup plus petit, d'environ 60pb, et est beaucoup plus sensible à une action prolongée de la nucléase micrococcale.

Afin de vérifier que ce petit fragment n'est pas de l'ARN, nous l'avons soumis à un traitement à la RNase A. L'analyse sur gel d'agarose montre que ce petit fragment est toujours présent, confirmant qu'il s'agit bien d'un fragment d'ADN (Figure 23 B). Ce petit fragment n'étant

pas produit dans les cellules somatiques soumises au même traitement, il pourrait bien correspondre à une structure nucléoprotéique spécifique des spermatides condensées.

Il existerait donc dans les spermatides condensées une fraction de la chromatine sous forme nucléosomale et une fraction sous la forme d'une structure nucléoprotéique inconnue non nucléosomale.

4. H2AL1/L2 sont présents au sein de nouvelles structures

Afin de définir si ces variants sont présents dans ces structures nucléosomales ou non nucléosomales, nous avons purifié ces deux structures sur gradient de sucrose, et leur contenu protéique a été analysé (Figure article 6A). Les histones conventionnelles cofractionnent seulement avec les nucléosomes conventionnels et ne sont pas détectées au sein des structures non nucléosomales. A l'opposé, H2AL1/L2 cofractionnent uniquement avec les structures non nucléosomales.

Afin d'être sûr que ces protéines sont bien associées aux fragments d'ADN et qu'elles ne comigrent pas avec l'ADN sous forme libre dans le gradient, nous avons purifié ces structures sur hydroxyapatite. C'est une résine échangeuse d'ions, qui présente une forte affinité pour l'ADN, ce qui permet sa capture (ainsi que les protéines associées) et ensuite son élution par l'utilisation de tampon phosphate (Rickwood and MacGillivray, 1975).

H2AL1/2 ainsi que TH2B sont éluées avec le petit fragment d'ADN (figure article 6,B.), démontrant qu'ils forment bien une structure particulière au sein des spermatides condensées.

5. H2AL1/L2 forment avec TH2B 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. Les figures 7 A. et B. de l'article montrent que H2AL1/L2 sont bien incorporés au sein de nucléosomes ex-vivo. De plus, la formation de nucléosomes contenant les variants H2AL1 ou H2AL2 serait facilitée en présence du variant TH2B, contrairement à H2B (Figure article 7A). Les nucléosomes ainsi formés sont de plus moins stables que des nucléosomes conventionnels (Figure article 7C).

Ainsi, exprimés dans des cellules somatiques, ces variants d'histones sont capables de former des nucléosomes. En revanche, dans les spermatides condensées, ils sont retrouvés dans des structures nucléoprotéiques spécifiques.

6. H2AL1/L2 colocalise avec l'hétérochromatine péricentromérique

Nous avons alors voulu savoir si ces structures étaient présentes dans des régions remarquables du génome. La distribution de l'ADN de chaque structure ainsi été analysée par FISH sur des cellules somatiques en métaphases (Figure article 3E) ou sur des cellules germinales (Figure article 3F). La figure montre que la sonde correspondant au petit fragment d'ADN marque une région qui apparaît très intensément marquée par le colorant DAPI. Le fragment d'ADN issu de la structure nucléosomale classique montre le même profil de localisation, alors que la sonde contrôle représentant le génome total marque elle la totalité du chromosome. Cette région très intensément marquée au DAPI a été identifiée comme étant les satellites majeurs, une région d'hétérochromatine constitutive péricentromérique. L'utilisation d'une sonde contrôle reconnaissant ces satellites majeurs montre bien une colocalisation avec nos fragments.

La distribution d'H2AL1/L2 dans les cellules germinales, analysée par immunofluorescence (Figure article 5A.), indique que ces variants sont incorporés dans les stades tardifs, après la vague d'acétylation, mais avant l'apparition des protamines. De plus, les images confirment bien la distribution hétérogène d'H2AL1/L2, s'accumulant spécifiquement au niveau de l'hétérochromatine constitutive péricentromérique.

Ainsi, les structures nucléoprotéiques organisent spécifiquement l'hétérochromatine péricentromérique.

7. Conclusion et présentation de l'article associé

L'ensemble de ces travaux effectué sur ces nouveaux variants d'histones a permis de démontrer, dans les stades tardifs de la spermiogénèse, leur incorporation au sein de structures nucléoprotéiques particulières au niveau des zones d'hétérochromatine péricentromérique.

Cette réorganisation différentielle de cette région, alors que le reste du génome est organisé en protamine, lui confère un état épigénétique particulier, dont la fonction reste à déterminer.

L'ensemble de ce travail a été publié dans *Journal of Cell Biology* en Janvier 2007. Il sera présenté page suivante.

Mon implication personnelle a porté sur la caractérisation du devenir de la chromatine péricentromérique dans les stades tardifs de la spermiogenèse (J. Govin ayant lui étudié les modifications de l'hétérochromatine péricentrique en début de spermiogenèse, que je n'ai pas présentées ici. Voir Figures 1 et 2 de l'article) : étude des nouveaux variants d'histones, purification et caractérisation des nouvelles structures nucléoprotéiques qu'ils forment au sein de l'hétérochromatine péricentromérique. J'ai également participé à la rédaction du manuscrit.

Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis

Jérôme Govin,^{1,2} Emmanuelle Escoffier,^{1,2} Sophie Rousseaux,^{1,2} Lauriane Kuhn,^{2,3,4} Myriam Ferro,^{2,3,4} Julien Thévenon,^{1,2} Raffaella Catena,⁵ Irwin Davidson,⁵ Jérôme Garin,^{3,4} Saadi Khochbin,^{1,2} and Cécile Caron^{1,2}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U309, Institut Albert Bonniot, F-38700 Grenoble, France

²Université Joseph Fourier, F-38700 Grenoble, France

³Commissariat à l'Énergie Atomique/Grenoble, F-38054 Grenoble, France

⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, ERM0201, F-38054 Grenoble, France

⁵Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire/Centre National de la Recherche Scientifique/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Université Louis Pasteur, F-67404 Illkirch, France

During male germ cell postmeiotic maturation, dramatic chromatin reorganization occurs, which is driven by completely unknown mechanisms. For the first time, we describe a specific reprogramming of mouse pericentric heterochromatin. 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 postmeiotic maturation of male haploid germ cells, or spermiogenesis, the DNA is repackaged 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 restructured 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 intraprotein cross-links (Oliva and Dixon, 1990; Lewis et al., 2003b).

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 (Lewis et al., 2003a; Govin et al., 2004; Kimmins and Sassone-Corsi, 2005), some of them presenting a heterogeneous distribution within the spermatids or mature sperm nucleus (Zalensky et al., 2002; Martianov et al., 2005). In addition, heterochromatin regions seem to maintain a distinct organization during spermiogenesis, as telomeres were shown to be enriched in somatic-type core histones and H2B variants (Gineitis et al., 2000; Zalensky et al., 2002; Wykes and Krawetz, 2003; Churikov et al., 2004), 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)

J. Govin and E. Escoffier contributed equally to this paper.

Correspondence to Cécile Caron: Cecile.Caron@ujf-grenoble.fr; or Saadi Khochbin: Khochbin@ujf-grenoble.fr

Abbreviations used in this paper: IF, immunofluorescence; IH, immunohistochemistry; MS, mass spectrometry; qPCR, quantitative PCR.

The online version of this article contains supplemental material.

and its association with nonhistone proteins including the HPI 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 harbors somatic features (O’Carroll et al., 2000; Peters et al., 2001). However, in mouse round spermatids, it undergoes a very unique reorganization characterized 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 nucleoprotein 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 reorganize the major satellite DNA in condensed spermatids. Altogether, these data highlight specific processes activated after meiosis and establish a differential organization of pericentric heterochromatin during mouse spermiogenesis.

Results

Pericentric heterochromatin acetylation during postmeiotic reorganization of the male genome

During postmeiotic chromatin reorganization in male germ cells, a global hyperacetylation of histones occurs, which precedes their removal (Hazzouri et al., 2000). To better characterize these events, the kinetics of the core histones’ hyperacetylation and disappearance has been followed by immunofluorescence (IF) on microdissected 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. 1 A). 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. 1 A, 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

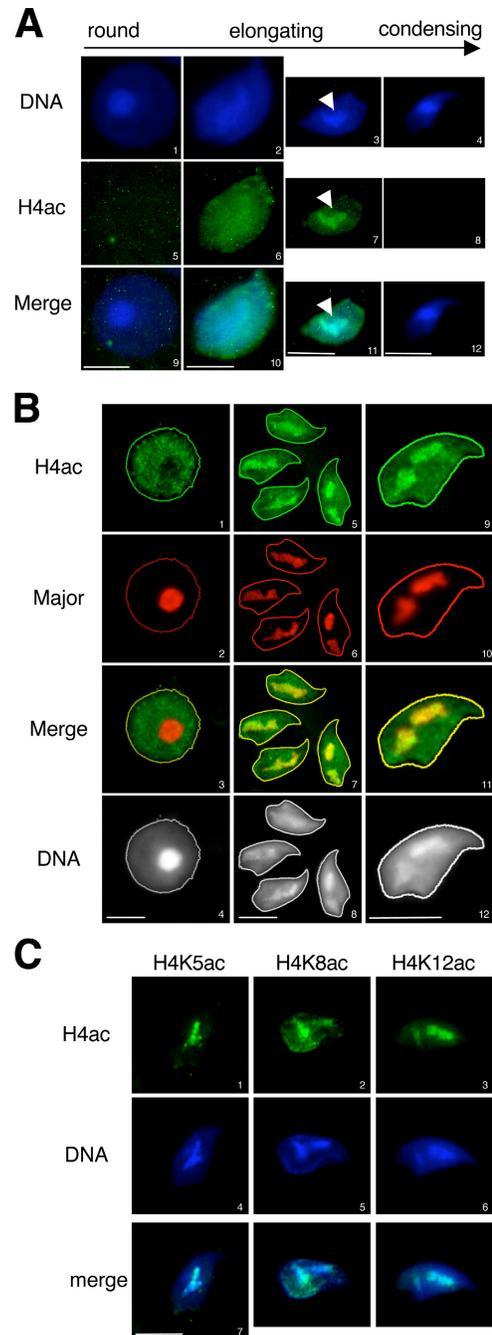


Figure 1. Pericentric chromatin becomes acetylated in elongating spermatids. (A) H4 acetylation pattern in germ cells was analyzed by IF on spermatids at the indicated stages of maturation, using an anti-tetra-acetylated H4 antibody (H4ac). DNA was counterstained with DAPI. Arrows indicate the redistribution of the acetylated signal in an intensely DAPI-stained region in elongating spermatids. (B) Immuno-FISH assays, detecting H4 acetylation (H4ac) by IF and major satellites by FISH, were performed on round (1–4) and elongating (5–12) spermatids. Acquisition of the H4 acetylation staining has been enhanced to increase the signal intensity, compared with A, to show the hypoacetylation state of pericentric heterochromatin in round spermatids. (C) The acetylation state of lysines 5, 8, or 12 of histone H4 (H4K5ac, H4K8ac, and H4K12ac, respectively) were analyzed in elongating spermatids by IF as in A using the corresponding antibodies. Bars, 5 μ m.

correspond to a region where the genome is differentially reorganized. Because of its intense DAPI staining, we hypothesized that this domain could correspond to the A/T-rich pericentric constitutive heterochromatin, composed of the mouse major satellites repeats. To investigate this point, immuno-FISH assays were performed, where acetylated H4 was first detected by IF and the major satellites were then localized by FISH on the same germ cells. As expected, the major satellites were detected in the identifiable chromocenter of round spermatids (Fig. 1 B, 2). The DAPI-dense regions of step 9–10 elongating spermatids were also completely stained by the major satellites probes (Fig. 1 B, 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 colocalizes with the round chromocenter. In elongating spermatids, it becomes enriched in acetylated histone H4 while undergoing decompaction and spreading within the nucleus (Fig. 1 B, compare 1 to 5 and 9; note that the acquisition of the H4 acetylation signal in round spermatids was enhanced compared with that in Fig. 1 A to give better evidence of the unacetylated state of pericentric heterochromatin in round spermatids compared with 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 (unpublished data). 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. 1 C).

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

This unusual accumulation of acetylated histones 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 β was present in the chromocenter of round spermatids but disappeared at later stages, when H4 acetylation accumulated (Fig. 2 A), showing a tight relationship between the presence of acetylated H4 in pericentric heterochromatin and the removal of HP1 β 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. 2 B). 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, revealed by Alexa 546 and Alexa 488 fluorochromes, respectively, were quantified: for each detection, a region containing values >50% of maximal fluorescence was delimited (Fig. 2 C, red and green borders, panels 4–8), and a quantification of fluorescence was shown along an axis and reported

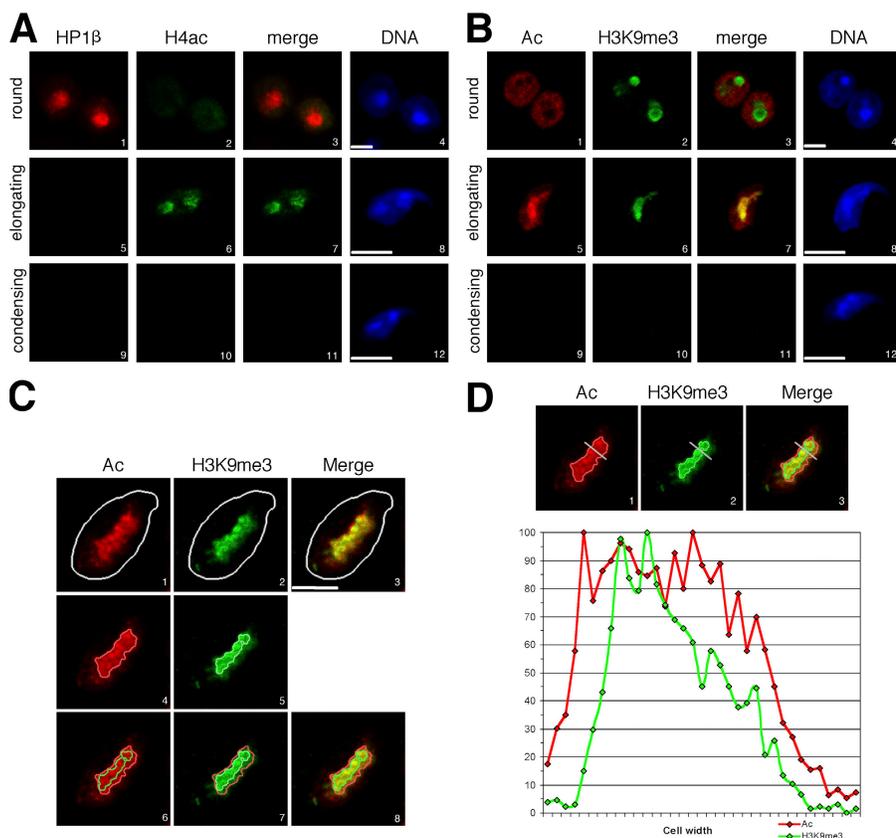


Figure 2. A restricted domain of pericentric chromatin harbors both euchromatic and heterochromatic marks in elongating spermatids. (A) HP1 β (red) and tetra-acetylated H4 (H4ac; green) were analyzed by IF in round (1–4), elongating (5–8), and condensing (9–12) spermatids. Merge corresponds to HP1 β and H4ac codetection. Bars, 5 μ m. (B) Acetylation of histones (Ac; red) and trimethylation of H3K9 (H3K9me3; green) were analyzed by IF in round (1–4), elongating (5–8), and condensing (9–12) spermatids. Merge corresponds to H4ac and H3K9me3 codetection. Bars, 5 μ m. (C and 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 >50% of maximal fluorescence was delimited (C, 4–8; red and green borders for Ac and H3K9me3 signals, respectively), and quantification performed along the gray axis (D, 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. Bar, 2.5 μ m.

on a diagram (Fig. 2 D). Similar experiments were performed by reversing the fluorochromes (H4Ac signal in green and H3K9me3 signal in red), so that artifacts due to differential bleaching or sensitivity could be ruled out (Fig. S1, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200604141/DC1>). It shows that the signals for H4 acetylation and H3K9 trimethylation actually do not strictly colocalize (Fig. 2 D and Fig. S1 B, diagrams). This observation suggests the existence within the analyzed domain of subregions where nucleosomes harbor either one or the other modification, but 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 behavior of pericentric heterochromatin during postmeiotic 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 harbor specific chromatin features at later stages of spermiogenesis, after disappearance of acetylated H4 and trimethylated H3K9 in condensing spermatids (Fig. 2, A and B, 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. 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 decondense them in a detergent-containing buffer, to obtain a soluble nuclear extract, and a chromatin-containing pellet, which was then submitted to MNase fractionation (Fig. S2 A, protocol 1, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200604141/DC1>). The MNase-solubilized fraction was then separated by centrifugation from an insoluble pellet.

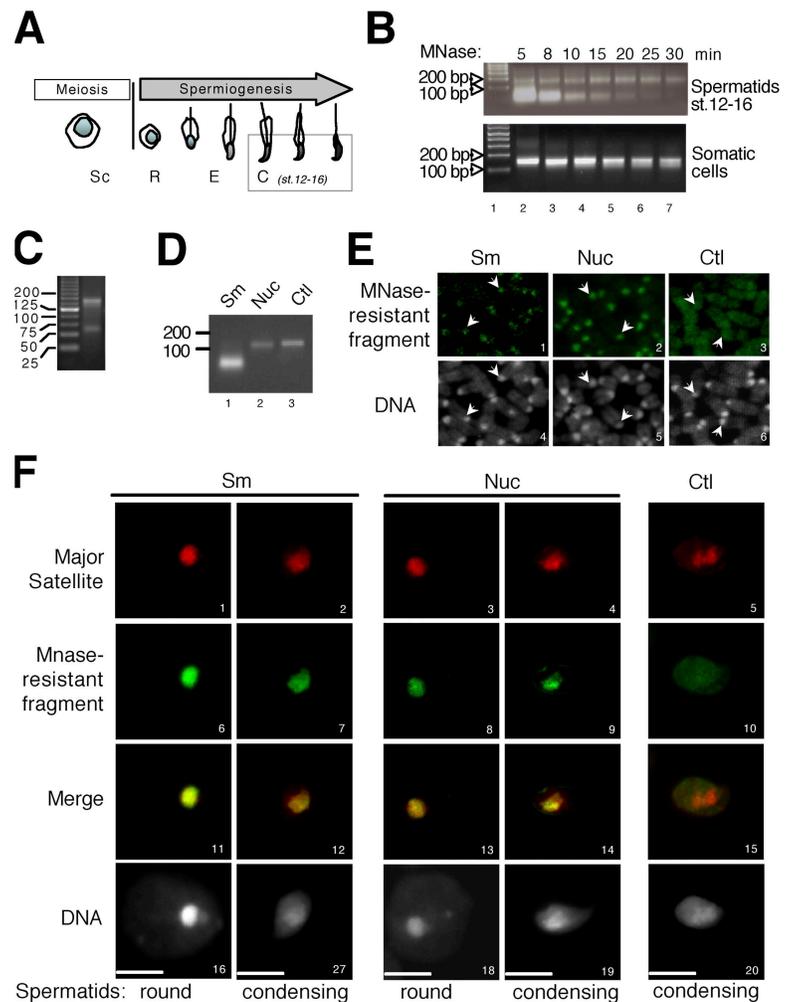


Figure 3. Two MNase-resistant structures are present in condensing spermatids and mainly correspond to pericentric heterochromatin. (A) Schematic representation of germ cells at different stages of spermatogenesis (Sc, spermatocytes; R, round spermatids; E, elongating spermatids; C, condensing and condensed spermatids [steps 12–16]) used in MNase-digestion assays. (B) Chromatin of purified step 12–16 spermatids (top) or somatic cells (bottom) were submitted to MNase digestion during the indicated times. The DNA fragments present in MNase-resistant nucleoprotein structures were purified and analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel. Lane 1 corresponds to the size markers. (C) MNase-resistant DNA fragments obtained as in B, after 15 min 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 after 8 and 30 min, respectively, of MNase digestion of condensing spermatids chromatin were purified 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 and F) FISH using probes described in C (green) were performed on mouse metaphase chromosomes (E) and on male germ cells in codetection with a major satellite probe (F, red). DNA was counterstained with DAPI. Arrows in E indicate centric and pericentric chromatin domains. Bars, 5 μ m.

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, ~ 150 bp, indicating that at least part of the nucleosomal chromatin of condensing spermatids was indeed obtained with this procedure (Fig. 3 B). Accordingly, core histones were abundantly released by MNase digestion (Fig. S2 B, H2A, H2B, and H4).

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. 3 B). 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 ~ 60 bp (Fig. 3 C). It is of note that this smaller DNA fragment was not produced

from somatic cells (Fig. 3 B, bottom) or from germ cells at earlier stages of spermiogenesis (not depicted), 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, and on mouse spermatogenic cells. Interestingly, both fragments detected the pericentric regions and perfectly colocalized with the major satellite regions both on metaphase chromosomes and in spermatogenic cells (Fig. 3, E and F; and Fig. S4 A, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200604141/DC1>).

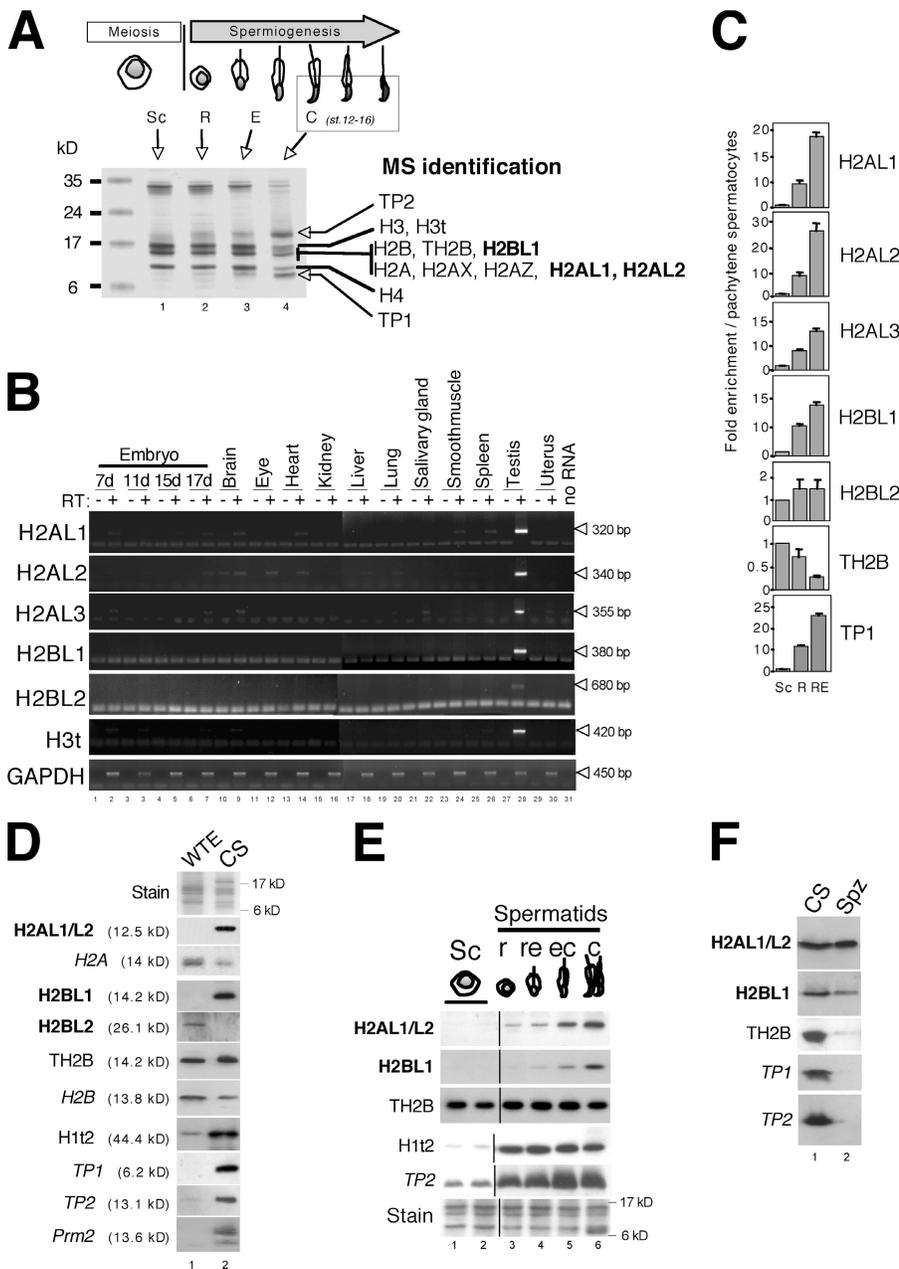


Figure 4. Identification of three new testis-specific histone variants specifically expressed during late spermiogenesis. (A) Acid-soluble extracts were prepared from male germ cells purified according to their maturation stages (Sc, spermatocytes; R, or round; E, elongating and condensing; C, condensing and condensed 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 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 with the spermatocytes was evaluated by qPCR using the appropriate primers. The mean value of at least two independent assays is presented. Error bars indicate mean \pm SD. (D, E, and F) Western blots using the indicated antibodies were performed on various testis or germ cell extracts. Coomassie staining of the extracts is also shown (Stain panels). (D) Whole testis extract (WTE) and step 12–16 spermatid nuclei. CS, condensing/condensed spermatids. 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 depicted). (E) Germ cells fractionated according to their maturation stages by sedimentation on BSA gradient. (F) Step 12–16 spermatid nuclei (CS) and mature epididymal sperm heads (Spz).

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. 3, E and F; and Fig. S4 A). The quantification of the fluorescence signals given by each probe show that ~72% of the nucleosomal fragment and 51% of the small fragment correspond to major satellite sequences (Fig. S4 B). 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 spermatid-specific proteins, which remained to be identified.

Identification of three new histone variants accumulating during late spermiogenesis

To find new proteins involved in the organization 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 with that of germ cells at earlier stages, with a decrease in histone content, and the appearance of two bands ~8 and 18 kD, corresponding to TP1 and TP2, respectively (Fig. 4 A). The proteins present in this particular cell fraction were identified by mass spectrometry (MS). As expected, transition proteins TP1 and 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 (available from GenBank/EMBL/DDBJ under accession no. XP_356549). The mRNA encoding the human orthologue was previously shown to be expressed in spermatocytes and spermatids (Govin et al., 2005).

More important, three new proteins containing substantial sequence similarity with the H2A or H2B histone folds were also identified. These new histone variants were named H2Alike1 (H2AL1; available from GenBank/EMBL/DDBJ

under accession no. AAH87913), H2Alike2 (H2AL2; accession no. NP_080903), and H2Blike1 (H2BL1; accession no. XP_127485), respectively. H2AL1 and H2AL2 are related proteins and show a better homology to each other than to H2A (Table I). H2BL1 is very similar to the bovine testis-specific H2B variant, known as SubH2Bv (Aul and Oko, 2001). In addition to the MS analysis, an *in silico* search in testis ESTs was performed and led to the identification of two supplementary H2A and H2B variants named H2AL3 (accession no. NP_080372) and H2BL2 (accession no. BAB24353), respectively (Table I).

The expression pattern of the genes encoding the five new histone variants was analyzed by RT-PCR on RNAs from various mice tissues. Fig. 4 B shows that, like the H3t variant, all the new histone variants are mainly expressed in the testis. To test whether all these new variants could be postmeiotically expressed, RT-qPCR (quantitative PCR) was performed on male germ cells fractionated according to their maturation stages on a BSA gradient. Fig. 4 C shows that H2AL1, H2AL2, H2AL3, 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, when mRNA was most abundant in meiotic cells. H2BL2 mRNA was detected at a very low level in meiotic, as well as postmeiotic, 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 (unpublished data). 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. 4 D and not depicted), and H2AL3 was not detected either in whole testis extracts or in germ cells (not depicted). These data suggest that these *in silico* identified histones probably do not play a role in the postmeiotic chromatin reorganization of male germ cells. In contrast, H2AL1/L2 and H2BL1 are strongly enriched in step 12–16 spermatids compared with the whole testis (Fig. 4 D) and accumulate during late

Table I. The new identified histone variants

Name	Accession no.	Length (aa)	% Similarities (% Identities)	Sequence
H2AL1	AAH87913	105	65 (30) with H2A; 83 (75) with H2AL2	MAKKMQRRRRQKRTRSQRGELPFSLVDRFLREFHSSRLSSALSFLTSLVLEYLTSNIL ELAGEVAQTTGRKRIAPEDVRLVQNNNEQLRQLFKPGGTSVNNEDDN
H2AL2	NP_080903	111	75 (41) with H2A; 83 (75) with H2AL1	MARKRQRRRRKRVTRSQR <u>AELQFPVSRVDRFLREGNYSRRSSAPVFLAGVLEYLT</u> SNILELAGEVAHTTGRKRIAPEHVCRVQNNNEQLHQLFKQGGTSVFPEPPDDN
H2AL3	NP_080372	117	60 (24) with H2A	MSEKKSQEKPCSDNNQIEDPSSRPEVQVPVNYVYRILQEEQYTPCIGSTTDFLL AMLDTYLDYILEVVGSEANINNQQNISQDRERQRDNDREPSRGFKNAPPSLFD EMPGPRRNG
H2BL1	XP_127485	123	72 (38) with H2B; 82 (58) with SubH2Bv	MAKPTFKRQCQYIKRHLRPLYRKHSRCSINLGHGNYSLYINRVLKEVVPNRGIS SYSVDIMNILINDIFERATEACQGMFLRKRCTLTIPGDIQQAVALHLLPKK <u>LATL</u> <u>AVTFGSKAVHRFIHS</u>
H2BL2	BAB24353	224	64 (31) with H2B	MASTTAMDVLEELSSDSSEKQVQPRKPEKAKREKDKPKKGGPEKAKKEKQEK AKPEKPKKKPEKEPEGEKLEKKPKDKREKAKPKKPEQENREQETPEGEKPE VQRRSLHQSIREDERRARLIRRRKNSFAIYFPKVLKNIHVGLSLSQRSVNIILDSFVK DMFERIASEASFLARQARNSTINSREIQTAIRLLPGLCCRRAVAEGTMAMVRYISNK

MS peptides are indicated by underlining.

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

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 for specific genome reorganizers in condensing spermatids.

H2AL1/L2 are present in the new nucleoprotein structures specifically organizing pericentric heterochromatin

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

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. 5, A and C). 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.

Because H2AL1/L2 were localized to pericentric heterochromatin, we checked for their presence in the major satellite-organizing nucleoprotein 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 (Fig. S2 B), suggesting an association of these histones with at least one of the two MNase-resistant nucleoprotein structures shown in Fig. 3 B. However, in contrast to the somatic core histones, a substantial amount of H2AL1/L2—and, to a lesser extent, TH2B—was also present in the soluble nuclear extract, suggesting that the decompacting buffer (Fig. S2 A, protocol 1) had partially disrupted the corresponding nucleoprotein structures (Fig. S2 B). We therefore set up another procedure using a less stringent decondensing buffer (Fig. S2 A, protocol 2), which prevented the partial disruption of histone variants (Fig. S2 C) but gave the same MNase-digestion pattern (Fig. S3 B and not depicted). To investigate the association of H2AL1/L2 within the nucleosomal or the smaller structure, the two structures

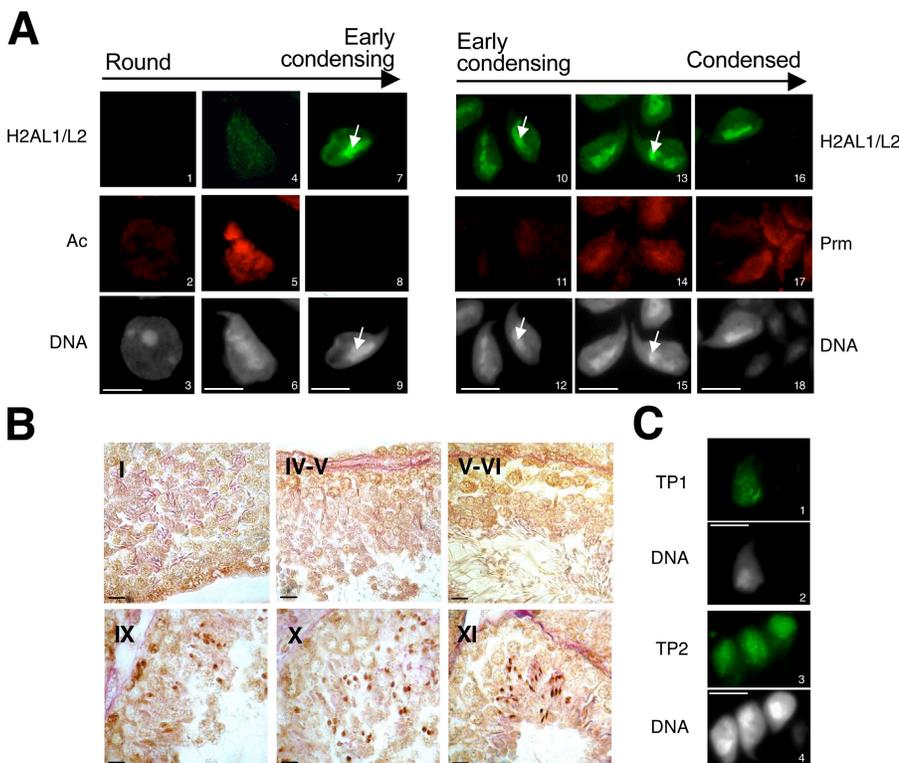
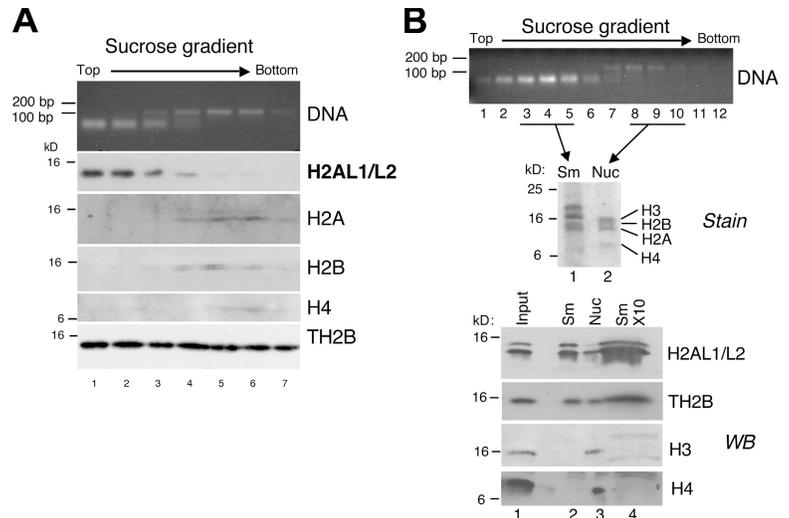


Figure 5. H2AL1/L2 are localized on pericentric heterochromatin in early condensing spermatids. (A) H2AL1/L2 were analyzed by IF on round (1–3), elongating (4–6), early condensing (7–12), and condensing and condensed (13–18) spermatids in codetection with acetylated histones (Ac; 1–9) or protamine (Prm; 10–18). The DNA panels correspond to the DAPI counterstaining. Arrows indicate the distribution of H2AL1/L2 on densely DAPI-stained regions. Bars, 5 μ m. (B) H2AL1/L2 were analyzed by IH 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 step 9, 10, and 11 spermatids). Bars, 20 μ m. (C) TP1 or TP2 were detected by IF on early condensing spermatids. DNA panels correspond to the DAPI counterstaining. Bars, 5 μ m.

Figure 6. In condensing spermatids, H2AL1/L2 are associated with the new nucleoprotein structure identified by MNase digestion. Nucleoprotein 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 analyzed, respectively, by electrophoresis on an agarose gel (DNA) and by Western blot using the appropriate antibodies. A and B correspond to two independent experiments. In B, fractions 3–5 (containing the small fragment [Sm]) and fractions 8–10 (containing the nucleosomal fragment [Nuc]) of the gradient were pooled for Western blots (bottom, lanes 2 and 3) and Coomassie staining (top, lanes 1 and 2) analyses, respectively. To confirm the absence of H3 and H4, the proteins from the small fragment fraction were also loaded in tenfold excess (Western blot [WB], lane 4).



(obtained using the less stringent protocol 2) were separated on a sucrose gradient, and the associated histones or histone variants were analyzed by Western blot (Fig. 6). As expected, the somatic-type histones H2A, H2B, H3, and H4 cofractionated with the larger fragment, confirming its nucleosomal nature (Fig. 6A, lanes 4–7; and Fig. 6B, stain [lane 2] and H3 and H4 [lane 3]). In contrast, the H2AL1/L2 variants specifically cofractionated with the small MNase-resistant DNA fragment, indicating that they could be major constituents of the new DNA packaging structure identified in condensing spermatids (Fig. 6A, H2AL1/L2 [lanes 1–4]; and Fig. 6B, V [lane 2]). Remarkably, neither H3 nor H4 could be detected in this structure, even when higher concentrations of proteins from these fractions were analyzed (Fig. 6B, stain [lane 1] and H3 and H4 [lanes 2 and 4]). Interestingly, TH2B cofractionated 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. 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 hydroxyapatite but also perfectly coeluted with the small DNA fragment (Fig. S3, B and C), showing that the small DNA 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 reorganize 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 coexpressed with H2A, H2AL1, and H2AL2 fused to GFP. H2B and TH2B were then immunoprecipitated using an anti-HA antibody, and the presence of H2A, H2AL1, and H2AL2 was 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 dimerization with TH2B compared with 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. To investigate this issue, the chromatin from cells expressing H2AL2/TH2B was digested by MNase, and the resulting oligonucleosomes were fractionated on a sucrose gradient. Fig. 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 with 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 nucleoprotein 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 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 trichostatin A 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 colocalize 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 organization 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. 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 dimerization. These unstable nucleosomes would then become targets for important structural reorganization in condensing spermatids, leading to the formation of the new structures evidenced here by MNase digestion. Several testis-specific factors could potentially play a

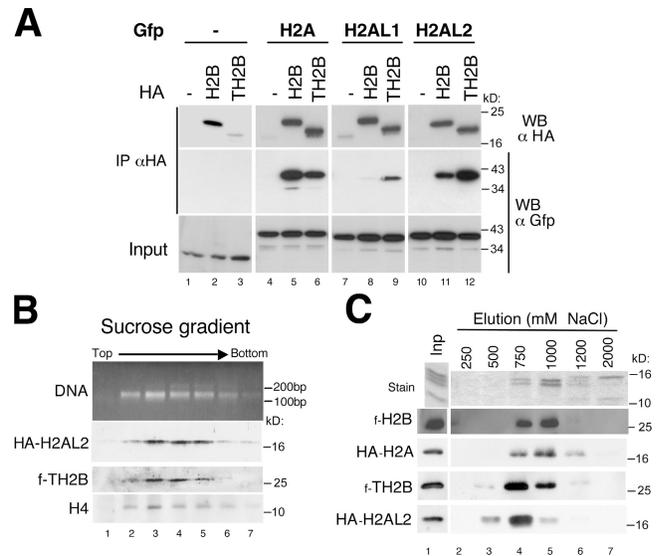


Figure 7. H2AL2–TH2B dimers can be assembled into nucleosomes when ectopically expressed in somatic cells. (A) Cos7 cells were cotransfected with vectors expressing GFP-fused H2A, H2AL1, H2AL2, or GFP alone as a control, and HA-tagged H2B or TH2B, or an empty vector (–). After immunoprecipitation (IP) performed on whole cell extracts using an anti-HA antibody, the immunoprecipitated proteins were denatured in Laemmli loading buffer and analyzed by Western blot (WB). A Western blot probed with an anti-HA antibody showed the efficiency of the immunoprecipitations (top). The coimmunoprecipitation of histones H2A, H2AL1, or H2AL2 was detected by Western blot with an anti-GFP antibody and compared with 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 analyzed, respectively, by electrophoresis on an agarose gel (DNA) 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 NaCl concentrations, endogenous somatic histones were detected on SDS-PAGE by Coomassie staining (top) and the ectopically expressed H2A/H2B or H2AL2/TH2B by Western blots.

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).

Although H2AL1/L2–TH2B dimers were incorporated into the nucleosomes in somatic cells, neither H3 nor H4 could be found in the H2AL1/L2–TH2B-containing structure in condensed spermatids. These observations are reminiscent of previous studies showing that a MNase digestion of chromatin from somatic cells could also produce subnucleosomal particles, some of which are composed of H2A–H2B dimers associated to a DNA fragment of \sim 50 bp (Nelson et al., 1977; Rill and Nelson, 1978; Nelson et al., 1982). Whether the H2AL1/L2–TH2B are the testis-specific counterparts of these somatic subnucleosomal particles or whether they associate with other sperm basic proteins to form completely new DNA packaging structures is to be addressed in the future.

In contrast to H2AL1/L2, the presence of TH2B is strongly reduced in epididymal spermatozoa (Fig. 4 F). However, longer Western blot exposures and MS analyses reveal that a small amount of TH2B remains (unpublished data), and an IF approach

also suggested that hTSH2B (the human homologue 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 synthesized 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 substantial 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 (Gineitis et al., 2000; Zalensky et al., 2002; Churikov et al., 2004). 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 postfertilization 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 specialized 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 (Santos et al., 2005; Martin et al., 2006). Therefore, it is tempting to speculate that the presence of H2AL1/L2 in a novel organizational 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 (Fig. S4 B). Characterization of these regions will constitute an additional, exciting challenge for the future, which 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 1:1,000 for Western blot and 1:250 for IF. Anti-H1t2 is described by Martjanov et al. (2005). Anti-H3 was provided by Abcam. Anti-TP1 and anti-TP2, anti-protamine, and anti-acetylated antibodies were provided by S. Kistler (University of South Carolina, Columbia, SC), R. Balhorn (Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, CA), and M. Yoshida (RIKEN, Wako, Japan), respectively. Other anti-histones antibodies were provided by Upstate Biotechnology 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 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 by Marushige and Marushige (1983). Pure fractions of epididymal sperm heads were obtained as follows. Epididymes were opened with a razor blade to free spermatozoa in a DME drop. The spermatozoa were then pelleted by centrifugation (4°C, 1,300 g, 10 min), resuspended in 1.5 ml DME containing 1 mg/ml salmon sperm DNA, sonicated at 250 J to break flagella, and centrifuged (1,300 g, 10 min, 4°C) on a discontinuous Percoll gradient (100%/70%/40%). The pellet, containing pure sperm heads, was washed once in DME/1 M NaCl and then in DME. The quality of each fraction or preparation was controlled by observation under a phase-contrast microscope.

IF and IH on germ cells

Microdissected tubules were prepared as described by 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-drying, incubating in 90% ethanol for 3 min, and air-drying again. Permeabilization of cells was allowed in 0.5% saponine, 0.25% Triton X-100, and 1 \times PBS for 15 min at room temperature. Nonspecific binding was blocked with 5% dried milk, 0.2% Tween 20, and 1 \times PBS for 30 min at room temperature. Primary antibodies were diluted in 1% dried milk, 0.2% Tween 20, and 1 \times PBS (dilutions are indicated in Antibodies section). Incubations were performed overnight at 4°C in a humidified chamber. Slides were then washed three times for 5 min in the antibodies dilution buffer. Secondary antibodies (anti-rabbit cross-linked to Alexa 488 and/or anti-mouse cross-linked to Alexa 546 [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 were mounted in MOWIOL. The protocol of IH experiments is described in detail by Faure et al. (2003).

FISH on germ cells

Slide preparation. The germinal cells from one mouse testis were obtained by dilacerating the seminiferous tubules in \sim 500 μ l DME/HamF12 medium (1:1), washed by centrifugation at 1,000 rpm for 10 min, resuspended, incubated for 10 min in 1% sodium citrate 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 min at room temperature and then spread onto dry, clean slides. The slides were air-dried and kept at room temperature for up to 1 wk, until FISH was done. For the immuno-FISH experiments, IF was performed as usual, the positions of the acquired IF images were recorded, and the slides were washed in 2 \times SSC at 37°C for 30 min, dehydrated by immersing in a series of ethanol (70%/90%/100%), and air-dried.

FISH procedure. The slides were denatured in 70% formamide/2 \times SSC for 12 min at 82°C (germinal cell preparation) or 1 min at 70°C (metaphase), dehydrated by passage through a cold ethanol series and air-dried (20 \times SSC: 175.3 g/l NaCl and 88.2 g/l sodium citrate in water, pH adjusted to 7 with NaOH). The DNA probes were labeled with either Biotin 11 dUTP or Digoxigenin dUTP by Nick Translation kit (Roche). A 10- μ l sample of hybridization mix (50% formamide, 20% dextran sulfate, 1 \times SSC, and 1 \times SSPE; 20 \times SSPE: 174 g/l NaCl, 27.6 g/l NaH₂PO₄H₂O, and 7.2 g/l EDTA, pH adjusted to 7.4), containing 50–100 ng of each of the labeled probes, 10 μ g sonicated salmon sperm DNA, and, when needed, 5–10 μ g mouse cot DNA, was heated at 72°C for 10 min, preincubated at 37°C for 30 min, and applied to each slide. The preparations were then placed in the dark, under sealed coverslips, for hybridization during 24–48 h in a moist chamber at 37°C. The coverslips were then carefully removed, and the slides were washed in 2 \times SSC for 2 min at 70°C and preincubated for 15 min in phosphate-buffered detergent (PBD; Qbiogene) at room temperature. The digoxigenin-labeled and biotin-labeled probes were detected, respectively, by a 15-min incubation at 37°C with anti-digoxigenin-rhodamine (1:100; Boehringer) or streptavidin-Alexa 488 (1:200; Invitrogen), diluted in PBD, and washed three times for 5 min in PBD at room temperature. The preparations were finally counterstained with 250 ng/ml DAPI in Vectashield (Vector Laboratories).

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 hybridized with 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 quantified using MetaMorph software (Molecular Devices). The “pericentric/whole chromosome” signal

ratio for the major satellite probe was considered 100% enrichment. For each of the other probes, this ratio (pericentric/whole chromosome) was also determined and normalized to the value obtained for a major satellite probe.

Microscope image acquisitions

A microscope (Axiophot; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) coupled to a -40°C chilled charge-coupled device camera (Hamamatsu) was used for 2D image acquisitions. Images were acquired at room temperature with a $63\times$ objective (1.4 NA). Confocal images were taken using a confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) and quantified using MetaMorph. The images presented in the figures were processed using Photoshop (Adobe).

MNase digestion of chromatin from step 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 μl buffer 1 (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, and 0.1% SDS) or buffer 2 (50 mM Tris, pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.1% DOC, 1 mM DTT, and antiprotease cocktail [Complete EDTA Free; Roche]). After centrifugation (20,000 g, 4°C , 10 min), the pellet was resuspended in 150 μl 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 $\sim 5,000$ bp, and unlysed spermatids were eliminated by an additional centrifugation. MNase digestion was performed on the buffer 1 or 2 lysates by the addition of 150 μl MNase buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM KCl, and 1 mM CaCl_2) and 15 U of micrococcal nuclease S7 (Roche), and incubation at 37°C for the indicated times. Reaction was stopped by 5 mM EDTA (final concentration). MNase-digested fractions were separated by ultracentrifugation (80,000 g, 20°C , 7 h) on a 10–30% linear sucrose gradient (in 1 mM phosphate buffer, pH 7.4, 80 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, and antiprotease cocktail). DNA analyses were performed on 10 μl of MNase-digested fractions by treatment with proteinase K followed by electrophoresis on a 2% agarose gel. Proteins of the collected fractions were analyzed Western blots.

MS and protein identification

After separation by SDS-PAGE, discrete bands were excised from the Coomassie blue-stained gel. The in-gel digestion was performed as previously described (Ferro et al., 2000). Gel pieces were then sequentially extracted with 5% (vol/vol) formic acid solution, 50% acetonitrile, 5% (vol/vol) formic acid, and acetonitrile. After drying, the tryptic peptides were resuspended in 0.5% aqueous trifluoroacetic acid. The samples were injected into a CapLC nanoLC system (Waters) and first pre-concentrated on a 300 $\mu\text{m} \times 5$ mm precolumn (PepMap C18; Dionex). The peptides were then eluted onto a C18 column (75 $\mu\text{m} \times 150$ mm; Dionex). The chromatographic separation used a gradient from solution A (2% acetonitrile, 98% water, and 0.1% formic acid) to solution B (80% acetonitrile, 20% water, and 0.08% formic acid) for >35 or 60 min at a flow rate of 200 nl/min. The LC system was directly coupled to a mass spectrometer (QTOF Ultima; Waters). MS and MS/MS data were acquired and processed automatically using Masslynx 4.0 software. Database searching was performed using the MASCOT 2.1 program. Two databases were used: a homemade list of well-known contaminants (keratins and trypsin) and an updated compilation of SwissProt and TrEMBL databases with specifying Mus as the species. For searching the Mus database, the variable modifications allowed were as follows: acetyl-lysine, N-ter acetylation, dimethyl-lysine, methyl-lysine, protein N-acetylation, methionine oxidation, serine and threonine phosphorylation, methionine sulphone, and cysteine acid. Because of 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 two peptides, both showing a score >40 , were validated without any manual validation. For proteins identified by only one peptide having a score >40 , the peptide sequence was checked manually. Peptides with scores >20 and <40 were systematically checked and/or interpreted manually to confirm or cancel the MASCOT suggestion.

Reverse transcription, PCR, and qPCR

Reverse transcription reactions were performed with the StrataScript First-Strand Synthesis system (Stratagene) using random hexamer primers. qPCR reactions were performed using Brilliant SYBR Green qPCR MasterMix on an Mx3005p cyler (Stratagene). cDNA from total testis was used for the standard curve, and data were normalized using Brd cDNA abundance, as Northern blot attests the constant level of this mRNA in meiotic and post-meiotic cells (Pivot-Pajot et al., 2003).

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). Plasmids were cotransfected in Cos7 cells by the Fugene transfection system (Roche), and cells were collected 24 h after transfection. Coimmunoprecipitations were performed as described by Caron et al. (2003). Preparation of oligonucleosomes and capture on hydroxyapatite were performed as described by Sun et al. (2003).

Online supplemental material

Fig. S1 shows codetection and quantification of H4Ac and H3K9me3 in elongating spermatids by immunofluorescence. Fig. S2 shows protocols used for the MNase digestion of condensed spermatids and analysis of the resulting release of chromatin-associated proteins. Fig. S3 shows fractionation and capture on hydroxyapatite of the MNase-resistant structures of condensed spermatids. Fig. S4 demonstrates quantification of FISH experiments, showing an enrichment of the two MNase-resistant structures of condensed spermatids in major satellite sequences. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200604141/DC1>.

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 Curtef-Benitski, Christine De Robertis, Roberte Pelletier, and Alexei Grichine for expert technical assistance.

The S. Khochbin Laboratory is supported by grants from the Regulome consortium (ANR-05-BLAN-0396-04), the Action Concertée Incitative, and Cancerpole Lyon Auvergne Rhone-Alpes (EpiMed and EpiPro programs).

Submitted: 21 April 2006

Accepted: 21 December 2006

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.* 239:376–387.
- 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.
- 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.
- 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.* 84:745–756.
- 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.* 9:757–763.
- 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.* 21:3517–3526.
- 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.* 18:3350–3356.
- 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.* 151:1591–1598.
- 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.* 271:3459–3469.
- Govin, J., C. Caron, S. Rousseaux, and S. Khochbin. 2005. Testis-specific histone H3 expression in somatic cells. *Trends Biochem. Sci.* 30:357–359.
- 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.* 279:48329–48341.
- Kimmins, S., and P. Sassone-Corsi. 2005. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature.* 434:583–589.
- 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.* 1:249–254.
- Lewis, J.D., D.W. Abbott, and J. Ausio. 2003a. A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem. Cell Biol.* 81:131–140.
- Lewis, J.D., Y. Song, M.E. de Jong, S.M. Bagha, and J. Ausio. 2003b. A walk though vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma.* 111:473–482.
- 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.* 44:2529–2535.
- 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. USA.* 102:2808–2813.
- Martin, C., N. Beaujean, V. Brochard, C. Audouard, D. Zink, and P. Debey. 2006. Genome restructuring in mouse during reprogramming and early development. *Dev. Biol.* 292:317–332.
- Marushige, Y., and K. Marushige. 1983. Proteolysis of somatic type histones in transforming rat spermatid chromatin. *Biochim. Biophys. Acta.* 761:48–57.
- Nelson, D.A., D.K. Oosterhof, and R.L. Rill. 1977. Histones H2A and H2B are neighbors along DNA in chromatin: characterization of subnucleosomal particles containing H2A+H2B. *Nucleic Acids Res.* 4:4223–4234.
- Nelson, D.A., A.J. Mencke, S.A. Chambers, D.K. Oosterhof, and R.L. Rill. 1982. Subnucleosomes and their relationships to the arrangement of histone binding sites along nucleosome deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* 21:4350–4362.
- O'Carroll, D., H. Scherthan, A.H. Peters, S. Opravil, A.R. Haynes, G. Laible, S. Rea, M. Schmid, A. Lebersorger, M. Jerratsch, et al. 2000. Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol. Cell. Biol.* 20:9423–9433.
- Oliva, R., and G.H. Dixon. 1990. Vertebrate protamine gene evolution I. Sequence alignments and gene structure. *J. Mol. Evol.* 30:333–346.
- 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.* 100:32–36.
- Peters, A.H., D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schofer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, et al. 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.
- Rill, R.L., and D.A. Nelson. 1978. Histone organization in chromatin: comparison of nucleosomes and subnucleosomal particles from erythrocyte, myeloma, and yeast chromatin. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 42:475–482.
- Rousseaux, S., C. Caron, J. Govin, C. Lestrat, A.K. Faure, and S. Khochbin. 2005. Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene.* 345:139–153.
- Russell, L., R. Ettl, A. Sinha-Hikim, and E. Clegg. 1990. *Histological and histopathological evaluation of the testis.* Cache River Press, Clearwater, FL. 286 pp.
- 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.* 280:225–236.
- 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.* 3:114–120.
- 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.* 277:43474–43480.

Supplementary Figure 1

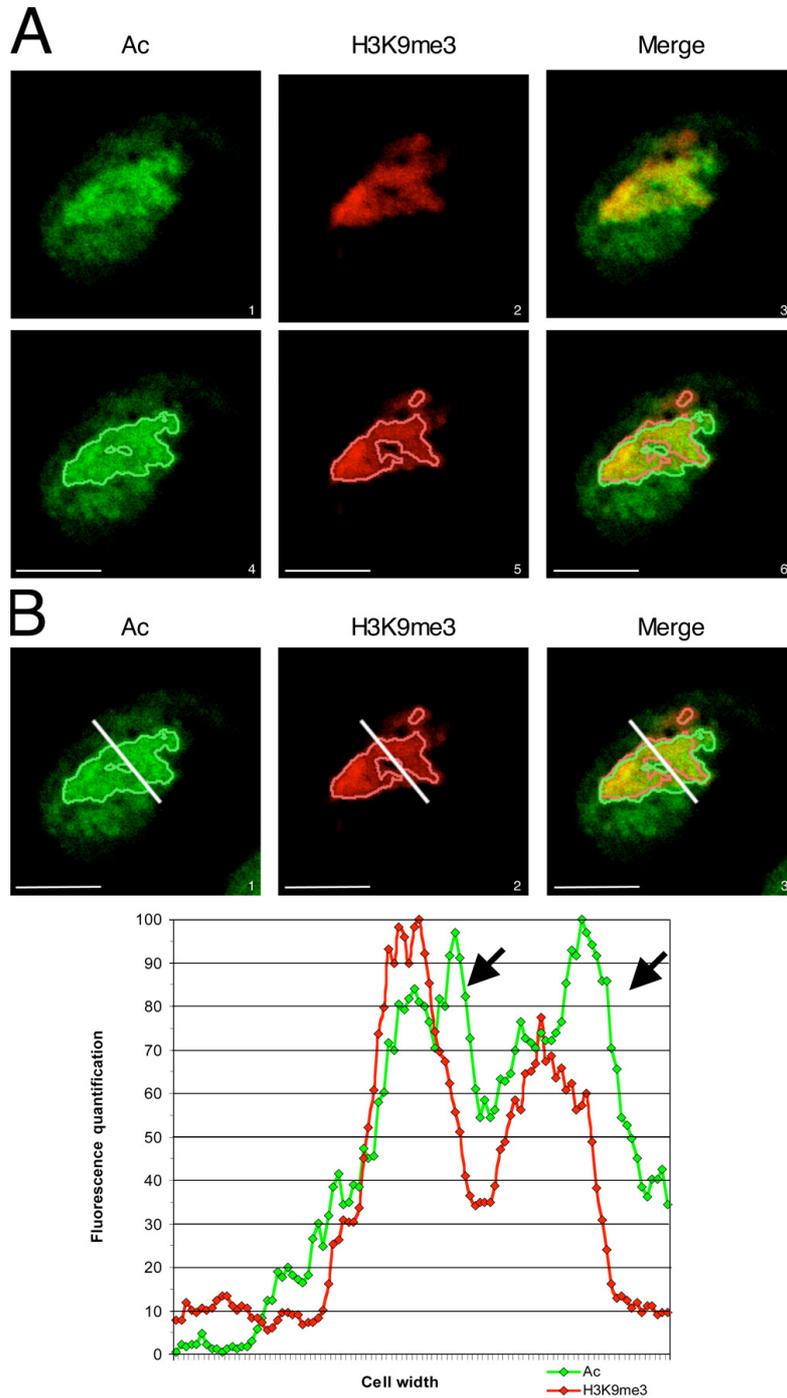


Figure S1. **H4Ac and H3K9me3 do not perfectly overlap on pericentric heterochromatin in elongating spermatids.** Acetylation of histones and trimethylation of H3K9 were analyzed by immunofluorescence in elongating spermatids as in Fig. 2 (B-D), except that fluorochromes were inverted: acetylation was detected in green (Alexa 488) and H3K9me3 in red (Alexa 546). A region containing values >50% of maximal fluorescence was delimited using the MetaMorph analysis software (A; green and red borders for Ac and H3K9me3 signals, respectively), and quantification performed along the white axis (B) was reported along a diagram. A representative picture of the analysis of three different cells shows that the acetylated domain and H3K9me3 do not perfectly overlap. Bars, 2.5 μ m.

Supplementary Figure 2

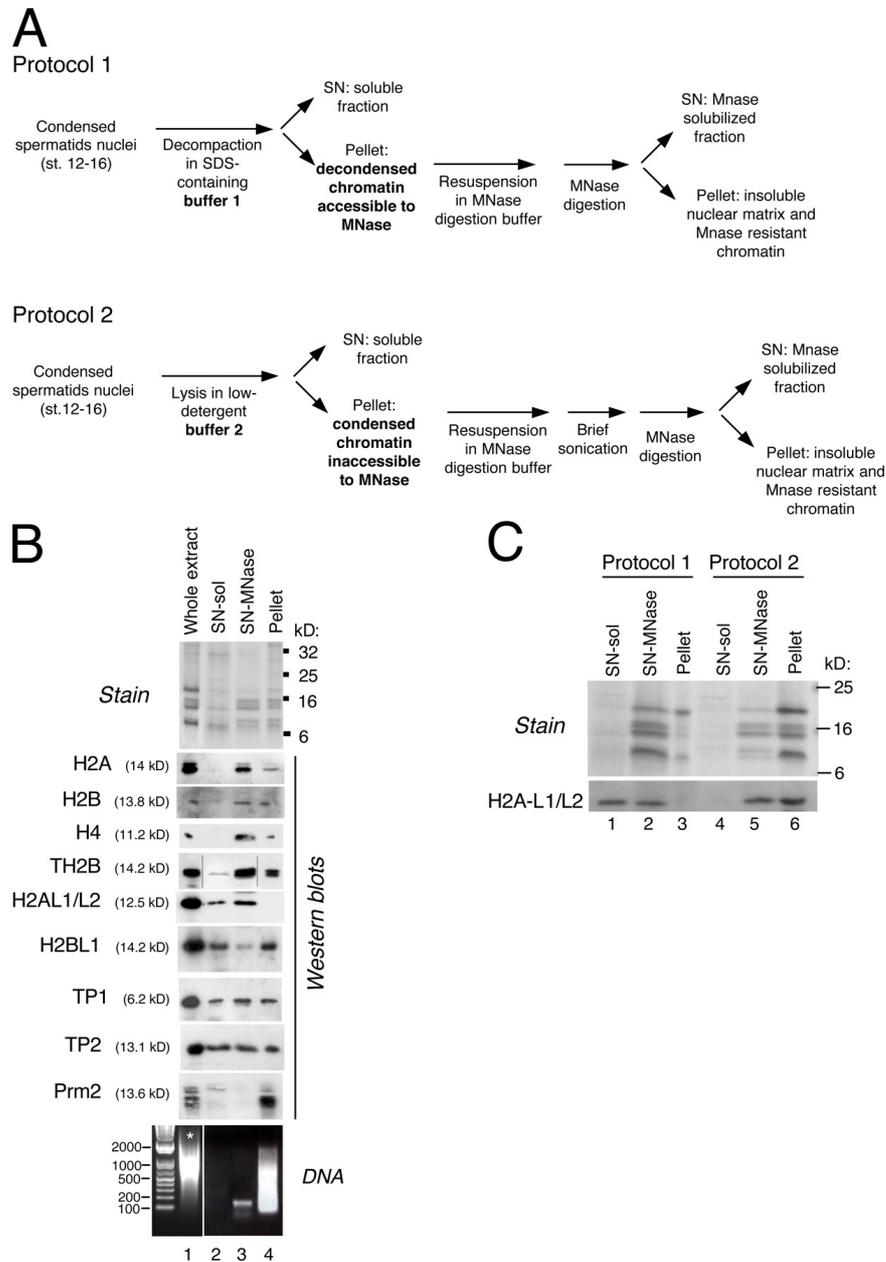


Figure S2. Preparation of nucleosomal structures by MNase digestion from condensed spermatids. (A) Overview of the protocols used for MNase digestion of condensed spermatids. SN; supernatant; MNase, micrococcal nuclease. (B) Three different fractions obtained by protocol 1, the soluble nuclear extract (SN-sol; lane 2), the MNase-digested fraction (SN-MNase; lane 3), and the MNase-resistant insoluble pellet (lane 4), were analyzed 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 and TP2), and protamine 2 (Prm2) was checked by Western blots with the corresponding antibodies. The DNA of each fraction was also analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel after degradation of the associated proteins by proteinase K (DNA panel). Asterisk indicates 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 with 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 extent, 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).

Supplementary Figure 3

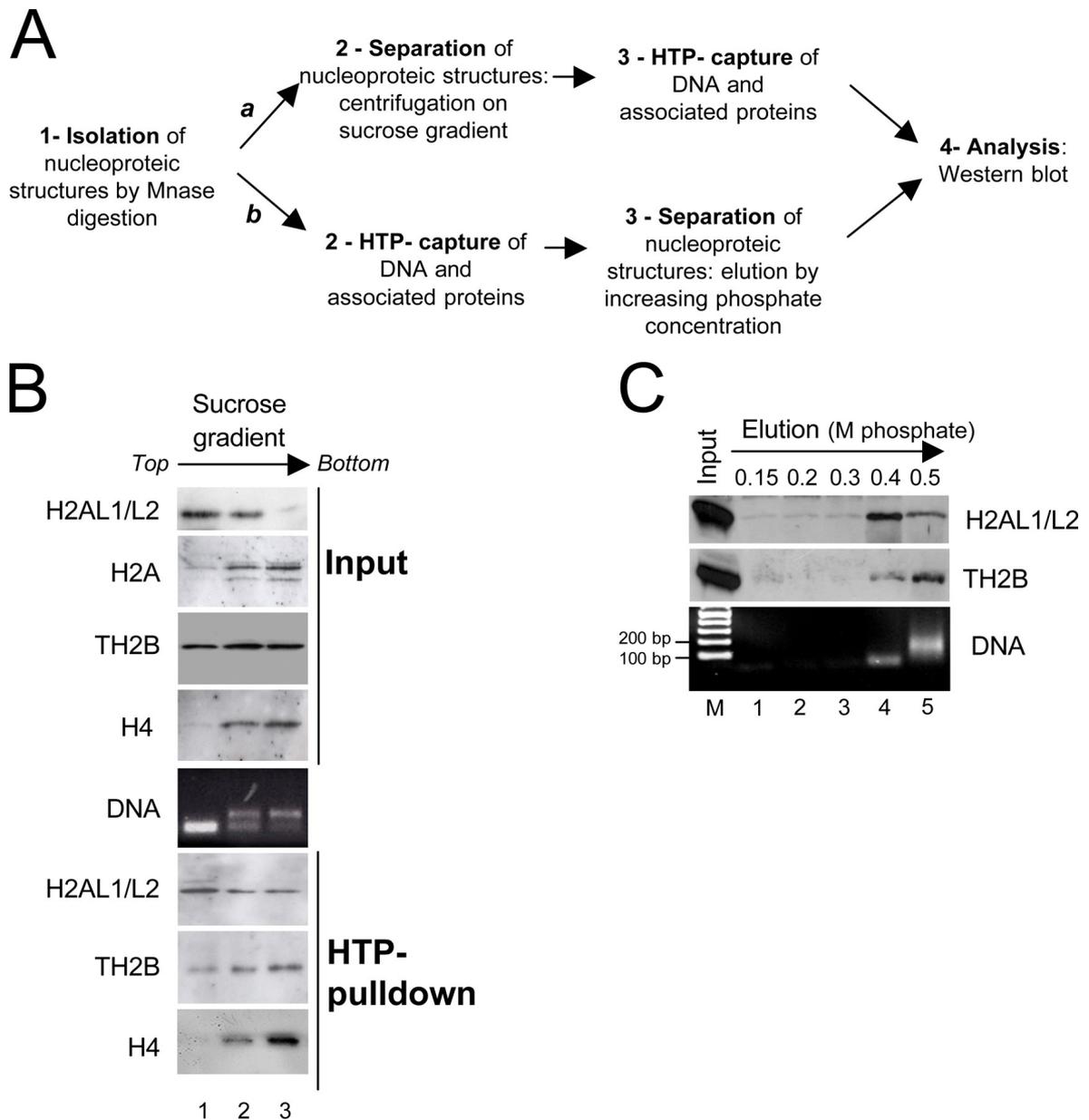


Figure S3. **H2AL1/L2 are associated to the small MNase-resistant DNA fragment.** (A) Two different procedures were used to analyze the histones associated to the nucleosomal and the short DNA fragments in condensed spermatids. Nucleoprotein structures were prepared from condensed spermatids by MNase digestion according to protocol 2 of Fig. S2 A. In the first procedure (a), 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 were released by denaturation in a SDS-PAGE loading buffer. In the second procedure (b), 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 first procedure. Input and DNA panels show the correct separation of nucleoprotein structures on sucrose gradient, with a cofractionation 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 Fig. 6. The HTP pull-down panels show that H2AL1/L2 and TH2B are indeed cocaptured with the small DNA fragment and that TH2B is also present (like H4) in nucleosomal structures. (C) Results of the second 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 coelution of H2AL1/L2 essentially with the small fragment (and not with DNA debris released at lower phosphate concentration), whereas TH2B coelutes with both the small and the nucleosomal fragment.

Supplementary Figure 4

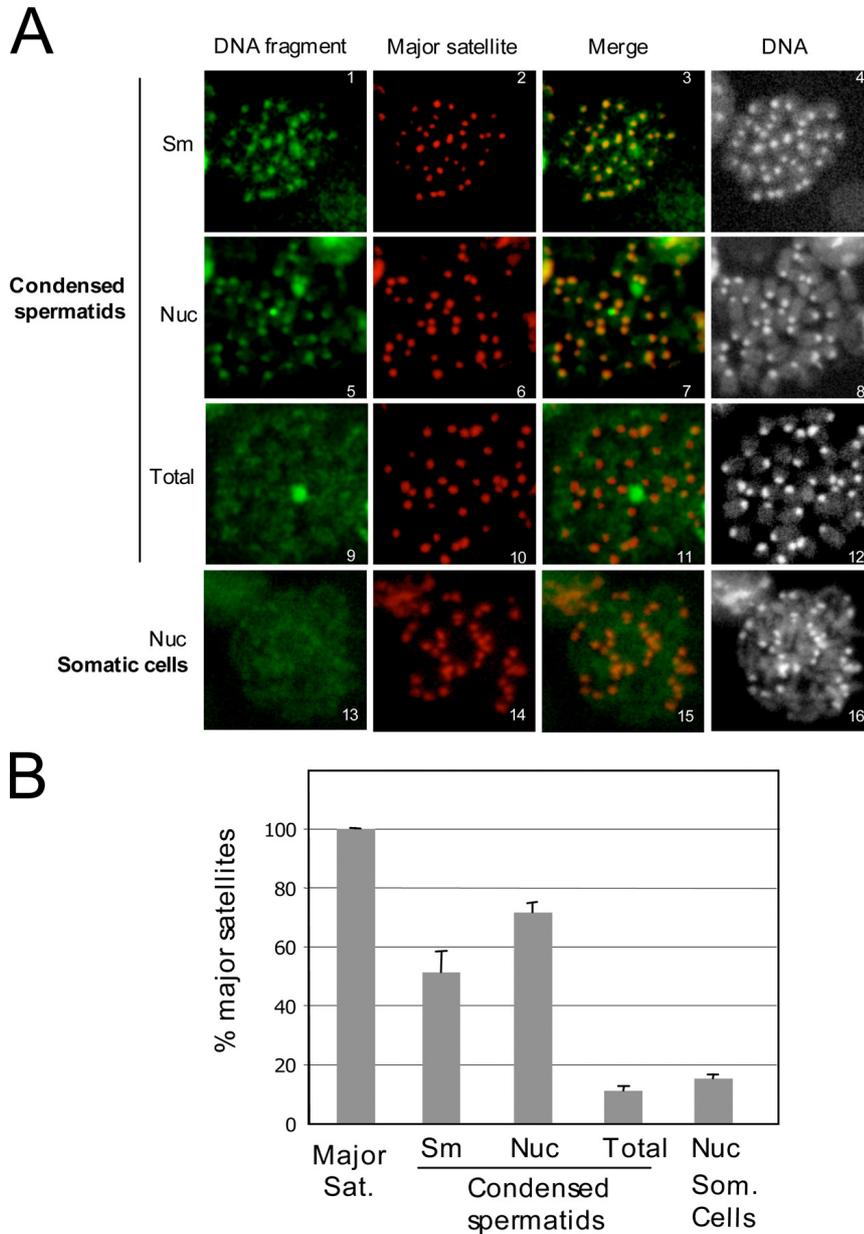


Figure S4. **Enrichment of the two MNase-resistant structures in major satellite sequences.** (A) FISH on mouse metaphase chromosomes was performed using labeled fractionated genomic DNA as probes (green), in codetection with a major satellite probe (red). Total DNA was counterstained with DAPI. The following DNA probes were used. Sm, small MNase-resistant DNA fragment, obtained from condensed spermatids according to Protocol 1 as described in Fig. S2 A; Nuc, nucleosomal MNase-resistant fragment obtained from condensed spermatids (pictures 5-8) or 3T3 cells (pictures 13-16) according to protocol 1. Total; DNA obtained by sonication from condensed spermatids lysed according to protocol 1 (visualized in Fig. S2 B, lane 1). (B) Quantification of FISH experiments. On each slide shown in B, the fluorescence intensity of each whole chromosome and of its corresponding pericentric region was quantified using MetaMorph software. The fluorescence intensity of pericentric hybridization signals for each probe was expressed as a ratio of total chromosome hybridization signal intensity (Flp/Flc) and then normalized to the Flp/Flc of the major satellite probe on the same chromosomes. Only well-individualized chromosomes were used for analysis (at least five chromosomes per slide). Mean values and standard deviation do not show significant variation between chromosomes. Results show that ~70% of nucleosomal fragments and 50% of the small fragments of condensed spermatids indeed hybridize at pericentric regions. Thus, ~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.

II. Les autres régions du génome susceptibles d'être organisées par ces variants (résultats non publiés)

Nous venons de voir que ces nouveaux variants d'histones organisaient une région spécifique du génome, l'hétérochromatine péricentromérique. Mais l'utilisation de la FISH comme technique d'étude a restreint l'identification des zones associées aux variants à de grandes régions identifiables par microscopie à fluorescence telles que les centromères, les péricentromères ou les télomères.

Mais ces variants pourraient également être présents au niveau de régions beaucoup plus restreintes du génome, tels que des séquences répétées ou des gènes.

Nous avons ainsi regardé la présence ou non de ces variants au niveau de régions particulières, susceptibles d'être marquées différemment dans le noyau spermatique. Cette étude a fait l'objet d'une collaboration avec le laboratoire de Robert Feil, à Montpellier.

1. Les séquences répétées du génome

Il existe dans le génome de nombreuses séquences répétées, caractérisées par des marques spécifiques et possédant un rôle très important.

On peut prendre l'exemple des régions centromériques, caractérisées par deux types d'éléments répétés, les satellites majeurs (6 Mégabases d'unités de 234 bp) formant l'hétérochromatine péricentromérique et les satellites mineurs (600 kb d'unités de 120 bp) formant les centromères (Choo, 2000). Dans les cellules somatiques, ces séquences ont des marques distinctes, les satellites majeurs possédant la modification d'histone H3K9me3 liant la protéine HP1 α , les satellites mineurs étant spécifiquement associées au variant d'histone CENP-A.

Deux autres exemples de séquences répétées sont les télomères et les séquences LINE, issues des rétroposons.

Toutes ces régions, possédant un rôle fonctionnel très important, seraient ainsi susceptibles d'être marquées différemment dans le noyau spermatique. Il a ainsi été montré dans la littérature que dans les spermatozoïdes, les séquences LINE sont enrichies en histones

(Pittoggi et al., 1999), tandis que chez l'homme, les télomères sont associés à un variant de H2B spécifique du sperme (Churikov et al., 2004; Gineitis et al., 2000).

Nous avons tout d'abord testé la présence de l'ADN de la petite structure et de l'ADN nucléosomal par dot blot sur des séquences répétées du génome, telles que les télomères, les séquences satellites majeures et mineures. L'ADN de chaque structure ainsi que l'ADN nucléosomal testiculaire total utilisé comme contrôle ont été marqués à l'aide de P^{32} . Chacun a ensuite été hybridé sur les séquences répétées, en présence d'ADN de sperme de saumon afin d'empêcher la fixation non spécifique des sondes. La radioactivité associée à chaque point de séquences répétées a été quantifiée et rapportée sur le graphique A de la figure 24.

Le graphique montre un très fort enrichissement de l'ADN de ces structures sur les séquences satellites majeures. Mais l'ADN contrôle s'hybridant de la même manière, cet enrichissement n'est pas significatif. Ceci peut s'expliquer par le fait que les sondes se sont hybridées de manières non spécifiques sur les séquences répétées. Nous avons testé différentes conditions d'hybridation en modifiant la température, la concentration de l'ADN de sperme de saumon, mais nous n'avons trouvé aucune solution qui a permis de palier à ce problème.

Nous pouvons donc en conclure que les structures nucléosomales et non nucléosomales identifiées précédemment ne semblent pas organiser spécifiquement les séquences répétées du génome.

Nous pouvons tout de même noter que l'étude des séquences LINE montre un enrichissement au niveau de cette région de l'ADN correspondant à la petite structure non nucléosomale composée des nouveaux variants d'histones. Il avait déjà été montré dans la littérature que les rétroposons, et en particulier les séquences LINE, étaient enrichies en histones (Pittoggi et al., 1999).

2. Les gènes soumis à l'empreinte parentale

L'asymétrie entre les génomes paternel et maternel joue un rôle crucial lors du développement. La non-équivalence des deux génomes parentaux s'exprime notamment au niveau des gènes soumis à l'empreinte. La répression allélique maternelle ou paternelle au niveau des gènes

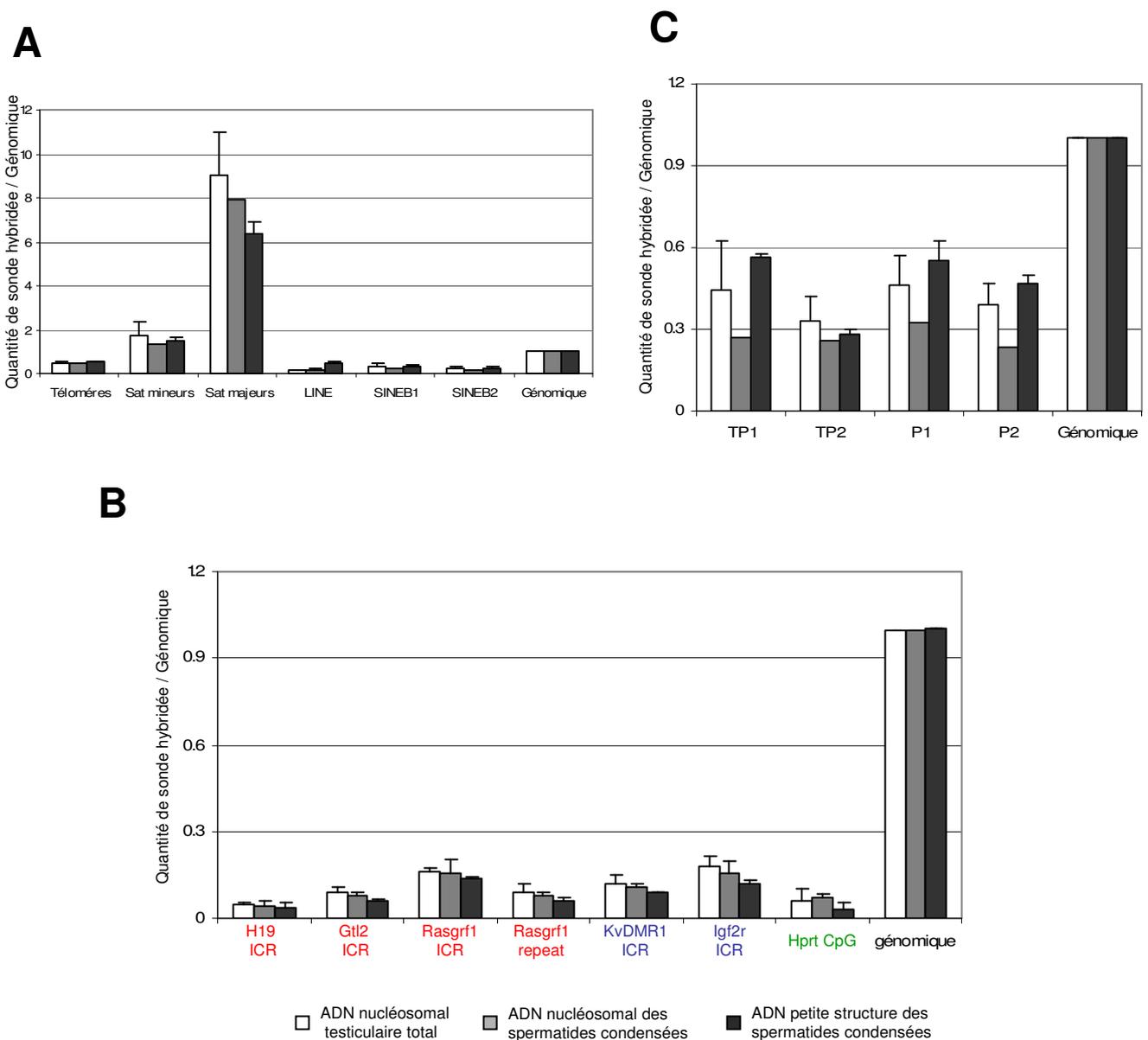


Figure 24. Les autres régions du génome susceptibles d'être organisées par les nouveaux variants d'histones

A. Mesure de l'enrichissement sur des séquences répétées. L'ADN d'intérêt est extrait puis purifié. Il est ensuite hybridé sur différentes séquences répétées (télomères, satellites majeurs et mineurs, LINE et SINE) La quantité de sonde hybridée a été mesurée puis rapportée par rapport à l'ADN génomique total.

B. Mesure de l'enrichissement sur les gènes soumis à l'empreinte parentale. L'ADN d'intérêt est hybridé sur les ICR des gènes soumis à l'empreinte paternelle (H19, Gtl2, Rasgrf1). Des ICR de gènes soumis à l'empreinte maternelle ont également été utilisés (KvDMR1, Igf2r) et une séquence CpG non soumis à l'empreinte parentale a été utilisée comme contrôle (Hprt CpG). La quantité de sonde hybridée a été mesurée puis rapportée par rapport à l'ADN génomique total.

C. Mesure de l'enrichissement sur des gènes exprimés tardivement au cours de la spermatogénèse. L'ADN d'intérêt est hybridé sur les gènes codants pour des protéines spécifiques de la spermatogénèse (protéines de transition et protamines). La quantité de sonde hybridée a été mesurée puis rapportée par rapport à l'ADN génomique total.

soumis à l’empreinte est médiée par les ICR (imprinting control regions) (Ferguson-Smith and Surani, 2001; Reik and Walter, 2001). Ce sont des éléments essentiels de quelques kilobases, correspondant le plus souvent à des îlots CpG, qui se retrouvent méthylés lorsqu’ils sont soumis à l’empreinte parentale. Ces ICR sont associés à des marques épigénétiques différentes, selon qu’ils sont méthylés ou non : la méthylation de l’ADN au niveau des ICR est associée à H4K20me3 et H3K9me3 tandis que l’allèle non méthylé correspondant est associé au contraire à H3K4me2 et H3ac (Delaval et al., 2007). De plus, après la fécondation, le génome paternel subit une déméthylation globale, rapide et active, sauf au niveau de ces ICR et de certaines autres séquences comme les séquences satellites ou celles des rétrotransposons (Morgan et al., 2005).

Le comportement particulier des ICR des gènes soumis à l’empreinte parentale nous incite à penser qu’ils peuvent être le lieu d’une réorganisation particulière de la chromatine. En effet ; les ICR soumis à l’empreinte paternelle ou maternelle étant associées à des modifications d’histones différentes au cours de la spermatogénèse, ces différences pourraient être à l’origine d’une réorganisation particulière de la chromatine au cours de la spermatogénèse. De plus, cette structuration spécifique au niveau des ICR soumis à l’empreinte pourrait les protéger de la déméthylation globale du génome s’effectuant après la fécondation.

Nous nous sommes ainsi demandé si les structures identifiées précédemment ne pouvaient pas structurer ces ICR.

Seulement trois ICR sont connus pour être méthylés sur l’allèle paternel. Il s’agit de l’ICR en amont du gène H19 contrôlant le locus Igf2/H19 (Thorvaldsen et al., 1998), l’ICR en amont du gène Gtl2 contrôlant le locus Dlk1/Gtl2 (Lin et al., 2003) et l’ICR du locus Rasgrf1 (Yoon et al., 2002). Chez ce dernier, une séquence répétitive adjacente à l’ICR est essentielle pour la méthylation de l’ICR au cours de la spermatogénèse (Rasgrf1 repeat). Nous avons également inclus dans cette étude deux ICR méthylées dans la lignée germinale maternelle : la région 2’ du gène Igf2r (Wutz et al., 1997) et l’îlot CpG nommé KvDMR1, situé au sein du gène Kcnq1 (Fitzpatrick et al., 2002).

Comme contrôle, il a été utilisé le promoteur du gène Hrpt1, un îlot CpG qui n’est pas soumis à l’empreinte parentale.

Nous avons réalisé l'étude de l'enrichissement de ces structures sur les gènes soumis à l'empreinte de manière identique à l'étude sur les séquences répétées. La radioactivité mesurée sur chaque gène a été quantifiée et rapportée sur le graphique B de la figure 24.

Le graphique ne montre pas d'enrichissement des ICR des gènes soumis à l'empreinte paternelle ou maternelle en structures nucléosomales ni en petite structure contenant H2AL1/L2.

Ainsi, les gènes soumis à l'empreinte parentale ne semblent pas réorganisés de manière différentielle à l'aide de ces nouvelles structures nucléoprotéiques au cours de la spermatogénèse.

3. Les gènes exprimés tardivement au cours de la spermatogénèse

Au cours de la spermatogénèse, la transcription s'arrête au stade méiotique des cellules germinales, mais certaines protéines, comme les protéines de transition ou les protamines, sont présentes uniquement dans les stades plus tardifs afin d'être associées à la chromatine pour sa réorganisation finale. Des travaux dans la littérature ont montré que certains gènes exprimés durant la spermatogénèse étaient plutôt associés à des structures nucléosomales tandis que les gènes réprimés durant cette période étaient plutôt associés aux protamines. C'est notamment le cas des gènes des protamines ainsi que des protéines de transition qui sont enrichis en histones (Wykes and Krawetz, 2003). On peut ainsi supposer que les gènes codant pour ces protéines ont besoin d'être encore accessibles aux facteurs de transcription dans les stades tardifs de la spermatogénèse. Ceci implique la possibilité que la chromatine associée à ces gènes reste organisée en nucléosomes, permettant ainsi la transcription tardive de ces protéines nécessaires à la spermatogénèse

Afin de vérifier ces données et de tester la présence ou non des variants d'histones sur ces séquences, nous avons testé de manière identique aux expériences précédentes la présence de l'ADN correspondant à la petite structure et de l'ADN correspondant au nucléosome classique sur les gènes codant pour les protéines de transition 1 et 2 et sur ceux codant pour les protamines 1 et 2. La radioactivité mesurée sur chaque gène a été quantifiée et rapportée sur le graphique C de la figure 24. L'étude de ce graphique montre qu'aucun des ADN étudiés n'est enrichi sur ces gènes par rapport au contrôle représentant l'ADN nucléosomal testiculaire total.

Ainsi, les structures nucléosomales et non nucléosomales ne semblent pas réorganiser les gènes des protéines de transition et des protamines au cours de la spermatogénèse.

4. Les régions codantes de l'ensemble des gènes murins

L'analyse de l'enrichissement en structures nucléosomales et non nucléosomales de gènes importants au cours de la spermatogénèse ou du développement n'a pas donné de résultats significatifs.

Nous avons donc décidé d'étudier la présence de ces structures au niveau de l'ensemble des gènes murins. Cette étude a fait l'objet d'une collaboration avec le laboratoire de Pascal Barbry, à Nice Sophia Antipolis.

Cette étude a nécessité l'utilisation de puces transcriptionnelles représentant 22 000 régions codantes de gènes murins. L'ADN d'intérêt issu de nos structures nucléosomales ou non nucléosomales a été marqué avec le fluorochrome Cy5 (rouge) puis hybridé sur la puce en même temps qu'un ADN contrôle marqué au fluorochrome Cy3 (vert) et correspondant à l'ensemble du génome mâle. Les intensités de fluorescence (vert et rouge) obtenues après hybridation sont mesurées pour chaque gène de la puce, et présentées sur un graphique (Figure 25).

Pour contrôler que les conditions de marquage et de co-hybridation étaient correctes, nous avons également marqué de l'ADN génomique total au Cy5. La cohybridation avec l'ADN total marqué au Cy3 donne comme attendu des signaux équivalents en rouge et en vert, et les gènes ainsi marqués se retrouvent sur la ligne médiane (points noirs).

Prenant cette ligne médiane comme référence, les ADN représentant les structures nucléosomales ou non nucléosomales sont retrouvés hybridés sur trois populations de gènes.

Juste sous la médiane (gris), on retrouve les gènes qui se sont moins hybridés à nos ADN d'intérêt par rapport à l'ADN total mâle. Nos fragments d'ADN structurent bien ces gènes car ils s'hybrident dessus. En revanche, ils sont moins bien représentés que le contrôle ADN total. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'au moment de l'extraction, les structures nucléoprotéiques qui structuraient ces gènes étaient en cours d'association ou de dissociation.

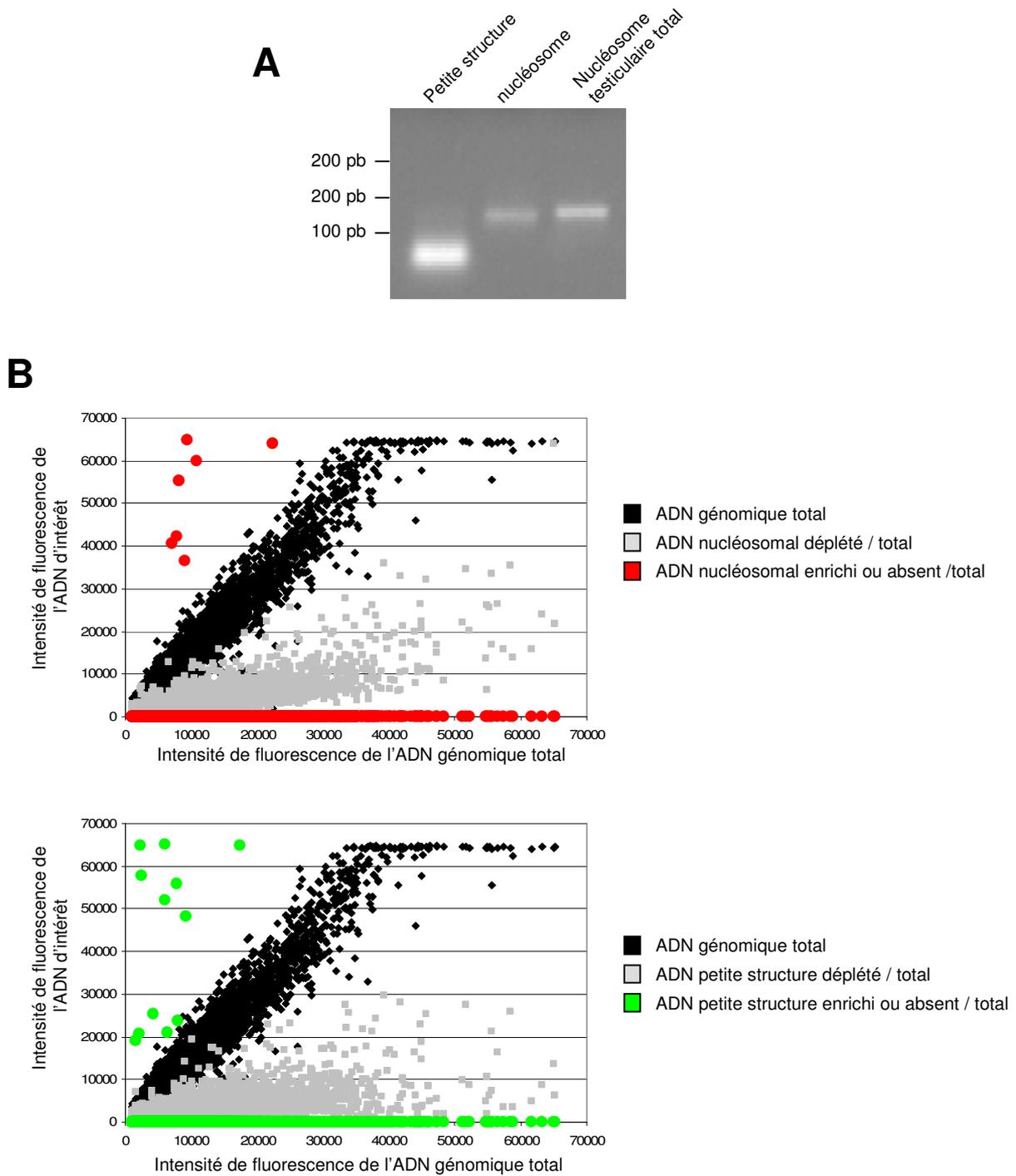


Figure 25. Enrichissement des structures nucléoprotéiques sur certains gènes

A. Extraction et purification de l'ADN. Les ADN associés aux nucléosomes canoniques et aux petites structures ont été isolés et purifiés. Le contrôle de leur qualité et de leur concentration a été effectué sur un gel d'agarose 1%.

B. Quantification de l'hybridation sur puces transcriptomiques. Les ADN d'intérêt ont ensuite été hybridés sur des puces transcriptomiques. L'hybridation de l'ADN d'intérêt sur chaque transcrite est quantifiée et rapportée par rapport à l'ADN total mâle. Le premier graphique représente l'ADN nucléosomal total et le deuxième graphique représente l'ADN des petites structures. L'ADN génomique total a été utilisé comme contrôle (noir). L'ADN déplété par rapport à l'ADN génomique total (gris) se trouve sous la médiane, tandis que les ADN absent ou enrichi (vert) se retrouvent respectivement sur la ligne des abscisses et au dessus de la médiane.

Sur l'axe des abscisses, on retrouve les gènes qui ne se sont pas du tout hybridés à nos ADN d'intérêt. Ils pourraient ainsi correspondre à des gènes associés aux protamines ou présents dans des zones très compactes de la chromatine telles que les télomères ou les centromères. Ces zones ne sont donc pas du tout retrouvés dans nos préparations d'ADN nucléosomal.

Enfin, et ce qui nous intéresse le plus, on retrouve au dessus de la médiane les gènes qui se sont beaucoup plus hybridés à nos ADN d'intérêt que l'ADN total mâle. Les structures nucléoprotéiques seraient donc majoritairement associées à ces gènes. Ainsi, les gènes faisant partis de cette population ont été identifiés et regroupés dans la table 5.

Nous nous sommes demandé si ces gènes pouvaient être regroupés en clusters au niveau d'une région donnée qui serait organisée de manière différentielle. L'étude de leur localisation chromosomique a permis de montrer qu'ils n'étaient pas regroupés sur un chromosome ou sur une région chromosomique donnée.

De même, nous nous sommes demandé s'ils pouvaient regrouper une fonction cellulaire précise, nécessaire à la spermatogénèse ou au développement. L'étude de leur fonction a ainsi pu montrer que ces gènes codaient pour des protéines aux fonctions très variables, telles que la réponse inflammatoire, la modification post-traductionnelle des protéines ou la mobilité cellulaire. Enfin, le profil d'expression de ces gènes à été analysé (Symatlas: <http://biogps.gnf.org/?referer=symatlas#goto=welcome>) et certains de ces gènes sont exprimés spécifiquement dans un tissu donné.

Nous pouvons alors émettre l'hypothèse selon laquelle la structuration spécifique de ces gènes serait là pour signaler leur devenir particulier au cours du développement. Cependant, cette étude demanderait à être reproduite, pour confirmation.

5. Conclusion

L'étude de régions potentiellement organisées par ces structures n'a pas permis de mettre en évidence une organisation différentielle de gènes importants dans le déroulement de la spermatogénèse ou dans le développement.

Pour l'instant, il a été démontré que seule la région d'hétérochromatine péri-centromérique était réorganisée par les structures nucléosomales, ainsi que par les structures non nucléosomales contenant H2A1/L2.

	ID Unigene	Nom	Chromosome	Fonction
ADN nucléosomal	Mm.246530	olfactory receptor 24	9qA3	Recepteur olfactif
	Mm.266033	Ras-related protein Rab-26	17qA3.3	Régulation secretion exocrine dans les glandes parotides
	Mm.260568	Neural cell adhesion molecule L1	XqA6-B	Molécule d'adhésion cellulaire du système nerveux
	Mm.188445	Keratin-associated protein 16-10-like	16qC3.3	Filaments intermediaires inétragissant avec kératine dans follicule pileux
	Mm.474445	Protein FAM116B	15qE3	Fonction inconnue
	Mm.274492 Mm.470418	2410002F23Rik	7qB1	Fonction inconnue
	Mm.220165	Zinc finger protein 353 (Zfp353)	8qA4	Fonction inconnue
ADN petite structure	Mm.221041	R3H domain 1	1qE4	Liaison acides nucléiques
	Mm.256858	dynein light chain LC8-type 1	5qF	Transport intracellulaire et mobilité; Modification et maintien du cytosquelette.
	Mm.131480	interleukin 19	1qE4	Réponse inflammatoire; Régule IL-6 and TNF-alpha ; induit apoptose
	Mm.225050/ Mm.394160/ Mm.425636/ Mm.461280	neuron navigator 3	10qD1	Regule production IL2; Régénération neuronale
	Mm.205569	Serine/threonine-protein phosphatase	1qH6	Phosphatase
	Mm.29854	histone deacetylase 6	XqA1.1	Déacetylase des histones
	Mm.133101	E3 ubiquitin-protein ligase SHPRH	10qA1	E3 ubiquitine ligase
	Mm.34855	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 2 (Lrig2)	3qF2.2	Fonction inconnue
	Mm.50817	4933402J10Rik	5qC2	Fonction inconnue
	Mm.280888	4933405L10Rik	8qD2	Fonction inconnue
	Mm.234080	4930567H12Rik	8qE2	Fonction inconnue
	Mm.314618/ Mm.389773	B230120H23Rik	2qC3	Fonction inconnue

Table 5. Analyse des données des puces transcriptomiques

Les gènes qui ont été trouvés hybridés avec l'ADN issu des structures nucléoprotéiques ont été analysés. Sont répertoriées leur localisation sur les chromosomes et la fonction des protéines qu'ils codent. Les structures nucléoprotéiques ne montrent une localisation chromosomique ni une fonction particulière.

III. Le mécanisme d'assemblage à la chromatine de ces variants

La dynamique d'assemblage et de désassemblage des nucléosomes au sein de la chromatine nécessite la présence de protéines chaperonnes spécifiques, qui permettent ce mouvement perpétuel (Paragraphe *Introduction A. III. 2.*). Ceci est encore plus vrai dans les cellules germinales où la majorité des histones va être remplacée par les protéines de transition puis les protamines.

L'identification d'une protéine pouvant chaperonner les nouveaux variants d'histones afin de les incorporer au sein de la chromatine a donc été la suite logique du travail précédent.

1. Identification de NAP1L4

Afin d'identifier les protéines impliquées dans l'enlèvement des histones et leur remplacement par les protéines de transition et les protamines, une approche par colonne d'affinité avait été réalisée avant mon arrivée par un autre étudiant. Ainsi, la protéine de transition TP1 recombinante a été couplée à une résine, tandis qu'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 (Table 6).

Comme attendu, cette approche a identifié plusieurs protéines chaperonnes présentes dans les stades terminaux de la spermatogénèse, dont la protéine NAP1L4.

NAP1L4 fait partie de la famille des NAP (Nucleosome Assembly Protein). Les NAP chaperonnent principalement les dimères H2A-H2B, et permettent leur incorporation à la chromatine. NAP1 semble être impliqué dans l'échange de H2A avec des variants d'histones (Park et al., 2005). En effet, chez la levure, NAP1 semble échanger H2A contre H2AZ (Mizuguchi et al., 2004), tandis que chez l'homme, NAP1 semble échanger H2A contre H2ABbd (Okuwaki et al., 2005). L'ensemble des propriétés de NAP1 nous a amené à considérer NAP1L4 comme une probable protéine clé du remodelage post méiotique de la chromatine et de la mise en place des variants H2AL2 et TH2B au cours de la spermatogénèse.

Famille	Description	ID	MW (kDa)	pI
Chromatine	Histone H2A	Q8BFU2	14	10.87
	Histone H2B	P10853	14	10.32
	Histone H4	Q9D0C9	11	11.18
Chaperonnes	Chromatine			
	Nucleosome assembly protein 1-like 4	O88701	43	4.56
	tNASP	Q99MD9	84	4.35
	Général			
	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
ARN	Topologie			
	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
Expression des gènes	Transcription			
	Myelin gene expression factor	Q8QZZ1	63	8.96
	TAF15 RNA polymerase II	Q8BQ46	59	8.51
	Traduction			
	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
Metabolisme	Production d'énergie			
	Dihydrolipoamide 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
	Lipides			
	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	Q91XR9	29	10.16
	Phospholipide hydroperoxide glutathione	O70325	22	8.74
Divers				
	D-dopachrome decarboxylase	O35215	13	6.15
	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta2-like1	P68040	35	7.57
Cytosquelette	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
Protéines ribosomales	40S ribosomal protein S18	P62270	18	11.00
	60S ribosomal protein L12	P35979	18	9.48
	Ribosomal protein, large P2	Q7TNQ6	12	4.49
Divers	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

Table 6. Protéines associées à TP1

Les protéines ont été capturées par colonne d'affinité à TP1 et identifiées par spectrométrie de masse.

2. Caractérisation de NAP1L4

La famille NAP contient cinq gènes chez les mammifères. L'expression de quatre des cinq gènes a été étudiée par RT-qPCR (Figure 26 A). L'ARNm de NAP1L5 n'a pas pu être quantifié, car aucune amorce testée n'a validé les critères de qPCR.

Il est intéressant de noter que NAP1L1 et NAP1L4 sont exprimées de manière ubiquitaire, tandis que NAP1L2 et NAP1L3 sont exprimées majoritairement dans le cerveau. Ces résultats sont à corrélérer avec le fait que NAP1L2 et NAP1L3 sont toutes les deux exprimées spécifiquement dans les neurones, suggérant une fonction neurale commune ou redondante (Rogner et al., 2000; Shen et al., 2001).

Un anticorps anti NAP1L4 a été développé et purifié afin de préciser le rôle de cette protéine au cours de la spermatogénèse. L'anticorps purifié reconnaît spécifiquement NAP1L4 transfectée dans des cellules somatiques, aussi bien par western blot (Figure 26 B) que par immunofluorescence (Figure 26 C). La protéine semble être présente parfois dans le noyau, parfois dans le cytoplasme, mais des travaux décrivent que sa localisation cellulaire est dépendante de la phase du cycle, NAP1L4 étant notamment présente dans le cytoplasme en phase G0/G1, et dans le noyau en phase S (Rodriguez et al., 1997). 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.

L'abondance de la protéine NAP1L4 endogène a été analysée sur une sélection de tissus murins adultes (cerveau, rein, testicule, muscle squelettique, coeur, poumon) et le western blot associé montre que NAP1L4 est majoritairement exprimée dans le testicule (Figure 26 D).

Le profil d'expression de NAP1L4 au cours de la spermatogénèse a été caractérisé par western blot (Figure 27 A) et montre que NAP1L4 est présente tout au long de la spermatogénèse, du stade spermatocyte au stade spermatides condensées.

Ainsi, NAP1L4 est bien enrichie au niveau du testicule et est présente dans les cellules germinales à tous les stades de la spermatogénèse.

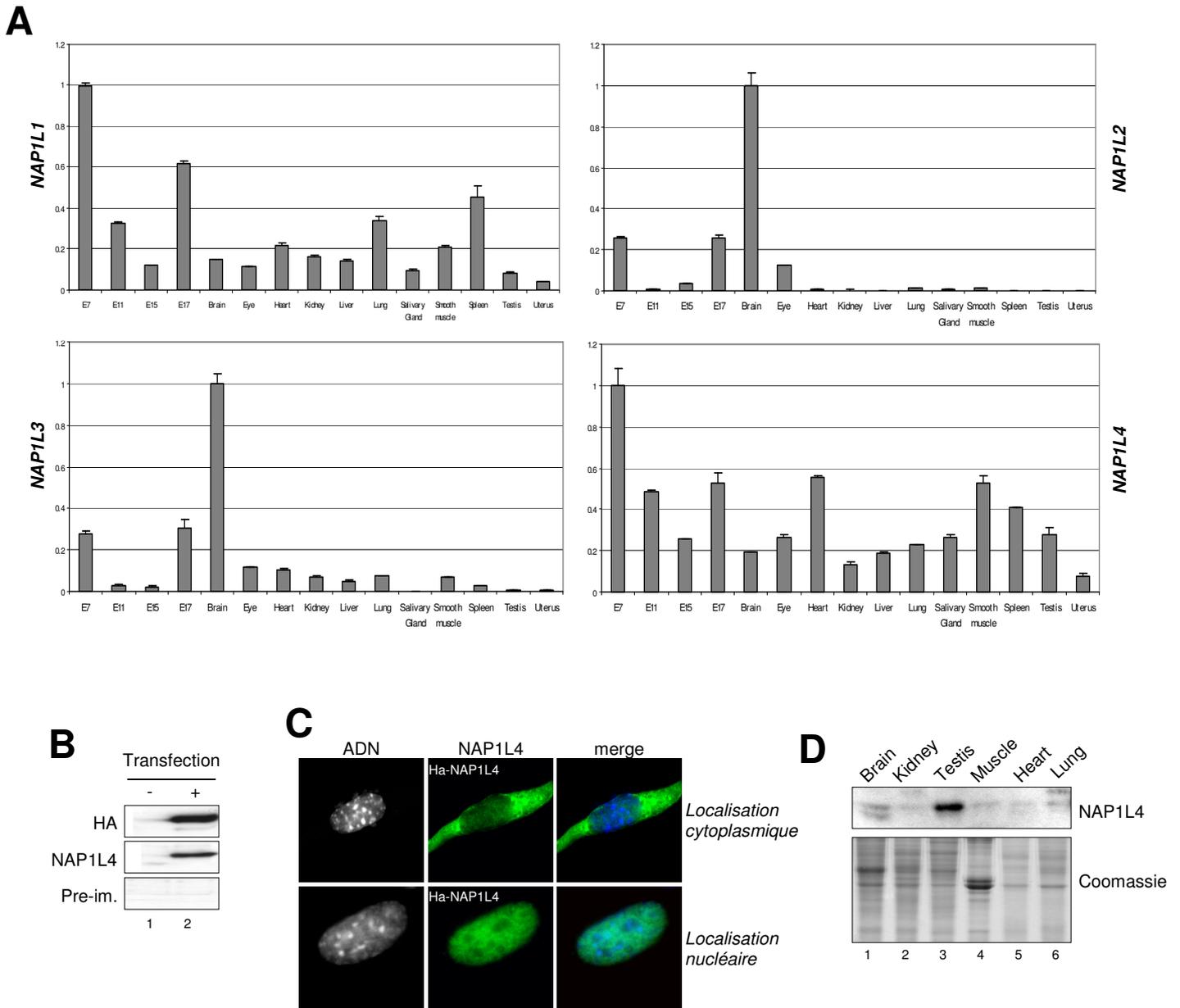


Figure 26. Caractérisation de NAP1L4

A. Profil d'expression des ARNm des NAP murines. 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, oeil, coeur, 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.

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. Immunofluorescence de NAP1L4 transfecté dans les cellules somatiques. La protéine NAP1L4 est transfectée dans les cellules somatiques de souris 3T3 Blab et détectée par l'anticorps NAP1L4. La protéine est présente selon les cellules parfois dans le noyau, parfois dans le cytoplasme.

D. NAP1L4 est enrichi dans les testicules. La protéine NAP1L4 a été détectée sur une sélection de tissus murins (cerveau, rein, testicule, muscle, coeur, poumon), et apparaît très enrichie dans le testicule. Un gel coloré au Coomassie atteste l'égalité des charges.

3. NAP1L4 chaperonne les histones canoniques et les variants d'histones

D'après l'ensemble des propriétés connues de NAP1 qui était capable d'échanger des variants d'histones, nous avons voulu déterminer si NAP1L4 était capable de chaperonner les nouveaux variants d'histones identifiés ci-dessus, afin de les incorporer au génome dans les spermatides de stade tardif.

Pour cela, une immunoprécipitation de NAP1L4 sur un extrait testiculaire total a été réalisée et les protéines co-immunoprécipitées ont été identifiées par spectrométrie de masse (figure 27 B).

Les histones classiques H2A et H2B ont été retrouvées, mais également les variants TH2B et H2AL2. L'expression de H2AL2 étant restreinte aux derniers stades de la spermatogénèse, nous avons voulu confirmer l'interaction entre NAP1L4 et H2AL2 dans des spermatides allongées de stade 12 à 16. Un western blot confirme bien que H2AL2 co-immunoprécipite avec NAP1L4 dans les spermatides de stade tardif (Figure 27 C).

Il était alors très tentant de penser que H2AL2 et TH2B pourrait être chaperonnées par NAP1L4 et ciblées au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique pour y être incorporés. Pour cela, nous avons tenté une étude fonctionnelle de cette protéine dans les cellules somatiques. En effet, les cellules germinales ne peuvent être cultivées et il nous fallait un modèle d'étude. Nous avons utilisé des fibroblastes murins, les 3T3 BalbC, car l'hétérochromatine péricentromérique y est facilement repérable par coloration de l'ADN au DAPI, et elles contiennent NAP1L4 endogène, comme nous l'avons vérifié par western blot et immunofluorescence. Si l'on transfecte dans ces cellules un vecteur codant pour H2AL2, celui-ci va se localiser sur l'hétérochromatine péricentromérique (résultats non montrés), indiquant que ces cellules possèdent bien la machinerie cellulaire permettant le ciblage spécifique du variant à l'hétérochromatine. Nous avons ensuite essayé de bloquer l'expression de NAP1L4 par siRNA, afin de regarder si elle était nécessaire à la localisation de H2AL2 au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique. Malheureusement, aucun SiRNA testé n'a réussi à réduire significativement l'expression de NAP1L4.

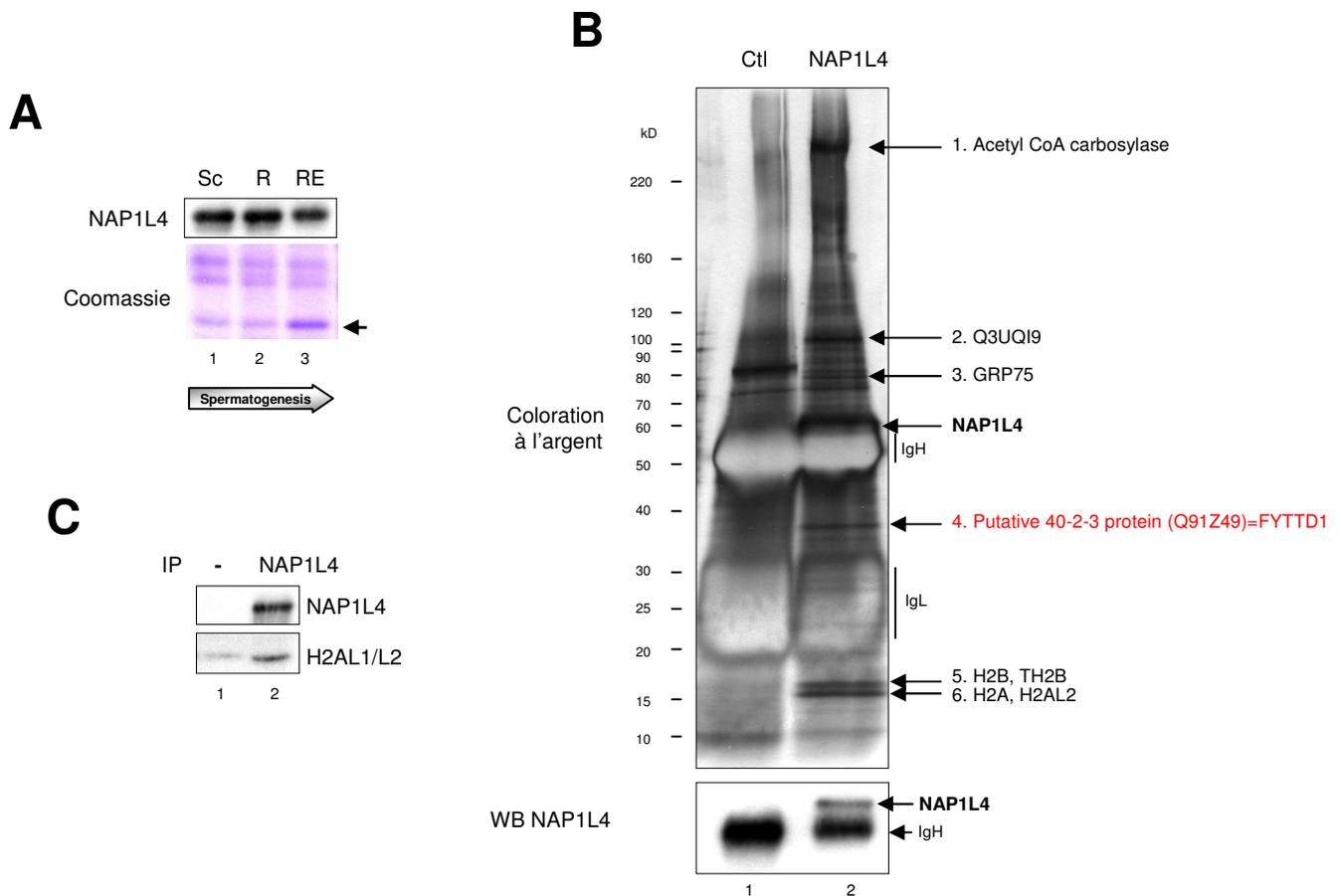


Figure 27. Caractérisation de NAP1L4 au cours de la spermatogénèse

A. 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).

B. Identification des protéines associées à NAP1L4. Le complexe NAP1L4 a été purifié à partir d'extraits cytosolubles de testicule entier. Les partenaires spécifiques sont montrés par gel SDS PAGE coloré à l'argent puis identifiés par spectrométrie de masse. La détection de NAP1L4 par western blot valide la spécificité des purifications. (Ctl, anticorps contrôle isotypique (lapin)). On retrouve dans les protéines identifiées la protéine FYTTD1.

C. Confirmation des variants d'histones associés à NAP1L4. Le complexe NAP1L4 a été purifié dans des spermatides condensées de type 12-16. NAP1L4 interagit spécifiquement avec le variant d'histone H2AL2.

Ainsi, la chaperonne NAP1L4 est associée avec les variants TH2B et H2AL2 dans les spermatides condensées, au moment des dernières étapes de réorganisation de la chromatine, et pourrait, étant donné les rôles connus des NAP, participer à la mise en place de ces variants.

4. NAP1L4 lie spécifiquement la queue N-terminale de l'histone H3

Suite à ce résultat et vu que les variants H2AL2 et TH2B sont incorporés spécifiquement au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique dans les stades tardifs de la spermatogénèse, nous avons recherché si NAP1L4 pourrait directement reconnaître les marques de l'hétérochromatine péricentromérique, afin d'y déposer spécifiquement ces variants. En effet, il était tentant de penser qu'une information épigénétique particulière de cette région pouvait être le signal de recrutement de NAP1L4 au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique.

Des données de la littérature montrent que NAP1 interagit avec les queues N-terminales des histones H3 et H4 (McBryant et al., 2003). Les queues N-terminales des histones étant le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles, ces dernières pourraient ainsi moduler l'interaction avec les chaperonnes d'histones. Or l'hétérochromatine péricentromérique montre un code histone tout à fait particulier. En effet, les nucléosomes présents dans l'hétérochromatine péricentromérique somatique montrent une hypoacétylation associée à des modifications post-traductionnelles spécifiques telles que H3K9me3 (établie par Suv39h1 et Suv39h2), H4K20me3 (établie par Suv4-20h1 et Suv4-20h2) et H3K27me1, ainsi que la présence de la protéine HP1 (Martens et al., 2005; Peters et al., 2003; Schotta et al., 2004).

Au cours de la spermiogénèse, les marques somatiques de l'hétérochromatine péricentromériques vont progressivement disparaître. En effet, durant l'élongation des spermatides, l'histone H4ac va progressivement envahir cette zone, induisant le départ de la protéine HP1. Un état particulier transitoire de cette région se met alors en place, avec la coexistence de H3K9me3 et de H4ac (Govin, Escoffier et al., 2007). Puis toutes ces modifications vont disparaître dans le stade des spermatides condensées.

Afin de mettre en évidence une interaction entre les queues N-terminales des histones et NAP1L4, nous avons utilisé des expériences de pull down. Des peptides biotinylés représentant les queues N-terminales des quatre histones de cœur sont fixés à des billes

d'agarose couplés à la streptavidine. L'étude des protéines restant fixées sur ces peptides se fait alors ensuite par western blot.

Avant de commencer, il a fallu contrôler que tous les peptides étaient bien biotinylés et qu'ils interagissaient donc tous bien avec la streptavidine fixée sur les billes. Pour cela, nous avons analysé par spectrométrie de masse (Seldi-Tof) la masse molaire de tous les peptides utilisés (Figure 28 A et B). Connaissant la masse molaire de chaque peptide ainsi que celle de la biotine, il nous était facile de voir si le pic du peptide biotinylé était supérieur à celui du non biotinylé. Ainsi, pour chacun des peptides, le pic du peptide biotinylé est plus haut que celui du peptide non biotinylé, ce qui indique que la biotinylation pour chaque peptide est bien efficace.

Afin de déterminer avec quelle histone NAP1L4 interagit, nous avons réalisé les expériences de pull down avec des peptides correspondant aux queues N-terminales des quatre histones de coeur. De plus, comme les histones subissent une vague d'acétylation au cours de la spermiogénèse, nous avons voulu savoir si l'acétylation des lysines des queues N-terminales des histones modifiait l'interaction avec NAP1L4. Un extrait testiculaire total a été incubé en présence de ces peptides acétylés ou non, et l'interaction de NAP1L4 a été analysée par western blot. Ce dernier montre que NAP1L4 interagit uniquement avec la queue de l'histone H3, lorsque celle-ci n'est pas acétylée (Figure 29 B).

Ainsi, NAP1L4 interagit avec l'histone H3, au niveau de sa queue N-terminale non acétylée.

Nous avons ensuite voulu établir plus précisément la zone d'interaction de NAP1L4 sur la queue N-terminale de l'histone H3, en utilisant des peptides de différentes longueurs (Figure 29 A). De plus, afin d'évaluer si l'interaction est directe ou médiée par un facteur testiculaire, nous avons également utilisé une protéine NAP1L4 traduite in-vitro (TIV) en lysat de réticulocytes (TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems, Promega). NAP1L4 TIV interagit avec les peptides représentant les acides aminés 1-21 et 1-29 (Figure 29 C). Comme elle n'interagit pas du tout avec le peptide représentant les acides aminés 1-20, il semblerait que l'acide aminé 21 soit important. De même, la partie 21-29 n'est à elle seule pas suffisante pour l'interaction, car NAP1L4 TIV n'interagit pas avec le peptide représentant les acides aminés 21-44.

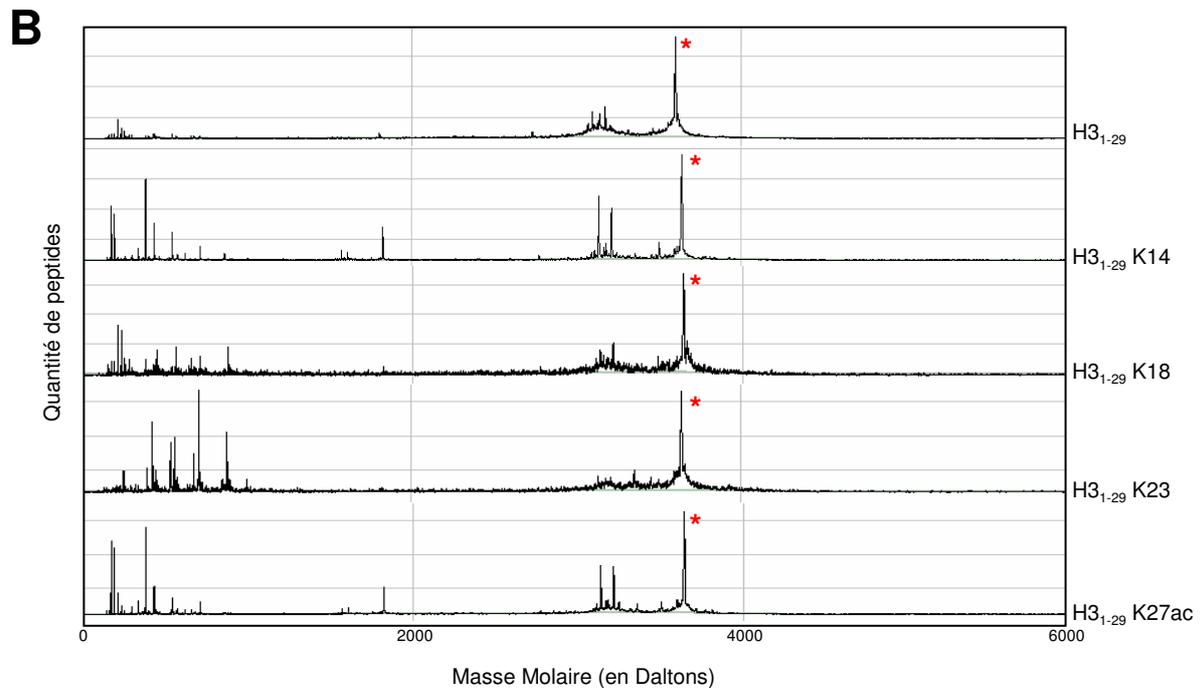
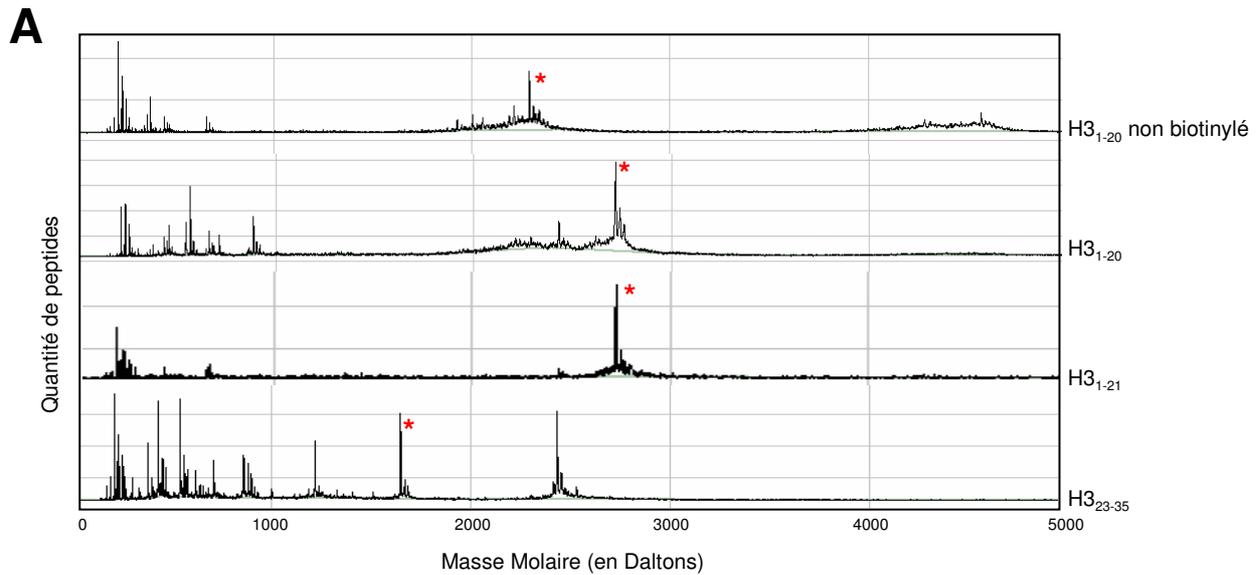


Figure 28. Test de biotinylation des peptides H3

A. La biotinylation des peptides H3 de différentes tailles est efficace. La biotinylation des peptides H3 de différentes taille a été testée par spectrométrie de masse Seldi-Tof. Les graphiques représentent la quantité de peptides en fonction de leur masse molaire en Daltons. Pour chaque peptide, le pic de peptide biotinylé est le plus haut (*), ce qui indique que la biotinylation a bien marché.

B. La biotinylation des peptides H3 1-29 modifiés est efficace. Chaque peptide 1-29 modifié sur une lysine est testé. Pour chaque peptide, le pic de peptide biotinylé est le plus haut (*), ce qui indique que la biotinylation a bien marché.

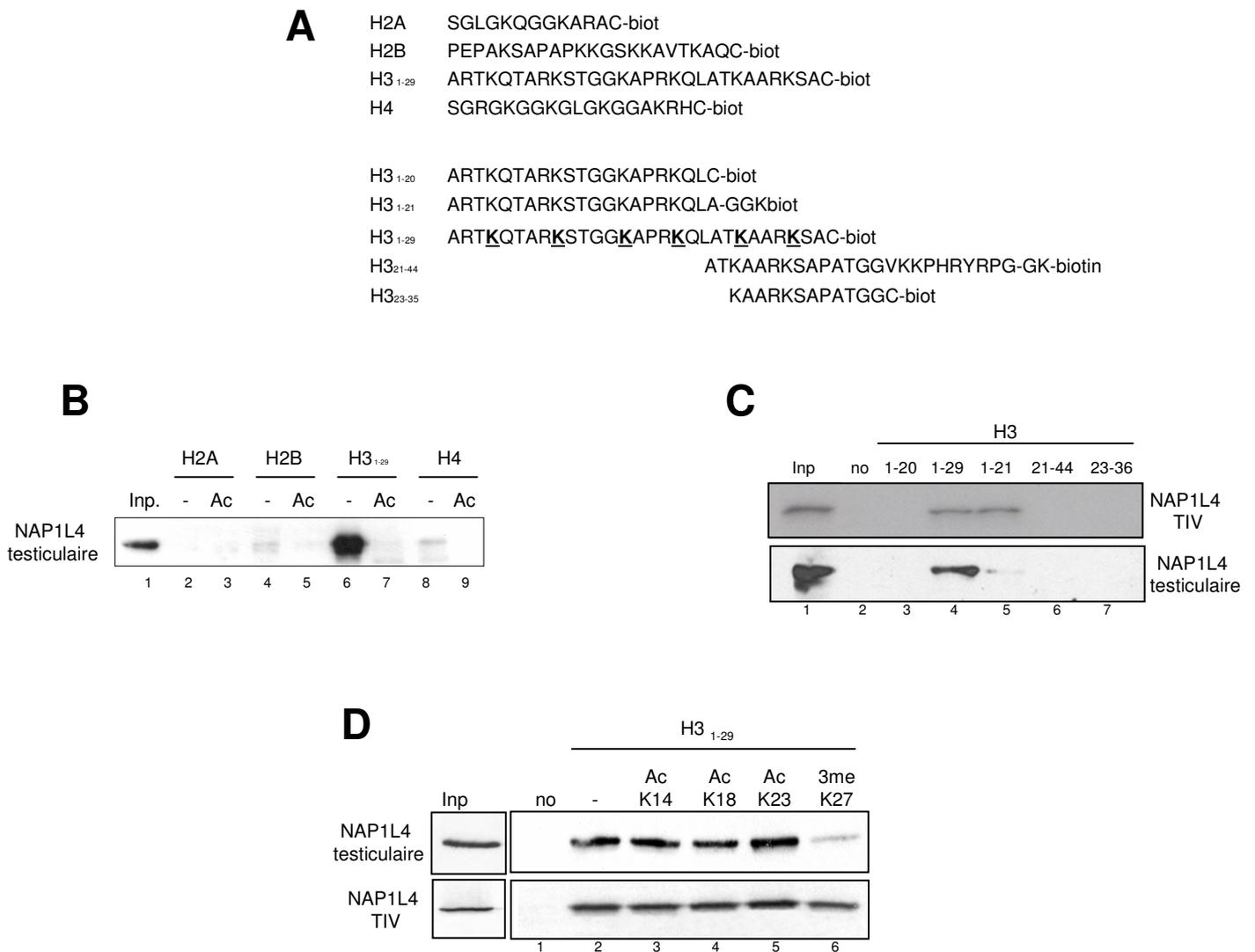


Figure 29. L'interaction de NAP1L4 sur les queues N-terminales des histones

A. Séquence des peptides utilisés. Les queues N-terminales des quatre histones de cœur, ainsi que les peptides de différentes tailles de H3 sont biotinyllées (biot, biotine) puis crosslinkés à des billes d'agarose *via* leur résidu cystéine. Les peptides H3 1-21, 1-29 et 21-44 sont achetés déjà biotinyllés.

B. NAP1L4 reconnaît H3 non acétylés sur toutes les lysines. Des pull downs ont été réalisés sur des extraits de testicule entier, avec les queues N terminales de quatre histones de cœur, acétylées sur toutes les lysines (Ac) ou non (-). NAP1L4 issu d'un extrait testiculaire ne fixe plus la queue N-terminales de H3 lorsque celle-ci est acétylé sur ses lysines.

C. NAP1L4 reconnaît différemment la zone 1-29. NAP1L4 traduit in-vitro (NAP1L4 TIV) lie de la même façon les peptides 1-21 et 1-29. NAP1L4 issu d'un extrait testiculaire lie de manière beaucoup moins forte le peptide 1-21.

D. NAP1L4 lie moins la zone 1-29 quand celle-ci est triméthylée sur la lysine 27. NAP1L4 traduit in-vitro lie de la même façon les peptides 1-29 modifiés. NAP1L4 issu d'un extrait testiculaire lie de manière beaucoup moins forte le peptide 1-29 tri-méthylé sur la lysine 27.

Nous avons voulu confirmer ces résultats en réitérant exactement la même expérience mais avec NAP1L4 issu un extrait testiculaire total. A notre grande surprise, nous n'avons pas obtenu les mêmes résultats. NAP1L4 issu d'un extrait testiculaire total interagit avec le peptide représentant les acides aminés 1-29, mais interagit beaucoup moins bien avec le peptide représentant les acides 1-21 (Figure 29 C). La zone 21-29 semblerait donc importante pour la fixation *in vivo* de NAP1L4 sur la queue N-terminale de l'histone H3, mais cette dernière seule ne serait pas suffisante car NAP1L4 n'intéragit pas avec le peptide 21-44.

Ainsi, NAP1L4 produite *in vitro* intéragit seulement avec la partie 1-21 de la queue N-terminale de l'histone H3, tandis que pour celle présente dans un extrait testiculaire, la fixation requiert la présence de la partie 21-29. Il est donc probable que des facteurs testiculaires présents dans l'extrait inhibent l'interaction de Nap1L4 avec la partie 1-21 (peut-être par simple compétition), mais permettent une interaction forte avec la partie 21-29.

Une acétylation de la totalité des lysines de la queue N-terminale de H3 abolit l'interaction de NAP1L4, mais nous avons voulu déterminer si c'était le cas avec des acétylations individuelles de chacune des lysines de la zone 1-29. De plus, cette zone contient la lysine K27 qui est spécifiquement triméthylée au sein de l'hétérochromatine péricentromérique. La fixation de NAP1L4 TIV sur les peptides 1-29 acétylés sur les lysines K14, K18 ou K23 ou triméthylés sur K27 est identique à celle obtenue sur un peptide 1-29 non modifié (Figure 29 D). En revanche, *in vivo*, la triméthylation de la lysine K27 diminue fortement cette interaction.

Ainsi, la modification individuelle des résidus lysines de la queue N-terminale de l'histone H3 ne modifie pas l'interaction de NAP1L4 produite *in vitro* tandis que la triméthylation de la lysine K27 abolit l'interaction de NAP1L4 présente dans les extraits testiculaires.

5. Conclusion

Ces résultats préliminaires semblent indiquer une régulation possible de l'interaction de NAP1L4 avec la chromatine dépendant des modifications post-traductionnelles des histones, et de facteurs testiculaires auxquels elle pourrait être associée. Pour pouvoir l'affirmer, des études plus complètes devraient cependant être menées, par exemple avec des peptides portant d'autres modifications post-traductionnelles de l'hétérochromatine comme H3K9me3, ou

H4K20me, pour voir si ces marques stimulent le recrutement de NAP1L4, médié ou non par des partenaires testiculaires.

B. EXISTE T'IL D'AUTRES PROTEINES BASIQUES SUCEPTIBLES D'ORGANISER DE MANIERE DIFFERENTIELLE LE GENOME SPERMATIQUE ?

En plus des histones, de nombreuses petites protéines basiques non histones sont associées à la chromatine afin de réguler l'activité chromatinienne. Des protéines de ce type, spécifiques ou non du testicule, pourraient également participer à la réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogenèse, et éventuellement marquer des régions spécifiques du génome mâle, comme nous l'avons montré pour H2AL1/L2.

Afin d'identifier de telles protéines, des analyses par spectrométrie de masse des protéines présentes dans les cellules germinales mâles ont été effectuées.

Deux approches, détaillées dans les paragraphes suivants, ont été utilisées, aboutissant à l'identification et la caractérisation de deux protéines basiques différentes.

I. La protéine FYTTD1

Au cours de la spermatogénèse, de nombreuses protéines sont impliquées dans l'enlèvement des histones et leur remplacement par les protéines de transition et les protamines. Nous avons précédemment identifié la protéine NAP1L4 comme faisant partie de ces protéines, chaperonnant les variants d'histones H2AL2 et TH2B.

Or, suite à nos travaux sur ces variants, nous recherchions des protéines testiculaires qui pourraient, avec H2AL2 et TH2B, former la petite structure non nucléosomale décrite dans la partie I. Lors de l'immunoprécipitation de NAP1L4 à partir d'un extrait testiculaire total, une protéine d'environ 36 kDa co-précipitait très clairement, en plus du doublet correspondant à H2A/H2B et H2AL1/L2-TH2B. Nous avons pensé que cette protéine pourrait peut-être être co-chaperonnée par NAP1L4 avec les variants d'histones pour former la structure non

nucléosomale. La bande correspondante a donc été découpée, et la protéine identifiée par spectrométrie de masse (Figure 27 B). Il s'agit de la protéine FYTTD1.

Cette protéine nous a semblé intéressante, car c'est une protéine très basique (11.83), d'assez petite taille (35887 Da) et de fonction inconnue. Elle possède ainsi tous les critères pour être une bonne protéine candidate au remodelage de la chromatine au cours de la spermatogénèse. L'étude de FYTTD1 a été un des thèmes d'étude de ma thèse. J'ai ainsi réalisé moi-même l'ensemble des travaux portant sur l'étude de cette protéine.

1. Caractérisation

FYTTD1 fait partie d'une famille de protéines d'environ 320 acides aminés nommées protéines 40-2-3. La fonction de ces protéines est totalement inconnue.

Chez l'homme, le gène (localisé sur le chromosome 3) donne naissance à deux transcrits, qui codent pour deux isoformes de la protéine (Figure 30 A).

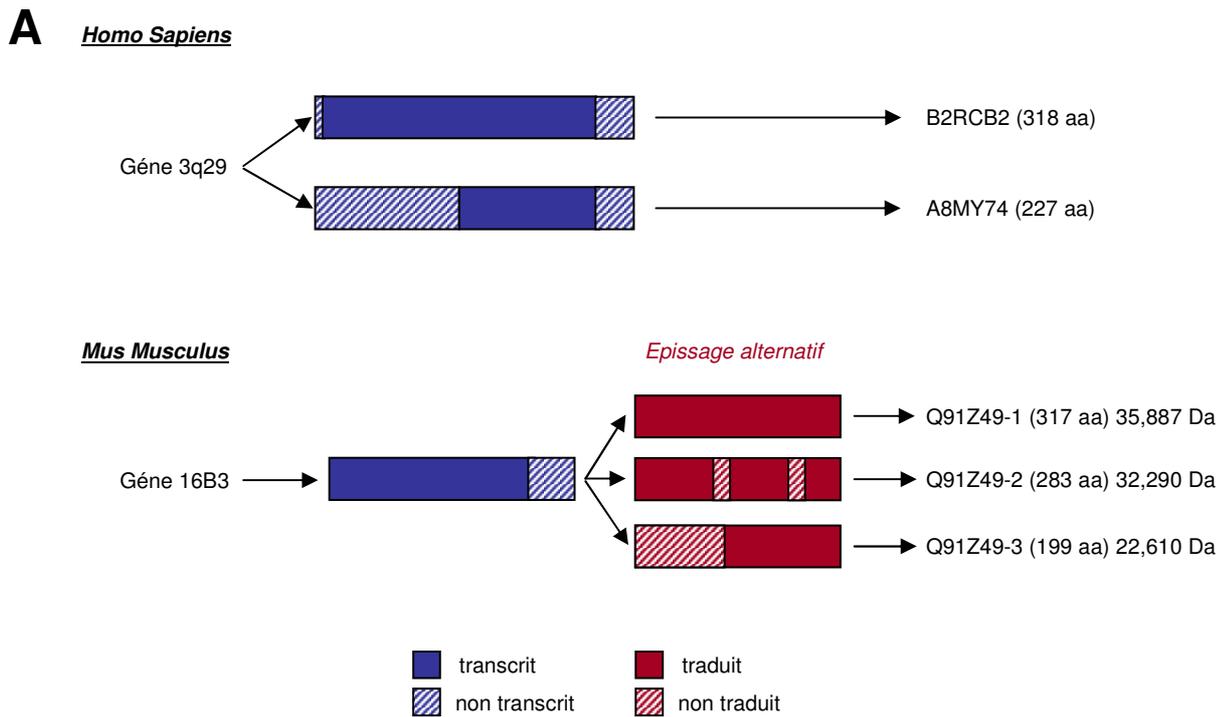
Chez la souris, le gène (localisé sur le chromosome 3) code pour un ARNm, qui va subir un épissage alternatif afin de donner trois variants d'épissage.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la forme murine entière, soit la protéine de 317 acides aminés.

Nous avons dans un premier temps voulu confirmer l'interaction de FYTTD1 avec NAP1L4 et tester son interaction avec les autres membres de la famille des NAP. Nous avons donc réalisé une immunoprécipitation de FYTTD1 exprimé transitoirement dans des cellules somatiques et nous avons regardé par western blot si les membres de la famille des NAP co-immunoprécipitaient (Figure 30 B). Le western blot confirme bien l'interaction entre NAP1L4 et FYTTD1, mais montre également que FYTTD1 interagit aussi avec NAP1L2.

2. FYTTD1 est enrichi dans les spermatocytes

Une recherche dans une banque de données transcriptomiques (Symatlas) nous montre que le gène murin FYTTD1 est spécifiquement transcrit dans le testicule par rapport à d'autres tissus (Figure 31 A).



B

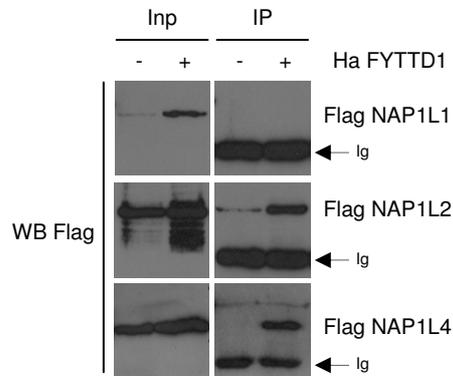


Figure 30. Caractérisation de FYTTD1

A. Schématisation de la transcription et de la traduction des gènes FYTTD1 humains et murins. Chez l'homme, le gène est transcrit en deux ARNm distincts qui codent pour 2 isoformes. Chez la souris, le gène est transcrit en un ARNm, qui va subir un épissage alternatif afin de donner naissance à 3 ARNm différents, qui vont coder pour 3 protéines différentes.

B. FYTTD1 interagit avec NAP1L2 et NAP1L4. La protéine FYTTD1 fusionnée avec le tag Ha est transfectée transitoirement dans des cellules cos en présence de NAP1L1, 2 ou 4 taguées Flag. Une immunoprécipitation anti Ha est ensuite réalisée et un western Blot anti-flag montre ou non l'interaction de FYTTD1 avec les NAP. (-, contrôle sans transfection; +, transfection Ha-FYTTD1)

Afin de valider ces résultats, nous avons testé par RT-qPCR l'expression de FYTTD1 dans différents tissus. Des amorces spécifiques du gène ont été construites et validées. Le graphique nous confirme que FYTTD1 est bien enrichi dans le testicule (Figure 31 B).

Nous avons ensuite caractérisé plus précisément le profil d'expression de FYTTD1 au cours de la spermatogénèse. Pour cela, nous avons testé son expression par RT-qPCR dans des cellules germinales à différents stades. Les résultats montrent que FYTTD1 semble s'exprimer majoritairement dans le stade méiotique, c'est-à-dire dans les spermatocytes (Figure 32 A).

Un anticorps anti FYTTD1 a été développé et purifié afin de préciser l'expression et étudier le rôle de cette protéine au cours de la spermatogénèse. La spécificité de cet anticorps a été testée sur des cellules Cos exprimant (par transfection transitoire) la protéine FYTTD1 étiquetée avec un tag Ha (Figure 32 B).

Le profil d'expression de FYTTD1 au cours de la spermatogénèse a ainsi pu être caractérisé par western blot et ce dernier confirme bien les données de RT-qPCR, à savoir que FYTTD1 est enrichi dans les spermatocytes et que son expression diminue dans les spermatides rondes pour disparaître dans les spermatides condensées (Figure 32 C).

Enfin, la localisation de la protéine FYTTD1 a été étudiée par immunofluorescence sur cellules germinales. Les images montrent bien un enrichissement de la protéine dans les cellules au stade spermatocyte (Sc) puis une diminution de son expression dans les spermatides rondes (R) pour ensuite quasiment disparaître dans les spermatides allongées (E) (Figure 32 D).

3. FYTTD1 ne colocalise pas avec l'hétérochromatine péricentromérique

FYTTD1 ne semble pas présent dans les stades tardifs de la spermatogénèse.. Ceci n'est donc pas en accord avec un rôle hypothétique dans la formation de la structure non nucléosomale formée en spermiogénèse tardive par les variants d'histone H2AL1/L2.

Néanmoins, comme nous avons identifié FYTTD1 en co-immunoprécipitation avec la chaperonne NAP1L4, qui interagit également avec les variants d'histones et qui pourrait les incorporer au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique, nous nous sommes demandé si

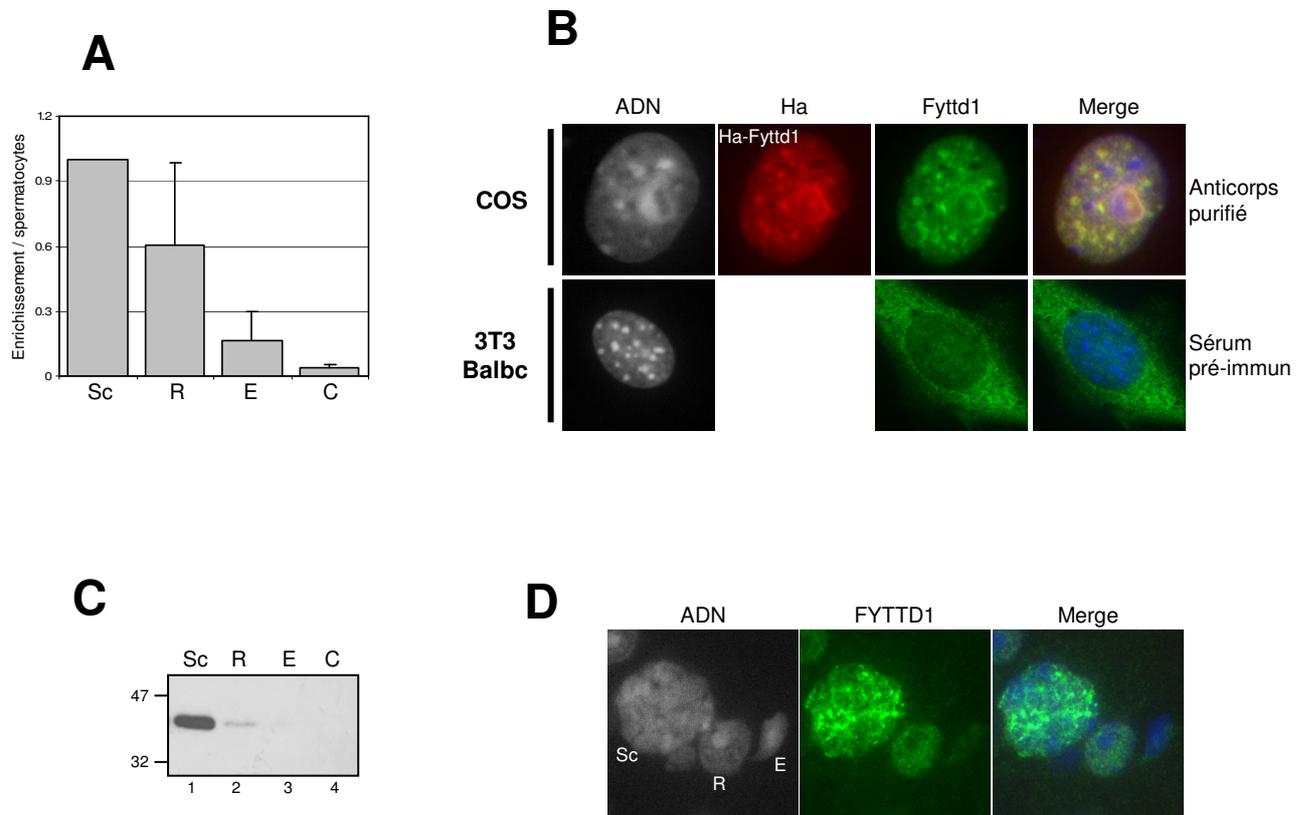


Figure 32. Profil d'expression de FYTTD1 au cours de la spermatogénèse

A. Profil d'expression de des ARNm de FYTTD1 murin par qPCR. Le graphique montre l'enrichissement de l'ADNc de FYTTD1 dans chaque fraction de cellules germinales à différents stades (Sc, spermatoocytes; R, spermatoïdes rondes; E, spermatoïdes allongées; C, spermatoïdes condensées) par rapport aux spermatoocytes pachytènes (Sc). La quantité d'ADNc a été normalisée par rapport à GAPDH, puis exprimée en unité arbitraire, 1 correspondant au taux détecté dans les spermatoocytes.

B. Validation de l'anticorps développé. L'anticorps reconnaît HA-FYTTD1 transfecté transitoirement dans des cellules somatiques, alors que le sérum pré-immun ne reconnaît rien. La spécificité de la réaction est contrôlée par une détection de l'étiquette HA.

C. 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 spermatoocytes (Sc), spermatoïdes rondes (R), spermatoïdes allongées (E) et spermatoïdes condensées (C). La protéine FYTTD1 est enrichie dans la fraction enrichie en spermatoocytes.

D. Immunofluorescence sur cellules germinales. La localisation de la protéine FYTTD1 dans les cellules germinales a été étudiée sur cellules germinales totale. La coloration de l'ADN montre sur l'image la présence d'un spermatoocyte (Sc), une spermatoïde ronde (R) et une spermatoïde allongée (E). La protéine est présente majoritairement dans le spermatoocyte.

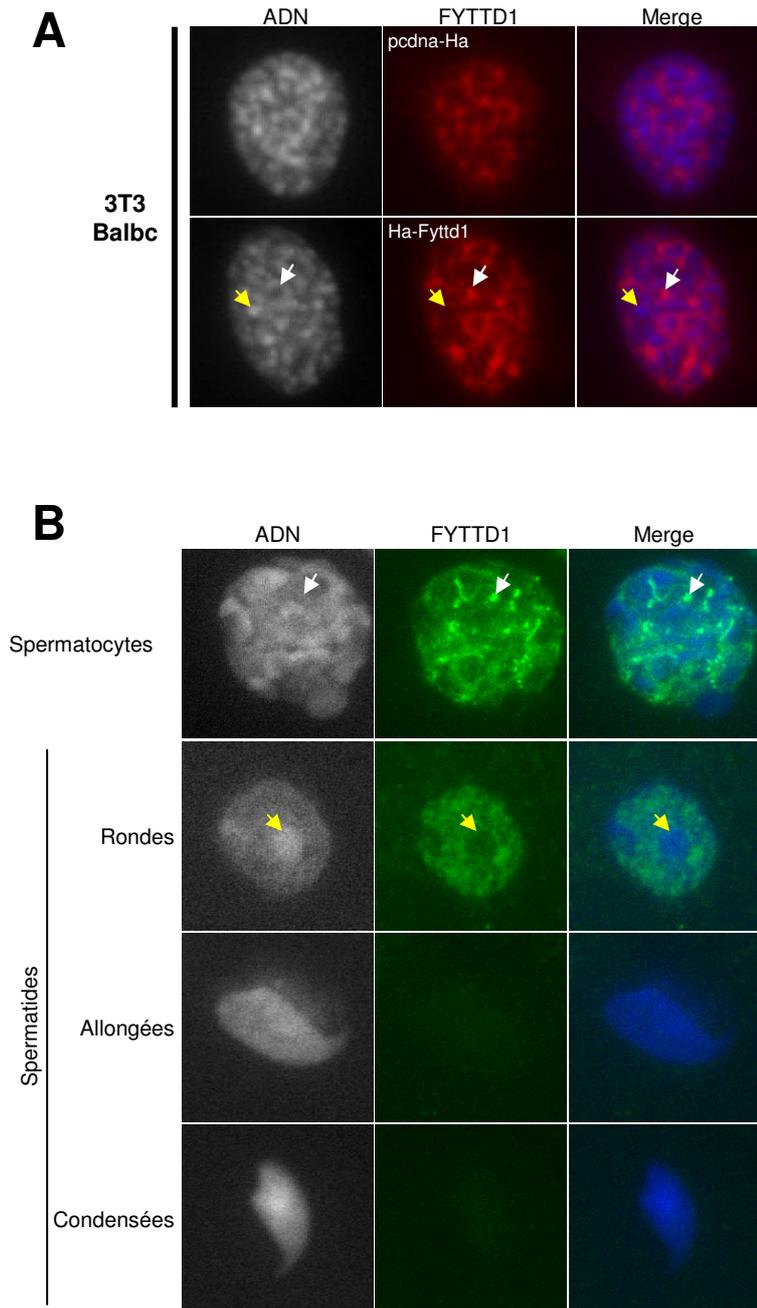


Figure 33. Localisation de FYTTD1 au sein des cellules

A. Localisation de FYTTD1 dans les cellules somatiques. La localisation de FYTTD1 endogène (pcdna-Ha) ou transfecté transitoirement (Ha-Fytd1) a été étudiée dans les cellules murines 3T3 Balbc par immunofluorescence. La protéine ne se localise pas au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique (flèche jaune), mais se relocalise au niveau d'autres foyers (flèche blanche).

B. Localisation de FYTTD1 dans les cellules germinales mâles. La présence de FYTTD1 uniquement dans les spermatocytes et les spermatides rondes est confirmée. FYTTD1 ne se localise pas au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique, bien visible dans les spermatides rondes sous la forme du chromocentre (flèche jaune), mais forme des foyers dans les spermatides (flèche blanche).

NAP1L4 pouvait avoir le même rôle sur FYTTD1, et si cette dernière se localisait au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique.

Nous avons donc étudié la localisation de FYTTD1 dans des cellules somatiques murines 3T3 BalbC, transfectées ou non avec FYTTD1 tagguée Ha. Nous avons utilisé des lignées cellulaires afin de pouvoir étudier la protéine transfectée, les cellules germinales n'étant pas cultivables ni transfectables. De plus, cette lignée de cellules montre des foyers d'hétérochromatine péricentromérique et exprime la protéine FYTTD1 de manière endogène. Nous pouvons observer que la protéine ne se localise pas au niveau de ces zones denses en ADN (flèche jaune) et semble même exclue de ces foyers d'hétérochromatine péricentromérique (flèche blanche) (Figure 33 A). Au niveau des cellules germinales, FYTTD1 se localise de manière identique, c'est-à-dire en dehors des zones d'hétérochromatine péricentromérique, bien visible dans les spermatides rondes (Figure 33 B).

4. FYTTD1 colocalise avec les speckles du spliceosome

La localisation de FYTTD1 dans les cellules germinales n'est pas uniforme. En effet, en immunofluorescence sur cellules somatiques ou cellules germinales, on peut remarquer que la protéine forme des foyers. Ce profil très particulier nous a fait penser au profil de localisation que forment les protéines présentes dans le spliceosome, « les speckles ».

Afin d'étudier une colocalisation entre notre protéine et celles du spliceosome, nous avons détecté par immunofluorescence FYTTD1 transfectée ou non ainsi qu'une protéine connue pour être présente au sein du spliceosome, la protéine SC35 (Fu and Maniatis, 1992) (Figure 34). Cette expérience a été réalisée en parallèle sur deux lignées de cellules (Cos et 3T3 BalbC), ces deux lignées exprimant les protéines FYTTD1 et SC35 de manière endogène.

On observe bien une parfaite colocalisation entre ces deux protéines, confirmant bien une colocalisation entre FYTTD1 et le spliceosome.

5. Conclusion

Ce travail a permis d'initier la caractérisation d'une nouvelle protéine basique, FYTTD1, identifiée par spectrométrie associée à NAP1L4. Nous n'avons pu mettre en évidence une

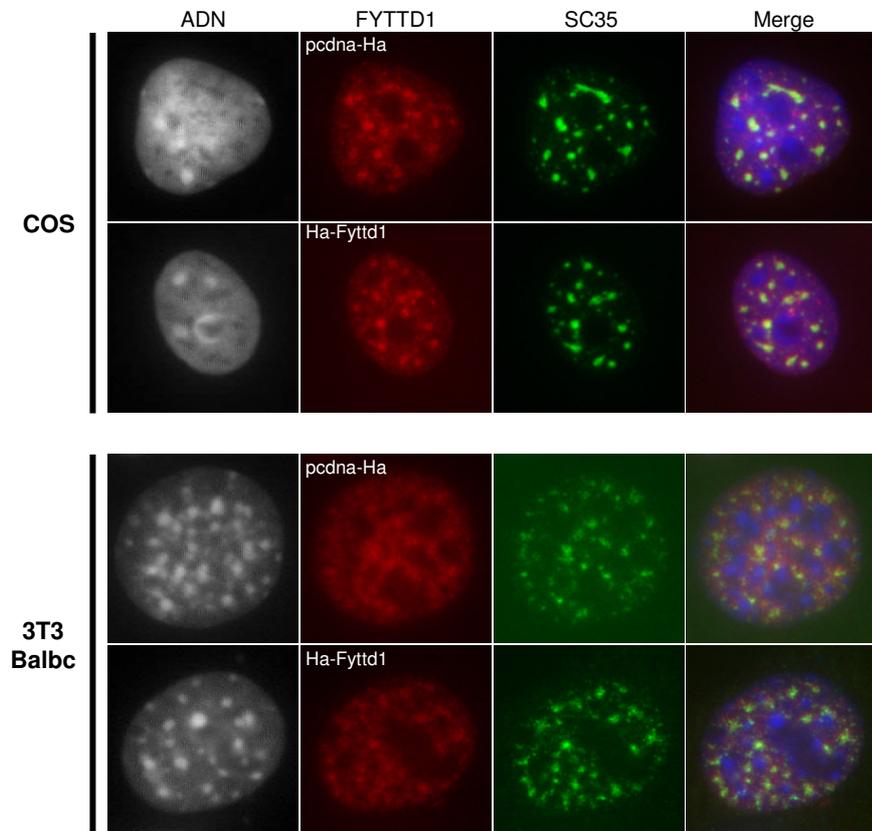


Figure 34. FYTTD1 colocalise avec les speckles du spliceosome

La colocalisation de FYTTD1 avec les speckles du spliceosome a été étudiée par immunofluorescence sur des cellules somatiques Cos et 3T3 BalbC. L'anticorps dirigé contre FYTTD1 a été utilisé pour détecter soit la protéine endogène (pcdna-Ha), soit la protéine transfectée transitoirement (Ha-Fytd1). Un anticorps reconnaissant la protéine SC35 spécifique du spliceosome a également été utilisé.

association de FYTDD1 avec les variants d'histone H2AL1/L2 chaperonnés également par NAP1L4, et nos résultats ne sont pas en faveur d'un rôle de cette protéine dans l'organisation de régions particulières du génome au cours de la spermiogenèse tardive. En revanche, nos résultats suggèrent un rôle de FYTDD1 dans l'épissage et à la maturation des ARN au niveau du spliceosome, ce qui est en accord avec le très fort épissage différentiel qui est connu pour avoir lieu dans les cellules germinales où FYTDD1 s'exprime.

II. La protéine HMGB4

L'utilisation de la spectrométrie de masse pour identifier des protéines interagissant avec des chaperonnes d'histones n'a pas donné les résultats escomptés. Afin d'augmenter nos chances d'identifier des protéines basiques jouant un rôle dans la spermiogenèse tardive, nous avons décidé de nous focaliser sur les protéines identifiées par spectrométrie de masse à partir d'un extrait acide de spermatides condensées. En effet, par cette technique, seules les protéines basiques présentes dans ces cellules sont gardées et identifiées.

L'analyse de l'ensemble de ces cellules est montrée table 7.

Cette approche protéomique nous a permis d'identifier des protéines attendues, telles que les histones conventionnelles, de nombreux variants testiculaires ou non ainsi que les protéines non histones spécifiques du testicule telles que les protamines.

Nous avons également identifié la protéine HMGB4 appartenant à la famille des « High Mobility Group » (Paragraphe *Introduction A. III. 1.*). L'étude de cette protéine a fait l'objet d'une collaboration avec le laboratoire de Irwin Davidson, à Illkirch. En effet, cette équipe a identifié cette protéine après une analyse protéomique des protéines coimmunoprécipitées avec la protéine testiculaire GFT2A1L (aussi connue sous le nom de ALF). L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication parue dans *Biology Of Reproduction* en Novembre 2008. Mon implication personnelle a porté sur la préparation des fibres de chromatine et l'étude de la liaison de HMGB4 au niveau de cette chromatine.

Famille	Description	ID	MW (kDa)	pI	
Chromatine	Core histone				
	H2A.1	P22752	14	10,9	
	H2A.X	P27661	15	10,7	
	H2A.Z	P17317	14	10,6	
	H2AL1	Q9DAD9	12	10,5	
	H2AL2	Q9CQ70	13	11,0	
	H2B	P10853	14	10,3	
	TH2B	P70696	14	10,3,	
	H2BL1	Q9D9Z7	14	10,3	
	H3	AAN10051	15	11,1	
	H3t	NP_003484	15	11,1	
	H4	Q9D0C9	11	11,2	
	Linker				
	H1.1	P43275	22	10,9	
	H1.2	P15864	21	11,0	
	H1.3	P43277	22	11,3	
	H1.4	P43274	52	11,1	
	H1.5	P43276	22	10,9	
	H1°	P10922	21	10,9	
	H1t	Q07133	22	11,7	
	H1t2	Q8CJI4	44	11,7	
	Protéines non histone spécifiques du testicule				
	TP2	P11378	13	11,8	
	Prm2	P07978	14	12,1	
	Protéines "High mobility group"				
	High mobility group protein 1	P63158 or Q8BQ02	25	5,6	
	High mobility group protein 2	P30681 ou Q9CT19 ou Q9EQD5	24 ou 21 ou 21	7 ou 9,9 ou 6,9	
	High mobility group protein 3	O54879	23	8,5	
	High mobility group protein 4	Q6P8W9	22	9,9	
	High mobility group protein	Q924L8	12	10,4	
	Testis specific HMG	P40630	28	9,7	
	Chaperonnes	Chromatine			
		Nucleolin	P09405	77	4,7
		Nucleoplasmin 3	Q9CPP0	19	4,7
		Général			
HSP70.2 (testis specific HSP70)		P17156	70	5,6	
T-complex protein 1, alpha subunit A or B	P11984 or P11983	60	5,76 or 5,82		
T-complex protein 1, gamma subunit	P80318	61	6,3		
Metabolisme	Peroxisredoxin 1 ou 4	P35700 or O08807	22 or 31	8,26 or 6,67	
	L-lactate dehydrogenase C chain, testis subunit	P00342	36	8,4	
	Fatty acid binding protein 9, testis	Q9DAL2	15	7,6	
Traduction	Elongation factor 1-beta	O70251	25	4,5	
	Elongation factor 1-gamma	Q9D8N0	50	6,3	
	Elongation factor 1-alpha 1	P10126	50	9,1	
Divers	ELAV-like protein 1 (RNA binding protein)	P70372	36	9,2	
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	P24369	23	9,5	
	Centromere protein V	Q9CXS4	27	9,9	
	Proteasome subunit alpha type 7 or type 7-like	Q9CWH6 or Q9Z2U0	28	8,81 or 8,59	
	Fau protein (ubiquitin domain)	Q920W8	15	9,9	
	Calmodulin	Q9D6G4	17	4,1	
	Cytochrome c	P62897	11	9,6	
	p15 (RNA polymerase II transcriptional coactivator)	P11031	14	9,6	
	Synaptonemal complex protein 3 (SCP-3)	P70281	29	8,7	
Protéines inconnues	Hypothetical lysine-rich protein	Q8C1R9	9	10,4	
	Hypothetical lysine-rich protein	Q9DA62	13	10,5	
	Hypothetical lysine-rich protein	Q9DAR6	13	11,3	

Table 7. Protéines acido-solubles identifiées par spectrométrie de masse dans les spermatides condensées de stade 12
Les histones canoniques et des variants connus d'histones sont retrouvés. De nouveaux variants d'histones ont été identifiés.

1. Identification

HMGB4 est une protéine de 181 acides aminés, caractérisée par deux domaines HMG, typiquement présents dans les membres de la famille HMGB et montrant une forte similarité de séquence au sein des vertébrés (figure 1 article).

La comparaison des séquences des différentes HMGB montre une divergence de séquence plus importante de HMGB4 par rapport aux autres membres, tels que HMGB1 et 2.

Une autre caractéristique distinctive de HMGB4 par rapport aux autres membres de cette famille est de ne pas posséder de queue N-terminale acide.

Ainsi, HMGB4 est une protéine caractérisée par une séquence divergente de la famille des HMG et ne possédant pas de queue N-terminale, suggérant un rôle particulier à cette protéine.

2. HMGB4 est exprimée dans le testicule et à des stades spécifiques dans les cellules germinales

Afin d'analyser l'expression de HMGB4, une RT-PCR a été effectuée sur différents tissus. L'ARN semble transcrit uniquement dans le cerveau, les reins et très fortement dans le testicule (figure 2 A. article). La présence de la protéine dans le testicule était déjà connue par l'analyse protéomique que nous avons réalisée, mais la production d'un anticorps spécifique à HMGB4 a permis d'analyser plus spécifiquement par western blot la présence de la protéine dans différents tissus (figure 2 B. article). Les données montrent que cette dernière n'est détectable que dans le testicule.

Par la suite, l'étude de l'expression de HMGB4 au cours de la formation des cellules germinales mâles a été analysée. Son expression début au stade des spermatocytes pachytènes. Puis dans les spermatides rondes, HMGB4 est localisé au niveau de l'euchromatine et est même exclu de l'hétérochromatine au cours de la spermiogenèse (figure 3, article). Puis la protéine disparaît dans les spermatides au stade 14.

L'analyse de la localisation et du profil d'expression de HMGB4 montre qu'elle disparaît en immunofluorescence dans les spermatides condensées. Or cette protéine a été identifiée par spectrométrie de masse dans un extrait acido-soluble de spermatides condensées. Ceci peut s'expliquer par le fait que les spermatides utilisées pour cet extrait représentaient les stades 12

à 16. HMGB4 disparaissant vers le stade 14, il est normal que cette protéine ait pu être identifiée en spectrométrie de masse.

L'analyse par qPCR de l'ARNm de HMGB4 au cours de la spermatogénèse montre un enrichissement progressif jusqu'au stade spermatides (Paragraphe Résultats B. III.), tandis que les données d'immunofluorescence indiquent le contraire. Ceci peut correspondre à une plus faible accessibilité de l'anticorps dans les cellules des stades les plus condensés, car des western blot (données non montrées) indiquent la présence de HMGB4 jusque dans les stades les plus tardifs.

3. HMGB4 lie la chromatine avec moins d'affinité que H1t

Afin de déterminer si HMGB4 est liée à la chromatine, une digestion à la nucléase micrococcale a été réalisée sur des extraits testiculaires (figure 2 C. article). Une première fraction contenant les protéines nucléaires solubles et les mononucléosomes a été récoltée, tandis qu'une seconde fraction contenant des fibres de chromatine plus longues de polynucléosomes est extraite dans un deuxième temps.

Un western blot réalisé sur ces deux fractions montre que HMGB4 est présent dans les deux fractions (figure 2 D. article), tandis que les variants d'histone linker H1T et H1T2 sont eux associés uniquement aux longues fibres de chromatine.

De plus, une capture de l'ADN (et donc des protéines associées) sur résine d'hydroxyapatite, avec élution différentielle en sel montre que HMGB4 est élué plus rapidement (donc avec moins de sels) que l'histone linker H1t (figure 2 E. article).

Ainsi, HMGB4 lie la chromatine avec moins d'affinité que l'histone linker H1t, tout comme le variant H1T2.

4. HMGB4 est localisée dans le pôle basal des spermatides en élongation

La distribution de HMGB4 dans les cellules germinales, analysée par immunofluorescence, indique que son expression débute dans les spermatocytes pachytènes puis disparaît dans les spermatides en élongation. Mais étonnamment, au cours de la phase d'élongation des spermatides, HMGB4 se relocalise au niveau du pôle basal de ces cellules, pour ensuite disparaître des spermatides au stade 14 (figure 4, article).

5. La localisation de HMGB4 est liée à la présence de H1T2

Ces résultats ont été corrélés avec ceux obtenus sur H1T2, ce dernier ayant également une localisation polaire, mais au niveau du pôle apical des spermatides rondes et en élongation (Martianov, 2005). Le rôle de H1T2 dans la condensation de la chromatine a été démontré et son invalidation induit des défauts d'allongement des spermatides et une diminution de la fertilité.

Afin de déterminer l'effet de la perte de H1T2 sur HMGB4, la localisation de HMGB4 a été analysée sur des souris H1T2 *-/-*. Dans la moitié des spermatides, l'expression de HMGB4 a été très fortement réduite. De plus, la localisation de la protéine n'est plus restreinte au pôle basal des cellules, mais se retrouve à travers tout le noyau.

L'interrelation entre ces protéines semble essentielle pour le maintien d'une bonne architecture nucléaire au sein des spermatides condensées. L'importance de territoires réorganisés de manière différentielle au sein du noyau des spermatozoïdes semble donc se confirmer par ces travaux. De même, Li et ses collaborateurs ont également démontré récemment que les séquences télomériques se localisaient au niveau d'une étroite zone postérieure dans le noyau des spermatozoïdes humains (Li et al., 2008). Une organisation différentielle de région du génome, dans un état de compaction particulier dû aux propriétés de remodelage différentes des protéines associées serait donc nécessaire aux spermatozoïdes.

6. HMGB4 est un répresseur transcriptionnel

L'effet de HMGB4 sur la transcription a été étudié grâce au système rapporteur Gal4-VP16-CAT. Cette étude a permis de démontrer que, contrairement à HMGB1, HMGB4 agissait comme un répresseur de la transcription.

Le fait qu'il interagisse de manière très forte avec l'ADN est cohérent avec son rôle de répresseur transcriptionnel.

Le fait qu'il soit associé à de la chromatine compactée et transcriptionnellement réprimée suggère un rôle de HMGB4 au cours de la spermatogénèse.

7. Conclusion et présentation de l'article publié

Ces travaux ont ainsi permis d'identifier la protéine HMGB4 qui est exprimée préférentiellement dans les spermatides en élongation où elle se relocalise au niveau du pôle basal. Cette localisation particulière implique une fonction de HMGB4 au cours de la spermiogénèse, tout comme H1T2 qui se localise au niveau du pôle basal et dont le rôle de condensation de la chromatine a été démontré (Martianov, 2005).

Ainsi, HMGB4 jouerait un rôle dans la réorganisation de la chromatine au cours de la spermiogénèse, jusque dans des stades assez tardifs puisque son expression a lieu jusqu'au stade 14 des spermatides en élongation. En revanche, elle ne semble pas présente dans les stades tout à fait terminaux, et ne participerait donc pas à l'organisation finale du génome spermatique.

HMGB4, a Novel Member of the HMGB Family, Is Preferentially Expressed in the Mouse Testis and Localizes to the Basal Pole of Elongating Spermatids¹

Raffaella Catena,³ Emmanuelle Escoffier,⁴ Cécile Caron,⁴ Saadi Khochbin,⁴ Igor Martianov,⁵ and Irwin Davidson^{2,5}

ALMA Consulting Group,³ European Research Project Management, 69338 Lyon, France
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U309,⁴ Institut Albert Bonniot, Unité de Formation et de Recherche (UFR) de Médecine, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche, France
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire,⁵ Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)/INSERM/Université Louis Pasteur, 67404 Illkirch, France

ABSTRACT

We identified HMGB4, a novel member of the HMGB family lacking the acidic tail typically found in this family. HMGB4 is strongly and preferentially expressed in the adult mouse testis and weakly in the brain, but not in many other tissues. HMGB4 associates with chromatin, and in transfection assays, in contrast to HMGB1, it acts as a potent transcriptional repressor. During spermatogenesis, HMGB4 is present in the euchromatin of late pachytene spermatocytes and haploid round spermatids, whereas stronger expression is observed during the elongation phase, where it localizes to the basal pole of the nucleus in a manner mutually exclusive with H1FNT (H1T2) localized at the apical pole. HMGB4 basal localization is lost in H1FNT-mutant spermatids, showing that H1FNT provides a positional cue for organizing chromatin domains within the nucleus. These results show that HMGB4 and H1FNT specify distinct chromatin domains at the apical and basal poles of the elongating spermatid nucleus.

chromatin, gene regulation, haploid cells, HMGB2, H1FNT, polarity, spermatid, spermatogenesis, testis

INTRODUCTION

Mammalian spermatogenesis involves the differentiation of spermatogonia stem cells into spermatocytes and then, through two successive meiotic divisions, into haploid round spermatids. During spermiogenesis, the haploid round spermatids undergo an elongation phase that sculpts them into mature spermatozoa. This entails a major biochemical and morphological restructuring of the germ cell in which the majority of the somatic histones are replaced, first by transition proteins, then protamines packing the DNA into the sperm cell nucleus.

In round spermatids the DNA is organized in a histone-containing chromatin structure that comprises core histone

¹Supported by grants from CNRS, INSERM, the Ministère de la Recherche et de la Technologie, the Association pour la Recherche contre le Cancer, the Ligue Nationale et Départementale Région Alsace contre le Cancer, and European Union research grant HPRN-CT-2002-00261 to I.D. and R.C. I.D. is an Equipe Labellisée by the Ligue.

²Correspondence: FAX: 33 3 88 65 32 01;
e-mail: irwin@titus.u-strasbg.fr

Received: 7 May 2008.

First decision: 6 June 2008.

Accepted: 22 October 2008.

© 2009 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

eISSN: 1259-7268 <http://www.biolreprod.org>

ISSN: 0006-3363

variants, such as HIST1H2BA (also known as testis histone 2B [TH2B]), H2AL1 (H2A-like 1), H2AL2 (H2A-like 2), or H2BL1 (H2B-like 1), or linker histone variants, like HIST1H1T (also known as H1T) and H1FNT (also known as H1T2) [1–3]. (Note that the linker histone variants currently do not have official nomenclature.) Additional observations suggest that the DNA is not homogeneously packed in the spermatozoa and that positional cues exist within the elongating spermatid nucleus. For example, H1FNT localizes to the apical pole of round and elongating spermatids, revealing a polarity in chromatin organization [4]. Similarly, the core histone variants H2AL1 and H2AL2 localize specifically to the heterochromatin, where they heterodimerize preferentially with HIST1H2BA, and telomeres were shown to be enriched in somatic-type core histones and HIST1H2B (H2B) variants [5–9].

In addition to the above, HMGB2 (high-mobility group box 2) is a chromatin-associated protein preferentially expressed in male germ cells [10]. HMGB2 is a member of the high-mobility group (HMG) proteins related to HMGB1 and HMGB3. These proteins are characterized by the presence of two HMG boxes, 80-amino acid domains composed of three alpha-helices that fold into a wedge-shaped domain that binds the minor groove of DNA with little or no sequence specificity, followed by a highly acidic C-terminal tail [11–14]. HMGB proteins act as architectural factors capable of organizing dynamic active chromatin structures and by bending DNA [15, 16]. They can interact directly with nucleosomes, transcription factors, and nucleosome-remodeling machines to promote the global establishment of active and, more rarely, inactive chromatin domains (see, for example [17–20], reviewed in Agresti and Bianchi [16]).

Three members of the family have been characterized. In the adult, HMGB1 is expressed everywhere except in neurons, whereas HMGB2 is expressed in testis and HMGB3 preferentially in lymphoid organs [16]. The generation of knockout mice for these proteins has shown that their functions are partially redundant: *Hmgb1*^{-/-} mice die immediately after birth, whereas *Hmgb2*^{-/-} mice are viable, but male mice have significantly reduced fertility, which is due to germ cell degeneration and immotile spermatozoa [10]. In addition to its role in chromatin, HMGB1 has been shown to exert an endocrine inflammatory function upon release from necrotic cells [21]. *Hmgb3*^{-/-} mice are viable but erythrocythemic [22, 23].

In this study we describe HMGB4, a novel member of the HMGB family, characterized by the absence of the acidic tail that is strongly and preferentially expressed in male germ cells, where it localizes to the basal pole of the elongating spermatid

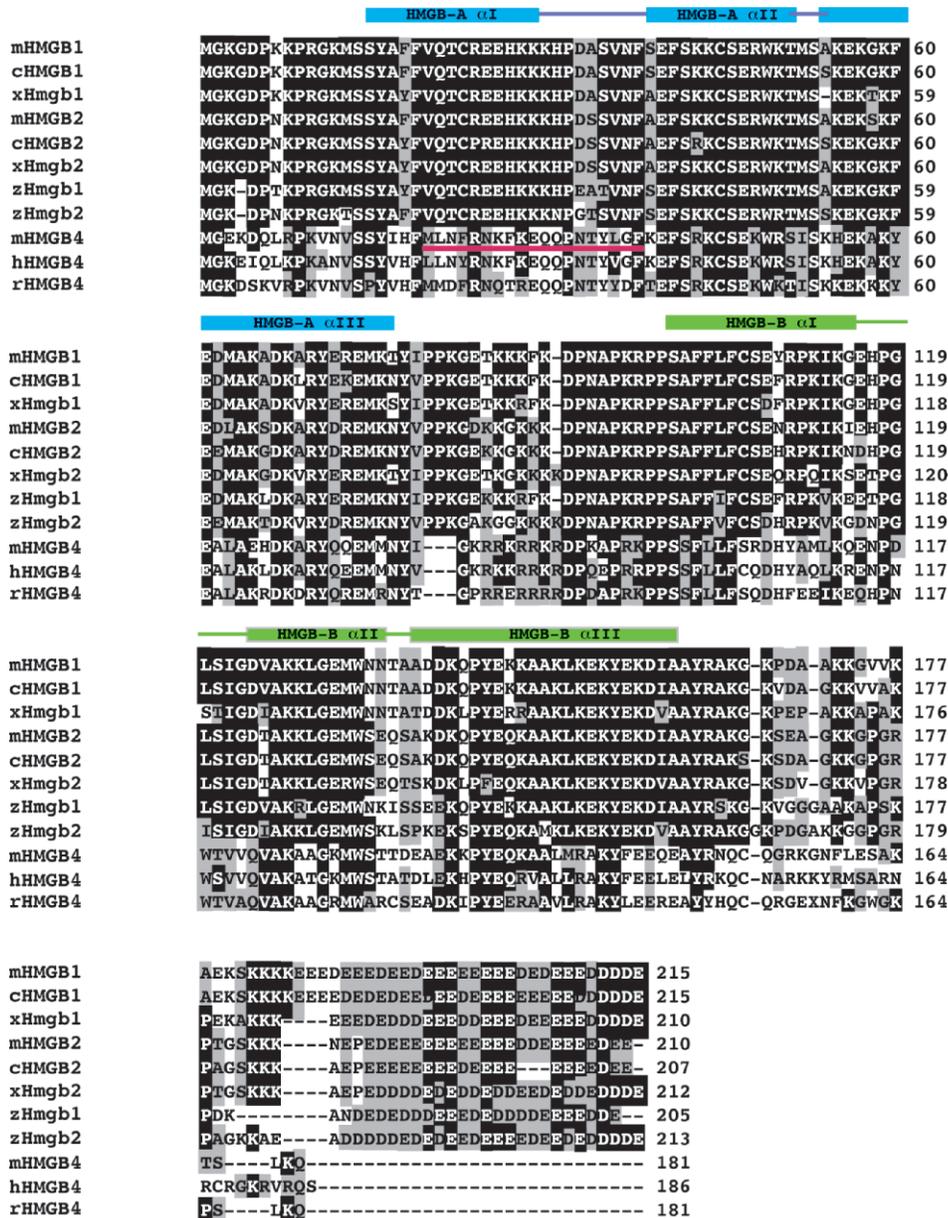


FIG. 1. HMGB4 is a novel member of the HMGB family. Alignment of the sequences of HMGB4 from mouse (m), rat (r), and human (h) HMGB4 with those of HMGB1 and HMGB2 from mouse, chicken (c), zebrafish (z), and *Xenopus* (x). The blue and green boxes indicate the position of the conserved α -helices forming the HMGB-A and HMGB-B boxes. Identical amino acids are shown in white on a black background. Positions with conserved amino acids are boxed in gray. Amino acids were classified as follows: small residues, P, A, G, S, T; hydrophobic, L, I, V, F, M, C, Y, W; polar/acidic, D, E, Q, N; and basic, R, K, H. The peptide used to generate the antibodies is underlined in red.

nucleus. Together, our results show that HMGB4 is novel chromatin-associated protein that, together with H1FNT, specifies distinct positional domains within the elongating spermatid nucleus.

MATERIALS AND METHODS

RT-PCR and Cloning of HMGB4

The RT-PCR on RNA from different organs was performed using standard protocols. Primers used to amplify *Hmgb4* were: forward: 5'-TCTGCTATC-CAGATCAGAG-3' reverse: 5'-TTATTGTTCAAACCTGGTCTTGGC-3'.

A full-length cDNA encoding HMGB4 was amplified by RT-PCR from murine adult testis RNA using oligonucleotide primers located at the 5' and 3' ends as deduced from the analysis of the mouse expressed sequence tag (EST) public databases. Primers contained *NotI* and *Bam*HI restriction sites. The 746-bp fragment was digested with *NotI* and *Bam*HI and cloned in pXJ41 expression vector or in a modified pXJ41 expression vector containing the FLAG epitope linearized with the same enzymes. Transfection of HeLa and GC-1 cells and preparation of transfected cell extracts were as previously described [24].

Immunoblots and Immunohistochemistry

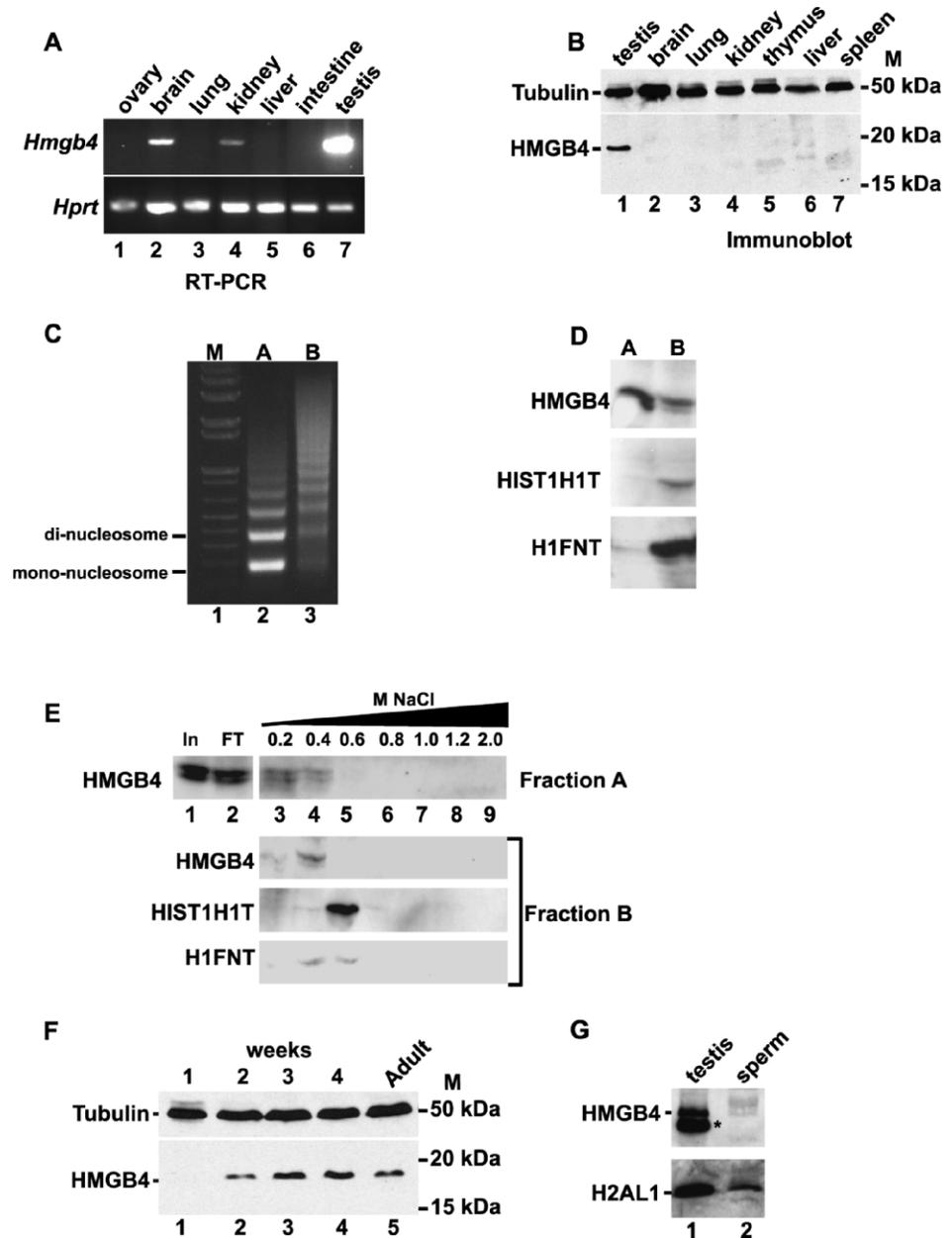
Mouse seminiferous tubule segments at defined stages were isolated using the transillumination-assisted microdissection method [25, 26]. Immunohistochemistry was performed on staged squash preparations of microdissected tubules from wild-type C57BL/6 mice, or *H1fn1*^{-/-} mice, as previously described [4, 27]. All mice were maintained in the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) mouse facility in accordance with the French national animal ethics regulations.

Antibodies against TBP and CBX5 (also known as HP1 α H2AL1, and H1FNT) have been described previously [4, 28, 29], and monoclonal (4E1) and polyclonal antibodies were generated against the HMGB4 peptide, indicated in Figure 1, and coupled to ovalbumin.

Extract Preparation

Total extracts were prepared from frozen mouse testis ground in a mortar in the presence of liquid nitrogen. The powdered material obtained then was resuspended in Laemmli buffer and heated at 95°C for 15 min before loading on an SDS-PAGE gel. Epididymal sperm was collected and resuspended directly in Laemmli buffer. Organ extracts were prepared by several cycles of the freeze-thaw in buffer A (50 mM Tris-HCl [pH 7.9], 10% glycerol, 1 mM

FIG. 2. Tissue-restricted expression of HMGB4. **A)** Reverse transcription-PCR was performed on the *Hmgb4* and the *Hprt* genes using RNA from the organs indicated above each lane. **B)** Expression of the HMGB4 protein in mouse adult tissues detected with the monoclonal antibody. M, The migration of the molecular mass markers. Alpha-tubulin is used as control. **C)** Ethidium bromide staining of an agarose gel showing MNase-digested DNA present in fractions A and B. DNA from mononucleosomes and dinucleosomes is shown. **D)** Western blot of HMGB4, H1FNT, and HIST1H1T present in fraction A and B. **E)** Immunoblots of the above proteins after elution of the A and B fractions from hydroxyapatite (HPT) by the increasing concentrations of NaCl indicated above each lane. **F)** HMGB4 expression was detected in extracts from 1–4 wk postnatal mouse testis with alpha-tubulin control. **G)** HMGB4 and H2AL1 expression in adult mouse testis and sperm.



dithiothreitol [DTT], and 0.1% Nonidet P-40) plus 500 mM KCl, followed by incubation for 30 min on ice and microfugation for 10 min at 4°C.

Preparation of Testis Cell Chromatin Fibers and Hydroxyapatite Powder Fractionation

Nuclei of testis cells were prepared by dissociation of two testes in a potter with 2 ml lysis buffer (0.34 M saccharose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl [pH 7.4], 0.65 mM spermidine, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.03% Triton X-100, 0.1 mM DTT, and 0.5 mM PMSF), centrifugation (10 min at 1500 rpm), washing in 10 ml lysis buffer, resuspension in 1 ml digestion buffer (lysis buffer without Triton X-100, EDTA, and EGTA), and filtering on 100- μ m filters. Nuclei were resuspended in 300 μ l digestion buffer and submitted to S7 MNase (Sigma) digestion (5 units per 2×10^6 nuclei, 10 min, 37°C). Reaction was stopped by 5 mM EDTA (final concentration). After centrifugation (10 min at 2000 rpm), a first supernatant (SN1) containing oligonucleosomes was recovered. Longer fibers were extracted from the pelleted nuclei by resuspension in 300 μ l of 0.1 mM EDTA, incubation for 1 h on ice, and centrifugation for 10 min at 10 000 rpm (SN2). DNA analyses were performed on 10 μ l of SN1 and SN2 by treatment with proteinase K followed by electrophoresis on a 1% agarose gel.

A total of 20 mg hydroxyapatite powder (Bio-Rad) was added to SN1 and SN2. After a 5 min incubation on ice and washes in 0.1 M potassium phosphate, pH 6.7, containing 0.15 M NaCl, the chromatin-associated proteins were eluted with phosphate buffer, containing 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, and 2 M NaCl.

Transfection Assays

GC-1 and COS1 cells were transfected with the 17m5-TATA-chloramphenicol transferase (CAT) reporter (2.5 μ g), the cytomegalovirus-based β -galactosidase expression vector as internal control, the GAL4-VP16 activator plasmid (250 ng), and increasing concentrations (1, 2, and 5 μ g) of expression vectors for F-HMGB4 or HMGB1 (kind gifts from M. Bianchi, Università Vita Salute San Raffaele, Milano, Italy). Cells were transfected with JetPEI (Polyplus) and harvested 48 h after transfection, lysed, and assayed for CAT activity with a CAT ELISA kit (Roche). The CAT activity was normalized against the protein concentration of the extract (see Figure 6D) or the measured β -galactosidase levels (data not shown). All transfections were carried out in triplicate. For Western blotting, the transfected cells were resuspended in buffer A plus 250 mM KCl (200 μ l per 10-cm dish) and subjected to three cycles of freeze-thaw, followed by incubation for 30 min on ice and microfugation at

2500 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant is the cytoplasmic fraction. The pelleted nuclei were resuspended in buffer A plus 800 mM KCl (100 μ l per 10-cm dish), and the supernatant corresponding to the nucleoplasmic fraction was recovered after three cycles of freeze-thaw and microfugation at 13 000 rpm for 10 min at 4°C. The residual chromatin pellet was recovered in SDS-PAGE loading buffer (100 μ l per 10-cm dish).

RESULTS

HMGB4, a Novel Member of the HMGB Family, Preferentially Expressed in Testis

While performing a proteomic analysis of proteins coimmunoprecipitated with the testis-specific factor GTF2A1L (also known as ALF) [30], we identified several peptides belonging to a novel protein containing an HMG box (subsequent immunoblotting revealed that HMGB4 does not coprecipitate specifically with GTF2A1L, but is rather a nonspecific contaminant; data not shown). Nevertheless, given the testis-specific expression of this protein (see below), we decided to further investigate it.

Using primers based on mouse ESTs in the public databases, a full-length cDNA encoding this HMG protein was amplified from murine adult testis RNA by RT-PCR. Public databases show that the mouse gene is located on chromosome 4. It is an intronless gene transcribed as a unique 746-bp transcript encoding a protein of 181 residues characterized by two HMG boxes, A and B, typically present in various members of the HMGB family (Fig. 1).

Sequence comparison of HMGB4 from rat, mouse, and human with the sequences of HMGB1 and HMGB2 from different vertebrates shows that the similarity within the family is highest in the HMG boxes. However, even within the HMG domains there are several regions where residues that are highly conserved in the HMGB1 and two proteins are divergent in the HMGB4 subfamily. More importantly, a striking distinctive feature of HMGB4 is the lack of the acidic tail, typically present in the HMGB family (Fig. 1). Extensive reiterative BLAST analysis revealed orthologs of HMGB4 in other mammals but not in other vertebrates or nonvertebrates. HMGB4 is therefore a mammalian-specific protein characterized by a divergent HMG sequence and lack of an acidic tail.

To analyze HMGB4 expression, RNA from several adult murine tissues was analyzed by RT-PCR, showing that it is strongly expressed in testis, whereas only weak expression is seen in brain and kidney, and no expression was shown in other organs tested (Fig. 2A). We generated a monoclonal antibody against a synthetic peptide (underlined in Fig. 1) specific for HMGB4. This antibody recognized a 20-kDa protein in extracts from mouse testis and from HeLa cells transfected with an HMGB4 expression vector (Fig. 2B, see below, and data not shown). Despite the fact that *Hmgb4* mRNA could be detected in brain and kidney, no significant expression of the HMGB4 protein could be detected in these tissues or in several other tested tissues (Fig. 2B). Thus, HMGB4 shows tissue-specific expression distinct from that of the other HMGB proteins, which are widely expressed, such as HMGB1, or restricted to testis and lymphoid organs, like HMGB2 and HMGB3, respectively.

To determine whether HMGB4 is associated with chromatin, we prepared micrococcal nuclease (MNase)-digested chromatin from testis. The nuclei were pelleted by centrifugation, and a first fraction (A) containing soluble nuclear proteins, mononucleosomes, and short-length oligonucleosomes was collected. Longer chromatin fibers then were extracted from the pelleted nuclei and recovered after centrifugation in a second fraction, B (Fig. 2C). HMGB4 is

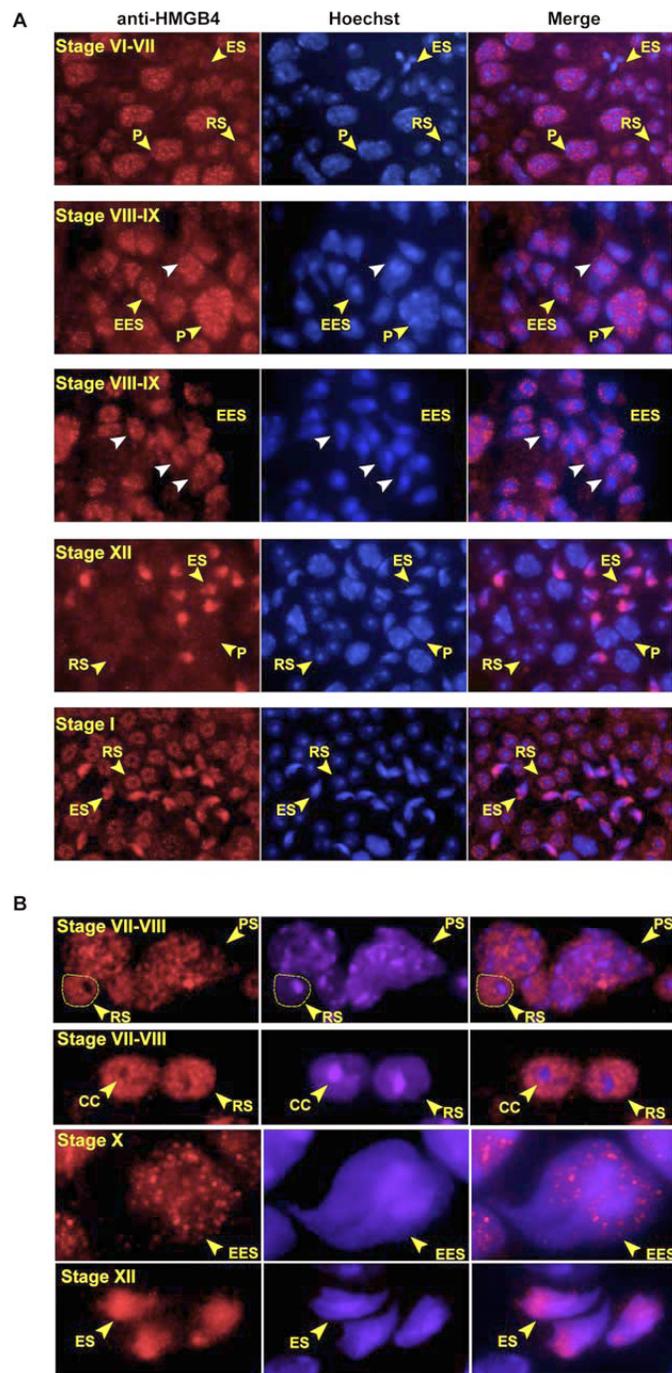
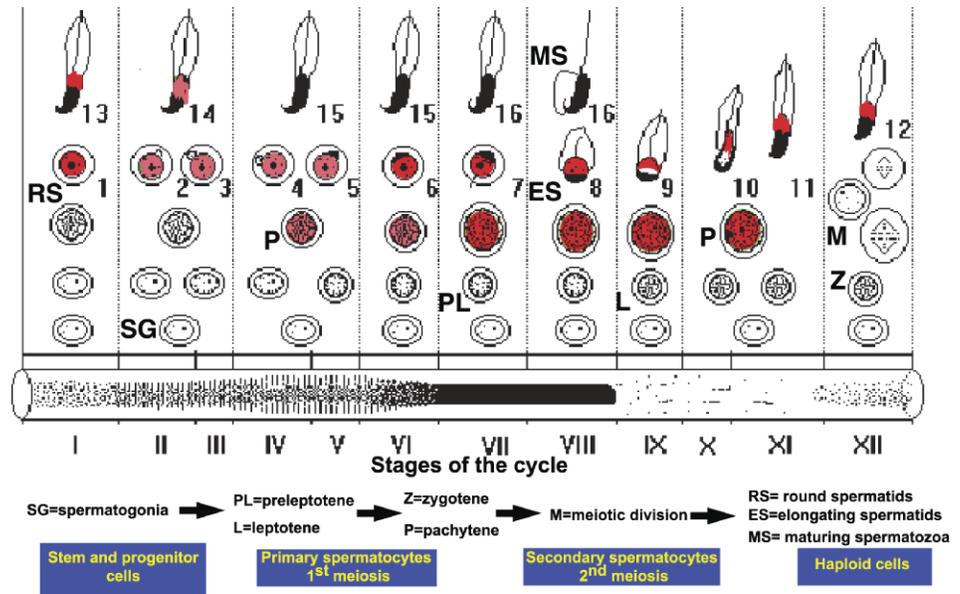


FIG. 3. Developmental expression of HMGB4 in male germ cells. **A**) The stage of each microdissected seminiferous tubule segment is indicated to the left of each subpanel. Immunostaining with the anti-HMGB4 antibody is shown on the left, Hoechst-stained DNA is shown in the center column, and the merged image appears in the right column. Representative examples of cell types are indicated. P, Pachytene spermatocytes; RS, haploid round spermatids; ES, elongating spermatids; EES, early elongating spermatids. Original magnifications $\times 63$ (stages VI–VII, XII, and I) and $\times 100$ (stages VIII–IX). The white arrowheads indicate the expression of HMGB4 at the basal pole of the nucleus in early elongating spermatids. **B**) Detailed views of differentiating germ cells. Panels from top to bottom show late-stage pachytene spermatocytes and a round spermatid (circled), round spermatids, early elongating spermatids, and elongate spermatids. Note the exclusion of HMGB4 from the dense Hoechst-stained heterochromatin in the pachytene spermatocytes and the chromocenter (CC) in the round spermatid nuclei. Original magnification $\times 100$.

FIG. 4. Summary of HMGB4 expression during spermatogenesis. The differentiation program is schematized in relation to the transillumination pattern of the seminiferous tubule at the bottom. Representative cell types are indicated. Localized expression of HMGB4 is indicated by red labeling.



found in both fractions A and B, unlike HIST1H1T and H1FNT, which are mainly associated with the longer chromatin fibers (Fig. 2D).

Nucleosomes and chromatin fibers from fractions A and B then were pulled down on hydroxyapatite, and the associated proteins were eluted with increasing salt concentration. A significant proportion of HMGB4 is readily released from chromatin by the MNase digestion, because most of the HMGB4 present in fraction A was not retained on hydroxyapatite (Fig. 2E, lanes 1 and 2) or eluted at low salt concentration (Fig. 2E, lanes 3 and 4). The HMGB4 present in fraction B was eluted between 0.3 and 0.4 M NaCl (Fig. 2E, lanes 3 and 4). Almost all the H1FNT or HIST1H1T was present in fraction B, and H1FNT eluted between 0.4 and 0.6 M NaCl and HIST1H1T ($H1^{\circ}$) at 0.6 M NaCl, as expected for a linker histone (Fig. 2E, lanes 4 and 5). These results show that HMGB4 binds chromatin with a lower affinity compared with the linker histone HIST1H1T. Moreover, H1FNT also appears also to interact less strongly with the chromatin when compared with the more canonical HIST1H1T.

Developmental and Stage-Specific Expression of HMGB4 in Male Germ Cells

Spermatogenesis occurs in synchronized waves within the seminiferous epithelia. The cycle is divided into 12 stages in mouse, where each stage comprises a mix of cells in given developmental steps. During the first wave of spermatogenesis, germ cells are synchronized in their development, with different cell types appearing progressively at different postnatal times. To study the expression of murine HMGB4 in developing male germ cells, we first analyzed total extracts from 1- to 4-wk postnatal testis by Western blot analysis (Fig. 2F). HMGB4 can already be observed at 2 wk postpartum and persists in adult testis (Fig. 2, F and G) but, unlike H2AL1, it is not present in mature epididymal sperm (Fig. 2G). The timing of appearance of HMGB4 expression correlates with the appearance of pachytene spermatocytes and increases with that of haploid round spermatids in developing testis.

For a more refined analysis we used the anti-HMGB4 monoclonal antibody to study the expression and intracellular localization of HMGB4 during mouse spermatogenesis by immunohistochemistry. Segments of mouse seminiferous

tubules corresponding to each developmental stage were isolated by transillumination-assisted microdissection to make squash preparations and subjected to immunostaining.

No expression of HMGB4 in spermatogonia, preleptotene, leptotene, and zygotene spermatocytes was observed, but it was present in the nuclei of Sertoli cells (data not shown). In germ cells, weak HMGB4 expression was first observed at stage V in the euchromatin of pachytene spermatocytes, then increased in pachytene cells until stage XI (Fig. 3, A and B, and data not shown). During spermiogenesis, HMGB4 was localized in the euchromatin of step 1 haploid round spermatids, but it was excluded from the heterochromatin in the chromocenter (Fig. 3, stage I). Its expression decreased somewhat in the nuclei of step 2–6 round spermatids (Fig. 3, A and B, stages VI–VII, and data not shown), but it increased during the elongation phase in the nuclei of step 8 early elongating spermatids up to step 13 elongate spermatids (Fig. 3, A and B, stages VIII–I, and data not shown). The specificity of these signals was verified in immunostaining experiments in the presence of an excess of epitope peptide, which almost completely eliminated the nuclear signals, leaving only nonspecific cytoplasmic staining (Supplemental Fig. 1, available online at www.biolreprod.org).

Strikingly, as round spermatids began to elongate, HMGB4 remained at the location of the round spermatid nucleus but did not spread to the elongating region (Fig. 3, A and B, stages VIII–I and X). During the elongation phase, HMGB4 was progressively localized to the basal pole of the nucleus, and in later-stage elongate spermatids it was strongly expressed at the basal pole. HMGB4 expression disappeared around step 14 and was no longer seen at later stages (Fig. 3A, stages VI–VII, and data not shown). Similar results were obtained with a polyclonal antibody raised against the same peptide (data not shown). Hence, HMGB4 is a nuclear protein that is developmentally regulated during spermatogenesis (summarized in Fig. 4) and which localizes specifically to the basal pole of the elongating spermatid nucleus.

HMGB4 Localization in Elongating Spermatids Is Affected by the Loss of H1FNT

The above results are reminiscent of those obtained with H1FNT, which also has a polar localization, but at the apical pole of the round and elongating spermatid. Indeed, double

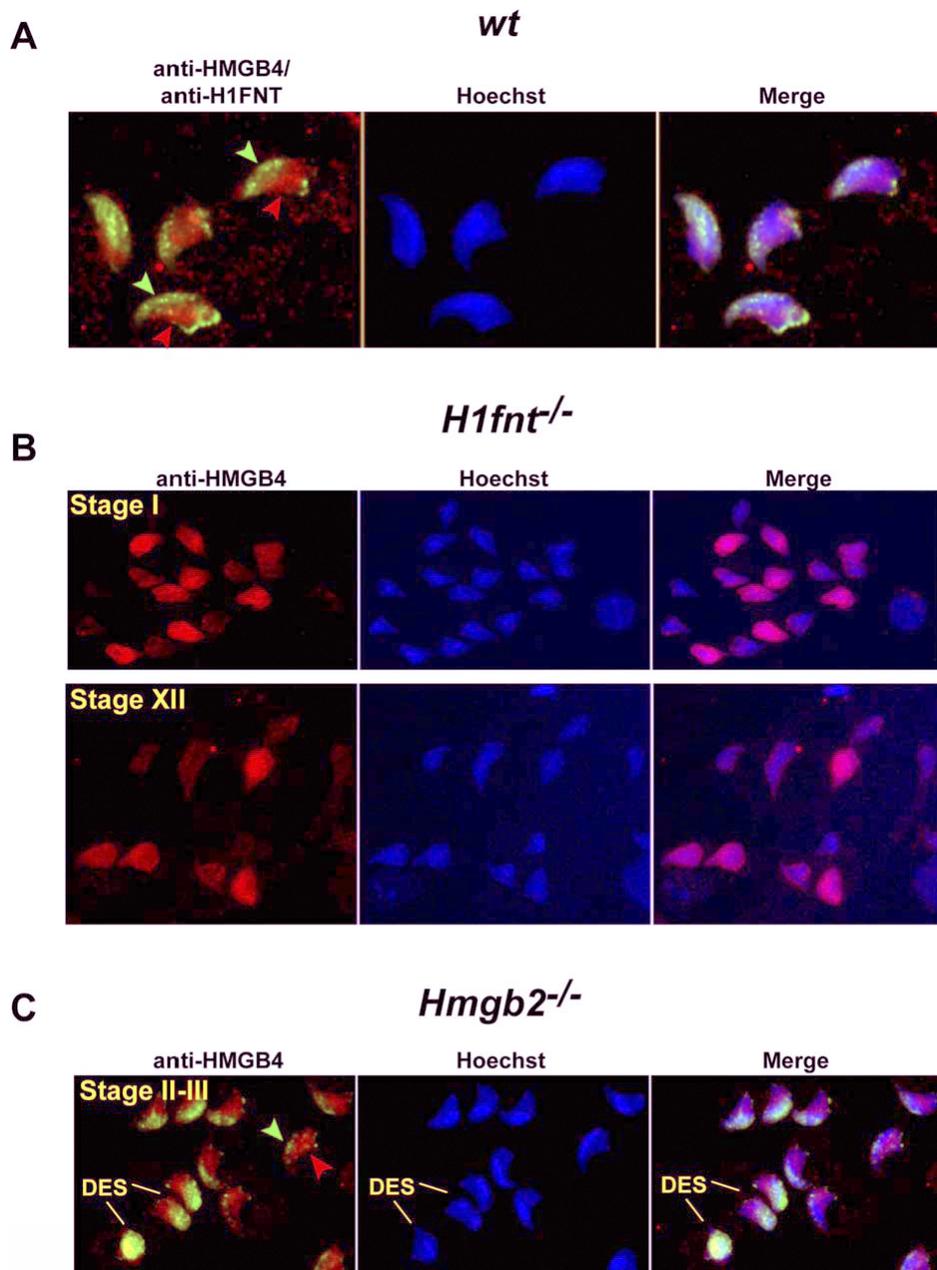


FIG. 5. HMGB4 localization in H1FNT-deficient spermatids. **A**) Double immunodetection of H1FNT (green) and HMGB4 (red) in elongating spermatids. The localization of H1FNT at the apical pole and HMGB4 at the basal pole is indicated by the green and red arrowheads, respectively. **B**) Immunodetection of HMGB4 in steps 12–13 (stages XII–I) elongating spermatids from *H1fnt^{-/-}* animals. **C**) Double immunodetection of H1FNT and HMGB4 in microdissected segments of *Hmgb2^{-/-}* stage II–III seminiferous tubules. Degenerate elongating step 14 spermatids are indicated (DES). Original magnifications $\times 100$ (**A**) and $\times 63$ (**B**, **C**).

staining of elongate spermatids with antibodies against HMGB4 and H1FNT confirm that these two proteins localize to opposite poles of the nucleus (Fig. 5A). We have shown previously that H1FNT plays an important role in the process of chromatin condensation, because its loss results in defective spermatid elongation and diminished male fertility [4]. We next asked whether loss of H1FNT affects HMGB4 localization in elongating spermatids of *H1fnt^{-/-}* mice. Staged squash sections of wild-type or *H1fnt^{-/-}* seminiferous tubules were prepared by transillumination-assisted microdissection and subjected to immunostaining for HMGB4. At the time of step 8–11 elongating spermatids, localization of HMGB4 was similar to the wild type (data not shown); at later steps, two abnormalities were observed. In around half of the spermatids, HMGB4 expression was strongly reduced. In addition, in most of the others HMGB4 was mislocalized and no longer limited to the basal pole of the nucleus, but rather was found throughout the nucleus or as a ring around the nuclear membrane (Fig. 5B). These results indicate that loss of H1FNT and the subsequent

disorganization of chromatin topology affect HMGB4 localization.

We have shown previously that loss of HMGB2 can affect H1FNT localization [31]. We therefore investigated the effect of loss of HMGB2 on HMGB4 expression using sections from *Hmgb2^{-/-}* animals. Although no significant effect on HMGB4 was seen in round spermatids (data not shown), both H1FNT and HMGB4 were affected in elongating spermatids. Most elongating spermatids showed normal localization of each protein, but in the degenerate spermatids the normal localization was lost, resulting in a more homogenous staining, and in some cases colocalization of the two (Fig. 5C).

Distinct Functional Properties of HMGB1 and HMGB4

We next investigated some of the functional properties of HMGB4. A vector expressing recombinant F-HMGB4 was transiently transfected in HeLa, COS-1, and the immortalized spermatogonial GC-1 cells and the recombinant protein

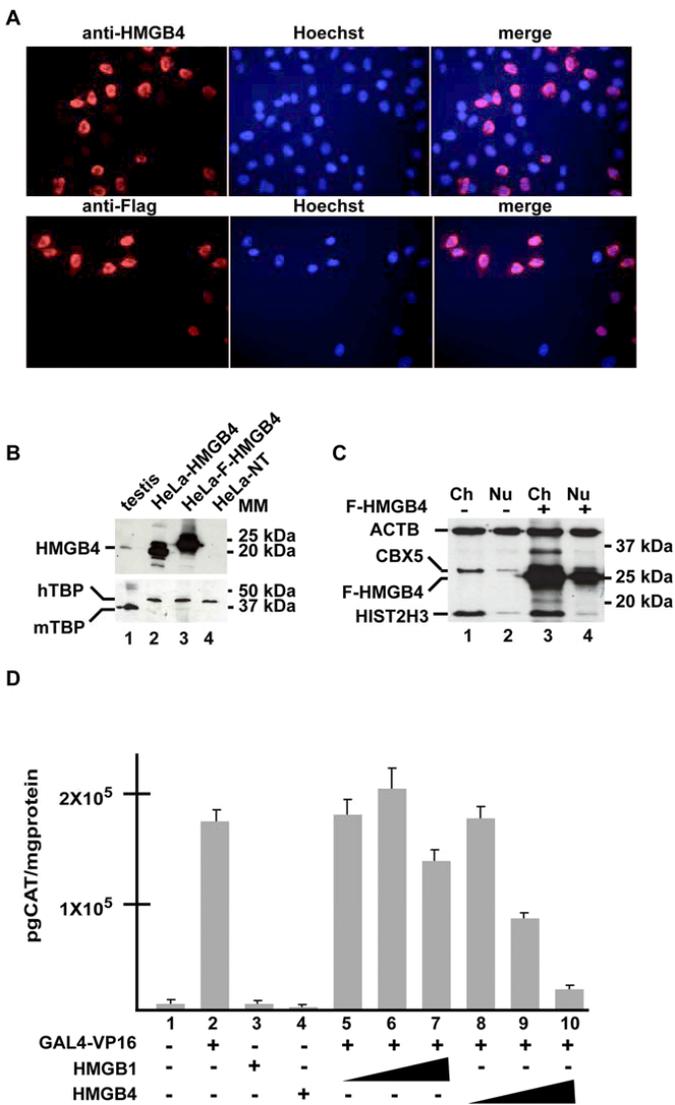


FIG. 6. HMGB4 is a transcriptional repressor. **A)** Immunodetection of HMGB4 in HeLa cells transfected with the recombinant F-HMGB4. Left column shows HMGB4 expression detected with monoclonal antibody 4E1 or with anti-FLAG antibody, the center images show the corresponding Hoechst-stained DNA, and the right column shows the merged image. Original magnification $\times 20$. **B)** HeLa cells were transfected with HMGB4, FLAG-HMGB4, or empty (NT) expression vector, and the recombinant HMGB4 was detected with monoclonal antibody 4E1. HMGB4 is also visible in the adult mouse testis extract. Human TBP (hTBP) and mouse TBP (mTBP) were also detected as loading control. **C)** Recombinant HMGB4 associates tightly with chromatin. Western blot analysis of nucleoplasmic (Nu) and chromatin (Ch) fractions from GC-1 cells transfected with recombinant F-HMGB4. HMGB4, HIST2H3 (H3), CBX5, and β -actin were revealed using specific antibodies. **D)** GC-1 cells were transiently transfected with the 17m5-TATA-CAT reporter plasmid (2.5 μ g), alone (lane 1) and together with activator GAL4-VP16 (250 ng, lane 2). Cotransfection of increasing quantities (1, 2, and 5 μ g) of HMGB1 had no significant effect (lanes 5–7), whereas F-HMGB4 expression led to a dose-dependent repression (lanes 8–10). F-HMGB4 expression (5 μ g) also represses basal expression in the absence of the GAL4-VP16 (lane 4).

detected by immunofluorescence with anti-HMGB4 and anti-FLAG antibodies or immunoblot (Fig. 6, A and B). In all cases, a clear nuclear staining was observed (Fig. 6A and data not shown). Extracts were prepared from the nucleoplasmic and chromatin fractions of nuclei from GC-1 cells transfected with

recombinant F-HMGB4. Little HMGB4 could be extracted in the nucleoplasmic fraction (Fig. 6C, lane 4), whereas the vast majority of the protein was present in the chromatin fraction (Fig. 6C, lane 3). As a control, the same extracts were also probed for the presence of HIST2H3C (also known as H3) and CBX5 (Fig. 6C), showing that HMGB4, HIST2H3C, and CBX5 are extracted in a similar manner. Therefore, transfected F-HMGB4, like the endogenous murine HMGB4, associates with chromatin.

We tested the effect of F-HMGB4 expression on transcriptional activation in GC-1 cells (Fig. 6D). We chose to use the potent GAL-VP16 activator and with a cognate reporter plasmid, a system that has been used widely to assess coactivator and repressor effects. The 17m5-TATA-CAT reporter plasmid, with five GAL4-binding sites in the promoter upstream of the *Cat* gene, was transiently transfected with a vector expressing the GAL4-VP16 activator and increasing concentrations of HMGB1 or F-HMGB4. Expression of GAL4-VP16 alone led to a potent stimulation of CAT activity (Fig. 6D, columns 1 and 2). Overexpression of HMGB1 had no significant effect on basal promoter activity (Fig. 6D, column 3), but expression of HMGB4 led to repression (Fig. 6D, column 4). In the presence of GAL4-VP16, expression of increasing amounts of HMGB1 had no significant effect on reporter activity (Fig. 6D, columns 5–7). In contrast, expression of F-HMGB4 led to a potent dose-dependent repression of GAL4-VP16 activity. Similar results were observed in COS-1 cells (data not shown). Therefore, HMGB1 and HMGB4 have different functional properties; HMGB1 has no significant effect, whereas HMGB4 is a potent transcriptional repressor.

DISCUSSION

HMGB4, a Novel and Atypical Member of the HMGB Family

In this paper we characterize HMGB4, a novel member of the HMGB family, and show that it is preferentially expressed in elongating spermatids, where it localizes to the basal pole. HMGB4 is characterized by the lack of an acidic tail and the presence of distinctive amino acids within the structured domain. Unlike the other HMGB proteins, HMGB4 is encoded by an intronless gene, suggesting that it is derived from a retrotransposed mRNA. HMGB4 seems specific to mammals, indicating that the retrotranscription event occurred early in the mammalian group. Several examples have been described where retrotransposed copies of X-linked genes have been relocated to autosomes to evade meiotic sex chromosome inactivation [32]. HMGB4 has therefore perhaps evolved to compensate meiotic inactivation of HMGB3 that is located on the X chromosome.

Biochemical fractionation experiments show that HMGB4 associates with chromatin in testis and in transfected cells. A comparison with H1FNT and HIST1H1T shows that HMGB4 has a lower affinity for chromatin than H1FNT, which itself binds less avidly than HIST1H1T. Previous reports have shown that loss of the acidic tail, which is thought to bind to the first HMG box and impede its interaction with DNA, leads to increased DNA binding and blocks nucleosome sliding [19, 33, 34]. Despite the lack of the acidic tail, HMGB4 shows low affinity for chromatin, but nevertheless acts as a transcriptional repressor. Thus, although HMGB4 has chromatin-binding properties distinct from those of linker histones, it has similar functional properties in terms of transcriptional repression.

Previous studies have suggested that HMG-type proteins competitively counteract the effects of linker histone H1, HIST1H1B. HIST1H1B and HMGB proteins bind competitively to nucleosomes, and although HMGB proteins have been shown generally to promote transcription by facilitating binding of transcription factors through DNA bending and/or direct interactions and enhancing nucleosome sliding and remodeling, HIST1H1B has generally the opposite effect by condensing chromatin [14, 35, 36]. Therefore, our observations show that HMGB4 is an atypical HMGB-type protein.

HMGB4 is strongly expressed at the basal pole of the elongating spermatid nucleus, suggesting that at this stage it may act to repress transcription in this domain of the nucleus. Although this speculation is inferred from the observed properties in transfection experiments, it is evident that a full understanding of the role of HMGB4 in male germ cell differentiation will require generation of *Hmgb4* knockout mice.

Specific Chromatin Domains in Elongating Spermatids

The striking feature of HMGB4 is that it localizes specifically to the basal pole of the elongating spermatid nucleus. Investigation of HMGB4 localization in H1FNT-null spermatids suggests that H1FNT may restrict HMGB4 localization, indicating its key role in organizing polar chromatin domains within the nucleus. The diminished HMGB4 expression also seen upon loss of H1FNT may be due to changes in HMGB4 transcription; however, at these late stages transcription is almost silenced. HMGB4 disappears from wild-type cells around step 14, suggesting that it is normally degraded at this time. A more probable explanation, therefore, is that loss of proper chromatin organization or other perturbations brought about by H1FNT inactivation affects the stability of HMGB4 such that it is prematurely degraded.

Our observations indicate a precise spatial topology of the DNA in two domains defined by the mutually exclusive presence of H1FNT or HMGB4. In addition, it has been shown previously that pericentric regions are associated with the novel H2AL1 and H2AL2 variants as well as HIST1H2BA [37]. It is striking that each of these domains is characterized by the presence of germ cell-specific or preferentially expressed variants. We have shown previously that H1FNT can be mislocalized within the nucleus by the alterations in chromatin structure that occur upon loss of TERF2 (TRF2) and HMGB2 [31]. Together, our observations therefore demonstrate the existence of a complex set of positional cues within the spermatid nucleus, suggesting that chromatin topology is important for organizing DNA condensation in a specific manner.

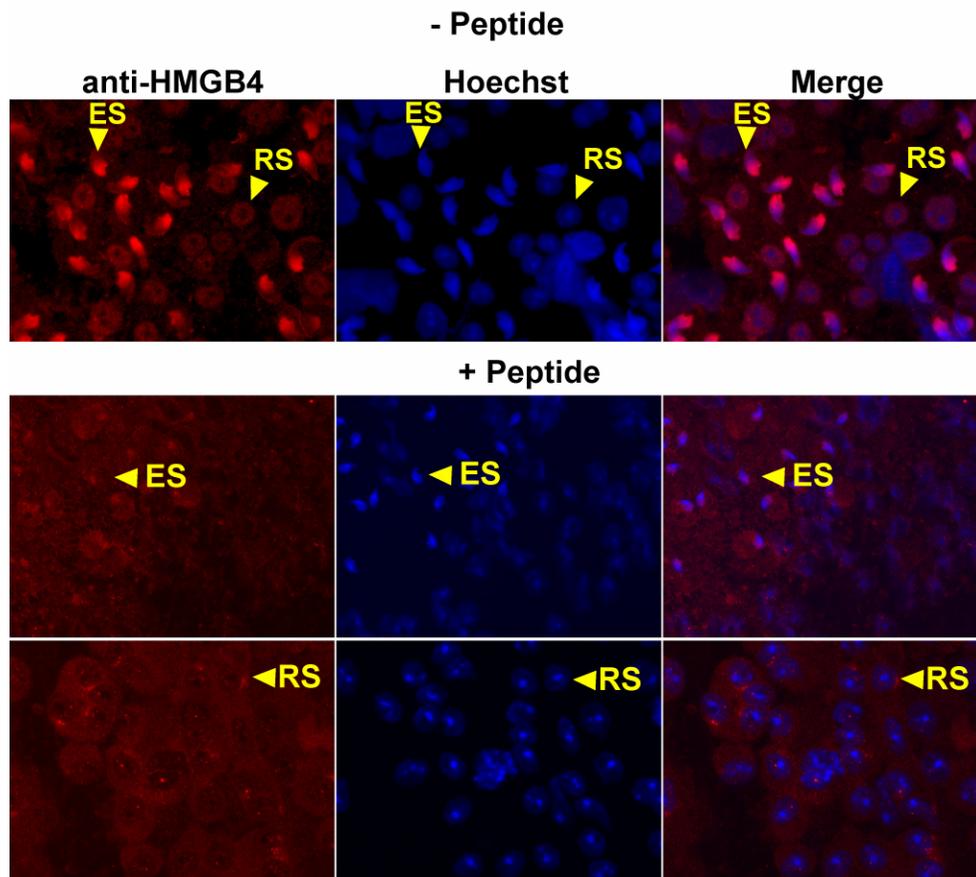
ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. M. Bianchi for HMGB1/2 cDNAs, J.-L. Vonesch and D. Hentsch for microscopy, the IGBMC microscopy, peptide, and antibody services, and all other IGBMC common services.

REFERENCES

- Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 2004; 271:3459–3469.
- Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 2005; 434:583–589.
- Lewis JD, Abbott DW, Ausio J. A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol* 2003; 81:131–140.
- Martianov I, Brancorsini S, Catena R, Gansmuller A, Kotaja N, Parvinen M, Sassone-Corsi P, Davidson I. 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* 2005; 102:2808–2813.
- Churikov D, Siino J, Svetlova M, Zhang K, Gineitis A, Morton Bradbury E, Zalensky A. Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics* 2004; 84:745–756.
- Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM, Zalensky AO. Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J Cell Biol* 2000; 151:1591–1598.
- Zalensky AO, Siino JS, Gineitis AA, Zalenskaya IA, Tomilin NV, Yau P, Bradbury EM. Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* 2002; 277:43474–43480.
- Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 2003; 278:29471–29477.
- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thévenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S, Caron C. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* 2007; 176:283–294.
- Ronfani L, Ferraguti M, Croci L, Ovitt CE, Scholer HR, Consalez GG, Bianchi ME. Reduced fertility and spermatogenesis defects in mice lacking chromosomal protein Hmgb2. *Development* 2001; 128:1265–1273.
- Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973; 38:14–19.
- Landsman D, Bustin M. A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. *Bioessays* 1993; 15:539–546.
- Stott K, Tang GS, Lee KB, Thomas JO. Structure of a complex of tandem HMG boxes and DNA. *J Mol Biol* 2006; 360:90–104.
- Bianchi ME, Agresti A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15:496–506.
- Thomas JO, Travers AA. HMG1 and 2, and related ‘architectural’ DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 2001; 26:167–174.
- Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13:170–178.
- Melvin VS, Harrell C, Adelman JS, Kraus WL, Churchill M, Edwards DP. The role of the C-terminal extension (CTE) of the estrogen receptor alpha and beta DNA binding domain in DNA binding and interaction with HMGB. *J Biol Chem* 2004; 279:14763–14771.
- Das D, Peterson RC, Scovell WM. High mobility group B proteins facilitate strong estrogen receptor binding to classical and half-site estrogen response elements and relax binding selectivity. *Mol Endocrinol* 2004; 18:2616–2632.
- Bonaldi T, Langst G, Strohner R, Becker PB, Bianchi ME. The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *EMBO J* 2002; 21:6865–6873.
- Das D, Scovell WM. The binding interaction of HMG-1 with the TATA-binding protein/TATA complex. *J Biol Chem* 2001; 276:32597–32605.
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418:191–195.
- Nemeth MJ, Cline AP, Anderson SM, Garrett-Beal LJ, Bodine DM. Hmgb3 deficiency deregulates proliferation and differentiation of common lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 2005; 105:627–634.
- Nemeth MJ, Curtis DJ, Kirby MR, Garrett-Beal LJ, Seidel NE, Cline AP, Bodine DM. Hmgb3: an HMG-box family member expressed in primitive hematopoietic cells that inhibits myeloid and B-cell differentiation. *Blood* 2003; 102:1298–1306.
- Mengus G, May M, Jacq X, Staub A, Tora L, Chambon P, Davidson I. Cloning and characterization of hTAFII18, hTAFII20 and hTAFII28: three subunits of the human transcription factor TFIID. *EMBO J* 1995; 14:1520–1531.
- Parvinen M, Hecht NB. Identification of living spermatogenic cells of the mouse by transillumination-phase contrast microscopic technique for ‘in situ’ analyses of DNA polymerase activities. *Histochemistry* 1981; 71:567–579.
- Kotaja N, Kimmins S, Brancorsini S, Hentsch D, Vonesch JL, Davidson I, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat Methods* 2004; 1:249–254.
- Martianov I, Fimia GM, Dierich A, Parvinen M, Sassone-Corsi P, Davidson I. Late arrest of spermiogenesis and germ cell apoptosis in mice lacking the TBP-like TLF/TRF2 gene. *Mol Cell* 2001; 7:509–515.
- Martianov I, Brancorsini S, Gansmuller A, Parvinen M, Davidson I, Sassone-Corsi P. Distinct functions of TBP and TLF/TRF2 during spermatogenesis: requirement of TLF for heterochromatic chromocenter formation in haploid round spermatids. *Development* 2002; 129:945–955.

29. Cammas F, Herzog M, Lerouge T, Chambon P, Losson R. Association of the transcriptional corepressor TIF1beta with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. *Genes Dev* 2004; 18:2147–2160.
30. Catena R, Argentini M, Martianov I, Parello C, Brancorsini S, Parvinen M, Sassone-Corsi P, Davidson I. Proteolytic cleavage of ALF into alpha- and beta-subunits that form homologous and heterologous complexes with somatic TFIIA and TRF2 in male germ cells. *FEBS Lett* 2005; 579:3401–3410.
31. Catena R, Ronfani L, Sassone-Corsi P, Davidson I. Changes in intranuclear chromatin architecture induce bipolar nuclear localization of histone variant HIT2 in male haploid spermatids. *Dev Biol* 2006; 296: 231–238.
32. Wang PJ, Page DC, McCarrey JR. Differential expression of sex-linked and autosomal germ-cell-specific genes during spermatogenesis in the mouse. *Hum Mol Genet* 2005; 14:2911–2918.
33. Lee KB, Thomas JO. The effect of the acidic tail on the DNA-binding properties of the HMG1,2 class of proteins: insights from tail switching and tail removal. *J Mol Biol* 2000; 304:135–149.
34. Knapp S, Muller S, Digilio G, Bonaldi T, Bianchi ME, Musco G. The long acidic tail of high mobility group box 1 (HMGB1) protein forms an extended and flexible structure that interacts with specific residues within and between the HMG boxes. *Biochemistry* 2004; 43:11992–11997.
35. Bustin M, Catez F, Lim JH. The dynamics of histone H1 function in chromatin. *Mol Cell* 2005; 17:617–620.
36. Catez F, Yang H, Tracey KJ, Reeves R, Misteli T, Bustin M. Network of dynamic interactions between histone H1 and high-mobility-group proteins in chromatin. *Mol Cell Biol* 2004; 24:4321–4328.
37. Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thevenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S, Caron C. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* 2007; 176:283–294.



Catena et al., Supplemental Figure 1

III. Les autres stratégies développées pour l'identification de protéines

L'analyse par spectrométrie de masse de protéines susceptibles de réorganiser la chromatine au cours de la spermiogénèse a permis d'identifier deux protéines, FYTTD1 et HMGB4, chacune avec des fonctions spécifiques. L'expression de ces protéines dans les stades intermédiaires de la spermatogénèse ne permet pas de conclure à leur participation à l'organisation du génome dans les stades tout à fait terminaux de la spermatogénèse.

La recherche par simple spectrométrie de masse de protéines susceptibles d'organiser différemment le génome spermatique se révélant donc trop aléatoire, nous avons eu recours à d'autres stratégies d'identification.

1. Analyse *in silico*

Afin d'identifier d'autres protéines basiques susceptibles d'organiser le génome spermatique, une autre stratégie a été d'utiliser les informations contenues dans les banques de données informatiques.

Plusieurs critères de choix ont été définis pour cette analyse.

Tout d'abord, les protéines doivent être basiques, notamment riches en lysines et arginine, afin de pouvoir interagir avec l'ADN qui lui est chargé négativement.

Ensuite, ces protéines doivent être de petite taille, les protéines structurant l'ADN étant souvent de faible poids moléculaire (comme par exemple les histones).

Enfin, elles devaient s'exprimer dans les stades très tardifs de la spermatogénèse. Pour cela, nous avons retenu les protéines ayant une expression spécifique du testicule d'après les recherches effectuées dans SymAtlas. De plus, le profil d'expression de ces gènes au cours du développement, recherché dans Geoprofile, devait présenter une expression à partir du stade adulte (30 jours) chez la souris, lorsque la spermatogénèse initiée à la naissance, atteint les stades terminaux.

La table 8 présente un certain nombre des protéines retenues. A titre d'exemple, deux protéines basiques testiculaires ont été exclues, car trop grandes et ayant un profil d'expression au cours du développement inconnu (grisées). Cette analyse a également permis de mettre en évidence un nouveau variant d'histone, nommé H2B-Like 2 (H2BL2, Q9DAB5).

ID Unigene	ID Swiss prot	Type	MW (Da)	pI	Protein Length	Expression (Symatlas)	Expression stade développemental (Geoprofile)
mm.78557	Q9D5G1	Putative uncharacterized protein	19305	12.14	169	Testis	Adulte
mm.46121	Q9DA62	Putative uncharacterized protein	13146	10.53	117	Testis	Adulte
mm.396214	Q9D9P0	Putative uncharacterized protein	12824	10.3	115	Ubiquitaire	De la gastrula à l'adulte
mm.291732	Q8C1R9	Putative uncharacterized protein	8773	10.43	78	Testis	Adulte
mm.302721	Q9DAB5	Novel histone h2b containing protein	26094	10.14	224	Testis et ovule fertilisé	Zygote
mm.159368	Q9D595	Putative uncharacterized protein	35050	9.96	322	Testis	?
mm.474494	Q9D3W5	Leucine-rich repeat-containing protein	61351	9.36	558	Ubiquitaire	?

Table 8. Liste des gènes identifiés in-silico dans les banques de données

Les protéines grisées n'ont pas été retenues pour une analyse ultérieure, en raison de leur trop grande taille et du manque de connaissance de leur stade d'expression au cours du développement.

2. Les groupes de gènes exprimés dans les cellules germinales mâles

Une étude bibliographique a été faite dans le but de déterminer les gènes connus pour s'exprimer au cours de la spermatogénèse. Une publication du groupe de Schultz et de ses collaborateurs nous a particulièrement intéressés (Schultz et al., 2003). Dans cette publication, Schultz et ses collaborateurs ont analysé l'expression des gènes testiculaires en extrayant l'ARNm de testicules de souris âgées de 1 jour à 60 jours (adulte). Dans les premiers jours après la naissance, les tubes séminifères contiennent principalement des gonocytes, des spermatogonies et des cellules de Sertoli. Les spermatocytes vont apparaître chez des souris âgées de 11 à 14 jours et les premières spermatides apparaîtront chez des souris âgées au minimum de 21 jours.

Ainsi, 21.374 transcrits ont été identifiés comme exprimés dans le testicule en développement. Afin de caractériser plus précisément seuls les transcrits issus des cellules germinales, les ARNm extraits à partir de populations de cellules de Sertoli et de cellules interstitielles ont été soustraits à ceux identifiés dans le testicule total.

L'ensemble des transcrits restants (au nombre de 3794) a été regroupé en 8 groupes : cinq regroupant les gènes s'exprimant chez les souris âgées d'au moins 11 jours, c'est-à-dire ayant débuté la phase de méiose et trois qui regroupent les gènes s'exprimant préférentiellement durant la phase où la population de spermatogonies est prédominante dans le testicule, c'est-à-dire chez les souris âgées de 1 à 11 jours.

Au sein des cinq premiers groupes, il a été fait la distinction entre les groupes 1, 2 et 3 qui rassemblent les gènes exprimés au début de la spermatogénèse, c'est-à-dire dans les spermatocytes, et les groupes 4 et 5, qui rassemblent les gènes qui s'expriment respectivement au début de la spermiogénèse et dans les spermatides condensées (Figure 35 A).

Ainsi, les groupes 4 et 5 nous intéressent particulièrement, car ils nous ont permis d'obtenir une liste de gènes exprimant des protéines de fonctions inconnues, avec une expression testiculaire et qui s'expriment tardivement au cours de la spermatogénèse (Table 9).

Nous avons ainsi pu retrouver dans cette liste les gènes qui codent pour les nouveaux variants d'histones H2AL1, H2AL2 et H2BL1. Un nouveau variant de H2A, nommé H2AL3, a également pu être mis en évidence dans cette analyse. En plus de ces variants d'histones, nous

ID Unigène	Cluster	Homologie	Length	MW	pI
mm. 109099	4	UPF0728 protein C10orf53 homolog	93	10 386	4
mm. 141451	4		175		9.0
mm. 158111	4	Putative uncharacterized protein	171	18 192	8.1
mm. 87057	4	Putative uncharacterized protein	134	15 138	8.7
mm. 158159	4	x			
mm. 159092	4	Putative uncharacterized protein	131	13 761	9.2
mm. 177847	4	x			
mm. 179421	4	CoA ligase	667	74 319	8.6
mm. 19977	4	Protéase			
mm. 440761	4	H2A like 1	105	12 112	10.5
mm. 20314	4	HMG	181	21 627	9.9
mm. 229259	4		53	6 174	8.2
mm. 22956	4		200	23 069	9.7
mm. 23382	4				
mm. 233840	4		119	12 740	5.2
mm. 23518	4		227	25 716	8.5
mm. 23887	4	H2A like 2	111	12 842	11.0
mm.156123	4	"Induced during sptgn"	67	7 129	7.8
mm. 26988	4		221	24 992	6.2
mm. 27023	4	Q9DAR6	119	13 156	11.3
mm. 29788	4	~ Facteur transcription	410	45 595	8.9
mm. 30957	4	"Hyp serine protease features"			
mm. 31410	4	Splicing fator	398	44 381	11.7
mm. 31415	4	Putative extensin	401	43 448	9.8
mm. 32231	4	TATA binding protein			
mm. 32245	4	Acrosin precurseur			
mm. 33624	4				
mm. 33629	4	Sperm antigen	348	39 936	9.2
mm. 33647	4	Mito carrier protein	312	34 505	9.5
mm. 33683	4				
mm. 33811	4				
mm. 33864	4		298	33 958	7.1
mm. 34841	4	Related with psoriasis	177	20 114	8.2
mm. 45302	4	Basic prot CKT1R3	173	19 580	9.7
mm. 45377	4	Oestradiol beta DH	174	19 597	9.6
mm. 45442	4		90	9 885	11.6
mm. 45611	4		342	38 163	8.3
mm. 45820	4		230	25 707	5.8
mm. 45824	4		158	18 057	5.5
mm.273327	4	Q9D2T6	108	12416	9.5
mm. 46121	4	Q9DA62	117	13 146	10.5
mm. 46146	4	H2A like 3	117	13 491	4.6
mm. 46151	4				
mm. 46159	4	TRAF2 Droso. Domain Ub ligase	239	27 175	8.8
mm. 46166	4		179	20 472	9.7
mm. 46167	4	Cystatin related	141	16 810	9.0
mm. 46170	4		340	38 539	7.1
mm. 50087	4		120	13 655	6.9
mm. 50982	4	Conserved in bactos	329	37 517	9.0
mm. 383398	4		97	11 413	9.5
mm. 55870	4	Visinin like	516	58 381	9.1
mm. 56430	4		413	46 212	4.6
mm. 56501	4	Ring finger protein	339	38 142	7.6
mm. 59225	4				
mm. 60688	4		223	27 598	5.3
mm. 61148	4				
mm.84522	4		103	11 182	10.8
mm. 72892	4				
mm. 73222	4		266	30 227	9.3
mm. 78172	4				
mm. 78368	4		891	101 655	7.5
mm. 78390	4				
mm. 78873	4				
mm. 79053	4	Similar to TCP, chaperon domain	562	60 719	6.5

(Suite) ID Unigène	Cluster	Homologie	Length	MW	pI
mm. 82810	4				
mm. 84066	4				
mm. 84522	4		113	11 182	10.8
mm. 86429	4				
mm. 86808	4	Protein phosphatase inhibitor			
mm. 87067	4		213	24 164	5.6
mm. 87357	4	Thioredoxin. Chaperon like	153	17 429	9.3
mm. 87369	4	Ribonuclease inhibitor	853	97 184	6.5
mm. 87418	4		258	30 230	10.0
mm. 87431	4				
mm. 87446	4	Glyrol Phosphate DH			
mm. 87455	4	Alpha Beta hydrolase fold	474	53 297	8.6
mm. 87434	5				
mm. 86986	5		158	17 557	5.0
mm. 84810	5				
mm. 84467	5		145	16 975	9.8
mm. 81032	5				
mm. 78473	5				
mm. 75060	5	COG4372 : Myosin Like	274	32 075	9.2
mm. 73124	5	Putative uncharacterized protein	269	30 600	9.4
mm. 72970	5		251	29 347	9.3
mm. 71906	5				
mm. 71904	5	Plunc precursor	232	25 713	8.9
mm. 71176	5				
mm. 71153	5				
mm. 46160	5				
mm. 67639	5		393	44 866	5.8
mm. 67595	5	Sel-1 like			
mm. 67455	5	Myosin	323	36 626	5.7
mm. 66946	5				
mm. 60359	5	Myosin. Chro Ség. ATPase	866	103 049	6.6
mm. 57614	5				
mm. 56997	5	Trypsin Precursor	241	26 865	7.5
mm. 52613	5		347	40 065	8.9
mm. 52575	5				
mm. 50904	5				
mm. 50361	5	WD40 repeat	411	47 049	5.7
mm. 50337	5				
mm. 50263	5		382	43 706	5.2
mm. 46096	5				
mm. 45819	5				
mm. 45773	5	Keratin& SWISNF related	214	23 974	4.8
mm. 45466	5	H2B like 1	123	14 196	10.2
mm. 45304	5		186	20 893	8.1
mm. 4583	5	Acetylcholine rcpt (Muscle)			
mm. 273316	5		219	24881	10.1
mm..262799	5				
mm..272772	5	New : Ubiquitin	46		
mm. 250837	5				
mm. 249241	5				
mm. 23516	5		206	22 536	6.1
mm. 23510	5		130	14 948	8.9
mm. 232542	5				
mm. 195787	5		114	13 082	9.3
mm. 183467	5		95	10 497	5.0
mm. 159335	5		236	27 041	5.9
mm. 158268	5		155	17 164	4.4
mm. 157047	5	Enoyl Co A Hyd. Worm		26 033	10.0
mm. 50369	5		182	20 494	5.7
mm. 23033	5		166	19 080	9.1

Table 9. Liste des gènes regroupés dans les clusters 4 et 5 de Schultz

Ces clusters regroupent les gènes exprimés dans les stades tardifs de la spermatogenèse (spermatides). Les gènes sélectionnés ont été surlignés.

avons retrouvé dans cette liste des protéines qui avaient précédemment été identifiées par spectrométrie de masse après extraction acide dans les spermatides condensées (grisées).

Beaucoup d'autres protéines dans cette liste semblent intéressantes, car de petits poids moléculaires et avec un pI très basique, donnant une liste très importante.

3. Analyse globale des données

Regroupant ainsi les données des résultats des identifications par spectrométrie de masse des protéines présentes dans les spermatides condensées, des protéines identifiées après analyse in-silico dans les banques de données protéiques ainsi que des gènes sélectionnés dans la liste effectuée par Schultz et ses collaborateurs, nous avons pu établir une liste de protéines candidates à la réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogénèse regroupées dans le tableau ci-joint (Table 10).

Les nouveaux variants d'histones H2AL1, H2AL2 et H2BL1 ont fait l'objet d'une caractérisation approfondie (Paragraphe Résultats A. I.).

Les autres variants identifiés des histones H2A et H2B, nommés H2AL3 et H2BL2 n'ont pas été retrouvés dans les cellules germinales tardives par les analyses que nous avons faites par RT-qPCR, et après avoir développé les anticorps correspondants. Ils n'ont donc probablement aucun rôle dans la réorganisation post-méiotique de la chromatine. Leur étude n'a donc pas été continuée.

Les autres protéines identifiées ont été renommées TSBP pour « Testis specific Small Basic Protein ».

Le profil d'expression de chacune de ces protéines au cours de la spermatogénèse a été analysé par RT-QPCR sur des ARNs totaux de cellules germinales à différents stades de la spermatogénèse. Les ARNs de toutes ces protéines (excepté pour l'ARNm de TSBP4 qui n'a pu être quantifié, car aucune amorce testée n'a validé les critères de qPCR) sont bien retrouvés exprimés tardivement au cours de la spermiogénèse, s'accumulant dans les spermatides condensées (Figure 35 B) Ceci est particulièrement vrai pour les TSBP1, 2, 3 ainsi que pour HMGB4, dont le taux d'ARN augmente de façon très nette au cours de la spermiogénèse. Les protéines TSBP5 et TSBP6 voient elles aussi leur taux d'ARN augmenter

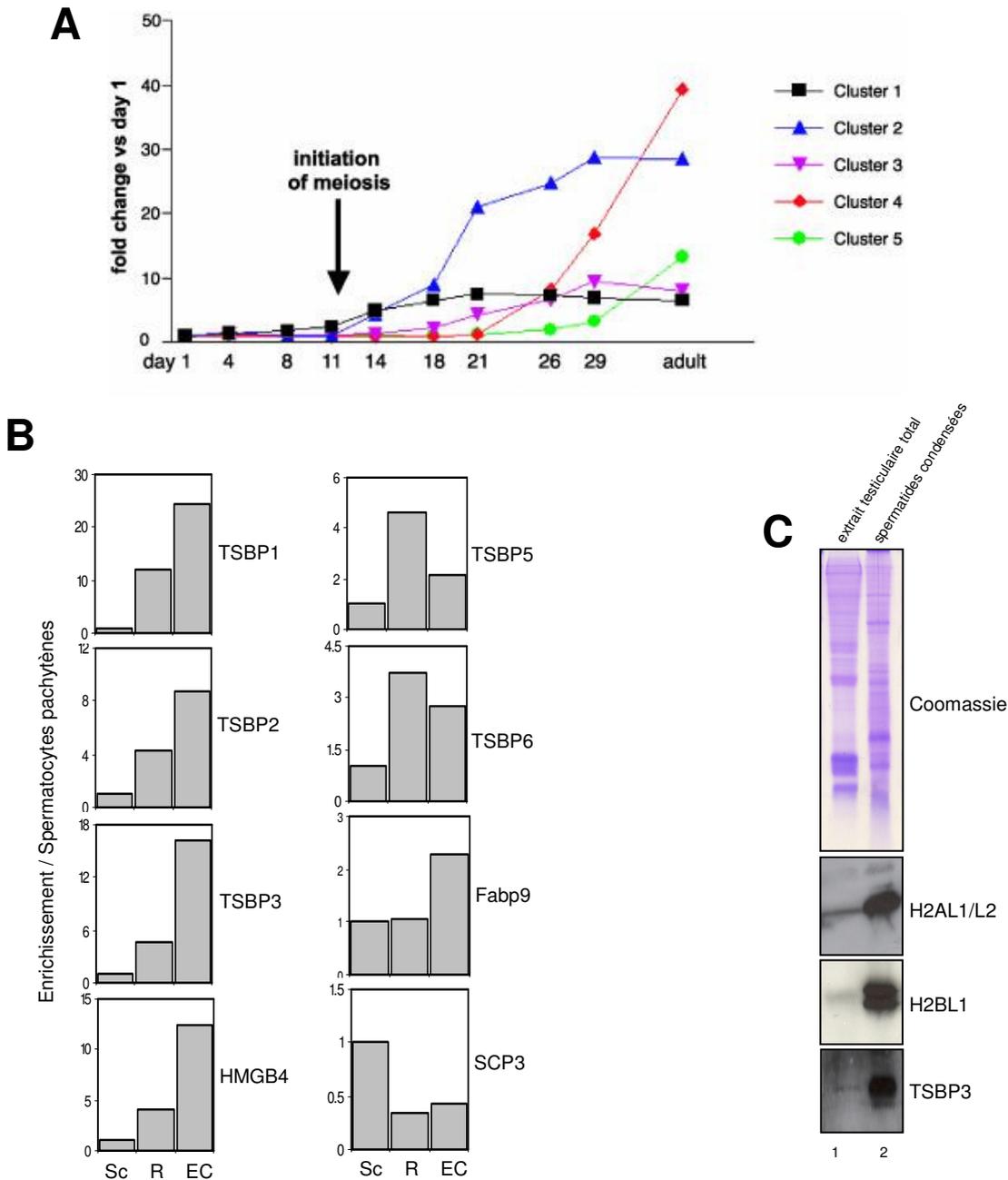


Figure 35. Caractérisation de nouvelles protéines basiques

A. L'expression des gènes dans les différents groupes. L'abondance relative des transcrits de gènes dans les testicules de souris âgées de 4, 8, 11, 14, 18, 21, 26 et 29 jours est comparée à ceux de souris âgées de 1 jour. L'augmentation de l'abondance relative des transcrits des groupes 4 et 5 coïncide avec la formation des spermatozoïdes (souris âgées de 21 jours). (D'après Schultz et coll, 2003)

B. Profil d'expression des ARNm des TSBP au cours de la spermiogenèse. Une RT-PCR a été effectuée sur des cDNA extraits de testicules avec les amorces correspondantes à chaque TSBP. Les graphiques montrent l'enrichissement de chaque fraction de cellules germinales à différents stades (Sc, spermatoocytes; R, spermatozoïdes ronds; EC, spermatozoïdes élongués et condensés) par rapport aux spermatoocytes pachytènes (Sc). L'ARN de toutes les TSBP semble s'accumuler dans les stades tardifs de la spermiogenèse. L'ARN control de la protéine SCP3 est lui bien enrichi dans le stade spermatoocyte.

C. Validation de l'anticorps développé contre TSP3. L'anticorps dirigé contre TSBP3 est testé sur un extrait testiculaire total et un extrait de spermatozoïdes condensés. Le western blot montre la présence très importante de la protéine TSBP3 dans les spermatozoïdes condensés.

Unigene	SwissProt	Nom	Type	SM	Cluster	In Silico	pI	MW	Protein Length	Expression tissu	Expression stade développemental
mm.440761	Q9DAD9	H2AL1	Novel histone H2A containing protein	x	4		10.5	12105	105	Testis	Adulte
mm.23887	Q9CQ70	H2AL2	Novel histone H2A containing protein	x	4		11	12835	111	Testis	Adulte
mm.46146	Q9CR04	H2AL3	Huntingtin interacting protein M		4		4.6	13 491	117	Testis	Adulte
mm.45466	Q9D9Z7	H2BL1 (SubH2Bv)	Histone H2B subacrosomal variant	x	5		10.26	14188	123	Testis	Adulte
mm.302721	Q9DAB5	H2BL2	Novel histone H2B containing protein			x	10.14	26094	224	Testis et ovule fertilisé	Zygote
mm.331893	Q6P8W9	HMGB4	High-mobility group box 4	x			10.5	21603	181	Testis	Adulte
mm.26654	Q9DAL2	Fabp9	Fatty acid binding protein 9	x			7.61	15017	132	Testis	Adulte
mm.297977	P70281	SCP3	Synaptonemal complex protein 3	x			8.7	29347	254	Ubiquitaire	Du blastocyste à l'adulte
mm.273327	Q9D2T6	TSBP1	Putative uncharacterized protein		4		9.5	12 416	108	Testis, foie, peau	Adulte
mm.46121	Q9DA62	TSBP2	Putative uncharacterized protein	x	4	x	10.53	13146	117	Testis	Adulte
mm.27023	Q9DAR6	TSBP3	Putative uncharacterized protein	x	4		11.3	13100	119	Testis	Adulte
mm.291732	Q8C1R9	TSBP4	Putative uncharacterized protein	x		x	10.43	8773	78	Testis	Adulte
mm.396214	Q9D9P0	TSBP5	Putative uncharacterized protein			x	10.3	12824	115	Ubiquitaire	De la gastrula à l'adulte
mm.78557	Q9D5G1	TSBP6	Putative uncharacterized protein			x	12.14	19305	169	Testis	Adulte

Table 10. Tableau récapitulatif des protéines basiques identifiées par différentes approches

Le nom des protéines ainsi que leurs identifiants (unigene ou swissprot) sont indiqués. Pour chacune des protéines, il est également indiqué quelle a été l'origine de son identification (SM, spectométrie de masse; numéro du cluster ; In-silico, Recherche dans les banques de données informatiques).

après la méiose, atteignant un maximum dans les spermatides rondes, mais rediminuer dans les spermatides allongées et condensées.

Les amorces correspondant au gène SCP3 ont été utilisées comme contrôle, car cette protéine est présente dans les complexes synaptonémaux, donc produite uniquement lors de la méiose (Yuan et al., 2000). Ainsi, on remarque que l'ARNm de cette protéine est bien présent dans les stades méiotiques (spermatocytes) et qu'elle disparaît par la suite, ce qui atteste de la qualité de notre préparation.

Nous avons tenté de réaliser des anticorps contre ces TSBP, mais seul l'anticorps dirigé contre la protéine TSBP3 a marché. Celui-ci a été testé par western blot et montre une forte expression de la protéine TSBP3 dans les spermatides condensées (figure 35 C). La caractérisation plus poussée de TSBP3 a montré un candidat sérieux pour cette réorganisation de la chromatine dans les stades tardifs de la spermatogénèse.

Toutes ces protéines ont tous les critères requis pour être de bonnes candidates à la réorganisation de la chromatine pendant les stades tardifs de la spermatogénèse. Il faudrait ainsi maintenant pouvoir toutes les caractériser afin d'étudier précisément leur rôle au cours de la spermatogénèse.

C. PARTICIPATION AUX AUTRES TRAVAUX DE L'EQUIPE

En parallèle de mon sujet de thèse, j'ai participé à des travaux de l'équipe portant sur l'étude des mécanismes de remodelage de la chromatine au cours de la spermatogénèse. Cette étude ont donné lieu à une publication, résumée et présentée ci-dessous.

1. Résumé de l'article

Dans les cellules somatiques, beaucoup de chaperonnes spécifiques sont connues pour contrôler l'assemblage des nucléosomes contenant des histones canoniques ou des variants d'histones. Mais au cours de la spermatogénèse, où la chromatine est complètement remodelée avec enlèvement des histones et remplacement par les protéines de transition ou les protamines, la seule chaperonne caractérisée spécifique du testicule est tNASP, qui chaperonne l'histone linker des cellules germinales mâles H1t (Alekseev et al., 2005).

Cette étude a donc été basée sur l'étude d'une chaperonne spécifique du testicule, HSPA2 (anciennement HSP70.2), connue pour jouer un rôle durant la méiose des cellules germinales mâles (Allen et al., 1996; Dix et al., 1996; Dix et al., 1997; Zhu et al., 1997). Cette chaperonne, abondamment présente dans les cellules au stade post-méiotique, a été identifiée comme la première chaperonne des protéines de transition TP1 et TP2. Ces travaux montrent que HSPA2 acquiert après la méiose une nouvelle fonction et contribue à la réorganisation drastique du génome ayant lieu dans les spermatides.

2. Présentation de l'article publié

L'ensemble de ce travail a été publié dans *The Journal of Biological Chemistry* en Décembre 2008. Il sera présenté page suivante.

Post-meiotic Shifts in HSPA2/HSP70.2 Chaperone Activity during Mouse Spermatogenesis*[§]

Received for publication, August 24, 2006, and in revised form, September 28, 2006. Published, JBC Papers in Press, October 11, 2006, DOI 10.1074/jbc.M608147200

Jérôme Govin^{‡§}, Cécile Caron^{‡§}, Emmanuelle Escoffier^{‡§}, Myriam Ferro^{§¶||}, Lauriane Kuhn^{§¶||}, Sophie Rousseaux^{‡§}, Edward M. Eddy^{**}, Jérôme Garin^{§¶||}, and Saadi Khochbin^{‡§1}

From [‡]INSERM, U309, Institut Albert Bonniot, F-38700 Grenoble, France, [§]Université Joseph Fourier, F-38700 Grenoble, France, [¶]Commissariat à l'Energie Atomique, DSV, DRDC, Laboratoire de Chimie des Protéines, F-38054 Grenoble, France, ^{||}INSERM, ERM0201, F-38054 Grenoble, France, and ^{**}Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, Gamete Biology Group, NIEHS, National Institutes of Health, Research Triangle Park, North Carolina 27709

HSPA2 (formerly 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 cell 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 HSPA2, which acquires new functions and becomes tightly associated with major spermatid DNA-packaging proteins, transition proteins 1 and 2. Hence, HSPA2 is identified here as the first transition protein chaperone, and these data shed a new light on the yet totally unknown process of genome-condensing structure assembly in spermatids.

Although several waves of genome-wide reorganization have long been known to occur during male germ cell post-meiotic maturation, the underlying mechanisms remain obscure. The most spectacular of these reorganizations are those associated with the replacement of histones by transition proteins (TPs)² and of TPs by protamines (1–4). 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 (5). 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 that are in action during spermiogenesis. The only characterized testis-

specific histone chaperone is tNASP, which binds the male germ cell linker histone, H1t (6). 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 HSPA2 that sheds light on potential mechanisms controlling the post-meiotic genome reorganization. HSPA2 had already been shown to possess an essential and specific role in male germ cell meiosis (7–10). However, because of a meiotic blockade and massive apoptosis of spermatocytes in HSPA2 knock-out mice, the post-meiotic function of this protein has remained obscure. Here, HSPA2 is identified as the first chaperone of transition proteins TP1 and TP2. Our data therefore strongly suggest that, after meiosis, HSPA2 acquires new functions and contributes to the dramatic spermatid-specific genome-wide reorganization.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Detailed methods are available in supplemental information.

Germinal Cell Fractionation—The fraction composed of condensing spermatids (steps 12–16) used for mass spectrometry analysis was obtained as described in Ref. 11. Other spermatogenic cell fractions were obtained using the Bellvé sedimentation method (12, 13). Cell fractions were enriched at 80% in each major stage (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 sulfuric 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-HSPA2 or anti-hemagglutinin (Santa Cruz) antibodies in the appropriate buffer (see supplemental information). Protein G coupled to dynabeads (Invitrogen) were used following the manufacturer's instructions. Bound proteins were washed, eluted in loading buffer, and analyzed by SDS-PAGE and silver staining (SilverQuest; Invitrogen) or Western blots using standard procedures.

Chromatin Fiber Extraction—Nuclei of pooled fractions obtained after fractionation were submitted to micrococcal nuclease digestion in the appropriate conditions (see supplemental methods). Nuclei were broken by osmotic shock by resuspension in H₂O, trichostatin A 300 nM, and antiprotease mixture Complete (Roche Applied Science). Micrococcal

* The Khochbin laboratory is supported by grants from the Regulome consortium (ANR-05-BLAN-0396-04) and the CLARA (EpiMed and EpiPro programs). The Eddy laboratory is supported by the Intramural Research Program of the NIEHS, National Institutes of Health. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[§] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Table S1 and supplemental text.

¹ To whom correspondence should be addressed: Inserm, U309, 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.

² The abbreviations used are: TP, transition protein; HSP, heat shock protein; Spc, spermatocyte; R, round spermatid; RE, round and elongating spermatids; EC, elongating and condensing spermatids.

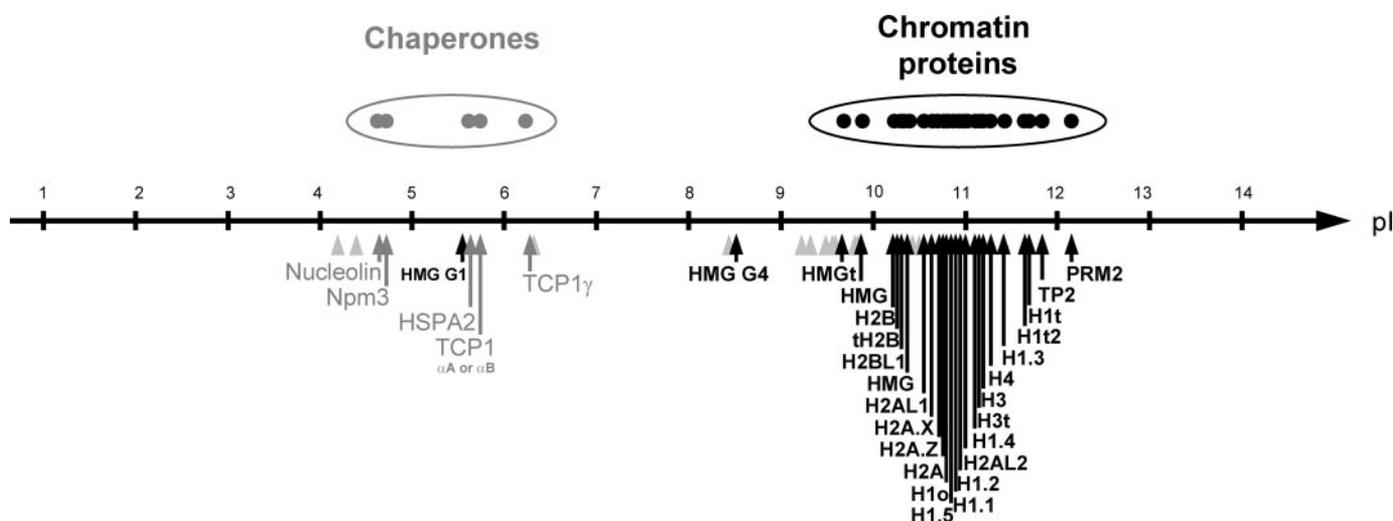


FIGURE 1. **The presence of acidic proteins in nuclear acid extracts from condensing mouse spermatids.** A global identification of proteins present in acid extracts from condensing spermatid nuclei was carried out, and the values of their isoelectric points (supplemental Table S1) were plotted along a pI scale. *Black arrows* indicate pI of chromatin proteins; *gray arrows* are for chaperones and *gray arrowheads* for miscellaneous proteins.

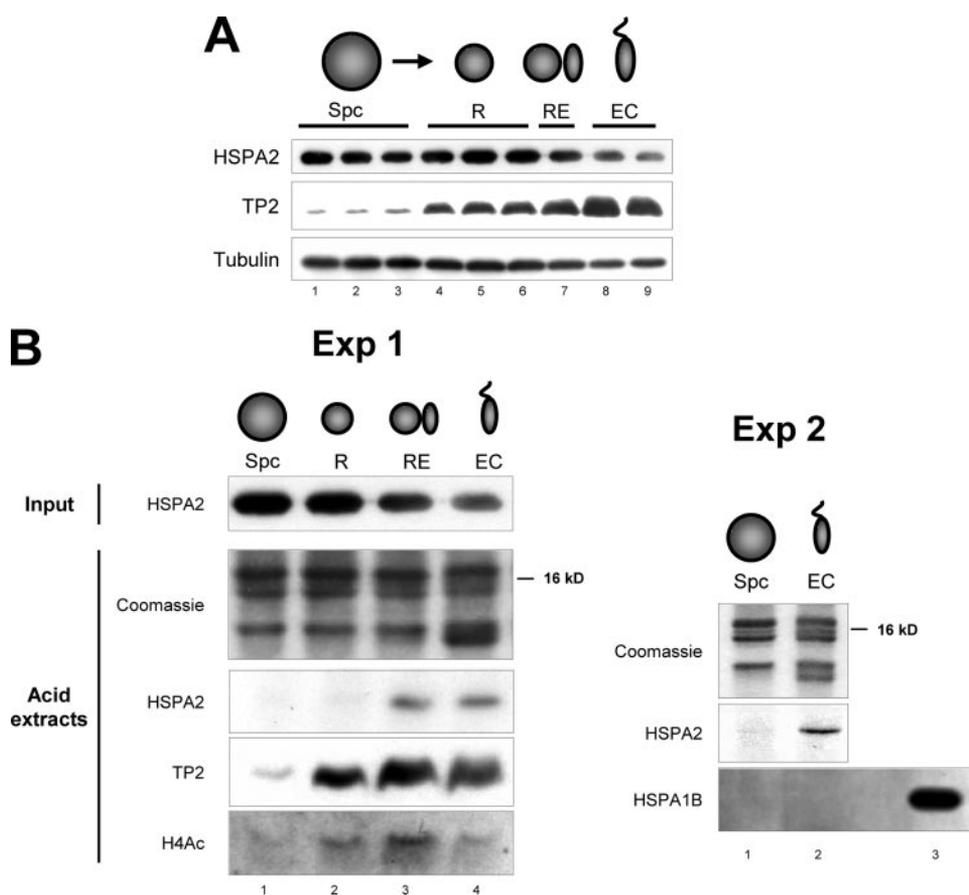


FIGURE 2. **Selective acid solubility of HSPA2 in elongating/condensing spermatids.** *A*, equivalent amounts of total cell extracts from fractionated spermatogenic cells were used to visualize the presence of HSPA2, TP2, and tubulin in cells at different stages. Fractions are as follows: *Spc*, spermatocytes; *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 HSPA2 before acid extraction is shown in the *input HSPA2* panel. After acid extraction proteins were recovered and solubilized in an appropriate buffer (see "Experimental Procedures"). The presence of HSPA2, 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 spermatid fraction (*EC*). The selective solubility of HSPA2 in pooled spermatids was monitored as above. Immunodetection of HSPA1B 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*).

nuclease-released proteins were analyzed by SDS-PAGE, using core histone amounts as internal loading control.

Immunofluorescence on Germ Cells—Nuclei were prepared as described under "Chromatin Fibers" and fixed on Superfrost slides. Detection details are available in supplemental methods. Confocal images were taken using a CLSM microscope (Zeiss) with slices of 0.7–1 μm .

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 steps 12–16, 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 supplemental Table S1. As expected, many DNA-packaging proteins are on the list. Among the

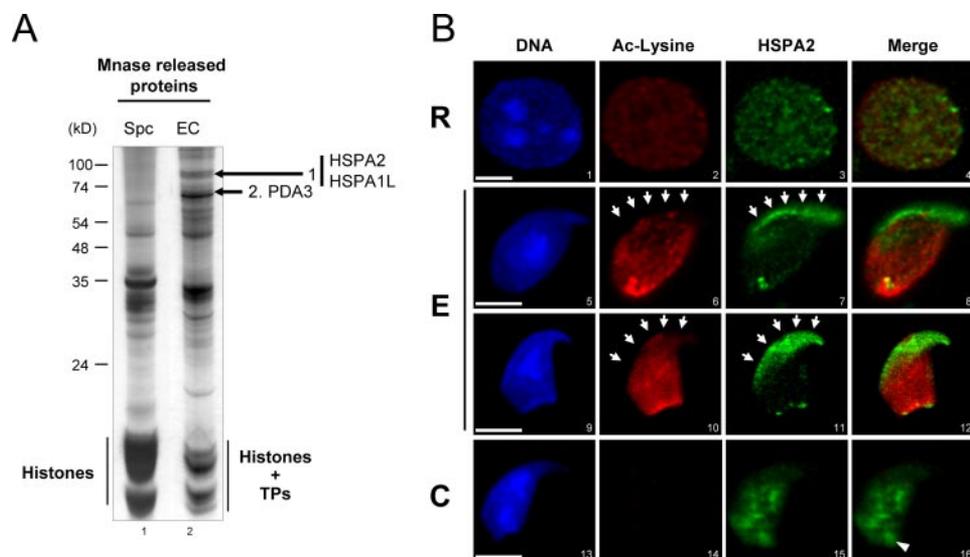


FIGURE 3. Stage-specific redistribution of HSPA2. A, stage-specific micrococcal nuclease-dependent release of HSPA2 from spermatogenic cell nuclei. Nuclei were prepared from pooled fractions of spermatocytes (*Spc*) and elongating and condensing spermatids (*EC*) and submitted to extensive micrococcal nuclease 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 1 contained HSPA2 and HSPA1L/HSC70t, and band 2 contained disulfide isomerase A3 (*PDA3*). B, stage-specific intranuclear redistribution of HSPA2 during spermiogenesis. Suspension of spermatogenic cells was used to prepare nuclei that were then subjected to co-immunolocalization of HSPA2 and acetylated lysines (monoclonal antibody detecting essentially histones in the nucleus). Images were acquired using a confocal microscope. Four representative situations are shown with R, round spermatids; E, elongating spermatids; and C, condensing spermatids. White arrows indicate regions of HSPA2 accumulation. These experiments were performed on purified nuclear suspensions because the cytoplasmic HSPA2 signal interfered with a clear detection of nuclear HSPA2, which was the object of this study. Some of the remaining cytoplasmic HSPA2 can be observed in the C panel (arrow head). Scale bar represents 2 μm .

linker histones, the newly identified H1t2 (14) 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.³ Other proteins non-related to histones were also found.

We then examined the isoelectric points (pI) of all the proteins found soluble in H_2SO_4 and plotted the pI values for each of these proteins along a pI 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 a pI between 4.5 and 6 (Fig. 1, gray arrows). An analysis of the nature of these acidic proteins revealed that known chaperones are among them. Based on these data, we hypothesized that a tight association between these acidic proteins, mainly the chaperones, and their basic partners may have induced their solubility in H_2SO_4 . Accordingly, we had here an interesting opportunity to uncover new functions for some of these chaperones in spermatids by identifying their partners.

Stage-specific HSPA2 Acid Solubilization—Among the identified chaperones, HSPA2, a testis-specific member of the HSP70 family (15), appeared to us as an interesting candidate chaperone. Indeed, the data presented above provided an excel-

lent 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 elongating spermatids (*RE*), and a mix of elongating and condensing spermatids (*EC*) were obtained and used to confirm that HSPA2 is expressed in meiotic as well as in post-meiotic cells (Fig. 2A). Our proteomic data suggested that HSPA2 becomes acid soluble because of its tight association with DNA-packaging basic proteins. To test this hypothesis, fractionated spermatogenic cells obtained as above were submitted to acid extraction. Fig. 2B shows the results of two independent experiments. Very interestingly, a fraction of HSPA2 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 HSPA1B/HSP70 (Fig. 2B, Exp 2, and

not shown). Because of high sequence identity between HSPA2 and HSPA1B, this experiment ruled out the possibility that the stage-specific acid solubility of HSPA2 could be due to nonspecific binding of basic proteins to HSPA2 during the extraction procedure.

HSPA2 Function Switch during Spermiogenesis—Our data suggested that the function of HSPA2 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 HSPA2 to DNA-organizing structures as spermiogenesis proceeds. Proteins preferentially released by micrococcal nuclease from post-meiotic cell nuclei (*EC*) compared with 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 with spermatocytes (Fig. 3A, arrows). Interestingly, in band 1, in addition to HSPA2, mass spectrometry identified HSPA1L/HSC70t, another testis-specific member of the HSP/HSC70 family. Band 2 contained disulfide isomerase A3 (*PDA3*).

We also tried to visualize the stage-specific HSPA2 redistribution *in situ*. A wave of histone acetylation is known to occur prior to histone replacement during spermatid elongation (2, 3). To have an insight into the relationship between HSPA2 localization and histone replacement, both histone acetylation and HSPA2 were detected in spermatogenic cells using, respectively, a monoclonal mouse anti-acetyl-lysine antibody (16) and a rabbit polyclonal antibody specific for HSPA2. Fig. 3B shows

³ J. Govin, C. Caron, and S. Khochbin, submitted for publication.

examples of three critical periods during spermiogenesis as a function of changes occurring in global histone acetylation. In round spermatids (*R*), HSPA2 is almost homogeneously distributed in the nucleus, and, as previously shown, histones are found underacetylated in these cells (17). Interestingly, the wave of histone acetylation observed at stage VIII spermatids (17) is associated with a dramatic redistribution of HSPA2, which becomes concentrated in a cap-like structure penetrating into the inner side of the nucleus. Co-localization with 4',6-diamidino-2-phenylindole DNA staining clearly shows that these regions are DNA-containing subacrosomal domains and, interestingly, also correspond to the domain previously shown to accumulate the spermatid-specific linker H1t2 at stage VIII (14). 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. Fig. 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 HSPA2 localization into various regions and its concentration in the nucleus.

Acid-resistant Association between TP1/TP2 and HSPA2—To visualize the binding of proteins to HSPA2 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 HSPA2. The HSPA2 antibody did not immunoprecipitate any histone, showing that if there is any HSPA2-histone interaction, it does not resist acid extraction (Fig. 4A, lane 3). The silver-stained profile of the immunoprecipitated proteins, as well as other data shown here (mainly the timing of TP accumulation and HSPA2 acid solubility) suggest that HSPA2 can form an acid-resistant complex with TP1 and TP2. To confirm this hypothesis, acid extracts from condensing spermatids were immunoprecipitated either with an irrelevant antibody (Fig. 4B, *Ir*) or the anti-HSPA2. Western blots confirmed the existence of a specific acid-resistant complex between TP1/TP2 and HSPA2 in elongating and condensing spermatids. It is interesting to mention that HSPA2 immunoprecipitation, after sonication of elongating-condensing spermatids in a buffer containing increasing amounts of salt, also allowed pull down of DNA fragments containing TP1 and TP2 (not shown). This confirms the association of HSPA2 with genomic regions where TP1/2 assembly takes place.

DISCUSSION

HSPA2, although sharing important sequence identity with other members of the HSP70 family, shows unique functions in spermatogenic cells. Indeed, the knock-out approach revealed the occurrence of specific meiotic defects in male germ cells despite the presence of another testis-specific member, HSPA1L/HSP70t, and the somatic type HSP70 in these cells (8). Male germ cells lacking HSPA2 arrest in prophase of meiosis I and pachytene spermatocytes undergo massive apoptosis (8). In these cells, HSPA2 was shown to be associated with the synaptonemal complex and to play a role in desynapsis (7–9).

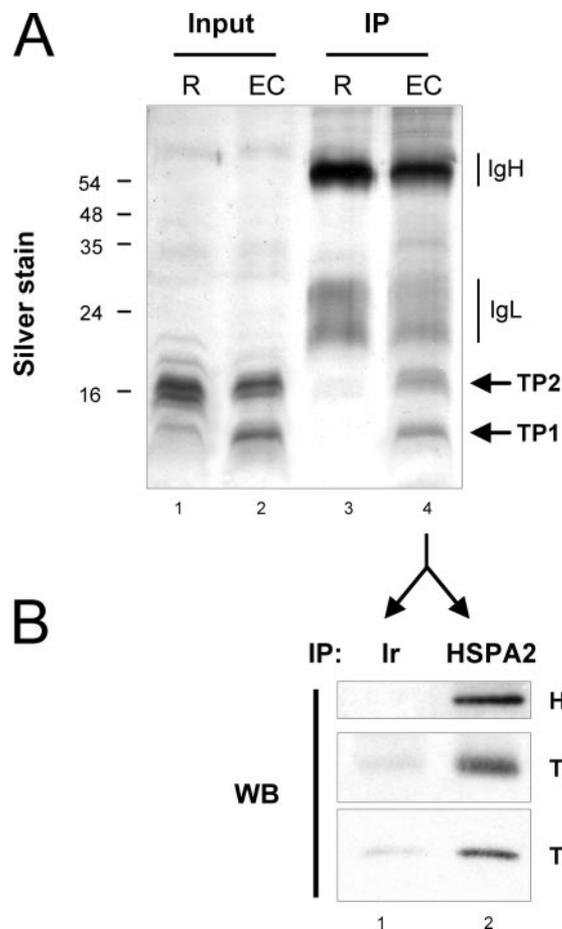


FIGURE 4. Stage-specific acid-resistant HSPA2-TP1/TP2 complex formation. A, acid extracts from pooled fractions containing round spermatids (*R*) or pooled fractions containing elongating and condensing spermatids (*EC*) were immunoprecipitated using the anti-HSPA2 antibody. A fraction of input and immunoprecipitated materials was visualized after silver staining of a gel. Expected TP1 and TP2 positions are indicated (arrows). B, acid extracts from elongating and condensing spermatids as shown in panel A were immunoprecipitated with equivalent amounts of an irrelevant antibody (*Ir*, anti-hemagglutinin) or an anti-HSPA2. The presence of HSPA2, TP1, and TP2 was monitored by a Western blot on the immunoprecipitated materials.

The protein also appears to play a role in the assembly of the Cdc2-cyclin B1 complex during meiosis (10). Although the amount of HSPA2 in post-meiotic cells is equivalent to that in meiotic cells, no function has been attributed to this chaperone in spermatids. Here we have shown that a fraction of HSPA2 becomes soluble in acid only in elongating spermatids. Specific association of HSPA2 with spermatid basic proteins, including TP1 and TP2, accounts for this selective solubility of HSPA2 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. Chaperones such as nucleolin or NPM3, known to be expressed in spermatogenic cells (18–20), have also been found among the acid-soluble proteins identified here (Fig. 1 and supplemental Table S1), but no information on their chaperone activity during spermiogenesis is available.

This report provides the first evidence for such an activity and, moreover, reveals a unique physiological situation where

HSPA2, a Spermatid-specific Chromatin Chaperone

the activity of a chaperone, HSPA2, evolves in a differentiation-dependent manner. The detailed analysis of the nuclear distribution of HSPA2 in spermatids with respect to histone acetylation confirms the existence of a specific nuclear subacrosomal compartment in elongating spermatids where transitions in genome-reorganizing structures seem to start. Interestingly, Davidson and co-workers (14) 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. We observed a specific accumulation of HSPA2 in the same region at approximately the same stage (VIII). Moreover, this particular mobilization of HSPA2 perfectly correlates with the disappearance of histone acetylation. Like H1t2 (14), HSPA2 accumulation spreads to various nuclear regions at later stages. Because histone acetylation is thought to be linked to their removal (2, 3), our data on the intranuclear distribution of HSPA2 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 HSPA2 and TP1 and TP2.

Based on all these data we propose here that, after the completion of meiosis, HSPA2 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.

Acknowledgments—We thank Drs. Steve Kistler and Minoru Yoshida for the generous gifts of anti-TP1 and anti-TP2 and for anti-acetylated lysines antibodies, respectively. We thank Sandrine Curtet-Benitski and Isabelle Galvez for expert technical assistance.

REFERENCES

1. Lewis, J. D., Song, Y., de Jong, M. E., Bagha, S. M., and Ausio, J. (2003) *Chromosoma* **111**, 473–482
2. Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2004) *Eur J Biochem* **271**, 3459–3469
3. Caron, C., Govin, J., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2005) *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **38**, 65–89
4. Kimmins, S., and Sassone-Corsi, P. (2005) *Nature* **434**, 583–589
5. Polo, S. E., and Almouzni, G. (2006) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 104–111
6. Alekseev, O. M., Widgren, E. E., Richardson, R. T., and O'Rand, M. G. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 2904–2911
7. Allen, J. W., Dix, D. J., Collins, B. W., Merrick, B. A., He, C., Selkirk, J. K., Poorman-Allen, P., Dresser, M. E., and Eddy, E. M. (1996) *Chromosoma* **104**, 414–421
8. Dix, D. J., Allen, J. W., Collins, B. W., Mori, C., Nakamura, N., Poorman-Allen, P., Goulding, E. H., and Eddy, E. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3264–3268
9. 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., and Eddy, E. M. (1997) *Development* **124**, 4595–4603
10. Zhu, D., Dix, D. J., and Eddy, E. M. (1997) *Development* **124**, 3007–3014
11. Marushige, Y., and Marushige, K. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **761**, 48–57
12. Bellve, A. R. (1993) *Methods Enzymol.* **225**, 84–113
13. Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5354–5365
14. Martianov, I., Brancorsini, S., Catena, R., Gansmuller, A., Kotaja, N., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., and Davidson, I. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2808–2813
15. Eddy, E. M. (1999) *Rev. Reprod.* **4**, 23–30
16. Komatsu, Y., Yukutake, Y., and Yoshida, M. (2003) *J. Immunol. Methods* **272**, 161–175
17. Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A. K., Usson, Y., Pelletier, R., Sele, B., Khochbin, S., and Rousseaux, S. (2000) *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 950–960
18. Biggiogera, M., Kaufmann, S. H., Shaper, J. H., Gas, N., Amalric, F., and Fakan, S. (1991) *Chromosoma* **100**, 162–172
19. Shackelford, G. M., Ganguly, A., and MacArthur, C. A. (2001) *BMC Genomics* **2**, 8
20. Eirin-Lopez, J. M., Frehlick, L. J., and Ausio, J. (2006) *Genetics*

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 HSPA2 antibody has been previously described (21) and used at 1/2000 in western blot and 1/100 in immunofluorescence. The TP1 and TP2 antibodies have been used as described in (22). Mouse monoclonal anti acetylated lysine antibody was used at 1/250 in immunofluorescence (16). 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 HSPA2 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. Micrococcal nuclease 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 0.7-1µm.

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 0.5µL aliquot of peptide mixture was mixed with 0.5µL matrix solution (-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 2µL 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 619.82 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 300µm X 5 mm PepMap C18 precolumn. The peptides were then eluted onto a C18 column (75 µm 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.

Supplementary reference

21. Rosario, M. O., Perkins, S. L., O'Brien, D. A., Allen, R. L., and Eddy, E. M. (1992) *Dev Biol* 150, 1-11

22. 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., and Meistrich, M. L. (2001) *Mol Cell Biol* 21, 7243-7255.

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, VTIAQGGVLPNIQAVLLPK
	H2A.X	P27661	15	10,7	LLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPK
	H2A.Z	P17317	14	10,6	GDEELDSLIV, ATIAGGGVIPHKK
	H2AL1	NP_083864	12	10,5	GELPFSLVDR, LVVQNNQLR
	H2AL2	Q9CQ70	13	11,0	AELQFPVSR
	H2B	P10853	14	10,3	AMGIMNSFVNDIFER, DAVTYTEHAK, LLLPGELAK, KESYSVYVYK, KESYSVYVYKLVKQVHPDGTGISSKAMGIMNSFVNDIFER
	TH2B	P70696	14	10,3	LLLPGLEAK, ESYSVYVYK, KESYSVYVYK, AMGIMNSFVNDIFER
	H2BL1	Q9D927	14	10,3	KLATLAVTFGSK
	H3	AAN10051	15	11,1	YRPGTVLR, EIAQDFKTDLR
	H3t	NP_003484	15	11,1	QLATKVAR
	H4	Q9D0C9	11	11,2	ISGLIYEETR, DAVTYTEHAK, DNIQGITKPAIR
	Linker histone				
	H1.1	P43275	22	10,9	KKPAGPSVSELIVQAVSSSK, SLAAAAGYDVEK, SGVSLAALKKSLAAAAGYDVEKNNSR, SLVNGKGLVQTK, SETAPVAQAASATEKPAAAK
	H1.2	P15864	21	11,0	SEAAPAAPAAPPAEK, ASGPPVSELITK, KASGPPVSELITK, ALAAAAGYDVEK
	H1.3	P43277	22	11,3	SETAAPAAPAPAPVEK, KASGPPVSELITK
	H1.4	P43274	52	11,1	TSGPPVSELITK, SETAAPAAPAPPAEK
	H1.5	P43276	22	10,9	SETAPAEAAPAPVEK
	H1°	P10922	21	10,9	YSDMIVAAIQAEK
	H1t	Q07133	22	11,7	LIPEALSTSQER, LIPEALSTSQERAGMSLAALKK, GTGASGSFKLSK, SETAPAAASSTLVPAPVEKPSK, ALAAAAGYDVEK, LIPEALSTSQERAGMSLAALKKALAAAAGYDVEK
	H1t2	Q8CJH4	44	11,7	ELGNAGYEVV
	Testis specific non histone protein				
	TP2	P11378	13	11,8	HPKPSVHSR
	Prm2	P07978	14	12,1	SPSEGHQPGQDHEREEQGGQGLSPER
	High mobility group protein				
	High mobility group protein 1	P63158 or Q8BQ02	25	5,6	TYIPPKGETK
	High mobility group protein 2	P30681 or Q9CT19 or Q9EQD5	24 or 21 or 21	7 or 9,9 or 6,9	KHPDSSVNFAEFSK, LGEMWSEQSAK, KLGEMWSEQSAK, YEKDIAAYR, KKLGMWSEQSAK, SKFDELAK, IEHPGLSIGDTAK, LGEMWSEQSAK
	High mobility group protein 4	O54879	23	8,5	STNPGISIGDVAK
	High mobility group protein	Q924L8	12	10,4	KQPPVSPGTALVGSQK
	Testis specific HMG	P40630	28	9,7	KPMSSYLRL, SAYNIYVSESFQEAKDDSAQSK, ELILLGKPK, KOAYIQLAK, SWEEQMAEVGR
High mobility group protein	Q9DAR4	22	9,9	KPPSSLLFSR	
Chaperones	Chromatin				
	Nucleolin	P09405	77	4,7	VEGSEPTTFFNLFIGNLNPKN, SEADAENKLEEK
	Nucleoplasmin 3	Q9CPP0	19	4,7	AAGAAAAALFNLQESR
	Generalist				
	HSPA2/HSP70.2	P17156	70	5,6	TTPSYVAFDTER, DAGTITGLNVLRIINEPTAAIAIYGLDK
	T-complex protein 1, alpha subunit A or B	P11984 or P11983	60	5,76 or 5,82	MEGPLSVFGDR
T-complex protein 1, gamma subunit	P80318	61	6,3	TAVETAVLLLR	
Metabolism	Peroxisome assembly factor 1	P35700 or O08807	22 or 31	8,26 or 6,67	QITINDLPVGR
	L-lactate dehydrogenase C chain, testis subunit	P00342	36	8,4	GLADELALVDADTNK
Translation	Elongation factor 1-beta	O70251	25	4,5	TPAGLQVLDNDYLADK
	Elongation factor 1-gamma	Q9D8N0	50	6,3	AAGTLTYYPENWR, STFVLDEFKR
	Elongation factor 1-alpha 1	P10126	50	9,1	STTTGHLYIK, YYVTIIDAPGHR, EHALLAYTLGVK, LPLQDYYK
Miscellaneous	ELAV-like protein 1 (RNA binding protein)	P70372	36	9,2	AMGIMNSFVNDIFER
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	P24369	23	9,5	TVDNFVALATGEK, DTNGSQFFITTVK
	Proline rich protein 6	Q9CXS4	27	9,9	LLLDTFEYQGLVK
	Proteasome subunit alpha type 7 or type 7-like	Q9CWH6 or Q9Z2U0	28	8,81 or 8,59	ALLEVVQSGGK
	Hypothetical lysine-rich protein	Q8C1R9	9	10,4	THYLTQDVVPSTSASKPK
	Hypothetical lysine-rich protein	Q9DA62	13	10,5	GKELFGHYHR, THNLTQDVEPSTSTSKPK
	Fau protein (ubiquitin domain)	Q920W8	15	9,9	FVNVPVTFGK
	Calmodulin	Q9D6G4	17	4,1	MADQLTTEEQIAEFKESLFDKDGDTITTK
	Cytochrome c	P62897	11	9,6	TGPNLHGLFGR, TQQAAGFSYTDANK
	p15 (RNA polymerase II transcriptional coactivator)	P11031	14	9,6	EQISDIDDAVR

D. ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

I. L'information épigénétique du spermatozoïde

1. Résumé de la revue

En plus d'une information génétique, le spermatozoïde apporte à l'embryon une information, épigénétique de nature encore mal connue, qui n'est pas portée par la séquence de l'ADN. Dans les cellules somatiques, la méthylation de l'ADN et les modifications des histones constituent des supports de cette information épigénétique. Au cours de la spermatogénèse, la structure du génome est modifiée par rapport à une cellule somatique, puisque la quasi-totalité des histones est enlevée pour être remplacé par les protamines. Cependant, des histones et probablement d'autres protéines restent associées à la chromatine. Cette revue discute ainsi sur l'hypothèse que cette hétérogénéité de l'épigénome spermatique pourrait véhiculer une information épigénétique importante pour le développement de l'embryon.

2. Présentation de la revue publiée

Cette revue a été publiée en 2006 dans *Gynécologie, Obstétrique et Fertilité*. Elle s'intitule "Epigenetics of the sperm cell".

Onzièmes Journées nationales de la FFER (Paris, 11–13 octobre 2006)

Épigénétique du spermatozoïde

Epigenetics of the sperm cell

S. Rousseaux*, A.-K. Faure, J. Thévenon, E. Escoffier, C. Lestrat, J. Govin, S. Hennebicq,
B. Sèle, C. Caron, S. Khochbin

Unité Inserm–UJF U309, institut Albert-Bonniot, rond-point de la Chantourne, 38706 La Tronche cedex, France

Reçu le 12 juin 2006 ; accepté le 5 juillet 2006

Disponible sur internet le 01 septembre 2006

Résumé

En plus d'une information génétique, le spermatozoïde apporte à l'embryon une information, de nature épigénétique, non codée par des variations de séquence de l'ADN. Dans la cellule somatique, il est actuellement admis que l'information épigénétique est régulée non seulement par la méthylation de l'ADN mais aussi par des modifications de la structure du génome, ou épigénome. Au cours de la maturation des cellules germinales mâles, la structure du génome est globalement remaniée puisque les histones, protéines nucléaires associées à l'ADN dans la cellule somatique, sont pour la plupart d'entre elles, enlevées et remplacées par les protamines, protéines basiques spécifiques du noyau spermatique, compactant l'ADN dans celui-ci. Cependant, des histones et probablement d'autres protéines restent associées à l'ADN spermatique, et la structure du génome spermatique est en réalité hétérogène. Une hypothèse est que cette hétérogénéité de l'épigénome spermatique pourrait véhiculer une information épigénétique importante pour le développement de l'embryon. Actuellement, s'il est possible d'apprécier globalement la structure du génome spermatique, rien n'est encore connu précisément sur cette structure. En particulier, des données très récentes suggèrent que certaines régions du génome pourraient être spécifiquement associées à des protéines spécifiques. Cette régionalisation du génome pourrait être le support d'une information épigénétique cruciale pour le développement embryonnaire.

© 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

In addition to genetic information, the spermatozoon carries another type of information, named epigenetic, which is not associated with variations of the DNA sequence. In somatic cells, it is now generally admitted that epigenetic information is not only regulated by DNA methylation but also involves modifications of the genome structure, or epigenome. During male germ cell maturation, the epigenome is globally reorganized, since most histones, which are associated to DNA in somatic cells, are removed and replaced by sperm specific nuclear proteins, the protamines, responsible for the tight compaction of the sperm DNA. However, a small proportion of histones, and probably other proteins, are retained within the sperm nucleus, and the structure of the sperm genome is actually heterogeneous. This heterogeneity of the sperm epigenome could support an epigenetic information, transmitted to the embryo, which could be crucial for its development. Although it is nowadays possible to appreciate the global structure of the sperm genome, the precise constitution of the sperm epigenome remains unknown. In particular, very recent data suggest that specific regions of the genome could be associated with particular proteins and define specific structures. This structural partitioning of the sperm genome could convey important epigenetic information, crucial for the embryo development.

© 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Spermatozoïde ; Épigénétique ; Procréation ; Infertilité ; Génome ; Chromatine ; Histones ; Protamines

Keywords : Spermatozoon; Epigenetics; Reproduction; Infertility; Genome; Chromatin; Histones; Protamines

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : sophie.rousseau@ujf-grenoble.fr (S. Rousseaux).

1. Introduction

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée dont la fonction essentielle est de transmettre l'information d'origine paternelle à la descendance. En plus de l'information génétique, il est maintenant admis que le spermatozoïde apporte à l'embryon une information qui n'est pas codée par la séquence nucléotidique des gènes, que l'on appelle épigénétique.

L'information épigénétique est une information transmissible et réversible, qui régule l'expression des gènes, ainsi que de nombreux processus cellulaires, notamment la différenciation et la prolifération. Pendant longtemps, le seul support connu et décrit de l'information épigénétique était la méthylation de l'ADN. On sait maintenant que dans la cellule somatique, la structure d'emballage du génome, la chromatine, participe également au code épigénétique. L'unité de base de la chromatine somatique est le nucléosome, au sein duquel l'ADN est enroulé autour d'un octamère formé des protéines histones, H2A, H2B, H3 et H4. Les modifications chimiques intéressant la molécule d'ADN, telles qu'une méthylation des cytosines, ou bien des modifications post-traductionnelles affectant les histones sont connues pour moduler l'information épigénétique. L'incorporation de variants des histones canoniques peut aussi affecter l'emballage nucléosomal et par conséquent l'information épigénétique d'une cellule. Ces modifications, ou marques épigénétiques, se combinent pour coder l'information épigénétique [1–3]. Celle-ci intervient de manière déterminante pour réguler le déroulement des processus de différenciation et le développement. Sa dérégulation peut être à l'origine d'anomalies congénitales ou de pathologies acquises diverses, incluant notamment les cancers.

2. Information épigénétique véhiculée par le spermatozoïde

Les expérimentations de transferts de pronoyaux dans des zygotes, ont montré pour la première fois que, bien que la contribution génétique de deux génomes parentaux soit équivalente, leur contribution épigénétique ne l'est pas. En effet, des zygotes présentant deux génomes haploïdes ovocytaires ou deux génomes haploïdes spermatiques ne pouvaient pas se développer [4]. Cette observation a conduit à l'identification d'un certain nombre de gènes dits soumis à l'empreinte parentale, dont seul l'allèle maternel ou seul l'allèle paternel est exprimé [5]. On sait maintenant que ces différences d'expression correspondent à un profil de méthylation spécifique des îlots CpG en amont des gènes soumis à l'empreinte, qui déterminera leur expression ou au contraire leur répression dans les cellules somatiques du futur individu [6–8].

Bien qu'actuellement la méthylation de l'ADN soit encore la seule marque épigénétique clairement identifiée dans les cellules germinales, il est hautement probable, qu'à l'instar de ce qui est observé dans les cellules somatiques, la structure spécifique d'emballage du noyau spermatique joue un rôle important comme support moléculaire d'une information qui sera épigénétiquement transmise à l'embryon.

Le noyau du spermatozoïde est transcriptionnellement réprimé et son génome, très condensé, présente une structure unique où la plupart des histones a été remplacée par les protamines [9,10]. Le rôle de cette structure compacte est probablement de protéger le génome spermatique contre des agressions physiques et/ou chimiques. Cependant, l'ADN spermatique n'est pas uniformément associé aux protamines puisqu'il persiste des histones ainsi que des protéines basiques différentes des protamines. Il est probable que cette hétérogénéité de la structure d'emballage du génome spermatique joue un rôle important pour la spécificité d'une information qui sera épigénétiquement transmise à l'embryon.

Cette hypothèse repose sur plusieurs observations. Premièrement, quelques travaux suggèrent une organisation spécifique des chromosomes et des régions sous-chromosomiques au sein du noyau spermatique [11–13]. Cependant, contrairement à ce qui est établi dans la cellule somatique où la relation entre la fonction et l'organisation structurale du noyau a été caractérisée [14], la signification fonctionnelle de l'architecture nucléaire du noyau spermatique reste à définir. Deuxièmement, il est connu depuis longtemps que plusieurs espèces de mammifères retiennent une organisation double nucléohistone/nucléoprotamine dans leur noyau spermatique, en particulier l'homme [15] et la souris [16]. Le noyau spermatique humain retient environ 15 % d'histones et contient également un mélange hétérogène de protamines. Il a été suggéré que cette double structure nucléoprotamine/nucléohistone pourrait correspondre à un arrangement différentiel de régions de chromatine correspondant à des fonctions spécifiques [17]. Enfin, des données récentes de nos travaux vont dans le même sens puisqu'elles suggèrent que la restructuration postméiotique du génome ne se déroule pas de manière homogène dans l'ensemble du noyau et pour l'ensemble des régions chromosomiques. Par exemple, chez la souris, nous avons observé que les régions péri-centromériques sont associées à de nouveaux variants d'histone H2A-like et H2B-like, incorporés très tardivement au cours de la spermiogenèse et persistant dans les spermatozoïdes (Escoffier et al. données non publiées).

Une hypothèse est qu'il pourrait exister une régionalisation du génome spermatique définie par des structures spécifiques associées à des régions particulières du génome. Cette régionalisation structurale du génome dans le spermatozoïde pourrait avoir un rôle dans la transmission d'une information épigénétique importante pour le développement embryonnaire. Cependant, les connaissances sont encore très insuffisantes concernant la structure du génome spermatique et c'est seulement lorsque celle-ci sera élucidée de manière précise que son importance et son rôle pourront être étudiés au cours du développement embryonnaire.

3. Mise en place de l'épigénome mâle au cours de la spermatogenèse

À l'heure actuelle, les facteurs impliqués dans la mise en place de l'épigénome mâle au cours de la spermatogenèse sont encore très mal connus. Les données existantes montrent

cependant que l'épigénome est considérablement remanié au cours de la maturation du gamète mâle, notamment lors de la maturation postméiotique des spermatozoïdes en spermatozoïdes, ou spermiogenèse où le génome haploïde est entièrement restructuré. En effet, alors que le noyau du spermatozoïde s'allonge et se condense, les histones somatiques (encore présentes dans le noyau du spermatozoïde rond) sont pour la plupart enlevées et progressivement remplacées par des protéines dites de transition ou TPs, lesquelles sont ensuite remplacées par des protéines nucléaires spécifiques du noyau spermatique, les protamines [18,19]. Les protamines sont de petites protéines basiques, responsables de la compaction très importante du génome dans le spermatozoïde. Bien que ces échanges de protéines aient été décrits au cours de la spermatogenèse dans de nombreuses espèces, les mécanismes moléculaires les dirigeant sont totalement inconnus. Deux observations concernant les histones avant leur enlèvement sont particulièrement intéressantes puisqu'elles ont permis d'engager la recherche de facteurs impliqués dans la restructuration postméiotique du génome. Il s'agit d'une part de l'incorporation, à la place des histones canoniques, d'un certain nombre de variants d'histones, dont certains sont spécifiques du testicule [20], et d'autre part de l'augmentation importante et globale du niveau d'acétylation des histones de cœur du nucléosome [21]. Chez la souris, la caractérisation précise des modifications post-traductionnelles affectant les histones avant leur enlèvement, notamment des profils d'acétylation, a mis en évidence un faible niveau d'acétylation des histones dans les spermatozoïdes ronds, suivi d'une augmentation de l'acétylation des extrémités N terminales des histones H2A et H4, intéressant d'abord la globalité du noyau lors du début de l'élongation (stades 8 et 9), puis se distribuant de manière plus restreinte dans un sous-domaine nucléaire dense au DAPI à des stades plus tardifs (stades 10 et 11) [22]. Nos données récentes suggèrent que le sous-domaine retenant les histones acétylées correspond aux régions péri-centromériques des chromosomes contenant les séquences satellites majeures murines, suggérant un rôle particulier de ces séquences lors de la restructuration du génome germinale mâle (Govin et al., données non publiées).

Afin d'identifier des facteurs pouvant être impliqués dans la réorganisation postméiotique du génome spermatique, nous avons recherché des facteurs d'expression testiculaire susceptibles de reconnaître et d'être recrutés sur la chromatine acétylée, et de participer à sa réorganisation. Les facteurs contenant des bromodomains, un domaine connu pour se lier aux peptides d'histones acétylées, étaient de bons candidats.

Ainsi BRDT (*Bromodomain testis specific*) est l'un des facteurs identifiés par cette approche. Il est exprimé spécifiquement dans le testicule et contient deux bromodomains, responsables de sa liaison aux histones acétylées. De plus, il présente la propriété unique d'induire une compaction globale majeure de la chromatine lorsque celle-ci est hyperacétylée [23]. Nos données d'expression suggèrent qu'il pourrait donc avoir la fonction de compacter la chromatine acétylée lors de la condensation des spermatozoïdes [24]. Un autre facteur, 3A-Brd, contenant un domaine AAA-ATPase et un bromodomaine, se

lie spécifiquement à la chromatine acétylée via ce bromodomaine et à des composants de la petite sous-unité du protéasome via son domaine AAA-ATPase (Lestrat et al., données non publiées). Ce deuxième facteur pourrait être impliqué dans la dégradation des histones.

Nous avons ainsi pu proposer un premier modèle décrivant les mécanismes moléculaires de la réorganisation postméiotique du génome [25–27]. Ce modèle est le suivant. Dans les spermatozoïdes ronds, la chromatine est encore de type somatique : au niveau de chaque nucléosome l'ADN est enroulé autour de l'octamère formé par les histones de cœur H2A, H2B, H3 et H4, et le niveau global d'acétylation des histones est maintenu faible par une activité histone déacétylase élevée (en effet, les histones déacétylases HDAC1 et 2 sont fortement présentes dans ces cellules). Les HDACs sont ensuite dégradées et s'ensuivrait l'augmentation globale de l'acétylation des histones H2A et H4 observées dès le début de l'élongation. Les facteurs à bromodomaine(s) seraient recrutés sur les histones acétylées. BRDT pourrait participer à la compaction de la chromatine. 3A-Brd, recrutant le protéasome, pourrait apporter les complexes dégradant les histones. D'autres données suggèrent que des chaperones pourraient faciliter les échanges protéiques, l'enlèvement des histones et l'incorporation des protéines de transition et des protamines (Govin et al., données non publiées).

4. Anomalies de l'épigénome spermatique et procréation humaine

Cela nous amène à considérer les conséquences potentielles d'anomalies de la réorganisation du génome spermatique en pathologie humaine. En effet, chez certains patients, une anomalie de l'un des facteurs dirigeant la réorganisation/compaction/empaquetage postméiotique du génome pourrait être responsable d'une altération de la spermatogenèse et par conséquent être une cause d'infertilité. Si de plus ce facteur participe à la mise en place d'une information épigénétique paternelle, il pourrait en résulter la production de gamètes dont l'information épigénétique est erronée. Si ces patients ont recours aux techniques d'Assistance médicale à la procréation (AMP), ces gamètes, à l'instar des gamètes porteurs d'un déséquilibre chromosomique, pourraient produire des embryons anormaux, conduisant à un échec de développement ou même à des anomalies détectées à la naissance ou des pathologies postnatales.

Quelques études ont en effet montré la possibilité d'anomalies épigénétiques chez des enfants conçus par ICSI [28–30]. Cependant, ces cas ne semblent pas directement liés à l'information paternelle. En revanche, une étude du statut de méthylation de deux gènes soumis à l'empreinte dans les spermatozoïdes de patients présentant une altération de la spermatogenèse suggère une association entre une empreinte anormale et une hypospermatogenèse [31]. Une autre étude ne montre pas de différence [32]. À l'heure actuelle, du fait de l'absence totale de données concernant un support moléculaire autre que la méthylation de l'ADN, pour l'information

épigénétique dans le spermatozoïde, il est encore impossible d'évaluer le statut épigénétique des spermatozoïdes chez les hommes infertiles.

D'une manière générale, les techniques actuelles permettant d'étudier l'épigénome spermatique chez l'homme visent à quantifier les protéines nucléaires spermatiques et/ou évaluent le degré de fragmentation de l'ADN [33,34]. La méthylation globale de l'ADN spermatique a également été mesurée [35]. Si ces approches ont permis de définir des anomalies parfois associées à des échecs de fécondation et/ou d'implantation ou de développement embryonnaire [36], elles restent très globales. La structure précise du génome spermatique n'ayant pas encore été décrite, il n'est pas possible de déterminer plus précisément le statut épigénétique du spermatozoïde humain normal et pathologique.

5. Anomalies de la restructuration postméiotique du génome et infertilité masculine

Une meilleure connaissance des événements et des facteurs impliqués dans la réorganisation postméiotique du génome mâle permet cependant de rechercher des anomalies chez des hommes présentant une spermatogenèse altérée. Par exemple, un profil d'acétylation des histones anormales, ou bien une anomalie du facteur BRDT peuvent être observés chez les hommes présentant un trouble sévère de la spermatogenèse.

Une augmentation globale d'acétylation des histones dans les spermatides en élongation est normalement observée au cours de la spermatogenèse humaine [37]. Ce profil d'acétylation de la chromatine est, de manière très surprenante, fortement altérée lors de certains troubles sévères de la spermatogenèse. En effet, chez les hommes présentant une absence totale de cellules germinales dans leurs testicules (*Sertoli cell-only syndrome* (SCO)), nous avons observé une augmentation globale de l'acétylation des histones dans les cellules de Sertoli. Il en est de même dans les tubes séminifères péricruraux dans les cancers du testicule. Or il est connu que les cancers du testicule sont plus fréquents chez les hommes ayant un SCO que dans la population générale. Ces données chez l'homme suggèrent que l'acétylation des histones participerait à une voie de signalisation régulant la spermatogenèse via un dialogue entre cellules germinales et cellules de Sertoli, et qu'une dérégulation de celle-ci pourrait être associée à la genèse de certains cancers du testicule [37].

Afin d'identifier des anomalies portant sur les facteurs réorganisant la chromatine chez les hommes infertiles, nous avons engagé une approche gène candidat. Ainsi, nous avons entrepris de rechercher systématiquement des anomalies dans les régions codantes du gène *Brdt* chez les hommes infertiles. Nos données (non publiées) suggèrent que l'une des variations observées, lorsqu'elle est à l'état homozygote, pourrait être associée à un phénotype d'infertilité masculine.

6. Conclusion

Actuellement l'épigénome spermatique ne peut être exploré que par des approches globales. Or, bien que le support de

l'information épigénétique dans le spermatozoïde ne soit pas encore élucidé, les données fondamentales suggèrent que la structure tout à fait unique du génome dans le noyau spermatique y contribue de manière spécifique. Ainsi, l'association de facteurs et protéines spécifiques à des régions particulières du génome pourrait définir le support moléculaire d'un code épigénétique qui sera transmis à l'embryon. Des études fondamentales sont nécessaires pour permettre le décodage précis de cette information, et l'identification de marques caractérisant le statut épigénétique du spermatozoïde. Ces marques pourront servir de base pour le développement de tests d'intégrité épigénétique des spermatozoïdes chez des hommes candidats à l'AMP. De même, la caractérisation des événements et des facteurs impliqués dans la mise en place de l'épigénome spermatique permettra de rechercher d'éventuelles anomalies chez les hommes infertiles présentant des troubles de la spermatogenèse.

Références

- [1] Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(2):172–83.
- [2] Cheung P, Lau P. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol* 2005;19(3):563–73.
- [3] de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas MA. Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* 2005;27(2):164–75.
- [4] McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984;37(1):179–83.
- [5] Cattanach BM, Kirk M. Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* 1985;315(6019):496–8.
- [6] Mann JR. Imprinting in the germ line. *Stem Cells* 2001;19(4):287–94.
- [7] Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2002;3(9):662–73.
- [8] Kierszenbaum AL. Genomic imprinting and epigenetic reprogramming: Unearthing the garden of forking paths. *Mol Reprod Dev* 2002;63(3):269–72.
- [9] Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982;93(2):298–305.
- [10] Ward WS, Zalensky AO. The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1996;6(2-3):139–47.
- [11] Zalensky AO, Allen MJ, Kobayashi A, Zalenskaya IA, Balhorn R, Bradbury EM. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* 1995;103(9):577–90.
- [12] Zalenskaya IA, Bradbury EM, Zalensky AO. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279(1):213–8.
- [13] Hazzouri M, Rousseaux S, Mongelard F, Usson Y, Pelletier R, Faure AK, et al. Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Mol Reprod Dev* 2000;55(3):307–15.
- [14] Cremer T, Cremer C. Chromosome Territories, Nuclear Architecture and Gene Regulation in Mammalian Cells. *Nat Rev Genet* 2001;2(4):292–301.
- [15] Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 1987;236(4804):962–4.
- [16] Pittoggi C, Renzi L, Zaccagnini G, Cimini D, Degrossi F, Giordano R, et al. A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J Cell Sci* 1999;112(20):3537–48.
- [17] Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 2003.
- [18] Poccia D. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int Rev Cytol* 1986;105:1–65.

- [19] Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevaillier P, Sautiere P. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* 1998;80(2):117–28.
- [20] Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 2004;271(17):3459–69.
- [21] Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Lin R, Bhatnagar YM, Allis CD. Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol Reprod Dev* 1992;31(3):170–81.
- [22] Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sele B, et al. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* 2000;79(12):950–60.
- [23] Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 2003;23(15):5354–65.
- [24] Govin J, Lestrat C, Caron C, Pivot-Pajot C, Rousseaux S, Khochbin S. Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis. In: Berger SL, Nakanishi O, Haendler B, editors. *The Histone Code and Beyond*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2006. p. 155–72.
- [25] Caron C, Govin J, Rousseaux S, Khochbin S. How to pack the genome for a safe trip. *Prog Mol Subcell Biol* 2005;38:65–89.
- [26] Rousseaux S, Faure AK, Caron C, Lestrat C, Govin J, Hennebicq S, et al. *Gynecol Obstet Fertil* 2004;32(9):785–91 [Organizing the sperm nucleus].
- [27] Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK, Khochbin S. Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* 2005;345(2):139–53.
- [28] Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002;71(1):162–4.
- [29] De Rycke M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: Risk analysis and epigenetic inheritance. *Hum Reprod* 2002;17(10):2487–94.
- [30] DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003;72(1):156–60.
- [31] Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004;363(9422):1700–2.
- [32] Hartmann S, Bergmann M, Bohle RM, Weidner W, Steger K. Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 2006;12(6):407–11.
- [33] Roux C, Tripogney C, Joanne C, Bresson JL. *Gynecol Obstet Fertil* 2004;32(9):792–8 [Nuclear quality of the spermatozoon: exploration tests of the chromatin of human spermatozoa (nuclear proteins)].
- [34] Sergerie M, Bleau G, Teule R, Daudin M, Bujan L. *Gynecol Obstet Fertil* 2005;33(3):89–101 [Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility].
- [35] Benchaib M, Braun V, Ressenkoff D, Lornage J, Durand P, Niveleau A, et al. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod* 2005;20(3):768–73.
- [36] Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update*; 2005.
- [37] Faure AK, Pivot-Pajot C, Kerjean A, Hazzouri M, Pelletier R, Peoc'h M, et al. Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Mol Hum Reprod* 2003;9(12):757–63.

II. La reprogrammation épigénétique du génome mâle au cours de la gamétogénèse et du développement zygotique.

1. Résumé de la revue

Au cours de la spermatogénèse, la structure chromatinienne est complètement perturbée car la quasi-totalité des histones est remplacée par les protamines, créant ainsi une structure hétérogène spécifique de ces cellules. L'organisation spécifique de ce génome spermatique suggère la possibilité d'une transmission d'un message épigénétique important pour le développement de l'embryon.

Cette revue résume ce qui est connu sur le processus fondamental de la formation des gamètes mâles, qui implique des changements globaux de la structure du génome haploïde mais également des changements de structure localisés, au niveau notamment des régions péricentromériques ou des chromosomes sexuels.

Elle résumé également l'importance de cette information épigénétique après la fécondation pour le développement de l'embryon, en montrant notamment les différences de profil de méthylation de l'ADN et de modifications d'histones au sein des deux pronucléi mâle et femelle.

2. Présentation de la revue publiée

Cette revue a été publiée en Février 2008 dans *Reproductive biomedicine online*.

Elle s'intitule "Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote".

Symposium: Genetic and epigenetic aspects of assisted reproduction

Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote



Sophie Rousseaux MD (1990) PhD (1995) is Research Director at INSERM. Her PhD focused on the genetics of male gametes. After post-doctoral research in human genetics with Professor Sue Povey (MRC, UCL, London, UK), Dr Rousseaux was appointed Assistant Professor in 1997, and Professor in 2006, at Grenoble University Medical School. Her research work within Saadi Khochbin's group is now dedicated to understanding the genetic and epigenetic factors of male infertility, and to developing co-operative research in epigenetics between the teams of the Research Center INSERM U823 and the medical teams of Grenoble University Hospital.

Dr Sophie Rousseaux

S Rousseaux, N Reynoird, E Escoffier, J Thevenon, C Caron, S Khochbin
INSERM, U823, Grenoble, F-38706 France and Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, F-38700 France

¹Correspondence: sophie.rousseau@ujf-grenoble.fr

Abstract

During post-meiotic maturation, male germ cells undergo a formidable reorganization and condensation of their genome. During this phase most histones are globally acetylated and then replaced by sperm-specific basic proteins, named protamines, which compact the genome into a very specific structure within the sperm nucleus. Several studies suggest that this sperm-specific genome packaging structure conveys an important epigenetic message to the embryo. This paper reviews what is known about this fundamental, yet poorly understood, process, which involves not only global changes of the structure of the haploid genome, but also localized specific modifications of particular genomic regions, including pericentric heterochromatin and sex chromosomes. After fertilization, the male genome undergoes a drastic decondensation, and rapidly incorporates new histones. However, it remains different from the maternal genome, bearing specific epigenetic marks, especially in the pericentric heterochromatin region. The functional implications of male post-meiotic and post-fertilization genome reprogramming are not well known, but there is experimental evidence to show that it affects early embryonic development.

Keywords: chromatin, epigenetics, histone acetylation, one-cell zygote, pericentric heterochromatin, spermatogenesis

Introduction

Epigenetic information is conveyed by inherited modifications of chromatin, which define the 'epigenome' (Bernstein *et al.*, 2007). In somatic cells, it involves DNA methylation as well as modifications of the genome packaging structure, or chromatin. The basic unit of chromatin is the nucleosome, where a length of 146 base pairs (bp) of DNA is wrapped around an octamer of core histones, H2A, H2B, H3 and H4 (Wolffe, 1995). Well-studied modifications of this structure include histone covalent modifications (Berger, 2007; Kouzarides, 2007; Li *et al.*, 2007), the incorporation of histone variants (Kamakaka and Biggins, 2005; Sarma and Reinberg, 2005), the recruitment of chromatin remodelling factors (Eberharter *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2006; Choudhary and Varga-Weisz, 2007; Hogan and Varga-Weisz, 2007) and the expression of non-coding RNA (Bernstein and

Allis, 2005; Grewal and Elgin, 2007; Zaratiegui *et al.*, 2007). In somatic cells, some histone modifications, including H3 and H4 lysine acetylation, and H3 lysine 4 methylation are associated with an open/accessible chromatin state, whereas the so-called 'repressive' marks are H3 methylation on lysine 9 and 27, and H4 methylation on its lysine 20.

Epigenetic information is involved in the regulation of gene expression, and, directly or indirectly, in numerous cellular processes, including cell differentiation and proliferation, and has been found deregulated in several constitutive and acquired diseases, including imprinting disorders and cancers (Feinberg, 2007; Jones and Baylin, 2007).

In the 1980s, pronuclei transfer experiments showing that zygotes with either two male or two female haploid pronuclei could not develop, demonstrated that the male and female haploid genomes, although each contributing half of the genetic information, were not equivalent (McGrath and Solter, 1984). This observation has led to the discovery of the so-called imprinted genes, which are monoallelically expressed, either from the maternal or from the paternal allele (Cattanach and Kirk, 1985). It is now known that these genes, which are crucial for early embryo development, are grouped in clusters, and that the allelic differences in their expression correspond to differential DNA methylation in the *cis*-regulatory control regions, named imprint control regions (ICR) between the paternal and the maternal chromosomes (Reik and Walter, 1998, 2001; Mann, 2001; Reik *et al.*, 2001, 2003; Kierszenbaum, 2002; Li, 2002). These allelic differences in the paternal and maternal DNA methylation profiles of the ICR are erased early during gametogenesis (in primordial germ cells), and then acquired in a sex-specific manner during oogenesis and spermatogenesis (for review see Reik *et al.*, 2001; Delaval and Feil, 2004; Allegrucci *et al.*, 2005; Reik, 2007; Schaefer *et al.*, 2007). Hence, along with its genome, each gamete brings sex-specific epigenetic information, which is crucial for early development of the embryo. In addition to the sex-specific DNA methylation reprogramming mentioned above, it has also been established that the male genome is globally restructured and reorganized during spermatogenesis.

The composition of the epigenome in the mature sperm cell is the result of a major restructuring of the genome, which takes place in the late phases of spermatogenesis, in post-meiotic maturing spermatids. The molecular mechanisms underlying this genome reorganization are just starting to be understood. The resulting sperm-specific genome structure could be crucial for the epigenetic information conveyed to the embryo, but this structure is still poorly known.

Another important global chromatin restructuring takes place immediately after the fusion of the sperm and the egg. It involves male genome decompaction, partly mirroring its post-meiotic compaction, followed by a series of chromatin changes of both maternal and paternal pronuclei, finally leading to their fusion and the first embryonic mitotic division.

The present review will focus on chromatin transitions affecting the genome, in male maturing germinal cells as well as in the early 1-cell embryo. Although at these stages the genome is globally remodelled, several studies have recently revealed that specific genomic regions, including the sex chromosomes and pericentric heterochromatin are differentially modified and are sites of specific chromatin reorganization.

Chromatin reorganization during male gametogenesis

One of the most dramatic chromatin remodelling and genome reorganizations ever observed takes place during the post-meiotic maturation of male germ cells. After meiosis, early male haploid cells, or spermatids, inherit a somatic-like chromatin-based genome organization. During the following stages of their maturation, histones are removed and replaced by testis-specific basic proteins, namely transition proteins and then protamines,

the latter being responsible for the very tight compaction of the sperm genome. Spermiogenesis is also associated with the extinction of gene transcription. Indeed, transcription is active in spermatogonia, pachytene spermatocytes and round spermatids. It is thought to stop shortly after in elongating spermatids (Sassone-Corsi, 2002).

Genome-wide nuclear protein transitions in condensing spermatids

During spermatid differentiation, between histone removal and the incorporation of protamines, transition proteins represent 90% of the basic proteins associated with chromatin (for reviews see Poccia, 1986; Wouters-Tyrou *et al.*, 1998; Meistrich *et al.*, 2003).

In humans, transition protein 1 (TP1) appears in step 3 to 4 spermatids, whereas TP2 is present in step 1 to 5 spermatids (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 yet been unravelled.

Experimental disruption of the major transition nuclear protein (TNP) genes, *TNP1* (Yu *et al.* 2000) or *TNP2* (Adham *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001) produces subfertile knockout mice, with an abnormal processing of protamine 2 (which is normally produced from a large precursor, subsequently undergoing a proteolytic maturation), and insufficient nuclear condensation. The absence of one *TNP* gene seems to affect the displacement of the other *TNP* gene, leading to its abnormal retention (Zhao *et al.*, 2004). By examining the effect of the nine possible combinations of heterozygous and homozygous *TNP1* and/or *TNP2* null mutations, a general decrease in normal morphology, motility and chromatin condensation has been observed, 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 spermatozoa from double heterozygous males (*TNP1*^{-/+}; *TNP2*^{-/+}) show fewer abnormalities than spermatozoa from males homozygous for a single *TNP*-null mutation suggests that the redundancy of TNP function is only partial. Interestingly, following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatids from mice lacking both *TNP* genes, the success rate of fertilization was one third of that of wild-type mice, and fewer pre-implantation embryos developed to the morula/blastocyst stage (Shirley *et al.*, 2004).

The molecular mechanisms driving the incorporation and removal of transition proteins are unknown. Recent results suggest that chaperones are involved. Indeed, the HSP70.2 protein, known to play a critical role in the completion of meiosis during male germ cell differentiation, acquires new functions in post-meiotic cells, where it becomes a chaperone of TP1 and TP2 (Govin *et al.*, 2006a).

In the final stages of spermatid condensation, the protamines become the predominant nuclear proteins. Protamines are highly basic proteins of low molecular mass that are

associated with nuclear DNA in the spermatozoa. They are responsible for the DNA being packaged in a very compact manner (Wouters-Tyrou *et al.* 1998; Lewis *et al.*, 2003b). In several mammals, including humans and mice, two protamines, Prm1 and Prm2, are present in sperm nuclei. It has been shown that both protamines are essential for normal sperm function, and that haploinsufficiency caused by a targeted disruption of one allele of either Prm1 or Prm2 results in a reduced amount of the respective protein, an abnormal processing of Prm2 and prevents genetic transmission of both mutant and wild-type alleles (Cho *et al.*, 2001). Using single-cell DNA electrophoresis (comet assay) and ultrastructural analysis these workers have further demonstrated a direct correlation between haploinsufficiency of Prm2 and spermatozoa with damaged DNA and a reduced compaction of chromatin (Cho *et al.*, 2003). The use of Prm2-deficient sperm for ICSI of metaphase II mouse eggs showed that, although most eggs were reactivated, only a few were able to develop to the blastocyst stage. According to these results, Prm2 would be essential for maintaining the integrity of sperm chromatin, and early embryo development (Cho *et al.*, 2003).

The phosphorylation of protamines has also been shown to be essential. Indeed, mutation of the calmodulin-dependent protein kinase Camk4, which phosphorylates Prm2, results in defective spermiogenesis and male sterility (Wu and Means, 2000; Wu *et al.*, 2000).

The structure of nucleoprotamine, predominant in the mature sperm nucleus, 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 very tight packaging of the DNA (Balhorn, 1982; Risley, 1990; Raukas and Mikelsaar 1999).

Although the global transitions in nuclear proteins mentioned above have been known for some time, the molecular basis of the driving elements controlling them is only starting to be deciphered.

Before global histone removal, two specific kinds of events affecting the nucleosome have been described: the incorporation of histone variants (Trostle-Weige, 1984; Meistrich *et al.*, 1985; Grimes, 1986; Nickel *et al.*, 1987; De Lucia *et al.*, 1994; Churikov *et al.*, 2004) and an increased global acetylation of the core histone tails (Grimes *et al.*, 1975; Christensen and Dixon, 1982; Oliva and Mezquita, 1982; Christensen *et al.*, 1984; Grimes and Henderson, 1984; Meistrich *et al.*, 1992; Hazzouri *et al.*, 2000a; Sonnack *et al.*, 2002; Faure *et al.*, 2003;). It has been postulated that these modifications could result in a looser nucleosomal structure, and facilitate the recruitment of factors and complexes further involved in histone replacement. (For reviews, see Govin *et al.*, 2004; Caron *et al.*, 2005).

More recently, specific functions have been described for some histone variants and histone modifications, which are leading to a better understanding of epigenomic changes during male gametogenesis.

Role of histone variants in remodelling and compartmentalizing the meiotic and post-meiotic genome during male gametogenesis

Histone variants are non-allelic forms of the conventional histones (Malik and Henikoff, 2003). Several histone variants replace canonical histones during spermatogenesis, many of them are incorporated during meiosis, and the function of some of them is beginning to be understood (for reviews see Lewis *et al.*, 2003a; Govin *et al.*, 2004; Rousseaux *et al.*, 2005). However, the functions of several testis-specific histone variants, such as TH2A, TH2B, TH3 (in rat) or H3t (in the human) have not been defined (Rao *et al.*, 1983; Trostle-Weige *et al.*, 1984; Meistrich *et al.*, 1985; van Roijen *et al.*, 1998).

Among the linker histone variants (Khochbin, 2001), the main known testis-specific variant is H1t, which is incorporated during meiosis, and is likely to act post-meiotically. Interestingly, H1t^{-/-} mice are fertile (Drabent *et al.*, 2000, 2003; Lin *et al.*, 2000). Another linker histone variant, HILS1 (H1-like protein in spermatids), was identified in mouse and human testis (Iguchi *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003). Its expression profile suggests that it could replace H1t in elongating condensing spermatids and be involved in reorganizing chromatin in these cells. Another variant, H1t2, is expressed late during spermatogenesis (Martianov *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2005). Its polar nuclear localization in elongating and condensing spermatids, as well as the phenotype of the mutant mice in which this gene was inactivated, suggests a major role for this variant during post-meiotic chromatin remodelling.

Several variants of the core histone H2A are involved in the formation of a separate chromatin domain called the sex body, which characterizes the mammalian male meiotic prophase (Handel, 2004). Within this specific DAPI 4,6-diamidino-2-phenylindole-dense structure, the X and Y chromosomes are partially synapsed and transcriptionally silenced, a process termed meiotic sex-chromosome inactivation or MSCI (Turner, 2007). The variants, which have been found associated with MSCI, include macroH2A.2 (Motzkus *et al.*, 1999; HoyerFender *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2001), H2AX (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003), H3.3 (van der Heijden *et al.*, 2007), and H2AZ (Greaves *et al.*, 2006). According to these studies, MSCI is initiated by the asynapsis of the non-homologous regions of the sex chromosomes, and triggered by phosphorylation of H2AX (Turner *et al.*, 2004, 2005). There is now recent evidence that some degree of transcriptional repression of the sex chromosomes is retained in post-meiotic cells as a direct consequence of MSCI (Turner *et al.*, 2006). In round spermatids, repressive chromatin marks, such as histone H3 dimethylated on lysine 9 and heterochromatin protein Hp1beta/CBX1, have been shown to co-localize, not only with the round chromocentre (corresponding to the pericentric heterochromatin region) but also with the nearby X or Y DAPI-dense domain (Turner *et al.*, 2006). Moreover, the histone variant H2A.Z, which was shown to be enriched in the sex chromosome domain in post-meiotic cells, could also have a role in maintaining the sex chromosomes in a repressed state (Greaves *et al.*, 2006). Recently, de Boer and collaborators have demonstrated that nucleosomes are massively replaced shortly after the induction of MSCI, resulting in the exclusive incorporation of the H3.3

variant (van der Heijden *et al.*, 2007), which, interestingly, was previously known as an 'active' chromatin mark. This process is accompanied by loss of all H3 modifications followed by reacquisition of a specific set of H3 modifications in the post-meiotic sex chromosome domain. Together, these studies suggest that the sex chromosomes define a specific chromatin domain in the male meiotic and post-meiotic germinal cells, which is functionally differentiated by the recruitment of specific histone variants and modifications.

Recent work suggests that core histone variants could also be incorporated in specific genomic regions of late spermatids, despite the removal of most core histones from the rest of the genome. Indeed, three new core histone variants, homologous to H2A and H2B, have been identified recently and named H2AL1, H2AL2 and H2BL1, respectively (Govin *et al.*, 2007). Interestingly, these new histone variants are incorporated very late during spermiogenesis, when most other histones are removed, and remain present in the mature spermatozoa. They are part of new chromatin structures, which associate with pericentric heterochromatin regions in late condensing spermatids, and could therefore be involved in specifically reprogramming these regions during male gametogenesis (see below).

Genome-wide histone acetylation and initiation of pericentric heterochromatin reprogramming

A massive increase in global histone acetylation, which mostly affects H4 and H2A, takes place in elongating spermatids in many species (Oliva and Mezquita, 1982; Meistrich *et al.*, 1992), including mice and humans (Hazzouri *et al.*, 2000a; Faure *et al.*, 2003).

In addition to this global increase in histone acetylation, phosphorylation of H4 serine 1 (S1), could also be an important event involved in genome post-meiotic reprogramming (Krishnamoorthy *et al.*, 2006). Recently Kimmins and co-workers observed that histone H3 lysine 4 mono-, di- and trimethylation is finely regulated during mammalian spermatogenesis and suggested that this mark, which interacts with transcriptional regulatory complexes, could be involved in the epigenetic control of the specific transcriptional programme governing male germ cell differentiation (Godmann *et al.*, 2007). The analysis of the other histone modifications did not highlight any other remarkable event (M Godmann, unpublished).

In addition, the authors and other researchers observed that the genome-wide histone H4 hyperacetylation, which occurs at the beginning of spermatid elongation, is followed by a dramatic reprogramming of the pericentric heterochromatin (van der Heijden *et al.*, 2006; Govin *et al.*, 2007).

In interphase somatic cells, pericentric heterochromatin from several chromosomes tend to cluster and form the so-called chromocentres, which are DAPI-dense regions, and are particularly visible in mouse cells (Haaf and Schmid, 1991; Guenatri *et al.*, 2004). Investigations on the molecular nature of heterochromatin at chromocentres have shown that histone methyltransferases homologous to Su(var)3-9 specifically methylate lysine 9 of histone H3 at chromocentres (Peters *et*

al., 2001) and that the heterochromatin proteins HP1 alpha and beta bind these modified histone tails (Muchardt *et al.*, 2002; Cheutin *et al.*, 2003; Gilbert *et al.*, 2003; Maison and Almouzni, 2004).

After the completion of meiosis, in early round spermatids, the pericentric heterochromatin regions become grouped and organized in a unique round chromocentre. Investigations show that, in these cells, the chromocentre exhibits all the expected characteristics of somatic-cell heterochromatin, including association with HP1 (heterochromatin protein 1) proteins and enrichment in H3 trimethylated in lysine 9 (H3K9me). Interestingly, in elongating spermatids, it has been shown that the occurrence of the global histone H4 hyperacetylation corresponds to a decompaction of this unique chromocentre, followed by a complete reprogramming of these pericentric regions. Initially devoid of acetylated histones, these regions gain histone H4 acetylation, and loose the associated HP1 proteins. However, despite the spreading of histone acetylation, H3K9me remains associated with these pericentric regions. A detailed analysis shows that, at this stage, pericentric heterochromatin is composed of a mixture of nucleosomes individually bearing, either the usual H3K9me mark or acetylated H4, but not both. Moreover, as the elongation/condensation of the spermatids proceeds, histone acetylation persists in the pericentric regions, while it disappears from the other regions, reflecting global histone removal in the latter (Govin *et al.*, 2007).

These data suggest that histone acetylation is associated not only with global histone replacement by transition proteins (in most of the genome) but also with constitutive heterochromatin reprogramming.

Genome-wide compaction of acetylated chromatin by a testis-expressed double bromodomain-containing protein

In order to establish a molecular link between histone acetylation and their replacement, Pivot-Pajot *et al.* (2003) looked for factors potentially capable of reading and functionally interpreting these specific histone acetylation marks, i.e. factors bearing the acetyl-lysine binding module, the bromodomain. Testis-specific bromodomain (BRDT) is a double bromodomain-containing protein expressed in testis. It is present during the critical post-meiotic stages, and is a very interesting possible candidate factor.

These investigations showed that BRDT has the extraordinary capacity of compacting chromatin, *in vivo* and *in vitro*, in a strictly acetylation-dependent manner (Pivot-Pajot *et al.*, 2003). This function is highly dependent on the integrity of its bromodomains and their ability to bind acetylated histone H4. It was further shown that BRDT colocalized very precisely with acetylated genomic regions throughout spermiogenesis (Govin *et al.*, 2006b). These results suggested that BRDT could indeed be involved in an early global compaction of acetylated chromatin occurring in condensing spermatids. Accordingly, recent observations showed that male mice bearing a homozygous deletion of the first bromodomain of BRDT are infertile, with signs of defective post-meiotic genome packaging (Shang, 2007; S Rousseaux, unpublished).

Pericentric heterochromatin regions remain associated with specific nucleosomes and nucleosome-like structures in condensing spermatids

In condensing spermatids, the persistence of nucleosomes associated with constitutive heterochromatin, despite their replacement in all other regions, was observed (van der Heijden *et al.*, 2006; Govin *et al.*, 2007). This suggested that specific chromatin-associated structures and proteins could differentiate these regions from the rest of the genome. A digestion of condensing spermatid nuclei by micrococcal nuclease (MNase) confirmed this hypothesis, and identified two MNase-resistant structures in these cells. One was identical to the somatic nucleosome and one was of a smaller size and contained new testis-specific histone H2A and H2B variants that have been named H2AL1, H2AL2, and H2BL1 (Govin *et al.*, 2007). More detailed investigations showed that TH2B, a previously identified testis-specific H2B variant of unknown function (Rao *et al.*, 1983; Meistrich *et al.*, 1985; van Rooijen *et al.*, 1998), could provide a platform for the structural transitions accompanying the incorporation of these new histone variants (Govin *et al.*, 2007). Both structures, as well as the new histone variants, were specifically associated with pericentric heterochromatin in late condensing spermatids as well as in mature spermatozoa. The new nucleosome-like structures that were associated with pericentric heterochromatin could convey information important for embryo development.

Working model for post-meiotic chromatin remodelling

After the completion of meiosis, the induction of a massive and genome-wide histone hyperacetylation triggers the reprogramming process. This is associated with histone replacement in most of the genome and a specific reprogramming of pericentric heterochromatin (**Figure 1**).

In elongating spermatids, histone acetylation would signal their removal and degradation. BRDT would link histone acetylation to: (i) a first step of genome compaction and massive histone removal in most of the genome; and (ii) to nucleosome survival and histone exchange, with incorporation of new histone variants, in pericentric regions.

The assembly of these structures allows regional differentiation of the male genome to be established in mature spermatozoa, mediating the transmission of yet unknown male-specific epigenetic information to the embryo. All these events should somehow be linked together. Future efforts should focus on establishing these links.

The sperm epigenome

In an effort to understand the global composition of the sperm nucleus, the basic unit of the nucleoprotamine structure was elucidated (Brewer *et al.*, 1999, 2002; Balhorn, 1982, 1989; Fita *et al.*, 1983), and it has been proposed that it is organized into loop domains attached at their bases to a nuclear matrix (Ward and Coffey, 1990, 1991; Ward, 1994; Ward and Zalensky, 1996; Yabuta *et al.*, 2006).

The relationship between function and nuclear organization has been well established in somatic cells (Cremer and Cremer, 2001; Fraser and Bickmore, 2007; Misteli, 2007). Several studies, describing the position of chromosomes and subchromosomal regions within the sperm nucleus (Zalensky and Zalenskaya, 2007), have established that, in the sperm cell, individual chromosomes define distinct territories (Haaf and Ward, 1995; Zalensky *et al.*, 1995), which are not randomly positioned relative to one another (Luetjens *et al.*, 1999; Hazzouri *et al.*, 2000b), and that centromeres are grouped well inside the nuclear volume whereas telomeres are localized at the nuclear periphery, where they interact in dimers and tetramers (Meyer-Ficca *et al.*, 1998; Hazzouri *et al.*, 2000b; Zalenskaya and Zalensky, 2002). A refined model for the organization of the nucleoprotamine fibre within the chromosome and subchromosomal domains has now been proposed (Mudrak *et al.*, 2005). The functional significance of this specific sperm nuclear architecture remains to be clearly defined.

Although the main component of sperm chromatin is the nucleoprotamine unit, the work described above, as well as other studies, suggest that the sperm nucleus structure is actually more heterogeneous and complex than initially thought. One hypothesis is that different chromatin structures could be associated with specific regions of the genome, defining a specific epigenetic code, which could be transmitted to the embryo, and be important for its development.

Several mammalian species retain a dual nucleohistone/nucleoprotamine organization within their sperm chromatin, including humans (Gatewood *et al.*, 1987) and mice (Pittoggi *et al.*, 1999). 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). Gatewood and collaborators have demonstrated that the nucleohistone and nucleoprotamine portions of human sperm chromatin form discrete structures, which are, at least partly, sequence specific (Gatewood *et al.*, 1987). They have also purified the four core histones from mature human sperm chromatin including H2A (and its variants H2A.X and H2A.Z), H4 (in its unacetylated and acetylated forms), H3.1 and H3.3, and H2B (Gatewood *et al.*, 1990). Whether the nucleohistone/nucleoprotamine dual structure corresponds to a specific differential arrangement of chromatin regions according to potential functions remains to be investigated. A few studies argue in favour of this hypothesis, which suggests that regions of the genome that contain genes that are either differentially expressed during spermatogenesis, such as the cluster *PRM1-PRM2-TNP2* (Kramer *et al.*, 2000; Martins and Krawetz, 2007), or that are expressed very early during embryogenesis are histone-enriched (Gardiner-Garden *et al.*, 1998; Wykes and Krawetz, 2003). Imprinted genes and some repetitive DNA regions could also be differentially marked (Wykes and Krawetz, 2003).

In addition, 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

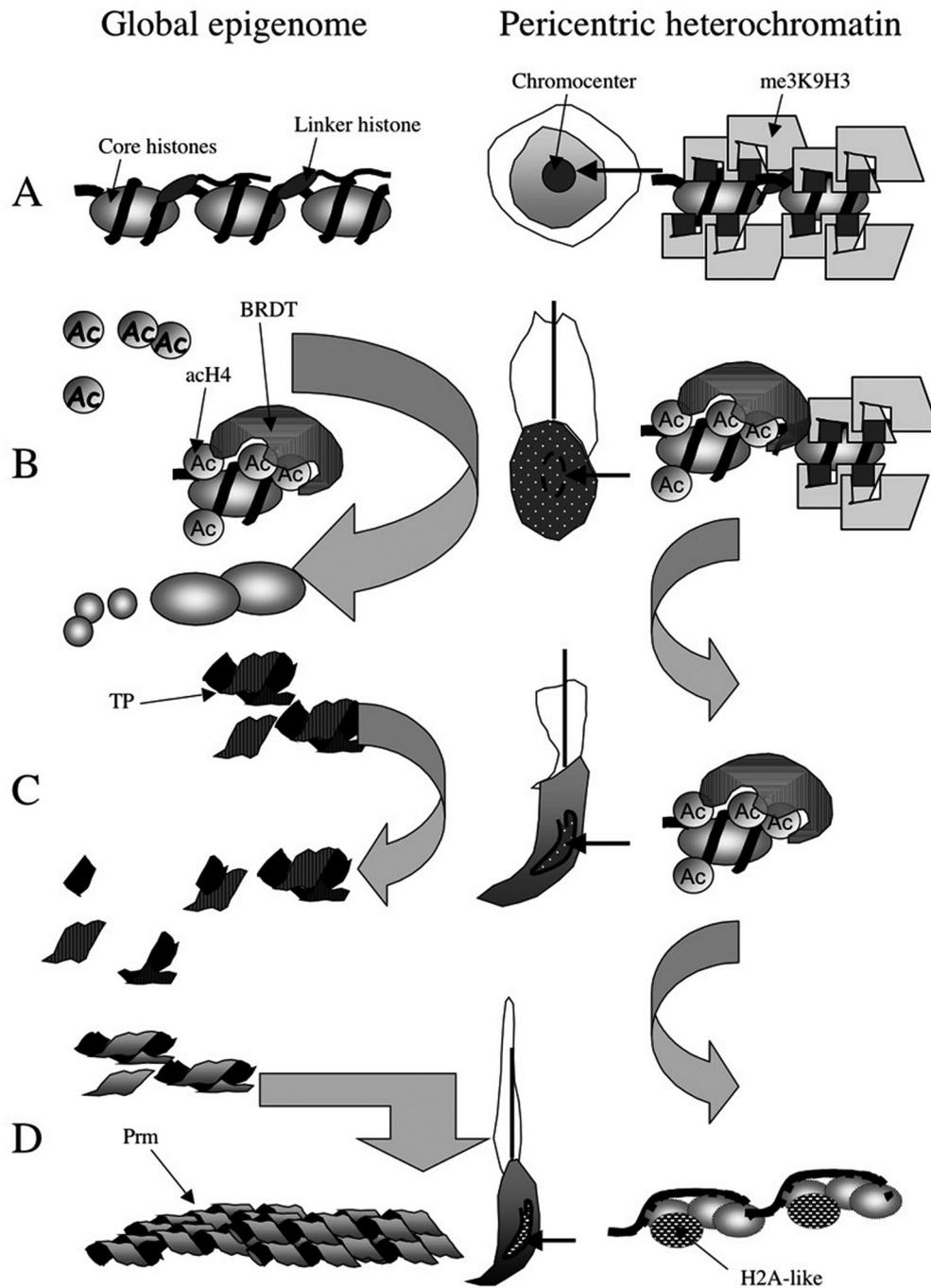


Figure 1. Working model for post-meiotic chromatin remodelling. (A) Round spermatid nucleus with a somatic-like nucleosomal structure: DNA (black line) is wrapped around octamers of core histones (ovals) and internucleosomal DNA is associated with linker histones. Pericentric heterochromatin form a round chromocentre and is enriched in lysine 9 trimethylated histone 3 (me3K9H3; parallelic shapes). (B) Early elongating spermatids: histones become globally hyperacetylated (round light circle), bromodomain, testis-specific (BRDT) associates with acetylated (Ac) histones (H) and compacts the genome, while most histones are removed. In pericentric heterochromatin histones remain and nucleosomes with acetylated histones co-exist with nucleosomes bearing me3K9H3. (C) In condensing spermatids, most histones have been removed and replaced by transition proteins (TP). Heterochromatin remains enriched with acetylated histones and bound BRDT. (D) In late-condensing spermatids and sperm cells, most of the genome is associated with protamines (Prm), but pericentric heterochromatin remains associated with testis-specific histones (H2A-like), forming a small nucleosome-like structure.

a possible role during post-fertilization sperm nucleus decondensation (Zalenskaya and Zalensky, 2002).

Moreover, the recently identified mouse testis-specific H2A variants, H2A-L1 and H2A-L2, appear in late condensing spermatids, where they specifically mark pericentric heterochromatin regions, and remain in mature epididymal sperm (Govin *et al.*, 2007). These variants could also be involved in directing the fate of these regions after fertilization. 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 to define these epigenetic marks. Finally, in addition to chromosomal architecture and histone variants and modifications, other factors could also be involved in the epigenetic information conveyed by the sperm nucleus, including non-coding RNAs.

The lack of detectable transcriptional activity during late post-meiotic stages, and the small cytoplasmic volume, supported the idea that DNA and chromatin were the only basis for the transmission of information by the male gamete to the embryo. Recent discoveries strongly suggest that this was a false idea. Indeed Krawetz and Miller have shown that spermatozoa from fertile men contain more than 3000 different mRNA species (Ostermeier *et al.*, 2002, 2004). Some of these RNAs encode proteins that are necessary for early embryo development, but the function of most of them is unknown. It has been shown that, in addition to mRNAs, the sperm cell contains small RNAs involved in regulating the expression of some genes (Ainsworth, 2005). Moreover, Rassoulzadegan and collaborators have recently demonstrated that the transfer of RNA molecules in fertilized eggs could induce a stable and transmissible phenotype (Rassoulzadegan *et al.*, 2007). These data show that RNA molecules could be directly involved in the epigenetic information transmitted to the zygote. However, the molecular basis of this process remains to be explored.

Moreover, a recent set of data suggest that non-coding RNAs and their associated proteins, including piRNAs associated with the Argonaute family members PIWI/PAZ proteins, are involved in the silencing of transposon activity and maintaining genomic integrity in the male germ cells (O'Donnell and Boeke, 2007; Wu and Chu, 2008).

Chromatin remodelling and nuclear protein exchanges in the zygote

After fertilization, several major global changes in nuclear and chromatin composition occur in the early developing embryo, which are associated with the establishment of specific and regulated nuclear functions. Immediately after sperm entry, the volume of the paternal chromatin dramatically increases, protamines are removed and new histones are quickly incorporated from the oocyte cytoplasm (McLay and Clarke, 2003). Despite the rapid acquisition of histones in the male pronucleus, the paternal and maternal genomes remain separated

and undergo differential modifications of their chromatin and epigenetic marks during the first cell cycle.

Global chromatin structure and organization is different between paternal and maternal genomes in the 1-cell embryo

The DNA of the paternal genome is globally, actively and rapidly demethylated within the first 6 h after gamete fusion (Reik *et al.*, 2001; Reik and Walter, 2001; Santos *et al.*, 2002; Beaujean *et al.*, 2004; Santos and Dean, 2004), whereas the maternal genome remains methylated. However, some specific regions of the paternal genome, including the paternally methylated imprinting control regions, are spared from this global demethylation. Recently, PGC7/Stella, a maternal factor essential for early development, was identified as the factor protecting the maternal genome as well as the paternal imprinting control regions (ICR) from this initial wave of DNA demethylation (Nakamura *et al.*, 2006).

The histone composition of the paternal genome also drastically differs from that of the maternal genome owing to the predominant incorporation of the H3 variant H3.3 by the assembly factor Hira (van der Heijden *et al.*, 2005). The variant H3.3 could be a key factor in maintaining the differentiation of the early male genome from the female, after histone incorporation. In the 1-cell zygote, the respective histone modifications differ between the maternal and the paternal genomes (Morgan *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005; van der Heijden *et al.*, 2005, 2006).

A decade ago, it was observed that following fertilization, hyperacetylated H4 was associated with paternal but not with maternal chromatin (Adenot *et al.*, 1997). Interestingly, histone H4 acetylated at K8 or K12 was recently observed even prior to full decondensation of the sperm nucleus, and it was suggested that these histones could have been inherited from the sperm cells, where they had remained specifically associated with pericentric heterochromatin (van der Heijden *et al.*, 2006). Other marks, including H4 K5 and K16 acetylation, H3 K9, K14 and K18 acetylation, H3 S10 phosphorylation were shown to be absent from the epididymal sperm and present on the maternal histones incorporated during sperm decondensation (van der Heijden *et al.*, 2006).

The only histone methylation marks observed in the early male pronucleus are monomethylation of H3K4 and H4K20, which are rapidly acquired in the decondensing male pronucleus (van der Heijden *et al.*, 2005). The paternal genome also shows increasing monomethylation on lysine 9 and 27 of H3. Trimethyl H3-K27 is not observed in the male until the completion of DNA replication (Santos *et al.*, 2005). Heterochromatin protein 1 beta is abundant in the male pronucleus in association with monomethyl H3-K9, and it was suggested that its presence could help prevent further methylation of H3-K9 by histone methyl transferases (Santos *et al.*, 2005).

The histones associated with the maternal genome show not only mono- but also di- and trimethylation of H3 on lysine 4, 9 and 27, as well as trimethylation of H4 lysine 20.

The role and meaning of this differential marking of the male and female genomes in the 1-cell embryo is not clear yet. However, the inefficiency of cloning technologies using somatic cell nuclear transfer suggests that it is essential for a successful embryonic development (Loi *et al.*, 2008).

Pericentric chromatin is differentially marked in the male and female pronuclei

Interestingly, in the female pronucleus, trimethylation of H3K9 and H4K20 are marks specifically localized in the pericentric heterochromatin, at the periphery of nucleolar precursor bodies (NPB, which form round-shaped structures devoid of nucleic acids within the nucleus) in the maternal pronucleus (Morgan *et al.*, 2005). In contrast, in the male pronucleus, trimethylated H3K9 and trimethylated H4K20 are absent and HP1 *beta* and monomethylated H4K20 are homogeneously distributed (van der Heijden *et al.*, 2005). This was recently confirmed by the work of Probst *et al.* (2007). Debey and collaborators, who focused on the reorganization of centric and pericentric regions during early mouse development, observed that, although the centromeres were predominantly present in the periphery of NPB, in both male and female pronuclei, these regions were enriched in late replicating DNA only in the female nucleus (Martin *et al.*, 2006).

Altogether, these data suggest that the division between euchromatin and heterochromatin in the paternal chromatin is either non-existent or requires specific marks, which are different to those of the maternal or somatic chromatin. They also provide a molecular basis for understanding how the sex-specific marks of the paternal and maternal genomes are maintained during early development.

Several data also suggest that specific genomic regions, which are differentially marked during gametogenesis, are crucial for early genome reprogramming. For instance, it has been shown that the pericentric regions described above undergo progressive spatial and temporal reorganization in the early dividing embryo, until the blastocyst stage, when chromocentres acquire their somatic characteristics, which are important for the regulation of differential gene expression patterns (Martin *et al.*, 2006). Other important sex-specific marks are those differentiating the male from the female X chromosome in XX embryos, enabling the process of imprinted X inactivation (Heard *et al.*, 1997; Heard, 2004; Heard and Distèche, 2006; Wagschal and Feil, 2006).

Consequences of the male genome post-meiotic reprogramming on early development

The lower success rate for offspring production following round spermatid injection (ROSI) (Ogura and Yanagimachi, 1995) compared with ICSI suggests that immature post-meiotic cells, although haploid, are not as efficient in supporting embryo development as mature spermatozoa. A recent study has identified epigenetic abnormalities specifically associated with embryos obtained from ROSI. Indeed, unlike the normal paternal genome, the paternal genome derived from a round spermatid, after being globally demethylated, is highly

remethylated before first mitosis. Genomes from elongated spermatids exhibit an intermediate level of DNA remethylation, suggesting that the male germ cell acquires the ability to remain undermethylated in the 1-cell zygote during its post-meiotic maturation (Kishigami *et al.*, 2006). The molecular basis of this property of the male genome remains to be elucidated.

Conclusion

Fundamental work has shown that a unique set of specific epigenetic modifications mark the male haploid genome during its post-meiotic differentiation, and that the pericentric heterochromatin and sex chromosome regions are differentially affected. Although the functional meaning of these modifications has yet to be unravelled, there is strong evidence that it affects male genome reprogramming during early embryonic development.

More effort is needed to understand the molecular basis of the epigenetic message, which is conveyed by the spermatozoan to the embryo, and how this message could be altered in patients suffering from infertility. This understanding will not only provide more insight into potential causes of male infertility, but will also help to evaluate the chances of assisted reproductive technologies being successful and resulting in the birth of healthy children. Moreover, some recent studies have highlighted adverse effects of environmental polluting components, including endocrine disruptors, on male germ cell epigenome reprogramming, leading to transgenerational transmission of adult-onset diseases such as spermatogenic defects and cancer (Anway and Skinner, 2007).

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the support of Agence Nationale de la Recherche (ANR, Regulome, EPISPERM and EMPREINTE projects), of the Région Rhone-Alpes (CIBLE project) and of CNRS (GDR 2586, Méiose et Reproduction).

References

- Adenot PG, Mercier Y, Renard JP, Thompson EM 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**, 4615–4625.
- Adham IM, Nayernia K, Burkhardt-Gottges E *et al.* 2001 Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Molecular Human Reproduction* **7**, 513–520.
- Ainsworth C 2005 Cell biology: the secret life of sperm. *Nature* **436**, 770–771.
- Allegrucci C, Thurston A, Lucas E, Young L 2005 Epigenetics and the germline. *Reproduction* **129**, 137–149.
- 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. *Biological Chemistry Hoppe Seyler* **367**, 515–522.
- Anway MD, Skinner MK 2007 Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. *Reproductive BioMedicine Online* **16**, 23–25.
- Balhorn R 1989 Mammalian protamines: structure and molecular interactions. In: KW Adolph (ed.) *Molecular Biology of Chromosome Function*. Springer Verlag, New York, pp. 366–395.
- Balhorn R 1982 A model for the structure of chromatin in mammalian

- sperm. *Journal of Cell Biology* **93**, 298–305.
- Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J *et al.* 1987 High-performance liquid chromatographic separation and partial characterization of human protamines 1, 2, and 3. *Biotechnology Applied Biochemistry* **9**, 82–88.
- Beaujean N, Hartshorne G, Cavilla J *et al.* 2004 Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Current Biology* **14**, R266–R267.
- Berger SL 2007 The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407–412.
- Bernstein E, Allis CD 2005 RNA meets chromatin. *Genes and Development* **19**, 1635–1655.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES 2007 The mammalian epigenome. *Cell* **128**, 669–681.
- Brewer L, Corzett M, Balhorn R 2002 Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 24.
- Brewer LR, Corzett M, Balhorn R 1999 Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science* **286**, 120–123.
- Caron C, Govin J, Rousseaux S, Khochbin S 2005 How to pack the genome for a safe trip. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* **38**, 65–89.
- Cattanach BM, Kirk M 1985 Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* **315**, 496–498.
- Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T *et al.* 2003 Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* **299**, 721–725.
- Cho C, Jung-Ha H, Willis WD *et al.* 2003 Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biology of Reproduction* **69**, 211–217.
- Cho C, Willis WD, Goulding EH *et al.* 2001 Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nature Genetics* **28**, 82–86.
- Choudhary P, Varga-Weisz P 2007 ATP-dependent chromatin remodelling: action and reaction. *Subcellular Biochemistry* **41**, 29–43.
- Christensen ME, Dixon GH 1982 Hyperacetylation of histone H4 correlates with the terminal, transcriptionally inactive stages of spermatogenesis in rainbow trout. *Developmental Biology* **93**, 404–415.
- Christensen ME, Rattner JB, Dixon GH 1984 Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout. *Nucleic Acid Research* **12**, 4575–4592.
- Churikov D, Zalenskaya IA, Zalensky AO 2004 Male germline-specific histones in mouse and man. *Cytogenetic and Genome Research* **105**, 203–214.
- Cremer T, Cremer C 2001 Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics* **2**, 292–301.
- De Lucia F, Faraone-Mennella MR, D'Erme M *et al.* 1994 Histone-induced condensation of rat testis chromatin: testis-specific H1t versus somatic H1 variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **198**, 32–39.
- Delaval K, Feil R 2004 Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Current Opinion in Genetics and Development* **14**, 188–195.
- Drabent B, Benavente R, Hoyer-Fender S 2003 Histone H1t is not replaced by H1.1 or H1.2 in pachytene spermatocytes or spermatids of H1t-deficient mice. *Cytogenetics Genome Research* **103**, 307–313.
- Drabent B, Saftig P, Bode C, Doenecke D 2000 Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochemistry Cell Biology* **113**, 433–442.
- Eberharter A, Ferreira R, Becker P 2005 Dynamic chromatin: concerted nucleosome remodelling and acetylation. *Biological Chemistry* **386**, 745–751.
- Faure AK, Pivot-Pajot C, Kerjean A *et al.* 2003 Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Molecular Human Reproduction* **9**, 757–763.
- Feinberg AP 2007 Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* **447**, 433–440.
- Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A *et al.* 2003 H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Developmental Cell* **4**, 497–508.
- Fita I, Campos JL, Puigjaner LC, Subirana JA 1983 X-ray diffraction study of DNA complexes with arginine peptides and their relation to nucleoprotamine structure. *Journal of Molecular Biology* **167**, 157–177.
- Fraser P, Bickmore W 2007 Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* **447**, 413–417.
- Gardiner-Garden M, Ballesteros M, Gordon M, Tam PP 1998 Histone and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 3350–3356.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R *et al.* 1990 Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 20662–20666.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R *et al.* 1987 Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* **236**, 962–964.
- Gilbert N, Boyle S, Sutherland H *et al.* 2003 Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1. *EMBO Journal* **22**, 5540–5550.
- Godmann M, Auger V, Ferraroni-Aguir V *et al.* 2007 Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biology of Reproduction* **77**, 754–764.
- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S *et al.* 2007 Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *Journal of Cell Biology* **176**, 283–294.
- Govin J, Caron C, Escoffier E *et al.* 2006a Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 37888–37892.
- Govin J, Lestrat C, Caron C *et al.* 2006b Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis. *Ernst Schering Research Foundation Workshop*, 155–172.
- Govin J, Caron C, Lestrat C *et al.* 2004 The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *European Journal of Biochemistry* **271**, 3459–3469.
- Greaves IK, Rangasamy D, Devoy M *et al.* 2006 The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z, containing facultative heterochromatin, following meiosis. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 5394–5405.
- Grewal SI, Elgin SC 2007 Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* **447**, 399–406.
- Grimes SR Jr 1986 Nuclear proteins in spermatogenesis. *Comparative Biochemical Physiology B* **83**, 495–500.
- Grimes SR Jr, Henderson N 1984 Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids. *Experimental Cell Research* **152**, 91–97.
- Grimes SR Jr, Chae CB, Irvin JL 1975 Acetylation of histones of rat testis. *Archive of Biochemistry and Biophysics* **168**, 425–435.
- Guenatri M, Bailly D, Maison C, Almouzni G 2004 Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *Journal of Cell Biology* **166**, 493–505.
- Gusse M, Sautiere P, Belaiche D *et al.* 1986 Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochimica et Biophysica Acta* **884**, 124–134.
- Haaf T, Schmid M 1991 Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. *Experimental Cell Research* **192**, 325–332.
- Haaf T, Ward DC 1995 Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. *Experimental Cell Research* **219**, 604–611.
- Handel MA 2004 The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Experimental Cell Research* **296**, 57–63.
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK *et al.* 2000a Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *European Journal of Cell*

- Biology* **79**, 950–960.
- Hazzouri M, Rouseaux S, Mongelard F *et al.* 2000b Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Molecular Reproduction and Development* **55**, 307–315.
- Heard E 2004 Recent advances in X-chromosome inactivation. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 247–255.
- Heard E, Disteche CM 2006 Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes and Development* **20**, 1848–1867.
- Heard E, Clerc P, Avner P 1997 X-chromosome inactivation in mammals. *Annual Reviews in Genetics* **31**, 571–610.
- Hogan C, Varga-Weisz P 2007 The regulation of ATP-dependent nucleosome remodelling factors. *Mutation Research* **618**, 41–51.
- Hoyer-Fender S, Costanzi C, Pehrson JR 2000 Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Experimental Cell Research* **258**, 254–260.
- 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. *International Journal of Andrology* **26**, 354–365.
- Jones PA, Baylin SB 2007 The epigenomics of cancer. *Cell* **128**, 683–692.
- Kamakaka RT, Biggins S 2005 Histone variants: deviants? *Genes Development* **19**, 295–310.
- Khochbin S 2001 Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* **271**, 1–12.
- Kierszenbaum AL 2002 Genomic imprinting and epigenetic reprogramming: unearthing the garden of forking paths. *Molecular Reproduction and Development* **63**, 269–272.
- Kishigami S, Van Thuan N, Hikichi T *et al.* 2006 Epigenetic abnormalities of the mouse paternal zygotic genome associated with microinsemination of round spermatids. *Developmental Biology* **289**, 195–205.
- Kouzarides T 2007 Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705.
- Kramer JA, McCarrey JR, Djakiew D, Krawetz SA 2000 Human spermatogenesis as a model to examine gene potentiation. *Molecular Reproduction and Development* **56**, 254–258.
- Krishnamoorthy T, Chen X, Govin J *et al.* 2006 Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes and Development* **20**, 2580–2592.
- Lewis JD, Abbott DW, Ausio J 2003a A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochemistry and Cell Biology* **81**, 131–140.
- Lewis JD, Song Y, de Jong ME *et al.* 2003b A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* **111**, 473–482.
- Li E 2002 Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* **3**, 662–673.
- Li B, Carey M, Workman JL 2007 The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707–719.
- Lin Q, Sirotkin A, Skoultchi AI 2000 Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 2122–2128.
- Loi P, Beaujean N, Khochbin S *et al.* 2008 Asymmetric nuclear reprogramming in somatic cells nuclear transfer? *Bioessays* **30**, 66–74.
- Luetjens CM, Payne C, Schatten G 1999 Non-random chromosome positioning in human sperm and sex chromosome anomalies following intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* **353**, 1240.
- Maison C, Almouzni G 2004 HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology* **5**, 296–305.
- Malik HS, Henikoff S 2003 Phylogenomics of the nucleosome. *Nature Structural Biology* **10**, 882–891.
- Mann JR 2001 Imprinting in the germ line. *Stem Cells* **19**, 287–294.
- Martianov I, Brancorsini S, Catena R *et al.* 2005 Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proceedings in the National Academy of Science of the USA* **102**, 2808–2813.
- Martin C, Beaujean N, Brochard Vet *et al.* 2006 Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development. *Developmental Biology* **292**, 317–332.
- Martins RP, Krawetz SA 2007 Decondensing the protamine domain for transcription. *Proceedings in the National Academy of Science of the USA* **104**, 8340–8345.
- McGrath J, Solter D 1984 Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**, 179–183.
- McLay DW, Clarke HJ 2003 Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* **125**, 625–633.
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M 2003 Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* **111**, 483–488.
- Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Lin R *et al.* 1992 Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Molecular Reproduction and Development* **31**, 170–181.
- Meistrich ML, Bucci LR, Trostle-Weige PK, Brock WA 1985 Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Developmental Biology* **112**, 230–240.
- 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. *Journal of Cell Science* **111** (Pt 10), 1363–1370.
- Misteli T 2007 Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* **128**, 787–800.
- Morgan HD, Santos F, Green K *et al.* 2005 Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics* **14** (Suppl. 1), R47–R58.
- Motzkus D, Singh PB, Hoyer-Fender S 1999 M31, a murine homolog of *Drosophila* HP1, is concentrated in the XY body during spermatogenesis. *Cytogenetics and Cell Genetics* **86**, 83–88.
- Muchardt C, Guilleme M, Seeler JS *et al.* 2002 Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO Report* **3**, 975–981.
- Mudrak O, Tomilin N, Zalensky A 2005 Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *Journal of Cell Science* **118**, 4541–4550.
- Nakamura T, Arai Y, Umehara H *et al.* 2006 PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nature Cell Biology* **9**, 64–71.
- Nickel BE, Roth SY, Cook RG *et al.* 1987 Changes in the histone H2A variant H2A.Z and polyubiquitinated histone species in developing trout testis. *Biochemistry* **26**, 4417–4421.
- O'Donnell KA, Boeke JD 2007 Mighty Piwis defend the germline against genome intruders. *Cell* **129**, 37–44.
- Ogura A, Yanagimachi R 1995 Spermatids as male gametes. *Reproduction Fertility Development* **7**, 155–158; discussion 158–159.
- Oliva R, Mezquita C 1982 Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Research* **10**, 8049–8059.
- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD *et al.* 2004 Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* **429**, 154.
- Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D *et al.* 2002 Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* **360**, 772–777.
- Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H *et al.* 2001 Loss of the suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**, 323–337.
- Pittoggi C, Renzi L, Zaccagnini G *et al.* 1999 A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *Journal of Cell Science* **112**, 3537–3548.
- Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J *et al.* 2003 Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 5354–5365.
- Poccia D 1986 Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *International Review of*

- Cytology* **105**, 1–65.
- Probst AV, Santos F, Reik W *et al.* 2007 Structural differences in centromeric heterochromatin are spatially reconciled on fertilisation in the mouse zygote. *Chromosoma* **116**, 403–415.
- Rao BJ, Brahmachari SK, Rao MR 1983 Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 13478–13485.
- Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Cuzin F 2007 Inheritance of an epigenetic change in the mouse: a new role for RNA. *Biochemical Society Transactions* **35**, 623–625.
- Raukas E, Mikelsaar RH 1999 Are there molecules of nucleoprotamine? *Bioessays* **21**, 440–448.
- Reik W 2007 Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* **447**, 425–432.
- Reik W, Walter J 2001 Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Genetics Reviews* **2**, 21–32.
- Reik W, Walter J 1998 Imprinting mechanisms in mammals. *Current Opinion in Genetics and Development* **8**, 154–164.
- Reik W, Santos F, Mitsuya K *et al.* 2003 Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences* **358**, 1403–1409; discussion 1409.
- Reik W, Dean W, Walter J 2001 Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089–1092.
- Risley MS 1990 *Chromatin Organization in Sperm*. CRC Press, Boca Raton.
- Rousseaux S, Caron C, Govin J *et al.* 2005 Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* **345**, 139–153.
- Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR 2006 Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology* **7**, 437–447.
- Santos F, Dean W 2004 Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* **127**, 643–651.
- Santos F, Peters AH, Otte AP *et al.* 2005 Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Developmental Biology* **280**, 225–236.
- Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W 2002 Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Developmental Biology* **241**, 172–182.
- Sarma K, Reinberg D 2005 Histone variants meet their match. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology* **6**, 139–149.
- Sassone-Corsi P 2002 Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* **296**, 2176–2178.
- Schaefer CB, Ooi SK, Bestor TH, Bourc'his D 2007 Epigenetic decisions in mammalian germ cells. *Science* **316**, 398–399.
- Shang E, Nickerson HD, Wen D *et al.* 2007 The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* **134**, 3507–3515.
- Shirley CR, Hayashi S, Mounsey S *et al.* 2004 Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biology of Reproduction* **71**, 1220–1229.
- Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K 2002 Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* **34**, 384–390.
- Steger K, Klönisch T, Gavenis K *et al.* 1998 Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Molecular Human Reproduction* **4**, 939–945.
- Tanaka H, Iguchi N, Isotani A *et al.* 2005 HANP1/HIT2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 7107–7119.
- Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P 1978 Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Experimental Cell Research* **117**, 347–356.
- Trostle-Weige PK, Meistrich ML, Brock WA, Nishioka K 1984 Isolation and characterization of TH3, a germ cell-specific variant of histone 3 in rat testis. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 8769–8776.
- Turner JM 2007 Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* **134**, 1823–1831.
- Turner JM, Mahadevaiah SK, Ellis PJ *et al.* 2006 Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Developmental Cell* **10**, 521–529.
- Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O *et al.* 2005 Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nature Genetics* **37**, 41–47.
- Turner JM, Aprelikova O, Xu X *et al.* 2004 BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Current Biology* **14**, 2135–2142.
- Turner JM, Burgoyne PS, Singh PB 2001 M31 and macroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis. *Journal of Cell Science* **114**, 3367–3375.
- van der Heijden GW, Derijck AA, Posfai E *et al.* 2007 Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nature Genetics* **39**, 251–258.
- van der Heijden GW, Derijck AA, Ramos L *et al.* 2006 Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Developmental Biology* **298**, 458–469.
- van der Heijden GW, Dieker JW, Derijck AA *et al.* 2005 Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mechanisms of Development* **122**, 1008–1022.
- van Roijen JH, Ooms MP, Spaargaren MC *et al.* 1998 Immunoeexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Human Reproduction* **13**, 1559–1566.
- Wagschal A, Feil R 2006 Genomic imprinting in the placenta. *Cytogenetics and Genome Research* **113**, 90–98.
- Ward WS 1994 The structure of the sleeping genome: implications of sperm DNA organization for somatic cells. *Journal of Cell Biochemistry* **55**, 77–82.
- Ward WS, Coffey DS 1991 DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction* **44**, 569–574.
- Ward WS, Coffey DS 1990 Specific organization of genes in relation to the sperm nuclear matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **173**, 20–25.
- Ward WS, Zalensky AO 1996 The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* **6**, 139–147.
- Wolffe A 1995 *Chromatin – Structure and Function* 2nd edn. Academic Press, London.
- Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevallier P, Sautiere P 1998 Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* **80**, 117–128.
- Wu TF, Chu DS 2008 Epigenetic processes implemented during spermatogenesis distinguish the paternal pronucleus in the embryo. *Reproductive Biomedicine Online* **16**, 13–22.
- Wu JY, Means AR 2000 Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV is expressed in spermatids and targeted to chromatin and the nuclear matrix. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 7994–7999.
- Wu JY, Ribar TJ, Cummings DE *et al.* 2000 Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nature Genetics* **25**, 448–452.
- Wykes SM, Krawetz SA 2003 The structural organization of sperm chromatin. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 29471–29477.
- Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y *et al.* 2006 Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biology of Reproduction* **75**, 705–716.
- Yan W, Ma L, Burns KH, Matzuk MM 2003 HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proceedings in the National Academy of Science of the USA* **100**, 10546–10551.
- Yu YE, Zhang Y, Unni E *et al.* 2000 Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proceedings in the National Academy of Science of the USA* **97**, 4683–4688.

- Zalenskaya IA, Zalensky AO 2002 Telomeres in mammalian male germline cells. *International Review of Cytology* **218**, 37–67.
- Zalensky A, Zalenskaya I 2007 Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information? *Biochemical Society Transactions* **35**, 609–611.
- Zalensky AO, Siino JS, Gineitis AA *et al.* 2002 Human testis/ sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 43474–43480.
- Zalensky AO, Allen MJ, Kobayashi A *et al.* 1995 Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* **103**, 577–590.
- Zaratiegui M, Irvine DV, Martienssen RA 2007 Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell* **128**, 763–776.
- Zhao M, Shirley CR, Mounsey S, Meistrich ML 2004 Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biology of Reproduction* **71**,

1016–1025.

- Zhao M, Shirley CR, Yu YE *et al.* 2001 Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 7243–7255.

Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.

Received 1 October 2007; refereed 23 October 2007; accepted 23 November 2007.

DISCUSSION

Un modèle de réorganisation de l'hétérochromatine péricentromérique au cours de la spermatogénèse.

Les données présentées dans la partie I permettent de présenter un modèle de la réorganisation de l'hétérochromatine péricentromérique au cours de la spermatogénèse (Figure 36). Ce modèle postule un rôle central de TH2B, et une fonction de Nap1L4 dans la mise en place des variants H2AL1/L2.

1- Rôle de TH2B dans la mise en place de la structure non nucléosomale ?

Nous avons montré d'une part que les variants d'histones H2AL1/L2, qui se mettent en place tardivement au cours de la spermiogénèse, semblent se dimériser de façon préférentielle avec TH2B par rapport à H2B. De plus, contrairement à H2B, le variant TH2B a été retrouvé au sein de ces nouvelles structures nucléoprotéiques. De par ces caractéristiques, TH2B semble donc jouer un rôle clé dans l'incorporation de ces variants. Or TH2B est exprimé plus précocement que les variants H2AL1/2 au cours de la spermatogénèse, et reste présent lorsque ces derniers apparaissent.

Toutes ces données permettent de proposer un modèle dans lequel le variant TH2B, une fois incorporé au sein de la chromatine, pourrait servir de plateforme de recrutement des nouveaux variants d'histones H2AL1/2 afin de former des nucléosomes contenant les variants H2AL1/2-TH2B. Ceci est soutenu par des travaux montrant que l'incorporation de TH2B au sein de nucléosomes contenant des histones canoniques déstabilise le nucléosome chimère (Li et al., 2005). Cette déstabilisation pourrait faciliter l'échange d'H2A et l'incorporation d'H2AL2 (par NAP1L4).

Les nucléosomes contenant TH2B/H2AL2 ainsi formés, instables, n'existeraient que de manière transitoire, donnant rapidement naissance à une structure plus petite ne contenant

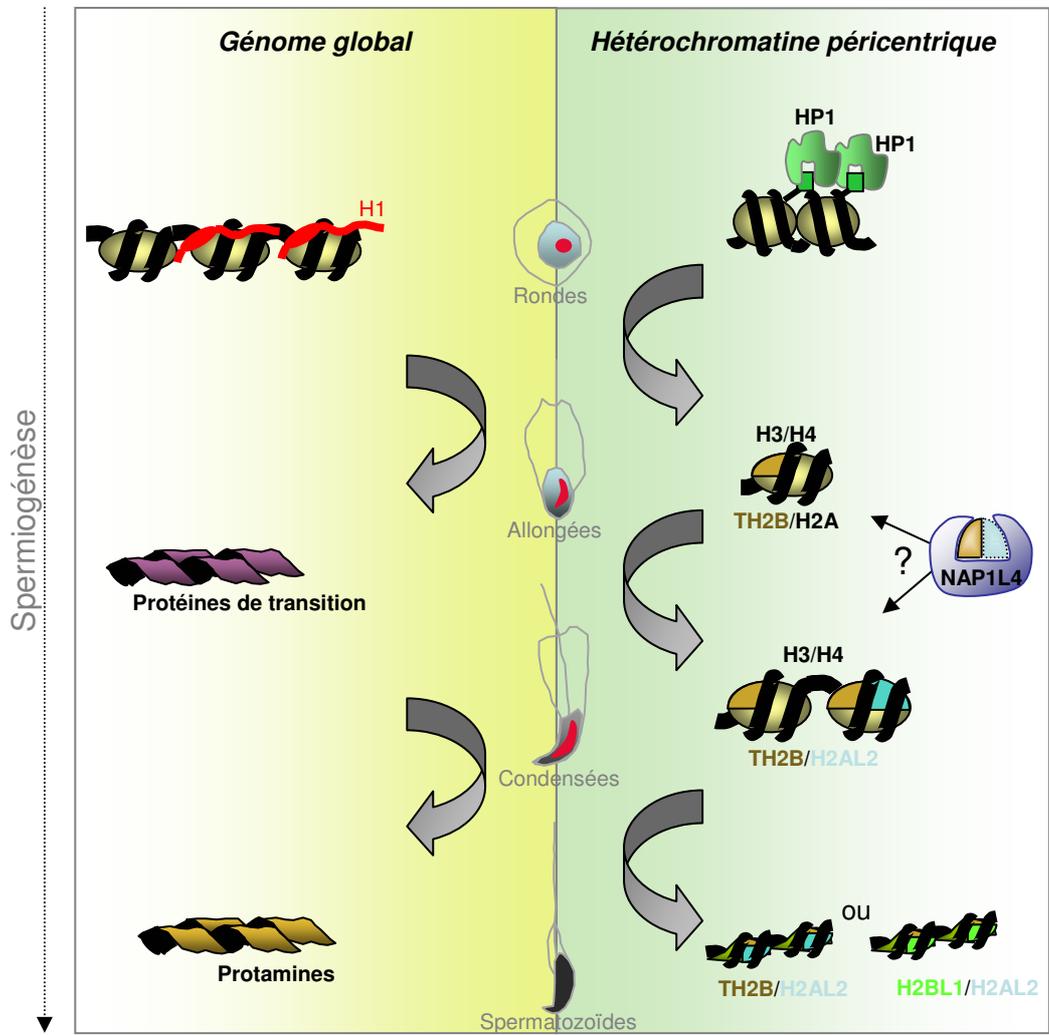


Figure 36. Modèle de réorganisation de la chromatine au cours de la spermiogénèse

plus les histones canoniques H3 et H4. L'étude de la séquence de ces nouveaux variants d'histones montre la présence d'une cystéine au sein des protéines H2AL2 et TH2B (Figure 37 A). Les protamines sont elles-mêmes des protéines très riches en cystéines qui permettent la formation de ponts disulfures au sein d'une même protéine ou entre plusieurs protéines, verrouillant ainsi la structure condensée de la chromatine dans le noyau des spermatozoïdes. La formation de ponts disulfure entre les variants TH2B et H2AL2 au sein de la petite structure, ou avec les protamines voisines, pourrait être également un moyen de verrouiller la chromatine de manière différente au niveau de régions particulières du génome.

Contrairement à H2AL1/2, la présence de TH2B dans les spermatozoïdes est très fortement diminuée. Cependant, une petite quantité semble persister et d'autres travaux ont montré la persistance dans les spermatozoïdes humains d'un homologue à TH2B, TSH2B (Zalensky et al., 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, ce dernier étant retrouvé au sein des spermatozoïdes. De plus, la présence de quatre cystéines au sein de H2BL1 pourrait être à l'origine d'une interaction beaucoup plus forte de ce variant avec H2AL2 ou avec des protamines voisines, permettant un verrouillage de la chromatine encore plus drastique au sein des spermatozoïdes. Cette compaction aurait un rôle similaire aux protamines, là où ces dernières ne sont pas incorporées, permettant une protection globale nécessaire du génome.

2- Rôles de NAP1L4 tout au long de la spermatogenèse ?

L'étude des protéines présentes dans les spermatides condensées a permis d'identifier la chaperonne d'histones NAP1L4.

NAP1L4 est enrichie dans le testicule, tant au niveau de son ARNm que de la protéine endogène. Nos travaux montrent qu'elle est présente tout au long de la spermatogénèse, aussi bien lors de la méiose que dans les stades post méiotiques. Il est connu que lors de la réplication, yNAP1 chaperonne les histones néosynthétisées, les importe dans le noyau et favorise leur incorporation à la chromatine (Chang et al., 1997; Mosammaparast et al., 2002; Okuwaki et al., 2005). Mais étant donné que seules les spermatogonies se divisent par mitose et que NAP1L4 est présent également dans les spermatides, son rôle dans ces cellules est indépendant de la réplication, et elle pourrait participer à la mise en place d'histones spécifiques des stades tardifs.

En accord avec cette hypothèse, 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 lors de la méiose.

H2AL2 est exprimé dans les spermatides de type 12-16, et est associé à la mise en place de structures chromatinienne 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 péricentromérique. Il a déjà été montré chez l'homme que NAP1L4 était capable de chaperonner H3t, un variant de H3 spécifique du testicule, et de l'incorporer au sein de nucléosomes *in vitro* (Tachiwana et al., 2008).

3- Mécanismes d'incorporation ciblée de H2AL1/L2 sur l'hétérochromatine péricentromérique ?

Le fait que H2AL1/2 s'incorporent spécifiquement au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique suggère l'existence d'un mécanisme de ciblage de ces variants mais ce dernier reste encore à élucider.

En effet, après transfection des variants H2AL2/TH2B dans des cellules somatiques en culture exprimant NAP1L4 de manière endogène les variants se retrouvent toujours localisés au niveau de l'hétérochromatine (résultat non montré). Les marques principales associées à l'hétérochromatine péricentromériques, telles que la méthylation de l'ADN ou la présence d'H3K9me3, pourraient ainsi être des signaux de recrutement.

L'importance de la méthylation de l'ADN dans le recrutement des variants via NAP1L4 a été testée. Les variants d'histones ont été transfectés dans des cellules 3T3 BalbC murines, exprimant de manière endogène NAP1L4, mais traitées à la 5-aza-cytidine, un inhibiteur de la l'ADN méthyltransferase Dnmt3a, ainsi que dans des fibroblastes d'embryon de souris (MEF) invalidés pour l'ADN méthyltransferase Dnmt1-/- (données non montrées). Malgré l'inhibition de la méthylation de l'ADN, les variants d'histones étaient toujours localisés au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique, suggérant bien un mécanisme de recrutement indépendant de la méthylation de l'ADN. D'ailleurs, nos travaux de dot blot ne montrent pas d'enrichissement de la structure contenant les variants d'histones sur les gènes soumis à l'empreinte ou les séquences répétées qui sont eux associés à de l'ADN méthylé.

L'implication d'H3K9me3 dans le recrutement des variants à l'hétérochromatine pourra être étudiée en invalidant la méthyltransférase responsable Suv39H1 par SiRNA et en regardant si les variants sont toujours incorporés au sein de l'hétérochromatine.

L'implication d'autres modifications post-traductionnelles des histones dans le recrutement des variants via NAP1L4 au sein de l'hétérochromatine a été testée par peptide pull down. La présence de la triméthylation de H3K27 semble bloquer cette interaction. Cette marque, spécifique de l'hétérochromatine facultative, est notamment retrouvée enrichie au niveau du chromosome X inactif (Plath et al., 2003), où les variants ne semblent pas s'accumuler.

De manière similaire, d'autres marques pourraient au contraire favoriser le recrutement de NAP1L4. Nos données de dot blot montrent un enrichissement de l'ADN correspondant à la structure contenant les variants d'histones d'environ 2 fois par rapport à l'ADN génomique total (Paragraphe *Résultats A. II. 1.*) sur les séquences LINE, mais pas sur les gènes soumis à l'empreinte parentale. Or des travaux ont montré que les séquences LINE du génome présentent un profil de modifications d'histones tout à fait unique, avec la présence de H4K20me3 et H4ac, ce qui n'est pas le cas des ICR des gènes soumis à l'empreinte (Delaval et al., 2007) (Figure 37 B).

La triméthylation de H4K20 semble ainsi être une marque épigénétique commune aux régions associées par ces variants d'histones, c'est-à-dire l'hétérochromatine péricentromérique et les séquences LINE. De plus, les séquences LINE sont associées à H4ac, qui est également le cas de l'hétérochromatine péricentromérique après la vague d'acétylation qui a lieu dans les cellules germinales (Voir l'article Govin, Escoffier, et al., 2008 figure 1). La combinaison de ces deux marques pourrait ainsi être nécessaire au recrutement de NAP1L4 et donc de ces nouveaux variants sur des régions particulières.

Existence d'homologues fonctionnels des nouveaux variants d'histone chez l'homme ?

H2AL1 et H2AL2 ne semblent pas strictement conservés chez l'homme. Cependant, le variant humain H2A.Bbd pourrait être l'homologue fonctionnel de H2AL2 chez l'homme. Il partage en effet 54% d'homologie de séquence (40% d'identité) avec H2AL2 et confère une structure instable au nucléosome une fois incorporé (Gautier et al., 2004).

Par ailleurs, les variants H2AL1 et H2AL2 sont assez divergents de l'histone canonique. En effet, ils partagent 75% d'identité de séquences entre eux contre 30% et 41% avec H2A pour H2AL1 et H2AL2 respectivement.

On peut donc imaginer qu'il n'a pas été nécessaire, au cours de l'évolution, que la séquence des variants d'histones soit strictement conservée. En revanche, ce qui pourrait être important, c'est l'expression dans les stades tardifs de la spermiogenèse d'histones suffisamment éloignées de la forme canonique pour créer une déstabilisation nécessaire au remaniement local de la chromatine et à la mise en place de nouvelles structures.

Par ailleurs, d'autres variants d'histones spécifiques du testicule sont présents dans les cellules germinales humaines et pourrait remplir un rôle comparable à ces nouveaux variants d'histones. Par exemple, H2BFWT, un variant humain d'H2B spécifique du testicule, est présent uniquement chez les primates (Churikov et al., 2004). Le variant H2BL1 est lui très similaire au variant bovin de H2B spécifique du testicule, SubH2Bv (Aul and Oko, 2001). Mais ces variants montrent tous deux une localisation particulière au sein du noyau (respectivement au niveau des télomères et de la région subacrosomale) alors que nos travaux sur H2BL1 au sein du laboratoire n'ont pas permis de mettre en évidence une localisation particulière de ce variant (données non publiées).

Les autres régions du génome marquées différemment au sein du spermatozoïde.

Les grandes régions d'hétérochromatine du génome, telles que les télomères ou les centromères, ont un rôle fondamental dans l'organisation du génome. En effet, une déstructuration de ces domaines provoque une instabilité génomique (de Lange, 2002; Peters et al., 2001).

De manière intéressante, il a été montré que ces régions étaient organisées différemment dans les spermatozoïdes. En effet, des travaux ont montré que les télomères ainsi que les centromères étaient organisés en nucléosomes au sein des spermatozoïdes humains (Palmer et al., 1990; Zalenskaya et al., 2000). Cette structuration semble identique chez la souris, car les télomères ont été localisés à la périphérie nucléaire, dans un environnement riche en nucléosomes (Haaf and Ward, 1995). De plus, ces structures sont associées à la présence

spécifique de variants d'histones. Un variant de H2B, nommé H2BFWT, serait ainsi spécifiquement associé aux télomères dans les spermatozoïdes humains matures (Churikov et al., 2004; Gineitis et al., 2000) tandis que le variant CENP-A resterait associé aux centromères (Palmer et al., 1990).

De manière identique, les zones péri-centromériques semblent organisées différemment dans les spermatozoïdes. En effet, la marque H4K20me3 spécifique dans cette région dans les cellules germinales semble rester présente au sein de l'hétérochromatine péri-centromérique durant la spermatogénèse et dans le spermatozoïde. Kourmouli et ses collaborateurs ont ainsi montré par immunofluorescence qu'il persistait au sein des spermatozoïdes matures murins des histones contenant la modification H4K20me3, au niveau des régions densément marquées par le colorant DAPI (Kourmouli et al., 2004). De plus, Van der Heijden et ses collaborateurs ont montré que persistaient également dans les spermatozoïdes murins les histones modifiées H4K8ac et H4K12 au niveau des chromocentres et de la région postérieure du noyau (van der Heijden et al., 2006).

En plus de la présence d'histones canoniques modifiées, nos travaux montrent la présence dans cette région de nouveaux variants d'histones chez la souris (Govin, Escoffier et al., 2007). Malgré la présence de ces histones canoniques modifiées et de ces nouveaux variants, nous ne pouvons pas exclure chez la souris qu'il persiste des nucléosomes canoniques associés à ces régions. D'ailleurs, nos résultats obtenus par FISH montrent bien que les sondes d'ADN issu des structures nucléosomales isolées à partir des spermatides condensées marquent ces régions d'hétérochromatine péri-centromérique.

En revanche, contrairement aux données de la littérature, nos travaux d'étude par dot blot montrent que les structures nucléosomales ne semblent pas enrichies au niveau des gènes soumis à l'empreinte parentale, au niveau des séquences LINE (Pittoggi et al., 1999), ni au niveau des gènes codant pour les protéines de transition et les protamines (Wykes and Krawetz, 2003) (Paragraphe *Résultats A. II.*). Pour cette dernière étude, les auteurs ont travaillé sur des spermatozoïdes humains matures. Contrairement à eux, mes travaux ont été effectués chez la souris, sur des spermatides condensées de stade 12 à 16, à un moment où il existe encore probablement beaucoup de nucléosomes qui sont amenés à disparaître dans les stades finaux. Les régions qui restent spécifiquement associées aux nucléosomes dans les

spermatozoïdes sont ainsi diluées dans ma préparation et peuvent ne pas sortir du bruit de fond en dot blot.

L'utilisation de la technique de dot blot pour identifier de petites régions susceptibles d'être réorganisées par ces variants ne semble donc pas une bonne approche et des techniques de Chip-on-ChIP ou de Chip-Seq auraient été plus adaptées. Une immunoprécipitation de la chromatine a été tentée sur les spermatides condensées avec des anticorps anti-H2AL1/L2, mais cette technique n'a pas fonctionné sur ces cellules. En effet, l'ADN étant tellement compacté, il a fallu le décompacter pour le rendre accessible aux anticorps, cette étape dissociant partiellement la chromatine des protéines. Ainsi, toutes les étapes de mises au point restent encore à être effectuées. De plus, très peu de protéines ont été immunoprécipitées, malgré l'utilisation de différentes conditions d'immunoprécipitation. La mise en place actuellement de souris knock-in produisant des variants d'histones tap-tagués est un bon espoir pour déterminer les régions géniques auxquelles ils peuvent être associés.

Enfin, sur ces dots blots, l'ensemble des séquences dotées étaient les séquences codantes des gènes. Or des travaux récents montrent chez la souris et l'homme, que c'est au niveau des séquences régulatrices de gènes impliqués dans le développement, que l'on trouve des nucléosomes (Arpanahi et al., 2009).

Devenir de l'organisation différentielle du génome spermatique après la fécondation

Après la fécondation, les génomes paternel et maternel se retrouvent ensemble au sein de l'ovocyte, mais séparés en deux pronuclei distincts dont les chromatines vont subir une réorganisation drastique. En effet, la fécondation permet à l'ovocyte, bloqué en métaphase II, de finir sa méiose tandis que le génome spermatique, constitué majoritairement de protamines, doit rapidement acquérir une organisation en nucléosomes. Les ponts disulfure entre les protamines du génome mâle sont réduits, permettant l'enlèvement de ces dernières et une rapide décondensation du pronucleus mâle. Ces événements sont très rapides, se déroulant en trente minutes. Les histones sont alors déposées, induisant une forte recondensation de la chromatine, puis le pronucleus mâle se redécondense progressivement, avant de fusionner avec le pronucleus femelle au bout de quelques heures.

En plus de ces phénomènes de décondensation, la chromatine des pronuclei mâle et femelle subissent des modifications au niveau de la méthylation de leur ADN et des modifications d'histones. En effet, le pronucléus femelle se distingue de celui du mâle par sa richesse en histones H3K4me, H3K9me2/3, H3K27me1 et H4K20me3 (Kourmouli et al., 2004; Santos et al., 2005) (figure 38 A). Durant la formation du pronucléus mâle, les protamines sont remplacées par des histones acétylées (Adenot et al., 1997). Cependant, d'autres marques comme H3K4me1, H3K9me1 et H3K27me1 sont rapidement détectées (Lepikhov and Walter, 2004). Les histones di ou triméthylées font leur apparition plus tardivement (Santos et al., 2005).

En plus de l'incorporation d'histones modifiées, les pronuclei vont subir une déméthylation au niveau de leur ADN : le pronucléus mâle subit une déméthylation active tandis que le génome entier est ensuite passivement déméthylé durant les divisions successives (Rougier et al., 1998) (Figure 38 B).

La structuration particulière des régions d'hétérochromatine au cours de la spermatogénèse pourrait jouer un rôle tout à fait particulier après la fécondation, afin de maintenir une spécification de ces régions au cours de la décompaction du pronucléus mâle et de la fusion avec pronucléus femelle. De plus, des travaux montrent que les télomères joueraient un rôle important dans le développement précoce du zygote (Liu et al., 2002). En effet, un fort pourcentage de zygotes issu de la fécondation d'un ovocyte et d'un spermatozoïde invalidé au niveau de sa télomérase n'arrive pas à franchir les étapes de divisions cellulaires. Dans ces zygotes, le noyau ne se décondense pas, impliquant un rôle structural des télomères durant les étapes précoces du remodelage de la chromatine.

Il est également intéressant de noter qu'après la fécondation, les régions d'hétérochromatine centromériques et péricentromériques échappent à la déméthylation globale et active du génome paternel (Morgan et al., 2005).

De plus, il a été montré de manière intéressante dans des embryons de souris que l'hétérochromatine centromérique et péricentromérique s'associaient à la périphérie des précurseurs des nucléoles (Martin et al., 2006; Probst et al., 2007; Puschendorf et al., 2008). Cette caractéristique de l'organisation zygotique de l'hétérochromatine constitutive est observée dans les embryons au stade 1 cellule, mais pas dans les stades plus avancés ni dans les cellules somatiques (Martin et al., 2006). A la fin du premier cycle cellulaire, une chromatine fonctionnelle centromérique et péricentromérique est reconstituée dans le zygote,

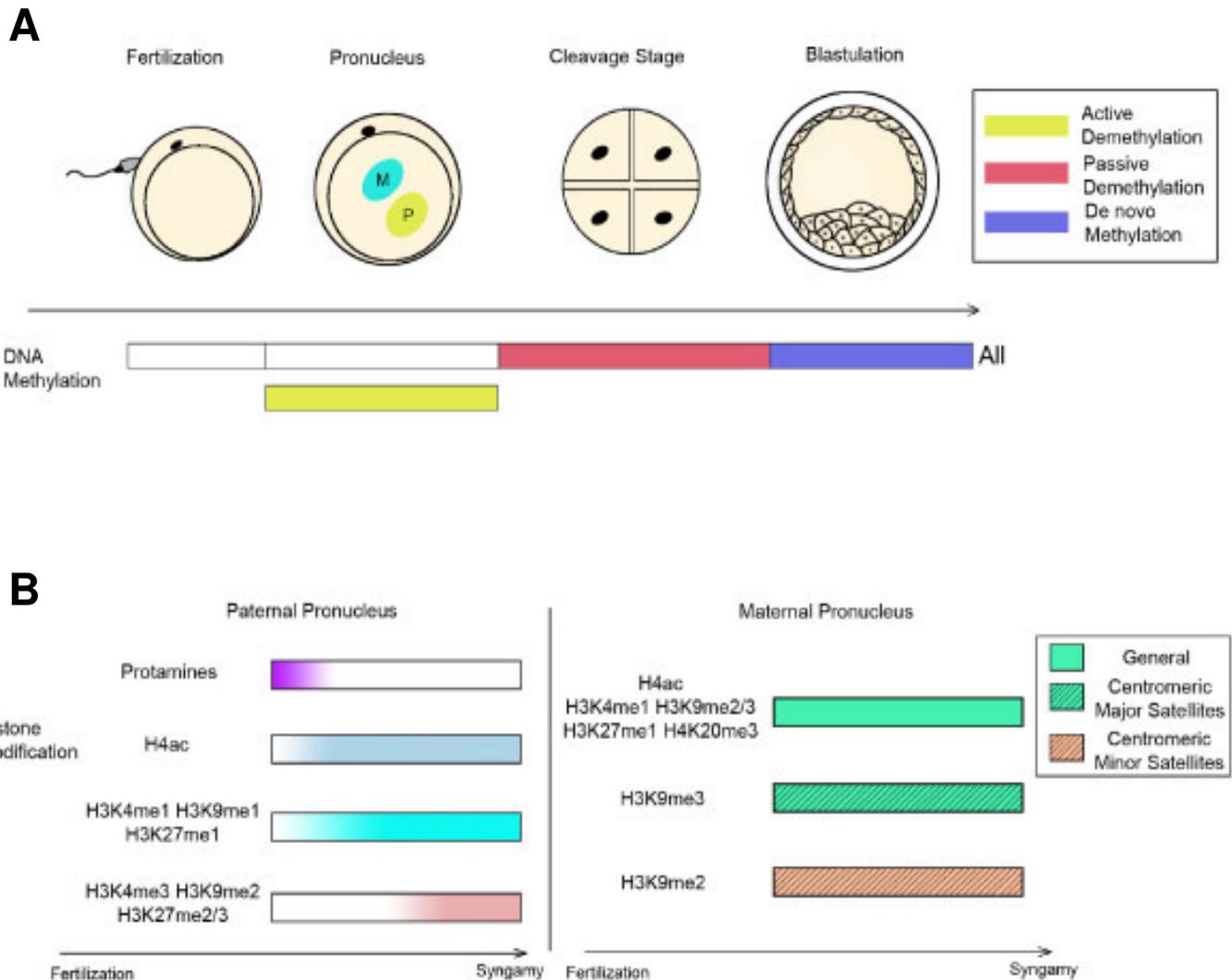


Figure 38. Les principales modifications épigénétiques au cours des étapes précoces du développement

A. La reprogrammation de la méthylation de l'ADN au cours du développement embryonnaire. Une déméthylation active a lieu dans le pronucléus paternel, suivi d'une déméthylation passive du génome entier durant les étapes premières divisions cellulaires. Puis une méthylation de novo a lieu quand débute la différenciation cellulaire.

B. La reprogrammation de la modification des histones de la fécondation à la syngamie (fusion des deux pronucléus). Dans le pronucléus mâle, les protamines sont remplacées par des histones acétylées, puis par des histones monométhylées. Les histones di et triméthylées apparaîtront plus tard. Dans le pronucléus maternel, toutes les modifications listées sont présentes durant cette période, mais à des endroits distincts.

(D'après Lingjun and, Ji, 2009)

avec la présence spécifique de H3K9me3, H4K20me3 ainsi que H3K27me1 (Lehnertz et al., 2003; Martens et al., 2005; Schotta et al., 2004)

On peut penser que le marquage différentiel de cette région d'hétérochromatine au cours de la spermatogénèse permettrait de la différencier du reste du génome, lui permettant d'acquérir des caractéristiques particulières juste après la fécondation.

La question était alors de savoir si ces variants restaient associés à l'hétérochromatine dans le pronucleus mâle au cours des étapes de décompaction ou de fusion avec le pronucleus femelle. Des travaux au sein du laboratoire par immunofluorescence sur des ovocytes de souris fécondés ont montrés que les nouveaux variants d'histones H2AL1/2 ne sont pas retrouvés au sein du pronucleus mâle (Wu et al., 2008). Comme ces travaux ont été réalisés sur des pronuclei à un stade où les protamines sont déjà remplacées par les histones, on peut supposer que ces variants sont enlevés très précocement, en même temps que les protamines.

Il est ainsi tentant de penser que la réorganisation spécifique de certaines régions du génome pourrait être le support d'une information épigénétique mâle, permettant ainsi de reconnaître ces régions et de les réorganiser spécifiquement après fécondation, pour reconstituer une chromatine somatique parfaitement fonctionnelle.

Matériels et méthodes

I. BIOLOGIE CELLULAIRE

Culture cellulaire et transfection

Les cellules Cos des cellules de rein de singe. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM 1 g/l de glucose (Invitrogen), additionné de 10% Sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (30min à 56°C), 2% L-glutamine et 1% Pénicilline-Streptomycine.

Les cellules 3T3 BalbC sont des fibroblastes de souris. Elles sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen), additionné de 10% SVF décomplémenté, 2% L-glutamine et 1% Pénicilline-Streptomycine.

Pour l'immunofluorescence, les cellules sontensemencées la veille de la transfection en labtecks 2 puits à la concentration de 6.10^4 cellules/ml.

Pour l'immunoprécipitation, les cellules sontensemencées la veille de la transfection en boîte de 10 cm à la concentration de 10^5 cellules/ml.

Les cellules sont transfectées à l'aide de Lipofectamine (Invitrogen) selon les instructions suivantes. Pour un puit de labteck, 1µl de lipofectmine et 1µg d'ADN sont séparément dilués dans 200µl d'OptiMEM (Invitrogen). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, la solution d'ADN est mélangée à la solution de Lipofectamine. Cette solution est incubée 20 minutes à température ambiante avant d'être transférée sur les cellules.

Séparation des cellules germinales par sédimentation

La séparation des cellules germinales est obtenue par sédimentation sur gradient linéaire de BSA (Bellve, 1993). Après euthanasie, les testicules de 2 souris adultes sont prélevés et les albuginées sont retirées. Les tubes séminifères sont isolés par une incubation de 10 minutes à 37°C dans 10 ml d'une solution de collagénase à 1 mg/ml dans PBS1x (Sigma). Ils sont ensuite incubés dans du milieu de sédimentation (Ham F-12 medium ou DMEM contenant 0.5% BSA (bovine serum albumin, Sigma) et 1µg/ml de DNase (Sigma). Les cellules germinales sont ensuite extraites des tubes pipétant ce mélange à la pipette Pasteur pendant 10 minutes, jusqu'à obtenir une population homogène de cellules en suspension qui est alors filtrée sur un filtre contenant des pores de 100µm de diamètre (Becton Dickinson). Cette suspension cellulaire est déposée sur un gradient linéaire de BSA (2-4%), contenu dans une chambre de sédimentation. La sédimentation a lieu pendant 70 min. à 4°C.

Des fractions de 10ml sont alors collectées, puis centrifugées (1000rpm, 10 min, 4°C). Les culots cellulaires sont repris dans du PBS et les cellules présentes dans chaque fraction sont identifiées par microscopie à contraste de phase. Les fractions sont ensuite poolées de manière à obtenir une population de cellules enrichie en spermatocytes, en spermatides rondes, allongées ou condensées.

Préparation de spermatides condensées par sonication

Les testicules de 50 souris mâles adultes sont prélevés et l'albuginée est retirée. Les testicules sont ensuite dissociés mécaniquement dans un potter dans 15mL de tampon HM1 (0.32M saccharose, 1.5mM CaCl₂, 10mM Tris pH8; 1mM DTT). La suspension est alors filtrée sur de la gaze médicale, puis répartie en 5. Après une centrifugation (10min, 1500rpm, 4°C) les culots sont repris dans 3mL tampon HM2 (0.32M saccharose, 1.5mM CaCl₂, 10mM Tris pH8; 1mM DTT, 0,5% triton). Les cellules sont ensuite soniquées 2 fois à 250 joules sur glace. Puis les cellules sont successivement lavées par 10mL de tampon HM2, HM3 (0.88M saccharose, 1.5mM CaCl₂, 10mM Tris pH8, 1mM DTT, 0,5% Triton X-100), et enfin HM1, en culottant les cellules entre chaque lavage par une centrifugation (10min, 1500rpm, 4°C). Les cellules sont alors transférées en eppendorfs à la quantité voulues, les culots étant conservés à sec à -80°C.

Immunofluorescence sur cellules en culture

Les cellules cultivées ont été transfectées 24 h avant. Après lavage au PBS, les cellules sont fixées dans 500µl de 4% PFA (Formalin solution, Sigma) pendant 5 minutes à température ambiante. Elles sont ensuite perméabilisées par une solution de 4% PFA, 0.2% Triton X-100 pendant 1 minute à température ambiante. Après 3 lavages successifs au PBS 1x, les sites non spécifiques sont bloqués par incubation dans une solution de PBS, 5% pendant 30 minutes à température ambiante. Après un rinçage au PBS, les cellules sont mises en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS, 1% lait pendant 1 heure à température ambiante. Après 3 lavages de 5 minutes au PBS, les cellules sont incubées 30 minutes à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, dilué dans du PBS, 1% lait. L'excès d'anticorps est alors éliminé par 3 lavages au PBS. Le marquage de l'ADN s'effectue en incubant les cellules 5 minutes dans une solution de Hoechst dilué au 1:500 dans le PBS, puis du liquide de montage pour microscopie de fluorescence (DakoCytomation) est ajouté avant de sceller les lamelles sur les lames.

Immunofluorescence sur cellules germinales

Les cellules germinales ont été déposées sur les lames par la technique suivante. Un testicule est congelé dans l'azote liquide, puis rapidement coupé en deux. La section du testicule est alors apposée sur les lames, avant qu'il ne se décongèle. Les lames sont ensuite séchées à l'air libre 2 à 3 minutes puis elles sont déshydratées dans un bain d'éthanol 90% pendant 10 minutes à température ambiante, puis re-séchées à l'air libre. Elles sont ensuite conservées 1 semaine à température ambiante ou 1 mois à -80°C.

Les cellules sont perméabilisées par du PBS 0.5% saponine, 0.25% Triton X-100 pendant 15 minutes à température ambiante. Les sites non spécifiques sont ensuite bloqués par incubation dans PBS 5% lait, 0.2% Tween 20 pendant 30 min à température ambiante. Les anticorps primaires sont dilués dans PBS 1% lait, 0.2% Tween 20 et incubés sur la nuit dans une chambre humide à 4°C. Les lames sont rincées 3 fois pendant 5 minutes dans le tampon de dilution des anticorps. Les anticorps secondaires sont dilués au 1:500^e dans du PBS 1% lait, 0.2% Tween 20 pendant 30 minutes à 37°C. Les rinçages s'effectuent de la même façon que

précédemment. L'ADN est marqué par le colorant DAPI et les lames sont montées dans du MOWIOL.

Hybridisation In-Situ Fluorescente (FISH)

Les sondes d'ADN sont marquées par Nick translation (Nick translation kit, Roche) avec des nucléotides couplés à la digoxigénine ou à la biotine : la DNase I coupe aléatoirement l'ADN, puis la polymérase I dégrade l'ADN par son activité exonucléase 5'-3' et resynthétise l'ADN manquant grâce à des nucléotides couplés présents dans le milieu réactionnel. Ces sondes sont ensuite précipitées 30min à -80°C, puis 6h à -20°C, puis dénaturées 10min à 72°C. Le culot est repris dans 5µl formamide 100% et 5µl de tampon d'hybridation (40% Dextran sulfate, 2x SSPE, 2x SSC). Les cellules sont fixées dans du méthanol (3vol) /acide acétique (1 vol), puis les lames sont dénaturées dans du formamide 70%/2SSC à 70°C pendant 50sec pour les métaphases, à 80°C pendant 10min pour les noyaux testiculaires. Les 10µl de sonde sont déposées sur les lames, puis sont hybridées sur la nuit à 37°C en chambre humide. Les lames sont ensuite lavées dans du SSC 2x pH7 pendant 2min à 70°C. Le blocage se fait dans du PBD 1x (QBiogene) pendant 15min à température ambiante, puis les cellules sont incubées en présence de streptavidine couplée à Alexa 488 dilué au 1:200 reconnaissant la biotine, ou en présence de l'anticorps anti-digoxigénine couplé à la rhodamine dilué au 1:100, pendant 15 min à 37°C en chambre humide. Les lames sont lavées 3 fois 5min dans du PBD 1x. Les noyaux sont alors colorés par 15 µl de DAPI (200 ng/ml). Les lames sont montées par une lamelle, et observées par microscopie à épifluorescence.

II. BIOLOGIE MOLECULAIRE ET BIOCHIMIE

Immunoprécipitation

Les cellules (germinales ou somatiques) sont resuspendues dans 50mM Hepes pH 7.9, 20% Glycérol, 300mM NaCl, 3mM MgCl₂, 1mM DTT, cocktail d'antiprotéases Complete (Roche)), et incubées 30 min sur glace dans ce tampon. Après centrifugation (15 min, 20.000g, 4°C), le surnageant et le culot sont séparés. Le surnageant est complété par son même volume de tampon 50mM Hepes pH 7.9, 20% Glycérol, 3mM MgCl₂, 1mM DTT, cocktail d'antiprotéases Complete (Roche), afin de baisser la concentration en sels, puis est incubé avec l'anticorps primaire une nuit sous rotation à 4°C. Les anticorps sont ensuite capturés par de la protéine G couplée à des billes d'agarose pendant 30 minutes sous rotation à 4°C. 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) ou par Western Blot.

RT-qPCR

Les RT ont été réalisées sur une sélection de tissus avec le kit StrataScript First-Strand Synthesis

System (Stratagen) en suivant les recommandations du fournisseur. Les réactions de qPCR ont été réalisées en utilisant les produits de RT à une dilution finale de 1:50, à l'aide du mix SYBR Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems) sur un thermocycler Mx3005p (Stratagene). Selon les expériences, les courbes standard n'ont pas été réalisées avec le même pool d'ADNc: pour les qPCR des histones-like, des petites protéines basiques et de FYTTD1, il a été utilisé des cDNA de testicules entiers tandis que pour les qPCR de NAP1L4, il a été utilisé des cDNA de tous les tissus. Les données ont été normalisées par rapport au taux de snRNA U6 pour NAP1L4, par rapport au taux de Brdt pour les histones-like et les petites protéines basiques, et par rapport au taux d'actine pour FYTTD1.

Préparation des nucléosomes à partir de spermatides condensées

Les spermatides condensées de stade 12 à 16, obtenues par sonication de 10 testis, sont incubées 15 minutes sur glace dans 150µl de tampon 1 (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, and 0.1% SDS) ou de tampon 2 (50 mM Tris, pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.1% DOC, 1 mM DTT, et un cocktail d'antiproteases [Complete EDTA Free; Roche]). Après centrifugation à 20,000 g, 4°C, 10 min, le culot est resuspendu dans 150 µl de tampon initial. Dans le cas du tampon 2, le culot resuspendu est soniqué dans la glace à 80Joules, les spermatides non lysées étant éliminées par une centrifugation additionnelle. La digestion à la nucléase micrococcale est ensuite réalisée dans les tampons 1 et 2 en ajoutant 150 µl de tampon de digestion (10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM KCl, and 1 mM CaCl₂) et 15 U de nucléase micrococcale S7 (Roche). L'incubation est réalisée à 37°C pendant le temps indiqué sur chaque expérience. La réaction est ensuite stoppée par ajout d'EDTA 5mM (concentration finale).

Gradient de saccharose

Les fractions digérées par la nucléase micrococcale sont séparées par ultracentrifugation (80.000g, 20°C, 7h) sur un gradient linéaire 10-30% de saccharose (1mM saccharose pH 7.4, 80mM NaCl, 0.2mM EDTA et cocktail d'antiproteases [Complete EDTA Free; Roche]).

Analyse des fragments d'ADN résistants à la MNase sur gels d'agarose

5µl d'extrait contenant les nucléoprotéines est incubé 30 min à 50°C en présence de protéinase K (100ng/µl PK, 0.1% SDS, 10:1 TE). Sur chacune de ces fractions est alors ajouté 1µl du bleu de charge x-cyanol 10x (50% Glycerol, 0.1% x-cyanol, 5mM EDTA). Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 2%, contenant 5% de Bromure d'ethidium (BET). Après migration à 100V dans du TAE 1x (40mM Tris-Acetate, 1mM EDTA, pH 8.3), l'ADN est visualisé aux UV.

Production et purification d'anticorps

Les anticorps dirigés contre les variants d'histones, NAP1L4 et FYTTD1 ont été générés chez des lapins par trois injections de 200 µg de protéines recombinantes produites chez *E. coli*.

Afin de reconnaître spécifiquement la protéine injectée, les sérums contenant les anticorps ont ensuite été purifiés de la manière suivante. Les protéines d'intérêt sont chargées sur un gel SDS-Page, puis transférées sur membrane de nitrocellulose qui est ensuite colorée au rouge Ponceau. La bande correspondant à la protéine est alors découpée puis glissée dans un tube eppendorff. La membrane est pré-traitée par 100µl de glycine 100mM, pH 2.5 pendant 5 minutes. Elle est ensuite lavée 2 fois par du PBS 1x, avant de bloquer les sites non spécifiques par 200µl de PBS, 10% SVF pendant 1h. Dans le milieu de blocage est rajouté directement 200 µl de sérum, qui va être incubé avec la membrane pendant la nuit sous rotation à 4°C. La membrane est ensuite lavée 3 fois avec du PBS. L'élution de l'anticorps purifié va se faire en incubant sur la membrane 50µl de glycine 100mM, pH 2.5 pendant 10 minutes à température ambiante, auquel va s'ajouter 10 µl de Tris 1M pH 7.8. Le pH de la solution d'anticorps purifié ainsi obtenu est ensuite vérifié sur une bandelette de pH.

Biotinylation des peptides et contrôle par spectrométrie de masse Seldi-Tof

Seuls les peptides correspondant aux acides aminés 1-20, 23-35, 1-29 K14ac, 1-29 K18ac, 1-29 K23ac et 1-29K27me3 sont à biotinyler, les autres étant achetés déjà biotinylés.

Pour chaque réaction, 3 nmol de peptide est incubé avec 7,2 nmol de réactif EZ-link Biotin-HPDP (Pierce), dans un volume final de 18 µl ajusté avec du PBS-EDTA (20mM Sodium phosphate, 150mM NaCl ; 1mM EDTA ; pH 7,4). Le mélange est incubé 90min à température ambiante.

Afin de contrôler la bonne biotinylation des peptides, chaque peptide biotinylé va être contrôlé par spectrométrie de masse Seldi-Tof (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization). 1 µl à 1 pmol/µl de chaque peptide biotinylé est spoté sur une barrette hydrophobe (H4). Une fois la goutte séchée, le point est lavé 2 fois par 5 µl d'Hepes 1M afin d'éliminer les sels, les détergents et les peptides n'ayant pas interagité avec la surface. La matrice, ou EAM (Energy Absorbing Molecules), est alors appliquée sur chaque spot afin de recouvrir l'échantillon et de permettre sa cristallisation et de faciliter la désorption et

l'ionisation générées par le laser. Ainsi, 0,8 µl de matrice CHCA 20% (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique 20%, soit 50% acétonitrile ; 0,1 % trifluoroacetic acid) est déposée deux fois de suite. La barrette est alors introduite dans un spectromètre de masse Seldi-Tof (PBS II System, Ciphergen) et les résultats sont analysés sur le logiciel *Ciphergen ProteinChip Software*.

Pulldown sur les queues N-terminales des histones

Des billes streptavidine agarose sont incubées avec les peptides biotinylés à 4°C pendant 30 minutes. Les peptides sont alors couplés aux billes via l'interaction biotine-streptavidine. Les billes sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS et une fois avec le tampon de lyse (20% glycérol, 3mM MgCl₂, 150mM KCl, 50 mM Hepes pH 7,9, 0,1% NP 40, cocktail d'antiprotéases Complete (Roche), 0,5mM PMSF) pour éliminer l'excédant de peptides. Les billes couplées aux peptides sont ensuite incubées pendant deux heures à 4°C avec l'extrait cellulaire adéquat (extrait testiculaire ou lysat de réticulocytes). Les complexes de protéines ayant une affinité avec le peptide vont alors se coller aux billes. Celles-ci sont ensuite lavées 3 fois avec 1ml de tampon de lyse, 1 fois avec 1ml de PBS. Les protéines retenues sont éluées dans du tampon Laemli et analysées sur gel SDS-PAGE.

Western Blot

Les extraits protéiques à analyser sont complétés avec du tampon de dénaturation Laemli (50mM Tris pH 6.8, 10%Glycérol, 6% βmercaptoéthanol, 1% SDS, 0,1mg/ml Bleu de Bromophénol), chauffés 3min à 90°C, puis déposés sur gel dénaturant SDS-polyacrylamide. Après migration des protéines par électrophorèse à 150V, dans le tampon d'électrophorèse (3g/L Tris, 14.4g/l Glycine, 0.1% SDS), les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C-extra; Amersham) pendant 1h à 100V dans le tampon de transfert (1.5g/l Tris, 7.2g/l Glycine; 0.05% SDS, 20% Ethanol). Les membranes sont incubées 1h à température ambiante dans du PBS, 5% lait, 0,1% Tween 20. Elles sont ensuite incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué dans le PBS contenant 10% de Sérum de veau fœtal (SVF) et 0,1% de tween 20. Après 3 lavages de 10 min à température ambiante, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, dilué au 1:5000

dans du PBS contenant 0,5% de lait. La détection se fait par chimioluminescence à l'aide du kit ECL+ (Amersham).

Dot Blot

Les sondes d'ADN vont être dénaturée par un chauffage pendant 10 minutes à 100°C. Puis l'incorporation de la radioactivité va se faire par l'incorporation de nucléotides dCTP^{P32}, en suivant les instructions du kit *Random Primed DNA labelling kit (Roche)*. Les dNTP n'ayant pas réagit sont éliminés et la radioactivité de chaque sonde est alors mesurée.

Les membranes sont pré-incubées dans le tampon d'incubation (5x SSC, 0.5 % SDS, 5x Denhardt) additionné de sperme de saumon dénaturé à 10µl/ml pendant 30 minutes à 60°C. Puis la sonde est ajoutée à une concentration de 10⁶ cpm/ml (coups par minute/ml) et incubée avec la membrane pendant la nuit à 60°C. Les membranes sont ensuite lavées par 2 lavages avec 2x SSC, 0.1% SDS pendant 5 minutes à température ambiante, puis par 2 lavages 1x SSC, 0.1% SDS pendant 10 minutes à 37 °C. La radioactivité est alors mesurée par *Phosphorimager* et les données sont analysées par le logiciel *ImagQuant*.

Bibliographie

- Abbott, D.W., M. Laszczak, J.D. Lewis, H. Su, S.C. Moore, M. Hills, S. Dimitrov, and J. Ausio. 2004. Structural characterization of macroH2A containing chromatin. *Biochemistry*. 43:1352-9.
- Adenot, P.G., Y. Mercier, J.P. Renard, and E.M. Thompson. 1997. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development*. 124:4615-25.
- Adham, I.M., K. Nayernia, E. Burkhardt-Gottges, O. Topaloglu, C. Dixkens, A.F. Holstein, and W. Engel. 2001. Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol Hum Reprod*. 7:513-20.
- Adkins, M.W., S.R. Howar, and J.K. Tyler. 2004. Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Mol Cell*. 14:657-66.
- Ajiro, K., H. Yasuda, and H. Tsuji. 1996a. Vanadate triggers the transition from chromosome condensation to decondensation in a mitotic mutant (tsTM13) inactivation of p34cdc2/H1 kinase and dephosphorylation of mitosis-specific histone H3. *Eur J Biochem*. 241:923-30.
- Ajiro, K., K. Yoda, K. Utsumi, and Y. Nishikawa. 1996b. Alteration of cell cycle-dependent histone phosphorylations by okadaic acid. Induction of mitosis-specific H3 phosphorylation and chromatin condensation in mammalian interphase cells. *J Biol Chem*. 271:13197-201.
- Akhmanova, A.S., P.C. Bindels, J. Xu, K. Miedema, H. Kremer, and W. Hennig. 1995. Structure and expression of histone H3.3 genes in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila hydei*. *Genome*. 38:586-600.
- Albig, W., J. Ebentheuer, G. Klobeck, J. Kunz, and D. Doenecke. 1996. A solitary human H3 histone gene on chromosome 1. *Hum Genet*. 97:486-91.
- Alekseev, O.M., D.C. Bencic, R.T. Richardson, E.E. Widgren, and M.G. O'Rand. 2003. Overexpression of the Linker histone-binding protein tNASP affects progression through the cell cycle. *J Biol Chem*. 278:8846-52.
- Alekseev, O.M., E.E. Widgren, R.T. Richardson, and M.G. O'Rand. 2005. Association of NASP with HSP90 in mouse spermatogenic cells: stimulation of ATPase activity and transport of linker histones into nuclei. *J Biol Chem*. 280:2904-11.
- Allegra, P., R. Sterner, D.F. Clayton, and V.G. Allfrey. 1987. Affinity chromatographic purification of nucleosomes containing transcriptionally active DNA sequences. *J Mol Biol*. 196:379-88.

- Allen, J.W., D.J. Dix, B.W. Collins, B.A. Merrick, C. He, J.K. Selkirk, P. Poorman-Allen, M.E. Dresser, and E.M. Eddy. 1996. HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma*. 104:414-21.
- Almouzni, G., and M. Mechali. 1988. Assembly of spaced chromatin involvement of ATP and DNA topoisomerase activity. *Embo J*. 7:4355-65.
- Amor, D.J., P. Kalitsis, H. Sumer, and K.H. Choo. 2004. Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol*. 14:359-68.
- Angelov, D., A. Verdel, W. An, V. Bondarenko, F. Hans, C.M. Doyen, V.M. Studitsky, A. Hamiche, R.G. Roeder, P. Bouvet, and S. Dimitrov. 2004. SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *Embo J*. 23:3815-24.
- Arents, G., R.W. Burlingame, B.C. Wang, W.E. Love, and E.N. Moudrianakis. 1991. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:10148-52.
- Arpanahi, A., M. Brinkworth, D. Iles, S.A. Krawetz, A. Paradowska, A.E. Platts, M. Saida, K. Steger, P. Tedder, and D. Miller. 2009. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res*. 19:1338-49.
- 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.
- Aul, R.B., and R.J. Oko. 2002. The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B. *Dev Biol*. 242:376-87.
- Baarends, W.M., J.W. Hoogerbrugge, H.P. Roest, M. Ooms, J. Vreeburg, J.H. Hoeijmakers, and J.A. Grootegeod. 1999. Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev Biol*. 207:322-33.
- Balhorn, R., L. Brewer, and M. Corzett. 2000. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol Reprod Dev*. 56:230-4.
- Balhorn, R., S. Weston, C. Thomas, and A.J. Wyrobek. 1984. DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Exp Cell Res*. 150:298-308.
- Bao, Y., K. Konesky, Y.J. Park, S. Rosu, P.N. Dyer, D. Rangasamy, D.J. Tremethick, P.J. Laybourn, and K. Luger. 2004. Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *Embo J*. 23:3314-24.
- Bassing, C.H., K.F. Chua, J. Sekiguchi, H. Suh, S.R. Whitlow, J.C. Fleming, B.C. Monroe, D.N. Ciccone, C. Yan, K. Vlasakova, D.M. Livingston, D.O. Ferguson, R. Scully, and F.W. Alt. 2002. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:8173-8.
- Bednar, J., R.A. Horowitz, S.A. Grigoryev, L.M. Carruthers, J.C. Hansen, A.J. Koster, and C.L. Woodcock. 1998. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:14173-8.
- Bell, A.C., and G. Felsenfeld. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature*. 405:482-5.
- Belmont, A.S. 2002. Mitotic chromosome scaffold structure: new approaches to an old controversy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:15855-7.

- Belotserkovskaya, R., S. Oh, V.A. Bondarenko, G. Orphanides, V.M. Studitsky, and D. Reinberg. 2003. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science*. 301:1090-3.
- Berger, S.L. 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 12:142-8.
- Bernstein, B.E., M. Kamal, K. Lindblad-Toh, S. Bekiranov, D.K. Bailey, D.J. Huebert, S. McMahan, E.K. Karlsson, E.J. Kulbokas, 3rd, T.R. Gingeras, S.L. Schreiber, and E.S. Lander. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*. 120:169-81.
- Bianchi, M.E., and A. Agresti. 2005. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev*. 15:496-506.
- Biggiogera, M., S. Muller, J.L. Courtens, S. Fakan, and M.G. Romanini. 1992. Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines in the course of mouse spermiogenesis. *Microsc Res Tech*. 20:259-67.
- Bolzer, A., G. Kreth, I. Solovei, D. Koehler, K. Saracoglu, C. Fauth, S. Muller, R. Eils, C. Cremer, M.R. Speicher, and T. Cremer. 2005. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol*. 3:e157.
- Bonaldi, T., G. Langst, R. Strohner, P.B. Becker, and M.E. Bianchi. 2002. The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *Embo J*. 21:6865-73.
- Bonnefoy, E., G.A. Orsi, P. Couble, and B. Loppin. 2007. The essential role of Drosophila HIRA for de novo assembly of paternal chromatin at fertilization. *PLoS Genet*. 3:1991-2006.
- Bortvin, A., and F. Winston. 1996. Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science*. 272:1473-6.
- Boulard, M., T. Gautier, G.O. Mbele, V. Gerson, A. Hamiche, D. Angelov, P. Bouvet, and S. Dimitrov. 2006. The NH2 tail of the novel histone variant H2BFWT exhibits properties distinct from conventional H2B with respect to the assembly of mitotic chromosomes. *Mol Cell Biol*. 26:1518-26.
- Bourc'his, D., and T.H. Bestor. 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*. 431:96-9.
- Brewer, L., M. Corzett, E.Y. Lau, and R. Balhorn. 2003. Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. *J Biol Chem*. 278:42403-8.
- Briggs, S.D., T. Xiao, Z.W. Sun, J.A. Caldwell, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, C.D. Allis, and B.D. Strahl. 2002. Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature*. 418:498.
- Bruce, K., F.A. Myers, E. Mantouvalou, P. Lefevre, I. Greaves, C. Bonifer, D.J. Tremethick, A.W. Thorne, and C. Crane-Robinson. 2005. The replacement histone H2A.Z in a hyperacetylated form is a feature of active genes in the chicken. *Nucleic Acids Res*. 33:5633-9.
- Burlingame, R.W., W.E. Love, B.C. Wang, R. Hamlin, H.X. Nguyen, and E.N. Moudrianakis. 1985. Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å. *Science*. 228:546-53.
- Burns, K.H., M.M. Viveiros, Y. Ren, P. Wang, F.J. DeMayo, D.E. Frail, J.J. Eppig, and M.M. Matzuk. 2003. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science*. 300:633-6.

- Bustin, M. 2001. Chromatin unfolding and activation by HMGN(*) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci.* 26:431-7.
- Bustin, M., and R. Reeves. 1996. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 54:35-100.
- Calvert, M.E., K.M. Keck, C. Ptak, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and L.F. Pemberton. 2008. Phosphorylation by casein kinase 2 regulates Nap1 localization and function. *Mol Cell Biol.* 28:1313-25.
- Camporeale, G., E.E. Shubert, G. Sarath, R. Cerny, and J. Zemleni. 2004. K8 and K12 are biotinylated in human histone H4. *Eur J Biochem.* 271:2257-63.
- Caron, C., E. Col, and S. Khochbin. 2003. The viral control of cellular acetylation signaling. *Bioessays.* 25:58-65.
- Carrozza, M.J., R.T. Utley, J.L. Workman, and J. Cote. 2003. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* 19:321-9.
- Catena, R., E. Escoffier, C. Caron, S. Khochbin, I. Martianov, and I. Davidson. 2009. HMGB4, a novel member of the HMGB family, is preferentially expressed in the mouse testis and localizes to the basal pole of elongating spermatids. *Biol Reprod.* 80:358-66.
- Catena, R., L. Ronfani, P. Sassone-Corsi, and I. Davidson. 2006. Changes in intranuclear chromatin architecture induce bipolar nuclear localization of histone variant H1T2 in male haploid spermatids. *Dev Biol.* 296:231-238.
- Celeste, A., S. Petersen, P.J. Romanienko, O. Fernandez-Capetillo, H.T. Chen, O.A. Sedelnikova, B. Reina-San-Martin, V. Coppola, E. Meffre, M.J. Difilippantonio, C. Redon, D.R. Pilch, A. Oлару, M. Eckhaus, R.D. Camerini-Otero, L. Tessarollo, F. Livak, K. Manova, W.M. Bonner, M.C. Nussenzweig, and A. Nussenzweig. 2002. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science.* 296:922-7.
- Chadwick, B.P., and H.F. Willard. 2001a. Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant. *Hum Mol Genet.* 10:1101-13.
- Chadwick, B.P., and H.F. Willard. 2001b. A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol.* 152:375-84.
- Chakravarthy, S., S.K. Gundimella, C. Caron, P.Y. Perche, J.R. Pehrson, S. Khochbin, and K. Luger. 2005. Structural characterization of the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol.* 25:7616-24.
- Chang, L., S.S. Loranger, C. Mizzen, S.G. Ernst, C.D. Allis, and A.T. Annunziato. 1997. Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry.* 36:469-80.
- Chang, S.C., T. Tucker, N.P. Thorogood, and C.J. Brown. 2006. Mechanisms of X-chromosome inactivation. *Front Biosci.* 11:852-66.
- Chau, K.Y., A.M. Keane-Myers, M. Fedele, Y. Ikeda, R.J. Creusot, L. Menozzi, D.J. Cousins, G. Manfioletti, L. Feigenbaum, A. Fusco, and S.J. Ono. 2005. IFN-gamma gene expression is controlled by the architectural transcription factor HMGA1. *Int Immunol.* 17:297-306.
- Chedin, F., M.R. Lieber, and C.L. Hsieh. 2002. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:16916-21.

- Chen, H.Y., J.M. Sun, Y. Zhang, J.R. Davie, and M.L. Meistrich. 1998. Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J Biol Chem.* 273:13165-9.
- Chen, Z.X., J.R. Mann, C.L. Hsieh, A.D. Riggs, and F. Chedin. 2005. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J Cell Biochem.* 95:902-17.
- Cho, C., W.D. Willis, E.H. Goulding, H. Jung-Ha, Y.C. Choi, N.B. Hecht, and E.M. Eddy. 2001. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet.* 28:82-6.
- Choo, K.H. 2000. Centromerization. *Trends Cell Biol.* 10:182-8.
- 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.
- Costanzi, C., and J.R. Pehrson. 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature.* 393:599-601.
- Costanzi, C., and J.R. Pehrson. 2001. MACROH2A2, a new member of the MARCOH2A core histone family. *J Biol Chem.* 276:21776-84.
- Costanzi, C., P. Stein, D.M. Worrada, R.M. Schultz, and J.R. Pehrson. 2000. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female preimplantation mouse embryos. *Development.* 127:2283-9.
- Cremer, M., K. Kupper, B. Wagler, L. Wizelman, J. von Hase, Y. Weiland, L. Kreja, J. Diebold, M.R. Speicher, and T. Cremer. 2003. Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol.* 162:809-20.
- Cremer, T., C. Cremer, H. Baumann, E.K. Luedtke, K. Sperling, V. Teuber, and C. Zorn. 1982. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum Genet.* 60:46-56.
- Cui, T., and F. Leng. 2007. Specific recognition of AT-rich DNA sequences by the mammalian high mobility group protein AT-hook 2: a SELEX study. *Biochemistry.* 46:13059-66.
- Das, D., and W.M. Scovell. 2001. The binding interaction of HMG-1 with the TATA-binding protein/TATA complex. *J Biol Chem.* 276:32597-605.
- Dasgupta, A., and W.M. Scovell. 2003. TFIIA abrogates the effects of inhibition by HMGB1 but not E1A during the early stages of assembly of the transcriptional preinitiation complex. *Biochim Biophys Acta.* 1627:101-10.
- de Lange, T. 2002. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene.* 21:532-40.
- De Lucia, F., M.R. Faraone-Mennella, M. D'Erme, P. Quesada, P. Caiafa, and B. Farina. 1994. Histone-induced condensation of rat testis chromatin: testis-specific H1t versus somatic H1 variants. *Biochem Biophys Res Commun.* 198:32-9.
- de Murcia, J.M., C. Niedergang, C. Trucco, M. Ricoul, B. Dutrillaux, M. Mark, F.J. Oliver, M. Masson, A. Dierich, M. LeMeur, C. Walztinger, P. Chambon, and G. de Murcia. 1997. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:7303-7.
- de Ruijter, A.J., A.H. van Gennip, H.N. Caron, S. Kemp, and A.B. van Kuilenburg. 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.* 370:737-49.

- De, S., D.T. Brown, Z.H. Lu, G.H. Leno, S.E. Wellman, and D.B. Sittman. 2002. Histone H1 variants differentially inhibit DNA replication through an affinity for chromatin mediated by their carboxyl-terminal domains. *Gene*. 292:173-81.
- de Wit, E., F. Greil, and B. van Steensel. 2007. High-resolution mapping reveals links of HP1 with active and inactive chromatin components. *PLoS Genet*. 3:e38.
- Delaval, K., J. Govin, F. Cerqueira, S. Rousseaux, S. Khochbin, and R. Feil. 2007. Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *Embo J*. 26:720-9.
- Dilworth, S.M., S.J. Black, and R.A. Laskey. 1987. Two complexes that contain histones are required for nucleosome assembly in vitro: role of nucleoplasmin and N1 in *Xenopus* egg extracts. *Cell*. 51:1009-18.
- Dix, D.J., J.W. Allen, B.W. Collins, C. Mori, N. Nakamura, P. Poorman-Allen, E.H. Goulding, and E.M. Eddy. 1996. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:3264-8.
- Dix, D.J., J.W. Allen, B.W. Collins, P. Poorman-Allen, C. Mori, D.R. Blizard, P.R. Brown, E.H. Goulding, B.D. Strong, and E.M. Eddy. 1997. HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development*. 124:4595-603.
- Doenecke, D., B. Drabent, C. Bode, B. Bramlage, K. Franke, K. Gavenis, U. Kosciessa, and O. Witt. 1997. Histone gene expression and chromatin structure during spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 424:37-48.
- Dorigo, B., T. Schalch, A. Kulangara, S. Duda, R.R. Schroeder, and T.J. Richmond. 2004. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science*. 306:1571-3.
- Downs, J.A., N.F. Lowndes, and S.P. Jackson. 2000. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature*. 408:1001-4.
- Doyen, C.M., F. Montel, T. Gautier, H. Menoni, C. Claudet, M. Delacour-Larose, D. Angelov, A. Hamiche, J. Bednar, C. Faivre-Moskalenko, P. Bouvet, and S. Dimitrov. 2006. Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome. *Embo J*. 25:4234-44.
- Earnshaw, W.C., B.M. Honda, R.A. Laskey, and J.O. Thomas. 1980. Assembly of nucleosomes: the reaction involving *X. laevis* nucleoplasmin. *Cell*. 21:373-83.
- Edwards, C.A., and A.C. Ferguson-Smith. 2007. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol*. 19:281-9.
- Eickbush, T.H., and E.N. Moudrianakis. 1978. The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry*. 17:4955-64.
- Eirin-Lopez, J., and J. Ausio. 2007. H2A.Z-Mediated Genome-Wide Chromatin Specialization. *Curr Genomics*. 8:59-66.
- Eirin-Lopez, J.M., T. Ishibashi, and J. Ausio. 2008. H2A.Bbd: a quickly evolving hypervariable mammalian histone that destabilizes nucleosomes in an acetylation-independent way. *Faseb J*. 22:316-26.
- Ellegren, H. 2002. Dosage compensation: do birds do it as well? *Trends Genet*. 18:25-8.
- Endoh, M., W. Zhu, J. Hasegawa, H. Watanabe, D.K. Kim, M. Aida, N. Inukai, T. Narita, T. Yamada, A. Furuya, H. Sato, Y. Yamaguchi, S.S. Mandal, D. Reinberg, T. Wada, and H. Handa. 2004. Human Spt6 stimulates transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. *Mol Cell Biol*. 24:3324-36.

- Esteller, M. 2007. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 16 Spec No 1:R50-9.
- Fan, J.Y., D. Ranganamy, K. Luger, and D.J. Tremethick. 2004. H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 α -mediated chromatin fiber folding. *Mol Cell.* 16:655-61.
- Fan, Y., T. Nikitina, J. Zhao, T.J. Fleury, R. Bhattacharyya, E.E. Bouhassira, A. Stein, C.L. Woodcock, and A.I. Skoultchi. 2005. Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell.* 123:1199-212.
- Fantz, D.A., W.R. Hatfield, G. Horvath, M.K. Kistler, and W.S. Kistler. 2001. Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis. *Biol Reprod.* 64:425-31.
- Ferguson-Smith, A.C., and M.A. Surani. 2001. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science.* 293:1086-9.
- Fernandez-Capetillo, O., S.K. Mahadevaiah, A. Celeste, P.J. Romanienko, R.D. Camerini-Otero, W.M. Bonner, K. Manova, P. Burgoyne, and A. Nussenzweig. 2003. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell.* 4:497-508.
- Fitzpatrick, G.V., P.D. Soloway, and M.J. Higgins. 2002. Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. *Nat Genet.* 32:426-31.
- Formosa, T., S. Ruone, M.D. Adams, A.E. Olsen, P. Eriksson, Y. Yu, A.R. Rhoades, P.D. Kaufman, and D.J. Stillman. 2002. Defects in SPT16 or POB3 (γ FACT) in *Saccharomyces cerevisiae* cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure. *Genetics.* 162:1557-71.
- Freitas, M.A., A.R. Sklenar, and M.R. Parthun. 2004. Application of mass spectrometry to the identification and quantification of histone post-translational modifications. *J Cell Biochem.* 92:691-700.
- Fu, X.D., and T. Maniatis. 1992. The 35-kDa mammalian splicing factor SC35 mediates specific interactions between U1 and U2 small nuclear ribonucleoprotein particles at the 3' splice site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:1725-9.
- Gambus, A., R.C. Jones, A. Sanchez-Diaz, M. Kanemaki, F. van Deursen, R.D. Edmondson, and K. Labib. 2006. GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol.* 8:358-66.
- Gao, L., M.A. Cueto, F. Asselbergs, and P. Atadja. 2002. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem.* 277:25748-55.
- 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.
- Gatewood, J.M., G.R. Cook, R. Balhorn, E.M. Bradbury, and C.W. Schmid. 1987. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science.* 236:962-4.
- Gatewood, J.M., G.R. Cook, R. Balhorn, C.W. Schmid, and E.M. Bradbury. 1990. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J Biol Chem.* 265:20662-6.
- Gautier, T., D.W. Abbott, A. Molla, A. Verdel, J. Ausio, and S. Dimitrov. 2004. Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep.* 5:715-20.
- Gilbert, N., S. Gilchrist, and W.A. Bickmore. 2005. Chromatin organization in the mammalian nucleus. *Int Rev Cytol.* 242:283-336.

- 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.
- Goll, M.G., and T.H. Bestor. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem.* 74:481-514.
- Goll, M.G., F. Kirpekar, K.A. Maggert, J.A. Yoder, C.L. Hsieh, X. Zhang, K.G. Golic, S.E. Jacobsen, and T.H. Bestor. 2006. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science.* 311:395-8.
- Govin, J., C. Caron, S. Rousseaux, and S. Khochbin. 2005. Testis-specific histone H3 expression in somatic cells. *Trends Biochem Sci.* 30:357-9.
- Govin, J., E. Escoffier, S. Rousseaux, L. Kuhn, M. Ferro, J. Thevenon, R. Catena, I. Davidson, J. Garin, S. Khochbin, and C. Caron. 2007. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol.* 176:283-94.
- Govin, J., C. Lestrat, C. Caron, C. Pivot-Pajot, S. Rousseaux, and S. Khochbin. 2006. Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis. *Ernst Schering Res Found Workshop:*155-72.
- Gowher, H., K. Liebert, A. Hermann, G. Xu, and A. Jeltsch. 2005. Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem.* 280:13341-8.
- Greaves, I.K., D. Rangasamy, M. Devoy, J.A. Marshall Graves, and D.J. Tremethick. 2006. The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z-containing [corrected] facultative heterochromatin [corrected] following meiosis. *Mol Cell Biol.* 26:5394-405.
- Green, E.M., A.J. Antczak, A.O. Bailey, A.A. Franco, K.J. Wu, J.R. Yates, 3rd, and P.D. Kaufman. 2005. Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1. *Curr Biol.* 15:2044-9.
- Grewal, S.I., and S.C. Elgin. 2007. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature.* 447:399-406.
- Grimes, S.R., Jr., M.L. Meistrich, R.D. Platz, and L.S. Hnilica. 1977. Nuclear protein transitions in rat testis spermatids. *Exp Cell Res.* 110:31-9.
- Grimes, S.R., D.C. Wilkerson, K.R. Noss, and S.A. Wolfe. 2003. Transcriptional control of the testis-specific histone H1t gene. *Gene.* 304:13-21.
- Groth, A., A. Corpet, A.J. Cook, D. Roche, J. Bartek, J. Lukas, and G. Almouzni. 2007. Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. *Science.* 318:1928-31.
- Groth, A., D. Ray-Gallet, J.P. Quivy, J. Lukas, J. Bartek, and G. Almouzni. 2005. Human Asf1 regulates the flow of S phase histones during replicational stress. *Mol Cell.* 17:301-11.
- Grunstein, M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 389:349-52.
- Guenther, M.G., S.S. Levine, L.A. Boyer, R. Jaenisch, and R.A. Young. 2007. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell.* 130:77-88.
- Guillemette, B., A.R. Bataille, N. Gevry, M. Adam, M. Blanchette, F. Robert, and L. Gaudreau. 2005. Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol.* 3:e384.
- Gusse, M., and P. Chevaillier. 1980. Electron microscope evidence for the presence of globular structures in different sperm chromatins. *J Cell Biol.* 87:280-4.

- Haaf, T., and D.C. Ward. 1995. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. *Exp Cell Res.* 219:604-11.
- Hake, S.B., B.A. Garcia, E.M. Duncan, M. Kauer, G. Dellaire, J. Shabanowitz, D.P. Bazett-Jones, C.D. Allis, and D.F. Hunt. 2006. Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J Biol Chem.* 281:559-68.
- Hall, I.M., G.D. Shankaranarayana, K. Noma, N. Ayoub, A. Cohen, and S.I. Grewal. 2002. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science.* 297:2232-7.
- Han, J., H. Zhou, Z. Li, R.M. Xu, and Z. Zhang. 2007. The Rtt109-Vps75 histone acetyltransferase complex acetylates non-nucleosomal histone H3. *J Biol Chem.* 282:14158-64.
- Harikrishnan, K.N., M.Z. Chow, E.K. Baker, S. Pal, S. Bassal, D. Brasacchio, L. Wang, J.M. Craig, P.L. Jones, S. Sif, and A. El-Osta. 2005. Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet.* 37:254-64.
- Harrer, M., H. Luhrs, M. Bustin, U. Scheer, and R. Hock. 2004. Dynamic interaction of HMGA1a proteins with chromatin. *J Cell Sci.* 117:3459-71.
- Hassan, Y.I., and J. Zempleni. 2006. Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. *J Nutr.* 136:1763-5.
- Hayashi, K., K. Yoshida, and Y. Matsui. 2005. A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature.* 438:374-8.
- 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.* 79:950-60.
- Henzel, M.J., Y. Wei, M.A. Mancini, A. Van Hooser, T. Ranalli, B.R. Brinkley, D.P. Bazett-Jones, and C.D. Allis. 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.* 106:348-60.
- Hennig, W. 2003. Chromosomal proteins in the spermatogenesis of *Drosophila*. *Chromosoma.* 111:489-94.
- Heun, P., S. Erhardt, M.D. Blower, S. Weiss, A.D. Skora, and G.H. Karpen. 2006. Mislocalization of the *Drosophila* centromere-specific histone CID promotes formation of functional ectopic kinetochores. *Dev Cell.* 10:303-15.
- Howman, E.V., K.J. Fowler, A.J. Newson, S. Redward, A.C. MacDonald, P. Kalitsis, and K.H. Choo. 2000. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:1148-53.
- Hoyer-Fender, S., C. Costanzi, and J.R. Pehrson. 2000a. Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Exp Cell Res.* 258:254-60.
- Hoyer-Fender, S., P.B. Singh, and D. Motzkus. 2000b. The murine heterochromatin protein M31 is associated with the chromocenter in round spermatids and is a component of mature spermatozoa. *Exp Cell Res.* 254:72-9.
- Iguchi, N., H. Tanaka, S. Yamada, H. Nishimura, and Y. Nishimune. 2004. Control of mouse *hils1* gene expression during spermatogenesis: identification of regulatory element by transgenic mouse. *Biol Reprod.* 70:1239-45.
- Iguchi, N., H. Tanaka, K. Yomogida, and Y. Nishimune. 2003. Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *Int J Androl.* 26:354-65.

- Ikura, T., S. Tashiro, A. Kakino, H. Shima, N. Jacob, R. Amunugama, K. Yoder, S. Izumi, I. Kuraoka, K. Tanaka, H. Kimura, M. Ikura, S. Nishikubo, T. Ito, A. Muto, K. Miyagawa, S. Takeda, R. Fishel, K. Igarashi, and K. Kamiya. 2007. DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol.* 27:7028-40.
- Ito, T., M. Bulger, R. Kobayashi, and J.T. Kadonaga. 1996. Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol Cell Biol.* 16:3112-24.
- Jason, L.J., S.C. Moore, J.D. Lewis, G. Lindsey, and J. Ausio. 2002. Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays.* 24:166-74.
- Jayaramaiah Raja, S., and R. Renkawitz-Pohl. 2005. Replacement by Drosophila melanogaster protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. *Mol Cell Biol.* 25:6165-77.
- Jenuwein, T., and C.D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science.* 293:1074-80.
- Jones, P.L., G.J. Veenstra, P.A. Wade, D. Vermaak, S.U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, and A.P. Wolffe. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 19:187-91.
- Kaplan, C.D., L. Laprade, and F. Winston. 2003. Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science.* 301:1096-9.
- Kareta, M.S., Z.M. Botello, J.J. Ennis, C. Chou, and F. Chedin. 2006. Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. *J Biol Chem.* 281:25893-902.
- Kato, Y., M. Kaneda, K. Hata, K. Kumaki, M. Hisano, Y. Kohara, M. Okano, E. Li, M. Nozaki, and H. Sasaki. 2007. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet.* 16:2272-80.
- Khadake, J.R., and M.R. Rao. 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.* 34:15792-801.
- Khochbin, S. 2001. Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene.* 271:1-12.
- Khochbin, S., A. Verdel, C. Lemerrier, and D. Seigneurin-Berny. 2001. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev.* 11:162-6.
- Kleinschmidt, J.A., E. Fortkamp, G. Krohne, H. Zentgraf, and W.W. Franke. 1985. Coexistence of two different types of soluble histone complexes in nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem.* 260:1166-76.
- Kleinschmidt, J.A., A. Seiter, and H. Zentgraf. 1990. Nucleosome assembly in vitro: separate histone transfer and synergistic interaction of native histone complexes purified from nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Embo J.* 9:1309-18.
- Klenova, E.M., H.C. Morse, 3rd, R. Ohlsson, and V.V. Lobanenko. 2002. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol.* 12:399-414.
- Knapp, S., S. Muller, G. Digilio, T. Bonaldi, M.E. Bianchi, and G. Musco. 2004. The long acidic tail of high mobility group box 1 (HMGB1) protein forms an extended and flexible structure that interacts with specific residues within and between the HMG boxes. *Biochemistry.* 43:11992-7.

- Knoepfler, P.S., and R.N. Eisenman. 1999. Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell*. 99:447-50.
- Kobayashi, H., A. Sato, E. Otsu, H. Hiura, C. Tomatsu, T. Utsunomiya, H. Sasaki, N. Yaegashi, and T. Arima. 2007. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet*. 16:2542-51.
- Konev, A.Y., M. Tribus, S.Y. Park, V. Podhraski, C.Y. Lim, A.V. Emelyanov, E. Vershilova, V. Pirrotta, J.T. Kadonaga, A. Lusser, and D.V. Fyodorov. 2007. CHD1 motor protein is required for deposition of histone variant H3.3 into chromatin in vivo. *Science*. 317:1087-90.
- Korber, P., S. Barbaric, T. Luckenbach, A. Schmid, U.J. Schermer, D. Blaschke, and W. Horz. 2006. The histone chaperone Asf1 increases the rate of histone eviction at the yeast PHO5 and PHO8 promoters. *J Biol Chem*. 281:5539-45.
- Kourmouli, N., P. Jeppesen, S. Mahadevhaiah, P. Burgoyne, R. Wu, D.M. Gilbert, S. Bongiorno, G. Prantera, L. Fanti, S. Pimpinelli, W. Shi, R. Fundele, and P.B. Singh. 2004. Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J Cell Sci*. 117:2491-501.
- Krause, C.D., Z.H. Yang, Y.S. Kim, J.H. Lee, J.R. Cook, and S. Pestka. 2007. Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther*. 113:50-87.
- Krishnamoorthy, T., X. Chen, J. Govin, W.L. Cheung, J. Dorsey, K. Schindler, E. Winter, C.D. Allis, V. Guacci, S. Khochbin, M.T. Fuller, and S.L. Berger. 2006. Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev*. 20:2580-92.
- Krogan, N.J., M. Kim, S.H. Ahn, G. Zhong, M.S. Kobor, G. Cagney, A. Emili, A. Shilatifard, S. Buratowski, and J.F. Greenblatt. 2002. RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol Cell Biol*. 22:6979-92.
- Kwon, Y.K., and N.B. Hecht. 1993. Binding of a phosphoprotein to the 3' untranslated region of the mouse protamine 2 mRNA temporally represses its translation. *Mol Cell Biol*. 13:6547-57.
- Landsman, D., and M. Bustin. 1993. A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. *Bioessays*. 15:539-46.
- Larsen, F., G. Gundersen, R. Lopez, and H. Prydz. 1992. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*. 13:1095-107.
- Laskey, R.A., B.M. Honda, A.D. Mills, and J.T. Finch. 1978. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*. 275:416-20.
- Lee, J., K. Inoue, R. Ono, N. Ogonuki, T. Kohda, T. Kaneko-Ishino, A. Ogura, and F. Ishino. 2002. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development*. 129:1807-17.
- Lee, K.B., and J.O. Thomas. 2000. The effect of the acidic tail on the DNA-binding properties of the HMG1,2 class of proteins: insights from tail switching and tail removal. *J Mol Biol*. 304:135-49.
- 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.
- Lepikhov, K., and J. Walter. 2004. Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote. *BMC Dev Biol*. 4:12.

- Levchenko, V., B. Jackson, and V. Jackson. 2005. Histone release during transcription: displacement of the two H2A-H2B dimers in the nucleosome is dependent on different levels of transcription-induced positive stress. *Biochemistry*. 44:5357-72.
- Levchenko, V., and V. Jackson. 2004. Histone release during transcription: NAP1 forms a complex with H2A and H2B and facilitates a topologically dependent release of H3 and H4 from the nucleosome. *Biochemistry*. 43:2359-72.
- 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.
- Li, E., C. Beard, and R. Jaenisch. 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*. 366:362-5.
- Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 69:915-26.
- Li, M., D. Strand, A. Krehan, W. Pyerin, H. Heid, B. Neumann, and B.M. Mechler. 1999. Casein kinase 2 binds and phosphorylates the nucleosome assembly protein-1 (NAP1) in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol*. 293:1067-84.
- Li, Y., C. Lalancette, D. Miller, and S.A. Krawetz. 2008. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J Androl*. 10:535-41.
- Lin, S.P., N. Youngson, S. Takada, H. Seitz, W. Reik, M. Paulsen, J. Cavaille, and A.C. Ferguson-Smith. 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.
- Lippman, Z., A.V. Gendrel, M. Black, M.W. Vaughn, N. Dedhia, W.R. McCombie, K. Lavine, V. Mittal, B. May, K.D. Kasschau, J.C. Carrington, R.W. Doerge, V. Colot, and R. Martienssen. 2004. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*. 430:471-6.
- Litt, M.D., M. Simpson, M. Gaszner, C.D. Allis, and G. Felsenfeld. 2001. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science*. 293:2453-5.
- Liu, L., J.R. Trimarchi, P.J. Smith, and D.L. Keefe. 2002. Mitochondrial dysfunction leads to telomere attrition and genomic instability. *Aging Cell*. 1:40-6.
- Lopes, S., A. Lewis, P. Hajkova, W. Dean, J. Oswald, T. Forne, A. Murrell, M. Constancia, M. Bartolomei, J. Walter, and W. Reik. 2003. Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. *Hum Mol Genet*. 12:295-305.
- Loppin, B., E. Bonnefoy, C. Anselme, A. Laurencon, T.L. Karr, and P. Couble. 2005. The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature*. 437:1386-90.
- Luger, K., A.W. Mader, R.K. Richmond, D.F. Sargent, and T.J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 389:251-60.
- Luk, E., N.D. Vu, K. Patteson, G. Mizuguchi, W.H. Wu, A. Ranjan, J. Backus, S. Sen, M. Lewis, Y. Bai, and C. Wu. 2007. Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. *Mol Cell*. 25:357-68.
- Lusser, A., and J.T. Kadonaga. 2004. Strategies for the reconstitution of chromatin. *Nat Methods*. 1:19-26.

- Mali, P., A. Kaipia, M. Kangasniemi, J. Toppari, M. Sandberg, N.B. Hecht, and M. Parvinen. 1989. Stage-specific expression of nucleoprotein mRNAs during rat and mouse spermiogenesis. *Reprod Fertil Dev.* 1:369-82.
- Malik, H.S., and S. Henikoff. 2003. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol.* 10:882-91.
- Martens, J.H., R.J. O'Sullivan, U. Braunschweig, S. Opravil, M. Radolf, P. Steinlein, and T. Jenuwein. 2005. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *Embo J.* 24:800-12.
- 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, C. Audouard, D. Zink, and P. Debey. 2006. Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development. *Dev Biol.* 292:317-32.
- Martin, C., and Y. Zhang. 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:838-49.
- Mason, P.B., and K. Struhl. 2003. The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo. *Mol Cell Biol.* 23:8323-33.
- McBryant, S.J., Y.J. Park, S.M. Abernathy, P.J. Laybourn, J.K. Nyborg, and K. Luger. 2003. Preferential binding of the histone (H3-H4)₂ tetramer by NAP1 is mediated by the amino-terminal histone tails. *J Biol Chem.* 278:44574-83.
- Meistrich, M.L., L.R. Bucci, P.K. Trostle-Weige, and W.A. Brock. 1985. Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Dev Biol.* 112:230-40.
- Meistrich, M.L., B. Mohapatra, C.R. Shirley, and M. Zhao. 2003. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma.* 111:483-8.
- Mello, J.A., H.H. Sillje, D.M. Roche, D.B. Kirschner, E.A. Nigg, and G. Almouzni. 2002. Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO Rep.* 3:329-34.
- Mermoud, J.E., C. Costanzi, J.R. Pehrson, and N. Brockdorff. 1999. Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation. *J Cell Biol.* 147:1399-408.
- Metzger, E., M. Wissmann, N. Yin, J.M. Muller, R. Schneider, A.H. Peters, T. Gunther, R. Buettner, and R. Schule. 2005. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature.* 437:436-9.
- Mito, Y., J.G. Henikoff, and S. Henikoff. 2005. Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat Genet.* 37:1090-7.
- Mizuguchi, G., X. Shen, J. Landry, W.H. Wu, S. Sen, and C. Wu. 2004. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science.* 303:343-8.
- Moore, S.C., L. Jason, and J. Ausio. 2002. The elusive structural role of ubiquitinated histones. *Biochem Cell Biol.* 80:311-9.
- Morgan, H.D., F. Santos, K. Green, W. Dean, and W. Reik. 2005. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet.* 14 Spec No 1:R47-58.
- Mosammaparast, N., C.S. Ewart, and L.F. Pemberton. 2002. A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *Embo J.* 21:6527-38.

- Munshi, A., G. Shafi, N. Aliya, and A. Jyothy. 2009. Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics*. 36:75-88.
- Narang, M.A., R. Dumas, L.M. Ayer, and R.A. Gravel. 2004. Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase. *Hum Mol Genet*. 13:15-23.
- Ng, H.H., and A. Bird. 1999. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev*. 9:158-63.
- Nourani, A., F. Robert, and F. Winston. 2006. Evidence that Spt2/Sin1, an HMG-like factor, plays roles in transcription elongation, chromatin structure, and genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 26:1496-509.
- Ohsumi, K., and C. Katagiri. 1991. Characterization of the ooplasmic factor inducing decondensation of and protamine removal from toad sperm nuclei: involvement of nucleoplasmin. *Dev Biol*. 148:295-305.
- Okada, Y., G. Scott, M.K. Ray, Y. Mishina, and Y. Zhang. 2007. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature*. 450:119-23.
- Okano, M., D.W. Bell, D.A. Haber, and E. Li. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 99:247-57.
- Okitsu, C.Y., and C.L. Hsieh. 2007. DNA methylation dictates histone H3K4 methylation. *Mol Cell Biol*. 27:2746-57.
- Okuwaki, M., K. Kato, H. Shimahara, S. Tate, and K. Nagata. 2005. Assembly and disassembly of nucleosome core particles containing histone variants by human nucleosome assembly protein I. *Mol Cell Biol*. 25:10639-51.
- Olins, A.L., and D.E. Olins. 1974. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science*. 183:330-2.
- Oliva, R., D. Bazett-Jones, C. Mezquita, and G.H. Dixon. 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*. 262:17016-25.
- Oliva, R., and C. Mezquita. 1986. Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles in vitro. *Biochemistry*. 25:6508-11.
- Orphanides, G., G. LeRoy, C.H. Chang, D.S. Luse, and D. Reinberg. 1998. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell*. 92:105-16.
- Orphanides, G., W.H. Wu, W.S. Lane, M. Hampsey, and D. Reinberg. 1999. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature*. 400:284-8.
- Oudet, P., M. Gross-Bellard, and P. Chambon. 1975. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*. 4:281-300.
- 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.
- Park, Y.J., J.V. Chodaparambil, Y. Bao, S.J. McBryant, and K. Luger. 2005. Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J Biol Chem*. 280:1817-25.
- Parthun, M.R., J. Widom, and D.E. Gottschling. 1996. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell*. 87:85-94.

- Paulson, J.R., and U.K. Laemmli. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*. 12:817-28.
- Pehrson, J.R., C. Costanzi, and C. Dharia. 1997. Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes. *J Cell Biochem*. 65:107-13.
- Pehrson, J.R., and V.A. Fried. 1992. MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science*. 257:1398-400.
- Perche, P.Y., C. Vourc'h, L. Konecny, C. Souchier, M. Robert-Nicoud, S. Dimitrov, and S. Khochbin. 2000. Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density. *Curr Biol*. 10:1531-4.
- Peters, A.H., S. Kubicek, K. Mechtler, R.J. O'Sullivan, A.A. Derijck, L. Perez-Burgos, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Tachibana, Y. Shinkai, J.H. Martens, and T. Jenuwein. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell*. 12:1577-89.
- 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*. 107:323-37.
- Philpott, A., G.H. Leno, and R.A. Laskey. 1991. Sperm decondensation in *Xenopus* egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. *Cell*. 65:569-78.
- Pilch, D.R., O.A. Sedelnikova, C. Redon, A. Celeste, A. Nussenzweig, and W.M. Bonner. 2003. Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol*. 81:123-9.
- Pittoggi, C., L. Renzi, G. Zaccagnini, D. Cimini, F. Degrassi, R. Giordano, A.R. Magnano, R. Lorenzini, P. Lavia, and C. Spadafora. 1999. A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J Cell Sci*. 112 (Pt 20):3537-48.
- 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*. 23:5354-65.
- Plath, K., J. Fang, S.K. Mlynarczyk-Evans, R. Cao, K.A. Worringer, H. Wang, C.C. de la Cruz, A.P. Otte, B. Panning, and Y. Zhang. 2003. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*. 300:131-5.
- Prado, A., I. Ramos, L.J. Frehlick, A. Muga, and J. Ausio. 2004. Nucleoplasmin: a nuclear chaperone. *Biochem Cell Biol*. 82:437-45.
- Prendergast, G.C., and E.B. Ziff. 1991. Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science*. 251:186-9.
- Probst, A.V., F. Santos, W. Reik, G. Almouzni, and W. Dean. 2007. Structural differences in centromeric heterochromatin are spatially reconciled on fertilisation in the mouse zygote. *Chromosoma*. 116:403-15.
- Puschendorf, M., R. Terranova, E. Boutsma, X. Mao, K. Isono, U. Brykczynska, C. Kolb, A.P. Otte, H. Koseki, S.H. Orkin, M. van Lohuizen, and A.H. Peters. 2008. PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. *Nat Genet*. 40:411-20.
- Qian, C., and M.M. Zhou. 2006. SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cell Mol Life Sci*. 63:2755-63.
- Ramesh, S., M.M. Bharath, N.R. Chandra, and M.R. Rao. 2006. A K52Q substitution in the globular domain of histone H1t modulates its nucleosome binding properties. *FEBS Lett*. 580:5999-6006.

- Rao, B.J., S.K. Brahmachari, and M.R. Rao. 1983. Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *J Biol Chem.* 258:13478-85.
- Rasmussen, T.P., T. Huang, M.A. Mastrangelo, J. Loring, B. Panning, and R. Jaenisch. 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.* 27:3685-9.
- Redon, C., D. Pilch, E. Rogakou, O. Sedelnikova, K. Newrock, and W. Bonner. 2002. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev.* 12:162-9.
- Reeves, R., and L. Beckerbauer. 2001. HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta.* 1519:13-29.
- Reik, W., and J. Walter. 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet.* 2:21-32.
- Reinke, H., and W. Horz. 2003. Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol Cell.* 11:1599-607.
- Richardson, R.T., O.M. Alekseev, G. Grossman, E.E. Widgren, R. Thresher, E.J. Wagner, K.D. Sullivan, W.F. Marzluff, and M.G. O'Rand. 2006. Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP), a linker histone chaperone that is required for cell proliferation. *J Biol Chem.* 281:21526-34.
- Richardson, R.T., I.N. Batova, E.E. Widgren, L.X. Zheng, M. Whitfield, W.F. Marzluff, and M.G. O'Rand. 2000. Characterization of the histone H1-binding protein, NASP, as a cell cycle-regulated somatic protein. *J Biol Chem.* 275:30378-86.
- Richler, C., S.K. Dhara, and J. Wahrman. 2000. Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY compartment of mammalian male meiotic nuclei. *Cytogenet Cell Genet.* 89:118-20.
- Richmond, T.J., and C.A. Davey. 2003. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature.* 423:145-50.
- Roberts, C., H.F. Sutherland, H. Farmer, W. Kimber, S. Halford, A. Carey, J.M. Brickman, A. Wynshaw-Boris, and P.J. Scambler. 2002. Targeted mutagenesis of the Hira gene results in gastrulation defects and patterning abnormalities of mesoendodermal derivatives prior to early embryonic lethality. *Mol Cell Biol.* 22:2318-28.
- Robinson, P.J., L. Fairall, V.A. Huynh, and D. Rhodes. 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.* 103:6506-11.
- Robinson, P.J., and D. Rhodes. 2006. Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol.* 16:336-43.
- Rodriguez, P., D. Munroe, D. Prawitt, L.L. Chu, E. Bric, J. Kim, L.H. Reid, C. Davies, H. Nakagama, R. Loebbert, A. Winterpacht, M.J. Petruzzi, M.J. Higgins, N. Nowak, G. Evans, T. Shows, B.E. Weissman, B. Zabel, D.E. Housman, and J. Pelletier. 1997. Functional characterization of human nucleosome assembly protein-2 (NAP1L4) suggests a role as a histone chaperone. *Genomics.* 44:253-65.
- Rodriguez, P., J. Pelletier, G.B. Price, and M. Zannis-Hadjopoulos. 2000. NAP-2: histone chaperone function and phosphorylation state through the cell cycle. *J Mol Biol.* 298:225-38.
- Roest, H.P., J. van Klaveren, J. de Wit, C.G. van Gorp, M.H. Koken, M. Vermey, J.H. van Roijen, J.W. Hoogerbrugge, J.T. Vreeburg, W.M. Baarends, D. Bootsma, J.A. Grootegoed, and J.H. Hoeijmakers. 1996. Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell.* 86:799-810.

- Rogakou, E.P., D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, and W.M. Bonner. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 273:5858-68.
- Rogner, U.C., D.D. Spyropoulos, N. Le Novere, J.P. Changeux, and P. Avner. 2000. Control of neurulation by the nucleosome assembly protein-1-like 2. *Nat Genet.* 25:431-5.
- Rougier, N., D. Bourc'his, D.M. Gomes, A. Niveleau, M. Plachot, A. Paldi, and E. Viegas-Pequignot. 1998. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev.* 12:2108-13.
- Rountree, M.R., K.E. Bachman, and S.B. Baylin. 2000. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet.* 25:269-77.
- Sanematsu, F., Y. Takami, H.K. Barman, T. Fukagawa, T. Ono, K. Shibahara, and T. Nakayama. 2006. Asf1 is required for viability and chromatin assembly during DNA replication in vertebrate cells. *J Biol Chem.* 281:13817-27.
- Sansom, O.J., K. Maddison, and A.R. Clarke. 2007. Mechanisms of disease: methyl-binding domain proteins as potential therapeutic targets in cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 4:305-15.
- Santisteban, M.S., T. Kalashnikova, and M.M. Smith. 2000. Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell.* 103:411-22.
- Santos-Rosa, H., R. Schneider, A.J. Bannister, J. Sherriff, B.E. Bernstein, N.C. Emre, S.L. Schreiber, J. Mellor, and T. Kouzarides. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature.* 419:407-11.
- 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.
- Sarcinella, E., P.C. Zuzarte, P.N. Lau, R. Draker, and P. Cheung. 2007. Monoubiquitylation of H2A.Z distinguishes its association with euchromatin or facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol.* 27:6457-68.
- Sassone-Corsi, P. 2002. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science.* 296:2176-8.
- Schalch, T., S. Duda, D.F. Sargent, and T.J. Richmond. 2005. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature.* 436:138-41.
- Schones, D.E., K. Cui, S. Cuddapah, T.Y. Roh, A. Barski, Z. Wang, G. Wei, and K. Zhao. 2008. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell.* 132:887-98.
- Schotta, G., M. Lachner, K. Sarma, A. Ebert, R. Sengupta, G. Reuter, D. Reinberg, and T. Jenuwein. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 18:1251-62.
- Schreiber, V., F. Dantzer, J.C. Ame, and G. de Murcia. 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:517-28.
- Schultz, N., F.K. Hamra, and D.L. Garbers. 2003. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:12201-6.
- Schwabish, M.A., and K. Struhl. 2004. Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* 24:10111-7.
- Schwabish, M.A., and K. Struhl. 2006. Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell.* 22:415-22.
- Schwartz, B.E., and K. Ahmad. 2005. Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev.* 19:804-14.

- Shang, E., H.D. Nickerson, D. Wen, X. Wang, and D.J. Wolgemuth. 2007. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development*. 134:3507-15.
- Shelby, R.D., O. Vafa, and K.F. Sullivan. 1997. Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *J Cell Biol*. 136:501-13.
- Shen, H.H., A.M. Huang, J. Hoheisel, and S.F. Tsai. 2001. Identification and characterization of a SET/NAP protein encoded by a brain-specific gene, MB20. *Genomics*. 71:21-33.
- Shi, Y., F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J.R. Whetstone, P.A. Cole, R.A. Casero, and Y. Shi. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 119:941-53.
- Shia, W.J., B. Li, and J.L. Workman. 2006. SAS-mediated acetylation of histone H4 Lys 16 is required for H2A.Z incorporation at subtelomeric regions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 20:2507-12.
- Shiio, Y., and R.N. Eisenman. 2003. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:13225-30.
- Shintomi, K., M. Iwabuchi, H. Saeki, K. Ura, T. Kishimoto, and K. Ohsumi. 2005. Nucleosome assembly protein-1 is a linker histone chaperone in *Xenopus* eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:8210-5.
- Shirley, C.R., S. Hayashi, S. Mounsey, R. Yanagimachi, and M.L. Meistrich. 2004. Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol Reprod*. 71:1220-9.
- Singleton, S., O. Mudrak, M. Morshedi, S. Oehninger, I. Zalenskaya, and A. Zalensky. 2007. Characterisation of a human sperm cell subpopulation marked by the presence of the TSH2B histone. *Reprod Fertil Dev*. 19:392-7.
- Smit, A.F., and A.D. Riggs. 1996. Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:1443-8.
- Smith, R.J., W. Dean, G. Konfortova, and G. Kelsey. 2003. Identification of novel imprinted genes in a genome-wide screen for maternal methylation. *Genome Res*. 13:558-69.
- Steger, K., T. Klonisch, K. Gavenis, B. Drabent, D. Doenecke, and M. Bergmann. 1998. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod*. 4:939-45.
- Steger, K., K. Pauls, T. Klonisch, F.E. Franke, and M. Bergmann. 2000. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod*. 6:219-25.
- Stott, K., G.S. Tang, K.B. Lee, and J.O. Thomas. 2006. Structure of a complex of tandem HMG boxes and DNA. *J Mol Biol*. 360:90-104.
- Strahl, B.D., and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403:41-5.
- Stucki, M., J.A. Clapperton, D. Mohammad, M.B. Yaffe, S.J. Smerdon, and S.P. Jackson. 2005. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*. 123:1213-26.
- Suetake, I., F. Shinozaki, J. Miyagawa, H. Takeshima, and S. Tajima. 2004. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem*. 279:27816-23.
- Sullivan, K.F., M. Hechenberger, and K. Masri. 1994. Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J Cell Biol*. 127:581-92.

- Sung, M.T., and G.H. Dixon. 1970. Modification of histones during spermiogenesis in trout: a molecular mechanism for altering histone binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 67:1616-23.
- Tachibana, M., M. Nozaki, N. Takeda, and Y. Shinkai. 2007. Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *Embo J*. 26:3346-59.
- Tachiwana, H., A. Osakabe, H. Kimura, and H. Kurumizaka. 2008. Nucleosome formation with the testis-specific histone H3 variant, H3t, by human nucleosome assembly proteins in vitro. *Nucleic Acids Res*. 36:2208-18.
- Taddei, A., and S.M. Gasser. 2004. Multiple pathways for telomere tethering: functional implications of subnuclear position for heterochromatin formation. *Biochim Biophys Acta*. 1677:120-8.
- Tagami, H., D. Ray-Gallet, G. Almouzni, and Y. Nakatani. 2004. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*. 116:51-61.
- Takami, Y., and T. Nakayama. 2000. N-terminal region, C-terminal region, nuclear export signal, and deacetylation activity of histone deacetylase-3 are essential for the viability of the DT40 chicken B cell line. *J Biol Chem*. 275:16191-201.
- Talasz, H., N. Sapojnikova, W. Helliger, H. Lindner, and B. Puschendorf. 1998. In vitro binding of H1 histone subtypes to nucleosomal organized mouse mammary tumor virus long terminal repeat promoter. *J Biol Chem*. 273:32236-43.
- Tan, B.C., C.T. Chien, S. Hirose, and S.C. Lee. 2006. Functional cooperation between FACT and MCM helicase facilitates initiation of chromatin DNA replication. *Embo J*. 25:3975-85.
- Tanaka, H., N. Iguchi, A. Isotani, K. Kitamura, Y. Toyama, Y. Matsuoka, M. Onishi, K. Masai, M. Maekawa, K. Toshimori, M. Okabe, and Y. Nishimune. 2005. HANP1/HIT2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol*. 25:7107-19.
- Tanemura, K., A. Ogura, C. Cheong, H. Gotoh, K. Matsumoto, E. Sato, Y. Hayashi, H.W. Lee, and T. Kondo. 2005. Dynamic rearrangement of telomeres during spermatogenesis in mice. *Dev Biol*. 281:196-207.
- Tang, Y., M.V. Poustovoitov, K. Zhao, M. Garfinkel, A. Canutescu, R. Dunbrack, P.D. Adams, and R. Marmorstein. 2006. Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. *Nat Struct Mol Biol*. 13:921-9.
- Taverna, S.D., R.S. Coyne, and C.D. Allis. 2002. Methylation of histone h3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in tetrahymena. *Cell*. 110:701-11.
- Thambirajah, A.A., D. Dryhurst, T. Ishibashi, A. Li, A.H. Maffey, and J. Ausio. 2006. H2A.Z stabilizes chromatin in a way that is dependent on core histone acetylation. *J Biol Chem*. 281:20036-44.
- Thomas, J.O. 2001. HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans*. 29:395-401.
- Thomas, J.O., and A.A. Travers. 2001. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci*. 26:167-74.
- Thorvaldsen, J.L., K.L. Duran, and M.S. Bartolomei. 1998. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev*. 12:3693-702.

- Tomonaga, T., K. Matsushita, M. Ishibashi, M. Nezu, H. Shimada, T. Ochiai, K. Yoda, and F. Nomura. 2005. Centromere protein H is up-regulated in primary human colorectal cancer and its overexpression induces aneuploidy. *Cancer Res.* 65:4683-9.
- Tomonaga, T., K. Matsushita, S. Yamaguchi, T. Oohashi, H. Shimada, T. Ochiai, K. Yoda, and F. Nomura. 2003. Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Res.* 63:3511-6.
- Torres-Padilla, M.E., A.J. Bannister, P.J. Hurd, T. Kouzarides, and M. Zernicka-Goetz. 2006. Dynamic distribution of the replacement histone variant H3.3 in the mouse oocyte and preimplantation embryos. *Int J Dev Biol.* 50:455-61.
- Trostle-Weige, P.K., M.L. Meistrich, W.A. Brock, and K. Nishioka. 1984. Isolation and characterization of TH3, a germ cell-specific variant of histone 3 in rat testis. *J Biol Chem.* 259:8769-76.
- Tse, C., T. Sera, A.P. Wolffe, and J.C. Hansen. 1998. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol.* 18:4629-38.
- Tsukada, Y., J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M.E. Warren, C.H. Borchers, P. Tempst, and Y. Zhang. 2006. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature.* 439:811-6.
- Turner, B.M. 2005. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat Struct Mol Biol.* 12:110-2.
- Turner, J.M., P.S. Burgoyne, and P.B. Singh. 2001. M31 and macroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis. *J Cell Sci.* 114:3367-75.
- Tyler, J.K., C.R. Adams, S.R. Chen, R. Kobayashi, R.T. Kamakaka, and J.T. Kadonaga. 1999. The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature.* 402:555-60.
- Ueda, T., H. Chou, T. Kawase, H. Shirakawa, and M. Yoshida. 2004. Acidic C-tail of HMGB1 is required for its target binding to nucleosome linker DNA and transcription stimulation. *Biochemistry.* 43:9901-8.
- Utley, R.T., N. Lacoste, O. Jobin-Robitaille, S. Allard, and J. Cote. 2005. Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4. *Mol Cell Biol.* 25:8179-90.
- van der Heijden, G.W., A.A. Derijck, E. Posfai, M. Giele, P. Pelczar, L. Ramos, D.G. Wansink, J. van der Vlag, A.H. Peters, and P. de Boer. 2007. Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet.* 39:251-8.
- van der Heijden, G.W., A.A. Derijck, L. Ramos, M. Giele, J. van der Vlag, and P. de Boer. 2006. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol.* 298:458-69.
- van der Heijden, G.W., J.W. Dieker, A.A. Derijck, S. Muller, J.H. Berden, D.D. Braat, J. van der Vlag, and P. de Boer. 2005. Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech Dev.* 122:1008-22.
- Verreault, A., P.D. Kaufman, R. Kobayashi, and B. Stillman. 1998. Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr Biol.* 8:96-108.
- Vilkaitis, G., I. Suetake, S. Klimasauskas, and S. Tajima. 2005. Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase. *J Biol Chem.* 280:64-72.

- Volpe, T.A., C. Kidner, I.M. Hall, G. Teng, S.I. Grewal, and R.A. Martienssen. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*. 297:1833-7.
- Wang, G.S., C.J. Hong, T.Y. Yen, H.Y. Huang, Y. Ou, T.N. Huang, W.G. Jung, T.Y. Kuo, M. Sheng, T.F. Wang, and Y.P. Hsueh. 2004. Transcriptional modification by a CASK-interacting nucleosome assembly protein. *Neuron*. 42:113-28.
- Wang, H., W. An, R. Cao, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, B. Chatton, P. Tempst, R.G. Roeder, and Y. Zhang. 2003. mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Mol Cell*. 12:475-87.
- Wang, Z.Q., L. Stingl, C. Morrison, M. Jantsch, M. Los, K. Schulze-Osthoff, and E.F. Wagner. 1997. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev*. 11:2347-58.
- Ward, W.S. 1993. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod*. 48:1193-201.
- Weber, M., I. Hellmann, M.B. Stadler, L. Ramos, S. Paabo, M. Rebhan, and D. Schubeler. 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*. 39:457-66.
- Wei, Y., C.A. Mizzen, R.G. Cook, M.A. Gorovsky, and C.D. Allis. 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*. 95:7480-4.
- Wellman, S.E., Y. Song, and N.M. Mamoon. 1999. Sequence preference of mouse H1(0) and H1t. *Biochemistry*. 38:13112-8.
- Whetstine, J.R., A. Nottke, F. Lan, M. Huarte, S. Smolikov, Z. Chen, E. Spooner, E. Li, G. Zhang, M. Colaiacovo, and Y. Shi. 2006. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*. 125:467-81.
- Whitley, M.Z., D. Thanos, M.A. Read, T. Maniatis, and T. Collins. 1994. A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters. *Mol Cell Biol*. 14:6464-75.
- Wigler, M.H. 1981. The inheritance of methylation patterns in vertebrates. *Cell*. 24:285-6.
- Williams, R.R. 2003. Transcription and the territory: the ins and outs of gene positioning. *Trends Genet*. 19:298-302.
- 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*. 51:157-68.
- Wilson, A.S., B.E. Power, and P.L. Molloy. 2007. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1775:138-62.
- Witt, O., W. Albig, and D. Doenecke. 1996. Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp Cell Res*. 229:301-6.
- Wolffe, A.P., S. Khochbin, and S. Dimitrov. 1997. What do linker histones do in chromatin? *Bioessays*. 19:249-55.
- Wu, C., and A. Travers. 2004. A 'one-pot' assay for the accessibility of DNA in a nucleosome core particle. *Nucleic Acids Res*. 32:e122.
- Wu, F., C. Caron, C. De Robertis, S. Khochbin, and S. Rousseaux. 2008. Testis-specific histone variants H2AL1/2 rapidly disappear from paternal heterochromatin after fertilization. *J Reprod Dev*. 54:413-7.

- Wu, J.Y., T.J. Ribar, D.E. Cummings, K.A. Burton, G.S. McKnight, and A.R. Means. 2000. Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat Genet.* 25:448-52.
- Wu, X.Q., and N.B. Hecht. 2000. Mouse testis brain ribonucleic acid-binding protein/translin colocalizes with microtubules and is immunoprecipitated with messenger ribonucleic acids encoding myelin basic protein, alpha calmodulin kinase II, and protamines 1 and 2. *Biol Reprod.* 62:720-5.
- Wutz, A., O.W. Smrzka, N. Schweifer, K. Schellander, E.F. Wagner, and D.P. Barlow. 1997. Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. *Nature.* 389:745-9.
- Wykes, S.M., and S.A. Krawetz. 2003. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem.* 278:29471-7.
- Yamazaki, Y., M.R. Mann, S.S. Lee, J. Marh, J.R. McCarrey, R. Yanagimachi, and M.S. Bartolomei. 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.* 100:12207-12.
- Yan, W., L. Ma, K.H. Burns, and M.M. Matzuk. 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.* 100:10546-51.
- Yoon, B.J., H. Herman, A. Sikora, L.T. Smith, C. Plass, and P.D. Soloway. 2002. Regulation of DNA methylation of Rasgrf1. *Nat Genet.* 30:92-6.
- Yu, Y.E., Y. Zhang, E. Unni, C.R. Shirley, J.M. Deng, L.D. Russell, M.M. Weil, R.R. Behringer, and M.L. Meistrich. 2000. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:4683-8.
- Yuan, L., J.G. Liu, J. Zhao, E. Brundell, B. Daneholt, and C. Hoog. 2000. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell.* 5:73-83.
- Zalenskaya, I.A., E.M. Bradbury, and A.O. Zalensky. 2000. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun.* 279:213-8.
- 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.
- Zhao, M., C.R. Shirley, S. Hayashi, L. Marcon, B. Mohapatra, R. Sukanuma, R.R. Behringer, G. Boissonneault, R. Yanagimachi, and M.L. Meistrich. 2004. Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis.* 38:200-13.
- Zhao, M., C.R. Shirley, Y.E. Yu, B. Mohapatra, Y. Zhang, E. Unni, J.M. Deng, N.A. Arango, N.H. Terry, M.M. Weil, L.D. Russell, R.R. Behringer, and M.L. Meistrich. 2001. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol.* 21:7243-55.
- Zhou, Y.B., S.E. Gerchman, V. Ramakrishnan, A. Travers, and S. Muyltermans. 1998. Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature.* 395:402-5.
- Zhu, D., D.J. Dix, and E.M. Eddy. 1997. HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development.* 124:3007-14.

Résumé

Au cours de la spermiogenèse, une réorganisation très importante de la chromatine se produit : la quasi-totalité des histones sont progressivement enlevées et remplacées par des protéines de transition puis par des protamines. Mon travail de thèse a alors consisté à caractériser l'organisation finale de cette chromatine dans les spermatozoïdes ainsi que les mécanismes mis en jeu.

Nos résultats montrent pour la première fois l'existence, dans les spermatides condensées de souris, de structures nucléoprotéiques contenant l'histone testiculaire TH2B ainsi que de nouveaux variants d'histones identifiés au laboratoire. De plus, ces structures organisent de manière préférentielle l'hétérochromatine péricentromérique de ces cellules. Cette réorganisation impliquerait la protéine chaperonne NAP1L4, qui pourrait être ciblée sur la chromatine en interagissant avec les queues N-terminales des histones H3.

D'autres régions particulières du génome pourraient être la cible de la réorganisation différentielle de la chromatine par ces structures, permettant de les différencier du reste du génome et constituant ainsi le support d'une information épigénétique mâle transmise lors de la fécondation.

L'analyse des protéines présentes dans les cellules germinales nous a également permis d'identifier deux autres protéines, HMGB4 et FYTTD1, qui ne semblent pas impliqués dans le processus de réorganisation de la chromatine dans les stades tardifs de la spermiogénèse. Néanmoins, le rôle potentiel de FYTTD1 dans le phénomène de maturation des ARN, ces derniers pouvant être un autre support de l'information épigénétique, pourrait s'avérer être un nouveau champ d'investigations très intéressant.

Summary

During spermiogenesis, a dramatic chromatin remodelling occurs: most of the histones are replaced by small basic proteins, called transition proteins which in turn are replaced by protamines. The focus of my thesis is the characterisation of the final chromatin organization in condensed spermatids and the mechanisms driving it.

Our results show for the first time the presence of new DNA packaging structures in condensed spermatids, containing the testis specific histone variant TH2B and new histone variants identified in our laboratory. Furthermore, these new structures are specifically present in the region of pericentric heterochromatin in these cells. This reorganization seems to imply the NAP1L4 chaperone, which could be targeted to chromatin by interacting with H3 histone tails.

Proteomic analysis of germinal cells allowed us to identify two other proteins, FYTTD1 and HMGB4, which don't seem to be implicated in chromatin remodelling during the late steps of spermiogenesis. Nevertheless, FYTTD1 seems to be involved in RNA processing. Since RNA could be another support for epigenetic information, the characterization of the exact role of this protein will be an exciting challenge for the future.